



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización y desarrollo de ozenoxacino: una quinolona no fluorada

Cristina Tarragó i Asamara



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina

**Departament d'Anatomia Patològica,
Farmacologia i Microbiologia.**

PROGRAMA 2003-2005 (Microbiologia Mèdica)

**“Caracterización y desarrollo de ozenoxacino:
una quinolona no fluorada”**

**Proyecto de Tesis Doctoral para optar al
grado de Doctor en Biología**

**Presentada por: Cristina Tarragó i Asamara
Bajo la Tutoría del Dr. Jordi Vila Estapé
Bajo la Dirección del Dr. Domingo Gargallo**



Jordi Vila Estapé, Catedrático del Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia de la Universitat de Barcelona i Cap del Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic de Barcelona

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “Caracterización y desarrollo de ozenoxacino: una quinolona no fluorada”, presentado por Cristina Tarragó i Asamara, ha sido realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo del Grupo Ferrer bajo su tutoría y cumple todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa delante del tribunal correspondiente.

Firmado: Dr. Jordi Vila Estapé
Tutor de la tesis doctoral

Barcelona, Septiembre del 2011

AGRADECIMIENTOS

Finalment ha arribat el moment, i un del llocs, per agrair a totes aquelles persones que m'heu ajudat en aquest projecte de tesi doctoral. Voldria, a l'escriure aquestes lletres, ser capaç de recollir i expressar el meu agraïment envers totes les persones que heu estat aprop, acompanyant-me i ajudant-me (no m'oblido de l'aguantant-me). Agrair a les que sempre hi sou, fent o no soroll, però sense les que res seria igual. Voldria, també, recordar a totes les que, des d'una mica més lluny, heu tingut sempre les paraules adequades i m'heu transmès ànims incansables.

Vull agrair, en primer lloc, tant al Grupo Ferrer, per la possibilitat de fer aquesta tesi doctoral, com al Dr. Jordi Vila, per la seva direcció i ajuda. Jordi, ha estat un honor per a mi que una persona com tu, amb la teva trajectòria, bagatge i obligacions professionals hagi volgut recolzar-me en aquesta aventura. Parlar de quinolones i resistències bacterianes amb un dels experts, a nivell nacional i internacional, ha estat un privilegi i un plaer que no oblidaré, tot i que competirà sempre amb el record de la teva categoria personal, que en cap moment es queda enrera. Voldria mencionar aquí a tots els altres organitzadors, ponents, col.laboradors i participants del curs de resistències bacterianes de Mallorca (2003), que crec que són responsables de l'inici d'aquest projecte.

Vull agrair sincerament al Dr. Domingo Gargallo l'haver acceptat la direcció d'aquest projecte, en els últims mesos, i la teva disponibilitat;, i, molt especialment, vull destacar i agrair el suport i la confiança que m'ha transmès el Sr. Jordi Ramentol, Director General del Grupo Ferrer, per a la realització d'aquesta tesi doctoral.

I a la Marta i al Jose, vull agrair-vos moltíssim la vostra ajuda, vareu ser els primers en animar-me a fer la tesi, i, increïblement incombustibles heu estat aquí fins al final. I a l'Andrés, mil gràcies per l'ajuda i el suport, per ser-hi sempre, i sobretot, per la generositat docent dels teus inescrutables coneixements en investigació i en el sector farmacèutic. No em vull oblidar del vostre sentit de l'humor, que tantes bones estones ens ha fet passar, gràcies, perquè un trosset d'això és degut a vosaltres, a la vostra confiança i sobretot, al vostre exemple, com a persones i com a professionals. Teresa i Laurence, gràcies per l'amistat, el suport, deixeu-me repetir "bones estones" que continuen, i sobretot pel vostre esperit crític i constructiu. Gràcies pels ànims, també, a altres bons amics com l'Olga, en Xavi, la Maita, la Pili, en Carlos, l'Ana, en José Luís, la Ma Carme, les Susanes y la Carmen.

I la família, haureu vist que us he mencionat al principi, i hi torno al final. Gràcies als pares pel carinyo, la companyia i l'exemple en la responsabilitat i el treball. Gràcies al Carlos, al Pau i al Guillem, per ser-hi, per l'ajuda i, sobretot, per la infinita paciència, dia rere dia; us conec, i sé que al llegir això direu que no és veritat, per portar-me la contrària, però no em convencereu. Gràcies per haver conviscut amb la tesi com si fos una més de la família. I també a l'Anna Maria, perquè gràcies a tu, els que et coneixem, sabem que és possible arribar a tot el que un

considera que val la pena, o si més no, intentar-ho. Amb una inesgotable capacitat d'ajudar i un pou sense fons d'idees, no deixes mai que ens adormim ni ens sentim sols, i gràcies al teu equip de tres, en Josep Maria, la Laura i la Xènia, que segueixen els teus passos, cadascú amb el seu estil. Tinc la immensa sort de tenir una gran família a qui agrair un munt de coses, i m'agradaria que aquí hi sortissiu tots: Ma Rosa, Vicens i Beth, Joan i Pilar, Alba, Anna, Joan, Xavi i Teresa, i els que, com en una teranyina, gens perillosa, hi heu anat entrant i sortint: en Joan, Paulina i Antonio i tots els "Mañés" (aquí, la n és impressionant), l'Andreu, en Sergi, l'Agus i en Ramy, l'Abril, l'Aleix, la Noa,...gràcies.

ÍNDICE

INDICE	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	16
I.1. Quinolonas, características e historia.....	18
I.1.1. Estructura básica de las quinolonas.....	19
I.1.2. Relación estructura-actividad.....	21
I.1.3. Clasificación química vs biológica.....	24
I.2. Mecanismo de acción.....	26
I.2.1. Moléculas diana.....	26
I.2.1.1. ADN girasa.....	27
I.2.1.2. Topoisomerasa IV.....	28
I.2.2. Modelo de acción/interacción.....	29
I.2.3. Actividad bactericida de las quinolonas.....	31
I.2.4. Efecto paradójico de las quinolonas.....	33
I.3. Mecanismo de resistencia.....	33
I.3.1. Mutaciones cromosómicas.....	34
I.3.1.1. Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas diana.....	34
I.3.1.1.1. ADN girasa.....	35
I.3.1.1.1.a Gen <i>gyrA</i>	35
I.3.1.1.1.b Gen <i>gyrB</i>	36
I.3.1.1.2. Topoisomerasa IV.....	36
I.3.1.1.2.a. Gen <i>parC</i>	36
I.3.1.1.2.b. Gen <i>parE</i>	37
I.3.1.2. Mutaciones en los genes que provocan una reducción en la acumulación intracelular.....	37
I.3.1.2.1. Sistemas de expulsión activa.....	37
I.3.1.2.2. Alteración de las porinas.....	41
I.3.2. Mutaciones en genes plasmídicos asociados con resistencia a las quinolonas.....	42
I.3.2.1. Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos y relacionados con las proteínas diana (Qnr).....	42
I.3.2.2. Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos y relacionados con modificación de las quinolonas (<i>aac(6')-ib-cr</i>).....	42
I.3.2.3. Plásmidos transportadores de genes que codifican para bombas de flujo (<i>qepA</i>).....	43
I.3.3. Alteración de la expresión de las proteínas dianas.....	44
I.3.4. Mecanismos de transferencia de la resistencia.....	44
I.3.5. Resistencia cruzada o resistencia disociada entre quinolonas.....	44
I.4. Aplicaciones terapéuticas de las quinolonas.....	46
I.4.1. Infecciones del tracto urinario.....	46
I.4.2. Enfermedades de transmisión sexual (ETS).....	47
I.4.3. Infecciones gastrointestinales.....	47
I.4.4. Infecciones respiratorias.....	48
I.4.5. Infecciones osteoarticulares.....	49
I.4.6. Infecciones de la piel y estructuras relacionadas (SSSIS).....	49
I.4.7. Infecciones intraabdominales y pélvicas.....	51
I.4.8. Infecciones del sistema nervioso central.....	52
I.4.9. Endocarditis.....	52
I.4.10. Infecciones oculares y otorrinolaringológicas.....	53
I.4.11. Septicemias e Infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCIs).....	54
I.4.12. Otros usos.....	55
I.4.12.1. Quinolonas en pediatría.....	55
I.4.12.2. Quinolonas en la tercera edad.....	57
I.4.12.3. Quinolonas en veterinaria.....	58
I.5. Efectos adversos, interacciones y recomendaciones de uso de las quinolonas.....	59
I.5.1. Efectos adversos.....	59
I.5.2. Interacciones.....	61
I.5.3. Recomendaciones de uso de las quinolonas.....	63
I.6. Epidemiología e incremento de las resistencias bacterianas en clínica.....	65
I.6.1 Nuevos tratamientos & enfoque al tratamiento de las uSSSIs.....	69
I.7. Ozenoxacino.....	71
I.7.1. Nomenclatura.....	71
I.7.2. Estructura.....	71
I.7.3. Características físico-químicas.....	71
I.7.4. Características enfocadas al desarrollo.....	71

ÍNDICE	Página
I.8. Bibliografía.....	72
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	92
II.1. Hipótesis de trabajo	94
II.2. Objetivo general.....	94
II.3. Objetivos específicos.....	94
CAPÍTULO III. PERFIL DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE OZENOXACINO	96
III.1 Materiales y métodos.....	98
III.1.1. Microorganismos.....	100
III.1.1.1. Estudio EM-1.....	102
III.1.1.2. Estudio EM-2.....	102
III.1.1.3. Estudio EM-3.....	104
III.1.1.4. Estudio EM-4.....	104
III.1.2. Productos.....	105
III.1.3. Determinación de la actividad de ozenoxacino y los productos comparativos (concentraciones mínimas inhibitorias).....	107
III.1.3.1. Determinación de las CMI – Estudio EM-1.....	107
III.1.3.2. Determinación de las CMI – Estudio EM-2.....	108
III.1.3.3. Determinación de las CMI – Estudio EM-3.....	108
III.1.3.4. Determinación de las CMI – Estudio EM-4.....	108
III.2. Resultados	110
III.2.1. Resultados del Estudio EM-1.....	112
III.2.2. Resultados del Estudio EM-2.....	115
III.2.3. Resultados del Estudio EM-3.....	134
III.2.4. Resultados del Estudio EM-4.....	203
III.2.5. Resultados comparativos actividad de ozenoxacino entre las cepas de patógenos Gram-positivos de infecciones de piel de los estudios EM-1, EM-2 Y EM-3... ..	207
III.3. Discusión	209
III.3.1. Gram-positivos, <i>Staphylococcus</i> spp.....	212
III.3.2. Gram-positivos, <i>Streptococcus</i> spp (y <i>Enterococcus</i> spp).....	214
III.3.3. Gram-positivos, <i>Propionibacterium acnes</i> y <i>Corynebacterium</i> spp.....	216
III.3.4. Gram-negativos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i>	217
III.3.5. Gram-negativos, Enterobacterias	217
III.3.6. Otras especies: <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i> y <i>H. pylori</i>	218
III.3.7. Bacterias anaerobias: <i>B. fragilis</i> , <i>C. difficile</i> y <i>C. perfringens</i>	219
III.3.8. Patógenos atípicos: <i>C. trachomatis</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>L. pneumoniae</i> y <i>M. tuberculosis</i>	220
III.3.9. Comparación actividad de ozenoxacino frente a patógenos gram-positivos en SSSIs, en los diferentes estudios: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>S. pyogenes</i>	220
II.3.10 . Actividad global comparativa a quinolonas.....	222
III.4. Bibliografía.....	224
CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD BACTERICIDA Y PERFIL EN CURVAS DE LETALIDAD.....	232
IV.1. Materiales y métodos.....	234
IV.1.1. Determinación de la ratio CMB/CMI. Determinación concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB)	236
IV.1.1.1. Microorganismos.....	236
IV.1.1.2. Productos.....	236
IV.1.1.3. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).....	237
IV.1.1.4. Determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB)...	237
IV.1.1.5. Cálculo de la ratio CMB/CMI.....	237
IV.1.2. Determinación de la actividad bactericida de ozenoxacino mediante curvas de letalidad.....	237
IV.1.2.1. Cepas.....	237
IV.1.2.2. Productos.....	238
IV.1.2.3. Medio de cultivo.....	238
IV.1.2.4. Método de determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).....	238
IV.1.2.5. Método de determinación de velocidad de curvas de letalidad bacteriana.....	238
IV.2. Resultados.....	240
IV.2.1. Determinación de las CMI, CMB y ratio CMB/CMI.....	242

ÍNDICE	Página
IV.2.2. Curvas de letalidad.....	245
IV. 2.2.1. Determinación de las CMI:.....	245
VI. 2.2.2. Curvas de letalidad:.....	245
IV.3. Discusión	252
IV.4. Bibliografía	258
CAPÍTULO V. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN.....	262
V.1. Materiales y métodos.....	264
V.1.1. Actividad frente a cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a otras quinolonas.....	266
V.1.1.1. Microorganismos	266
V.1.1.2. Productos	266
V.1.1.3. Método	267
V.1.2. Influencia de las bombas de flujo en la actividad frente a cepas de <i>S. aureus</i>	267
V.1.2.1. Microorganismos	267
V.1.2.2. Productos	267
V.1.2.3. Método	267
V.1.3. Generación cepas con sensibilidad reducida a ozenoxacino.....	267
V.1.3.1. Método determinación de la frecuencia de aparición de mutantes espontáneos con sensibilidad reducida a ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino.....	267
V.1.3.1.1. Microorganismos	267
V.1.3.1.2. Productos.....	267
V.1.3.1.3. Método	267
V.1.3.2. Desarrollo <i>in vitro</i> de mutantes resistentes de <i>S. aureus</i> tras pases sucesivos con quinolonas (ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino) y caracterización genética de las cepas.....	268
V.1.3.2.1. Microorganismos	268
V.1.3.2.2. Productos.....	268
V.1.3.2.3. Método	268
V.1.3.3. Análisis de los mecanismos de resistencia en las cepas mutantes resistentes a quinolonas de <i>S. aureus</i> seleccionadas <i>in vitro</i>	268
V.1.3.3.1. Caracterización genética de las cepas resistentes	268
V.1.3.3.2. Influencia de las bombas de flujo en la resistencia de las cepas seleccionadas	269
V.2. Resultados.....	270
V.2.1. Actividad frente a cepas de <i>S. aureus</i> con mutaciones en QRDR (resistentes a otras quinolonas).....	272
V.2.1.1. Cepas de <i>S. aureus</i> - Ensayo ER-1	272
V.2.1.2. Cepas de <i>S. aureus</i> – Ensayo ER-2.....	273
V.2.2. Influencia de las bombas de flujo en la actividad de ozenoxacino.....	273
V.2.3. Generación de cepas con sensibilidad reducida a ozenoxacino.....	274
V.2.3.1. Resultados de mutantes espontáneos / determinación de la frecuencia de mutación.....	274
V.2.3.2. Resultados de selección de cepas resistentes tras pases sucesivos con ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino.....	274
V.2.3.3. Resultados de la caracterización genética de los mutantes resistentes seleccionados.....	277
V.2.3.4. Resultados estudio de la influencia de las bombas de flujo en los mutantes resistentes seleccionados.....	278
V.3. Discusión.....	280
V.4. Bibliografía.....	286
CAPÍTULO VI. EFICACIA <i>IN VIVO</i> DE OZENOXACINO.....	292
VI.1. Materiales y métodos.....	294
V.1.. Modelo de infección dérmica por <i>S. aureus</i> en roedores, protocolo general.....	296
VI.1.1.1. Animales.....	296
VI.1.1. 2. Microorganismo o cepa infectante.....	296
VI.1.1.3. Tratamientos.....	296
VI.1.1.4. Medios de cultivo.....	297
VI.1.1.5. Modelo o protocolo general.....	297
VI.1.2. Estudio EV-1.....	299
VI.1.3. Estudio EV-2	300
VI.1.4. Estudio EV-3	300
VI.1.5. Estudio EV-4	301

ÍNDICE	Página
VI.1.6. Estudio EV-5	302
VI.1.7. Estudio EV-6	302
VI.1.8. Estudio EV-7	303
VI.1.9. Estudio EV-8.....	303
VI.1.10. Estudio EV-9	303
VI.2. Resultados.....	304
VI.2.1. Resultados estudio EV-1.....	306
VI.2.2. Resultados estudio EV-2.....	308
VI.2.3. Resultados estudio EV-3.....	310
VI.2.4. Resultados estudio EV-4.....	312
VI.2.5. Resultados estudio EV-5.....	314
VI.2.6. Resultados estudio EV-6.....	317
VI.2.7. Resultados estudio EV-7.....	319
VI.2.8. Resultados estudio EV-8.....	321
VI.2.9. Resultados estudio EV-9.....	323
VI.2.10. Resultados conjuntos estudios EV-1 - EV-9.....	325
VI.3. Discusión.....	330
VI.4. Bibliografía.....	336
CAPÍTULO VII. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE OZENOXACINO	340
VII.1. Materiales y métodos.....	342
VII.1.1. Absorción <i>in vitro</i>	344
VII.1.1.1. Célula de Franz	344
VII.1.2. Absorción <i>in vivo</i>	345
VII.1.2.1. Rata.....	345
VII.1.2.1.1. Rata ensayo EV-2.....	345
VII.1.2.1.2. Rata estudio EA-1.....	346
VII.1.2.2. <i>Minipig</i>	346
VII.1.2.2.1. Pomada estudio EA-3.....	346
VII.1.2.2.2. Crema y pomada estudio EA-4.....	347
VII.1.3. Absorción en humanos.....	347
VII.1.3.1. Estudio EC-1: dosis única ascendente pomada de ozenoxacino al 1%.....	347
VII.1.3.2. Estudios de dosis repetida.....	348
VII.1.3.2.1 Estudio EC-2 pomada.....	348
VII.1.3.2.2. Estudio EC-3 crema.....	350
VII.2. Resultados.....	352
VII.2.1. Absorción <i>in vitro</i>	354
VII.2.1.1. Célula de Franz	354
VII.2.2. Absorción <i>in vivo</i>	354
VII.2.2.1. Rata	354
VII.2.2.1.1. Rata ensayo EV-2.....	354
VII.2.2.1.2. Rata estudio EA-1.....	354
VII.2.2.2. <i>Minipig</i>	355
VII.2.2.2.1. <i>Minipig</i> pomada estudio EA-3.....	355
VII.2.2.2.2. <i>Minipig</i> pomada y crema, estudio EA-4.....	356
VII.2.2. Absorción en humanos.....	358
VII.2.2.1. Dosis única ascendente pomada. Estudio EC-1.....	358
VII.2.2.2. Dosis repetida.....	358
VII.2.2.2.1. Dosis repetida pomada. Estudio EC-2.....	358
VII.2.2.2.2. Dosis repetida crema. Estudio EC-3.....	359
VII.3. Discusión.....	360
VII.3.1. Absorción <i>in vitro</i> en modelo de piel humana extirpada.....	362
VII.3.2. Absorción <i>in vivo</i>	362
VII.3.2. Absorción en humanos.....	363
VII.4. Bibliografía.....	366
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES.....	372

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

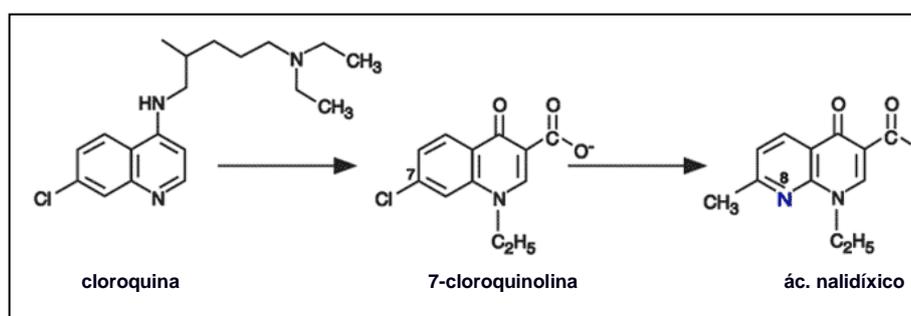
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. QUINOLONAS, CARACTERÍSTICAS E HISTORIA

Las quinolonas han sido centro de considerable interés científico y clínico desde su descubrimiento en los años 60, y, uno de los grupos de antimicrobianos de mayor desarrollo. Como fármacos, poseen muchas características para ser los antibióticos ideales: combinan una alta potencia, un amplio espectro de actividad, una buena biodisponibilidad, formulaciones orales y endovenosas, elevados niveles en suero, un amplio volumen de distribución con una excelente llegada a tejidos, y, un perfil discreto de efectos secundarios (Hu, 2003). Desde entonces y hasta nuestros días, se ha realizado mucha investigación para conseguir potenciar y optimizar estas características.

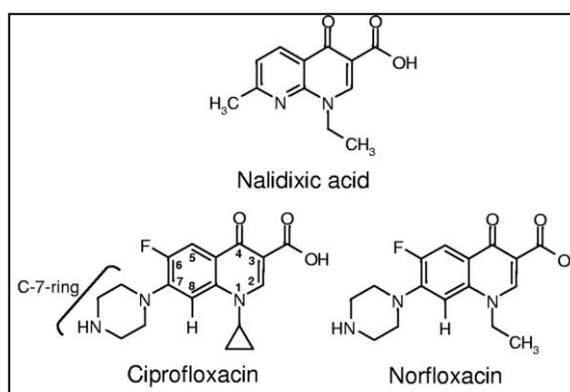
Leshner, en 1962, durante el proceso de purificación de la cloroquina descubrió de modo fortuito el ácido nalidíxico, la primera quinolona comercializada, aunque se tardó más de una década en tener disponibles para su uso clínico a otros compuestos, como flumequino, norfloxacin y enoxacin. La indicación principal para los primeros productos de esta familia fue el tratamiento de las infecciones urinarias.

Figura I.1: Estructuras desde la cloroquina al ác. nalidíxico



A finales de la década de los 80 nuevos y más potentes compuestos, como ciprofloxacino y ofloxacino, llegaron al mercado, y se abrieron nuevas indicaciones como el tratamiento de las infecciones respiratorias.

Figura I.2: Primeras quinolonas



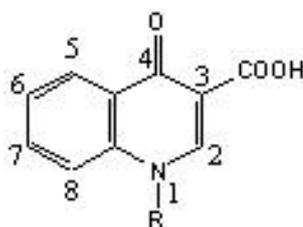
La plasticidad del grupo químico central ha permitido la síntesis y ensayo de miles de moléculas distintas, hasta llegar a unas 10.000 moléculas patentadas, y muchas de ellas desarrolladas. La optimización de las diferentes series químicas de quinolonas se ha llevado a cabo desde el punto de vista de la potencia, la farmacocinética y la farmacodinamia, los efectos secundarios, y, finalmente las indicaciones y su uso clínico (Fábrega, 2009).

I.1.1. Estructura básica de las quinolonas

A partir del ácido nalidíxico, surgió un conjunto de compuestos análogos con actividad antibacteriana, llamados quinolonas, 4-quinolonas, carboxiquinolonas o ácidos quinolona carboxílico (Drlica, 1997, Hooper, 1995, Wolfson, 1989).

Desde el punto de vista estructural, las quinolonas son unos heterociclos con una estructura central bicíclica (figura I.3). El grupo del ácido carboxílico en la posición 3 y del carbonilo en la posición 4 parecen ser esenciales para la actividad de las quinolonas. De manera adicional, los grupos sustituyentes en las posiciones 1 y 7 u 8 (en una cara del núcleo bicíclico) parecen tener un rol relevante en la ampliación del espectro antibacteriano. La relación entre la estructura química y la actividad biológica (relación estructura-actividad, SAR, siglas en inglés) de estas moléculas ha motivado la síntesis de compuestos con distintos radicales (Chu, 1996, Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

Figura I.3. Farmacóforo

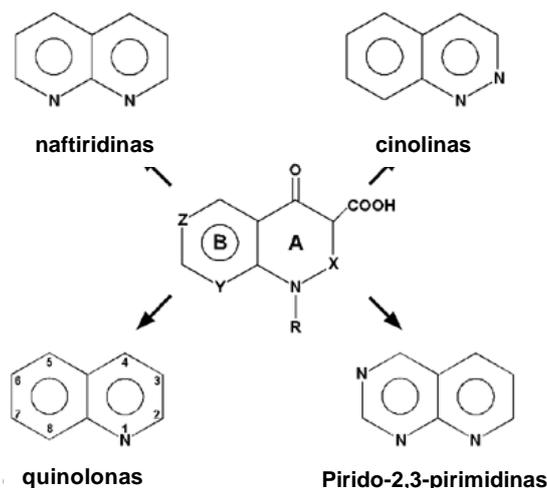


Los estudios químicos revelan que resulta esencial el N-1 del anillo de piridona en la actividad de la molécula, no pudiendo ser reemplazado; mientras que el C-2 admite pocas variaciones. El C-3 sólo puede ser reemplazado por un anillo tiazolidona fusionado con el C-2; mientras que se tiene poca información sobre variaciones en C-4 (Chu, 1988). El otro componente de la molécula es generalmente un anillo aromático (o farmacóforo) con diferentes sustituyentes y que le confiere las características farmacológicas y farmacocinéticas (Tálens, 2002).

Desde el punto de vista químico, las quinolonas se engloban en 4 grupos (figura I.4):

- a- 4-oxo-naftiridinas ó 4-naftiridonas
- b- 4-oxo-cinolininas ó 4-cinolonas
- c- 4-oxo-quinolininas ó 4-quinolonas
- d- 4-oxo-piridopirimidinas ó 4-piridopirimidinas ó 4-pirimidonas

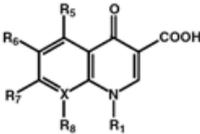
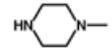
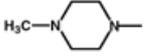
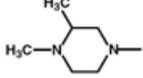
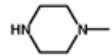
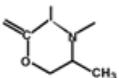
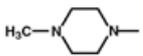
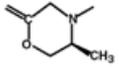
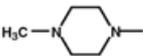
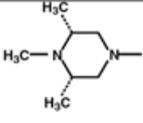
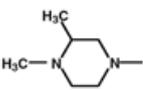
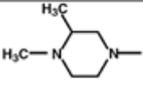
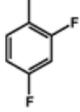
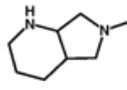
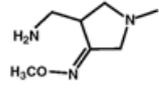
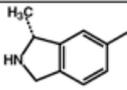
Figura I.4. Estructura básica de las naftiridinas, cinolininas, quinolonas y pirido-2,3-pirimidinas



De estos grupos, solo las 4-quinolonas y las 4-naftiridonas han aportado moléculas activas, ya que la presencia de un nitrógeno en posición 2 ó en 6, reducen considerablemente su eficacia (Gutiérrez-Zufiarra, 2004). Del núcleo central de la molécula de quinolona, el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, derivan las quinolonas fluoradas y no fluoradas (Wolfson, 1989).

Las *piperazinyl-based* quinolonas normalmente poseen un amplio rango de cobertura de Gram-negativos y un limitado espectro en Gram-positivos (como ciprofloxacino y levofloxacino). Por otro lado, *piperidinyl-* y *pyrrolidinyl-based* quinolonas poseen un espectro mucho más balanceado o equilibrado entre Gram-positivos y Gram-negativos (gemifloxacino) (Van Bambeke, 2005).

Fig I.5: Farmacóforo y estructuras de las principales quinolonas que se han aprobado para su uso en humanos (tomado de Van Bambeke, 2005).

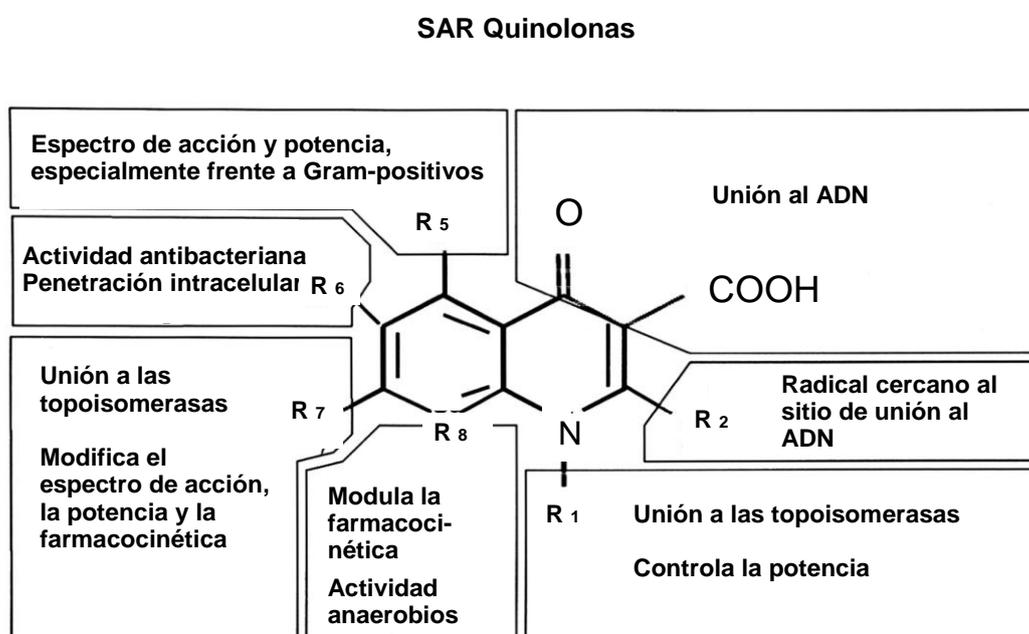
							
generation	drug [orig. ref./patent]]	X	R ₈	R ₁	R ₅	R ₆	R ₇
1	nalidixic acid [283;284]	N		-CH ₂ -CH ₃	H	H	-CH ₃
2a	norfloxacin [285-287]	C	H	-CH ₂ -CH ₃	H	F	
	pefloxacin [288;289]	C	H	-CH ₂ -CH ₃	H	F	
	lomefloxacin [290;291]	C	F	-CH ₂ -CH ₃	H	F	
	ciprofloxacino [292-294]	C	H		H	F	
	ofloxacin [295;296]				H	F	
levofloxacino [297;298]				H	F		
2b	<i>sparfloxacin</i> [299;300]	C	F		-NH ₂	F	
	<i>grepafloxacin</i> [301;302]	C	H		-CH ₃	F	
3a	gatifloxacino [303;304]	C	-O-CH ₃		H	F	
	<i>trovafloxacin</i> [305;306]	N			H	F	
	moxifloxacino [307;308]	C	-O-CH ₃		H	F	
3b	gemifloxacino [309;310]	N			H	F	
4	garenoxacin [311;312]	C	-O-CHF ₂		H	H	

I.1.2. Relación Estructura-Actividad

Además del núcleo central típico de la quinolona, son claves los radicales periféricos de la molécula que modulan la actividad antibacteriana global, así como, la relación espacial. Los distintos sustituyentes pueden influenciar algunos parámetros relevantes para la actividad de la molécula, ya sea su afinidad a las dianas, su espectro de acción, su farmacocinética, o su penetración intracelular. Aunque algunas propiedades antibacterianas se pueden asociar con algunos de los radicales, la molécula actúa en conjunto, y los diversos radicales variables pueden actuar de forma positiva o negativa entre sí (Chu, 1996, Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

Las sustituciones en las distintas posiciones se pueden clasificar en constantes, habituales y variables. Las constantes (posiciones 3 y 4), son las que definen al grupo; las habituales (posiciones 2 y 6) son en las que las opciones de cambio son escasas, en ambos casos es un nitrógeno o un carbono unido a un átomo o radical muy pequeño. Las sustituciones variables (posiciones 1, 5, 7 y 8) son aquellas en las que las posibilidades de sustitución han sido mayores, sobretodo en la 7. Las que afectan a la posición N1 y la 7 son esenciales, por su función en la unión de las quinolonas con las topoisomerasas, mientras que las del carbono 5 y del átomo en 8 son, aunque importantes, accesorias (Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

Figura I.6: Esquema de la relación entre la estructura y la actividad de las quinolonas (SAR)



Posición 1. Las sustituciones en la valencia libre del nitrógeno de la posición 1 son variables, pero esenciales, en la actividad antimicrobiana y en las características farmacocinéticas, y controlan la interferencia con la teofilina. Forma parte del complejo ADN-enzima (Llorente, 1996).

En esta posición se encuentran, básicamente, tres radicales distintos. Las primeras quinolonas presentaban un grupo etilo (ácido nalidíxico, norfloxacin, lomefloxacin). Posteriormente, se añadieron grupos más voluminosos que mejoraron la actividad antibacteriana, tanto frente a Gram-negativos como Gram-positivos (Chu, 1989, Gutiérrez-Zufiarra, 2004, Peterson, 2001). La sustitución con un grupo ciclopropilo mejoró la actividad frente a Gram-negativos, y es el que presentan la mayor parte de las quinolonas (ciprofloxacin, esparfloxacin, grepafloxacin, gemifloxacin, sitafloxacin y ozenoxacin), ya que se considera que proporciona la mayor potencia a la molécula (Appelbaum, 2000, Peterson, 2001). El tercer radical es un 2,4-difluorofenilo (tosfloxacin, trovafloxacin o temafloxacin), aumenta la actividad frente a bacterias Gram-positivas, como *S. pneumoniae*, y es relevante para el efecto post-antibiótico y

bactericida (Chu, 1989, Gutiérrez-Zufiarra, 2004, Peterson, 2001). Otros radicales en esta posición parecen dar lugar a un descenso de la actividad de la molécula, probablemente por un menor número de enlaces entre la molécula y el enzima (Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

Posición 2. Esta posición está muy ligada al lugar de unión del ADN, y cerca del de las topoisomerasas, y se supone que debe ser un radical de pequeño volumen, para no inhibir el acceso al lugar de unión de la molécula con el ADN (Domagala, 1994). Se han probado un carbono unido a un hidrógeno, un nitrógeno o un átomo de azufre, siendo la mejor la primera de estas sustituciones, que además presentan la totalidad de las quinolonas. En cinoxacino se colocó un nitrógeno en 2, pero no se consiguió mayor actividad (Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

Posición 3 y 4. Las ocupan un grupo carboxilo y un grupo ceto, respectivamente. Estos dos sustituyentes son fijos para todas las quinolonas, y son indispensables para que la molécula se pueda unir al ADN, fijando el complejo Quinolona-Enzima diana-ADN, y bloqueando la acción de las topoisomerasas. Sin estos substituyentes la molécula no tendría actividad. Se considera que son posiciones esenciales también para el transporte al interior de la bacteria, y se unen al calcio, magnesio y hierro, pudiendo determinar una disminución en su absorción (Domagala, 1994, Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

Está descrita la síntesis de quinolonas no activas tras realizar modificaciones significativas del grupo carboxilo, pero que de manera excepcional, pueden recuperar la actividad si, *in vivo*, este radical es capaz de volver a convertirse en carboxilo (Chu, 1989, Higgins, 2003).

Para la posición 4, fija y no muy explorada, se ha reemplazado el grupo ceto por otros radicales y el resultado han sido moléculas inactivas o muy débilmente activas (Basuri, 2009).

Posición 5. Es una sustitución importante ya que parece que modifica la configuración estérica de la molécula, afectando a su actividad, aunque está muy influenciada por las otras posiciones ya que la mayoría de las moléculas presentan un hidrógeno, en esta posición (Llorente, 1996, Gutiérrez-Zufiarra, 2004). Parece controlar la actividad de la molécula y su espectro de acción (Appelbaum, 2000).

De mayor a menor actividad, la presencia de un grupo amino (esparfloxacino), hidroxilo o metilo (grepafloxacino) incrementa la actividad frente a Gram-positivos, y no en Gram-negativos (Andersson, 2003, Domagala, 1994, Yoshida, 1996); mientras que radicales voluminosos (grupo metoxi o átomo halógeno) disminuyen notablemente la actividad intrínseca de la molécula (Domagala, 1994), posiblemente por las interacciones entre las posiciones 3 y 4. La mayoría de las quinolonas presentan un hidrogeno en esta posición (Andersson, 2003, Gutiérrez-Zufiarra, 2004, Peterson, 2001).

Los efectos adversos de esparfloxacino (grupo amino en 5) y de grepafloxacino (grupo metilo en 5) se han asociado con el radical en esta posición (Higgins, 2003).

Posición 6. En esta posición puede existir un nitrógeno que no admite sustitución, o un carbono, que permite la introducción de otro radical que debe ser pequeño. La adición de un grupo flúor en esta posición mejoró la actividad intrínseca de la molécula (de 5 a 100 veces), y la penetración (de 1 a 70 veces) (Basuri, 2011) y ha dado lugar a las llamadas fluoroquinolonas. En un principio se relacionaba la posesión de este átomo de flúor con la mayor actividad de la molécula (Chu, 1989, Roychoudhury, 2002) y con una mayor penetración de la molécula al interior celular. Se están desarrollando un nuevo grupo de quinolonas, las des(6)fluoroquinolonas (Ledoussal, 1999), cuyo principal representante es el garenoxacino, (otras como ozenoxacino, nemonoxacino y PGE 9262932), que presentan un hidrógeno en esta posición. Estas nuevas quinolonas mantienen o mejoran poco su actividad frente a bacterias Gram-negativas, y aumentan mucho su actividad frente a patógenos Gram-positivos, incluso resistentes a quinolonas, anaerobios, atípicos y patógenos intracelulares (Jones, 2001, Roychoudhury, 2002).

Existen otras moléculas, como las 6-amino 8-metilquinolonas que aumentan su actividad frente a gram-positivos (Cecchetti, 1996).

Posición 7. Las modificaciones en esta posición, al igual que en la 1, son variables pero esenciales, ya que participan en la unión de la quinolona a la topoisomerasa. Su influencia directa es en la actividad y espectro de acción, además de en la solubilidad, en la farmacocinética, especialmente en la vida media, y, en algunas interacciones (Chu, 1989).

La información disponible indica, que las quinolonas con sustituyentes pequeños o lineales en esta posición (H, Cl, CH₃, NH₂CH₂CH₂NH₂) muestran poca actividad bactericida (Gutiérrez-Zufiarrá, 2004).

Básicamente, se considera que los grupos heterocíclicos nitrogenados de 5 (aminopirrolidinas) o 6 (piperazinas) átomos de carbono se corresponden con una mayor actividad antimicrobiana. En función del radical, la mejor actividad se produce frente a Gram-negativos (piperazina, 6 átomos), o frente a Gram-positivos (aminopirrolidina, 5 átomos) (Peterson, 2001). Aunque, metil-derivados (CH₃-) de ambos grupos, las aminopirrolidinas (esparfloxacino, grepafloxacino, o levofloxacino) o las piperazinas (gatifloxacino), también muestran una gran mejora en la actividad frente a Gram-positivos, la solubilidad y la vida media de los compuestos (Perry, 1999, Peterson, 2001, Piddock, 1998).

Otra de las modificaciones es la presencia de un segundo anillo fusionado a la pirrolidona (moxifloxacino, trovafloxacino) que potencia la actividad sobre Gram-positivos (Appelbaum, 2000, Gutiérrez-Zufiarrá, 2004, Higgins, 2003, Peterson, 2001).

El gemifloxacino, presenta un 3-aminometil y una 4-metiloximopirrolidina, la presencia del grupo metilo, como se ha mencionado, aumenta la actividad frente a Gram-positivos, aunque la disminuye frente a Gram-negativos (Davies, 2000).

Se asocia la presencia de un radical voluminoso en esta posición, con la protección de la molécula frente a mecanismos de expulsión activa, posiblemente como resultado de un aumento de hidrofobicidad de la molécula, además de que disminuye la probabilidad de selección de mutaciones en las bacterias, que confieran resistencia a estos compuestos (Davies, 2000, Gutiérrez-Zufiarrá, 2004, Pestova, 2000, Peterson, 2001).

Posición 8. Las sustituciones en este radical van a dar lugar a cambios en la estructura tridimensional de las moléculas y esto puede implicar un cambio en la afinidad de la quinolona por una u otra topoisomerasa. Los diferentes radicales en 8 van a afectar, también, su actividad frente a anaerobios, la farmacocinética, la fototoxicidad y la genotoxicidad, ya que se relaciona con la mutagenicidad de la molécula (Appelbaum, 2000, Higgins, 2003).

En la posición 8 puede existir un carbono (4-quinolonas) o un nitrógeno (4-naftiridonas), no pudiendo, en este último caso, añadir radicales (Higgins, 2003), aunque las moléculas poseen una buena actividad (Chu, 1989). En este grupo se encuentra gemifloxacino y trovafloxacino. En cambio, entre las moléculas derivadas de las 4-quinolonas, se pueden encontrar un radical halógeno (cloro o flúor) como sería el caso del clinafloxacino o esparfloxacino, que presentan un gran aumento de actividad frente a anaerobios (Appelbaum, 2000). También se sustituye por un grupo metoxi (moxifloxacino y gatifloxacino) o metilo, obteniendo también moléculas con actividad mejorada frente a bacterias Gram-positivas y anaerobios, incluso resistentes a las anteriores fluoroquinolonas, y con mejor actividad frente a *E. coli* y *M. tuberculosis*, una posible explicación podría ser una actividad dual sobre las dos dianas (Gutiérrez-Zufiarrá, 2004, Peterson, 2001). Se ha descrito que si se acompaña de un radical voluminoso en la posición 7, se previene la aparición de cepas resistentes en *S. aureus* (Jorgensen, 1999). Son radicales habituales el hidrógeno o un nitrógeno integrado en el ciclo de las naftiridonas.

En resumen, se puede concretar que un ciclopropilo en la posición 1 y un metilo o metoxi en 8, o, la presencia de un nitrógeno en 8, son los mejores sustituyentes, y posiblemente, sean responsables del aumento de afinidad frente a las dos dianas, aunque a expensas de los radicales presentes en otras posiciones. Las variaciones en 7 son importantes para la actividad, especialmente con radicales voluminosos, disminuyendo, también, la probabilidad de selección de cepas resistentes o de ser susceptibles de ser expulsadas, por bombas de flujo, al exterior de la bacteria. Finalmente, el cambio del carbono entre el C4 y el C5 por un nitrógeno (2-pirrolidonas), la adición de un metilo en la posición 5 y el cambio del flúor en la posición 6

por un hidrógeno (desfluoroquinolonas) o por un grupo amino parecen ser eficaces (Gutiérrez-Zufiarra, 2004).

I.1.3. Clasificación Química vs Biológica

Las quinolonas se pueden clasificar en función de su fecha de llegada al mercado, en función de su estructura química, o en función de su actividad y características farmacocinéticas, que de hecho, siguen un orden cronológico. El espectro de actividad de las quinolonas ha ido cambiando, en paralelo a las modificaciones químicas, desde de la primera estructura, el ácido nalidíxico (Fábrega, 2009).

Las quinolonas se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química en cuatro grupos: monocíclicas, bicíclicas, tricíclicas y tetracíclicas, y, cada grupo se puede subdividir en función de si posee o no, un átomo de flúor en la posición 6.

Por otro lado, en 1997, se propuso la clasificación biológica, que se ha ido ampliando con nuevas moléculas; éstas se agrupan por generaciones, en función de su época de aparición, estructura química y, especialmente, del espectro bacteriano y uso clínico. La clasificación biológica reconoce cuatro grupos: la primera y segunda generación son compuestos que poseen un espectro bacteriano limitado (Enterobacterias, básicamente), mientras que las generaciones tres y cuatro poseen un espectro ampliado. En las generaciones dos y cuatro se incluyen los compuestos que se metabolizan en menos de un 5%, y en la uno y la tres, el resto (Bryskier, 1995, Naber, 1998).

Hay moléculas que se agrupan en una generación u otra dependiendo del autor (Ball, 2000b, King, 2000, Naber, 1998), dentro de las cuatro generaciones descritas hasta el momento y en función de matices de su valoración.

Figura I.7. Generaciones de las quinolonas (tomado de Pharmacology, Finkel, R., Alexia, M. y cols. Lippincott Williams & Wilkins, Ed., 2008).

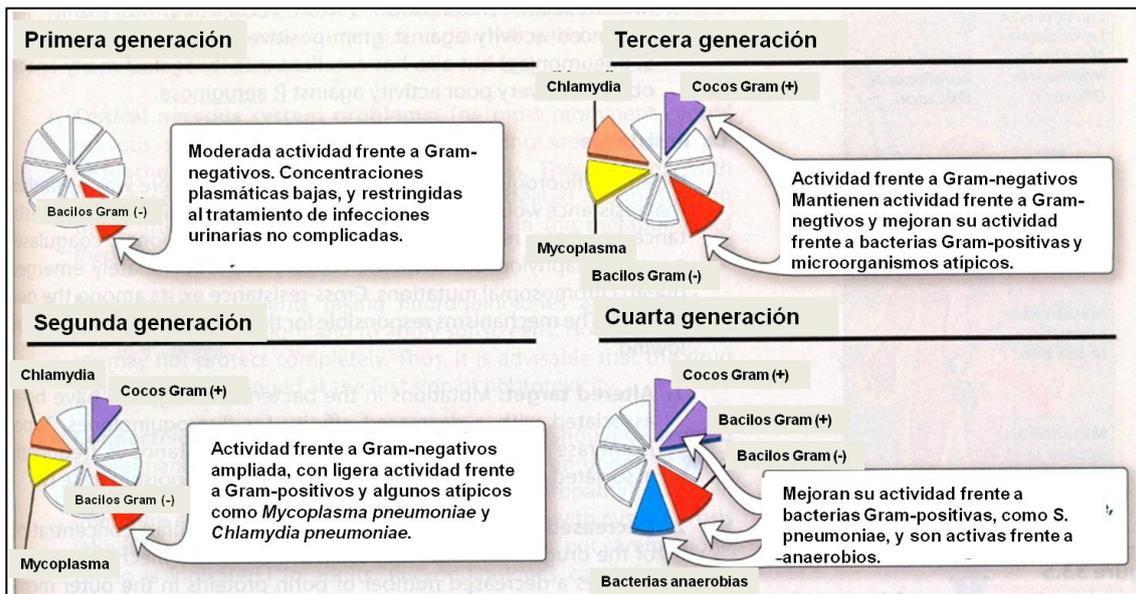


Tabla I.1 Clasificación Biológica de las Quinolonas				
Generación	Quinolona	Espectro Microbiológico	Vía de administración	Indicaciones
PRIMERA	Ac. nalidíxico	Gram-negativos (<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>) excepto <i>Pseudomonas</i> *	oral	Infecciones urinarias no complicadas
	Cinoxacino			
	Ac. oxolónico			
	Ac. pipemídico			
	Ac. piromídico			
	Rosoxacino Flumequino			
SEGUNDA	Norfloxacino	El mismo que la primera, añadiendo <i>P. aeruginosa</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> (incluyendo MR), <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , micobacterias y atípicos	Orales todas, y algunas parenterales y tópicas (ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino), nadifloxacino tópica	Urinarias complicadas y no complicadas, gastroenteritis, osteomielitis, ETS, Infecciones respiratorias de las vías altas, infecciones de piel y estructuras asociadas
	Ciprofloxacino			
	Ofloxacino			
	Enoxacino			
	Pefloxacino			
	Lomefloxacino			
	Tosufloxacino Nadifloxacino			
TERCERA	Levofloxacino	Similar a la segunda, expandiéndose a Gram-positivos como <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> PS y PR, y atípicos	Todas orales, levofloxacino parenteral. Buena distribución en órganos. Buena absorción gastrointestinal	Además de las de la segunda generación, otras RTIs (bronquitis crónica, neumonías hospitalarias y de la comunidad), sepsis bacteriana
	Sparfloxacino			
	Grepafloxacino			
	Tosufloxacino			
	Temafloxacino			
CUARTA	Trovafoxacino	Similar a la tercera, expandiéndose a bacterias anaerobias (<i>Clostridium</i> spp, <i>Bacteroides</i> spp...)	Orales y parenterales todas (sitafoxacino sólo parenteral, besifloxacino tópica)	Se añaden, infecciones mixtas (abdominales, ginecológicas, pélvicas), especial énfasis en las infecciones respiratorias, Se eliminan las urinarias
	Moxifloxacino			
	Gemifloxacino			
	Gatifloxacino			
	Pazufloxacino			
	Sitafoxacino			
	Clinafloxacino Besifloxacino			
NUEVAS en desarrollo	Garenoxacino	Similar a la cuarta, pero con mayor potencia frente a Gram-positivos, anaerobios y atípicos	Pendientes: Orales,tópicas, parenterales	Pendientes y variadas: infecciones respiratorias, infecciones de piel
	Ozenoxacino			
	Nemonoxacino			
	Delafloxacino			
	Zabofloxacin			

En resumen, las fluoroquinolonas se consideran una clase importante de antibióticos de amplio espectro, que ha evolucionado en paralelo a modificaciones de la estructura desde la primera quinolona, el ácido nalidíxico (Fàbrega, 2009). El ácido nalidíxico, que se considera de la primera generación de quinolonas, se introdujo en la práctica clínica en 1962 (Leshner, 1962) y se administró inicialmente para tratar infecciones del tracto urinario causadas por bacterias Gram-negativas, tanto en humanos como en animales (Suh, 1995).

A continuación, la estructura molecular de las quinolonas se modificó para mejorar sus propiedades antimicrobianas y su perfil farmacocinético (Ball, 1998, Kim, 2001). La segunda generación de quinolonas se inició con las fluoroquinolonas que se obtuvieron por fluorización de la molécula de quinolona en la posición 6. La primera fluoroquinolona, norfloxacino, se sintetizó en 1978 y llegó a clínica en 1987. Las fluoroquinolonas son activas frente a un amplio

rango de patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, y muestran una mejorada absorción oral y distribución sistémica. De esta manera, las aplicaciones clínicas de estos compuestos se han extendido al tratamiento de infecciones del tracto respiratorio inferior, a las de la piel y estructuras relacionadas, infecciones de transmisión sexual y del tracto urinario (Chu, 2005). Sin embargo, esta segunda generación de quinolonas poseía una actividad limitada frente a un número de patógenos Gram-positivos y anaerobios, clínicamente relevantes (Ball, 1998 y 2000b, Zhanel, 2002).

Desde el año 1987, variaciones estructurales sobre las fluoroquinolonas han originado numerosos compuestos con espectro ligeramente modificado. En la tercera generación de quinolonas, se han desarrollado fluoroquinolonas más potentes, el principal exponente es levofloxacin (Barret, 2000, Perry, 1999) con una actividad bactericida optimizada frente a bacterias Gram-positivas.

La cuarta generación de quinolonas, con moxifloxacin y gemifloxacin (Lowe, 2000) ha demostrado una buena actividad frente a cocos Gram-positivos y una actividad relevante, también, frente a bacterias anaerobias (Bhavnani, 2000, Kim, 2001).

Hace unos años, con la aparición en desarrollo clínico de un grupo de moléculas sin flúor en la posición 6, parecía que se iban a diferenciar, sustancialmente, de la cuarta generación, como para crear una quinta. No ha sucedido así, y las moléculas como garenoxacin, ozenoxacin, nemonoxacin, u otras fluoradas como delafloxacin o zabofloxacin, se siguen incluyendo en la cuarta generación.

I.2. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de las quinolonas se basa principalmente en la formación de complejos ternarios con el ADN y las topoisomerasas de tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV), enzimas que poseen una función relevante en la topología del ADN (Hooper, 2002, Wigley 1995).

La acumulación intracelular de las quinolonas es imprescindible para poder ejercer su acción antibacteriana. El mecanismo utilizado por las quinolonas para penetrar en el citoplasma bacteriano es la difusión pasiva a través de los canales acuosos de las porinas, o bien, de la capa de los lipopolisacáridos (Pidcock, 1999). Una vez dentro de la célula, actúan por mecanismos que son complejos y no del todo conocidos.

I.2.1. Moléculas Diana

Las quinolonas inhiben la síntesis de ADN uniéndose a dos topoisomerasas de tipo II, esenciales en el proceso de replicación del ADN, son la ADN Girasa y la Topoisomerasa IV (Topo IV). Ambas enzimas permiten que una cadena de ADN simple pase a través de la otra, seguido de una religación a la cadena original, cambiando, por tanto, dos uniones del ADN en cada paso enzimático. Aunque ambas enzimas muestran un elevado grado de similitud en sus estructuras y funciones, durante la replicación del ADN, su función específica es diferente (Figura I.8) (Fàbrega, 2009, Levine, 1998).

Se han identificado cuatro tipos de topoisomerasas de *Escherichia coli*, I, II, III y IV. Las topoisomerasas son un grupo de enzimas necesarias para la viabilidad de todos los organismos, desde las bacterias hasta el hombre, ya que controlan y modifican el estado topológico del ADN mediante rupturas transitorias y posterior unión del mismo (Wang, 1971). Para muchas topoisomerasas, un residuo específico de tirosina forma una unión covalente reversible con el extremo 5', o, menos frecuentemente, con el extremo 3' del ADN. Se dividen en dos clases dependiendo de si actúan en una hélice del ADN (tipo I), o en ambas (tipo II) (Mizuuchi, 1980).

En cualquier caso, se cree que las quinolonas utilizan un mecanismo de puente enzimático, en el cual se forma un corte transitorio en una cadena de ADN, de tal forma que se abre un hueco

entre las partes rotas que permite el paso de una segunda cadena de ADN o un segmento de doble cadena. Las topoisomerasas I y III son enzimas tipo I, mientras que girasa y topoisomerasa IV son enzimas de tipo II. En concreto, las topoisomerasas I, II y IV están implicadas en la eficacia de la replicación y transcripción del ADN (Dinardo, 1992) pero, mientras las topoisomerasas del tipo II son esenciales para el crecimiento bacteriano, las topoisomerasas de tipo I no lo son, puesto que su pérdida puede compensarse por alteración en los genes de las topoisomerasas del tipo II (Dinardo, 1992). Conviene matizar que en las células de los mamíferos, las topoisomerasas I y III α , que pertenecen a la familia tipo I, sí resultan esenciales para el crecimiento y división celular *in vivo* (Morham, 1996).

De manera resumida, las funciones de las cuatro topoisomerasas son:

a) Topoisomerasa I. El gen que codifica esta enzima se denominó *topA* (Trucksis, 1981, Tse-Dinh, 1986, Wang, 1971), y, entre otras funciones, relaja el ADN superenrollado en ausencia de ATP.

b) Topoisomerasa II (ADN girasa), es la única enzima entre las topoisomerasas capaz de producir el superenrollamiento negativo del ADN relajado en una reacción dependiente de ATP (Gellert, 1976).

Las bacterias confrontan un gran problema topológico ya que en su mayoría miden 2 μm de longitud por 1 μm de ancho, teniendo que contener en su interior un DNA de doble cadena de 1.300 μm de longitud; las topoisomerasas de tipo II son responsables del enrollamiento del DNA, manteniendo al cromosoma en un estado de superespiral y fijándolo a la superficie interna de la célula. También se encargan de la reparación de pequeñas roturas del filamento de DNA que ocurren durante la replicación.

c) Topoisomerasa III. Es una cadena polipeptídica, codificada por el gen *topB*, que provoca la decatenación del ADN en ausencia de ATP (Srivenugopal, 1984). Se ha observado que esta enzima puede actuar como ARN topoisomerasa, jugando un papel importante en la topología molecular del ARN (Dean, 1992, DiGate, 1992, Wang, 1996).

d) Topoisomerasa IV (Kato, 1990) provoca la decatenación del ADN en presencia de ATP.

1.2.1.1. ADN girasa

La enzima ADN girasa (Drlica 1980, Engle 1982, Gellert, 1976), como se ha mencionado, pertenece al grupo de las II topoisomerasas y es necesaria para la replicación del ADN, y también para ciertos aspectos de la transcripción, reparación, recombinación y trasposición del ADN.

La ADN girasa es una diana excelente para las quinolonas ya que no está presente en eucariotas, y es esencial para el crecimiento bacteriano. Este enzima es una proteína heterotetramérica que contiene dos subunidades A (97 KDa) y dos subunidades B (90 KDa), quienes forman el tetrámero A₂B₂ (Higgins, 1978, Kevan, 1980, Liu, 1978b). Los genes *gyrA* y *gyrB* codifican para estas dos proteínas.

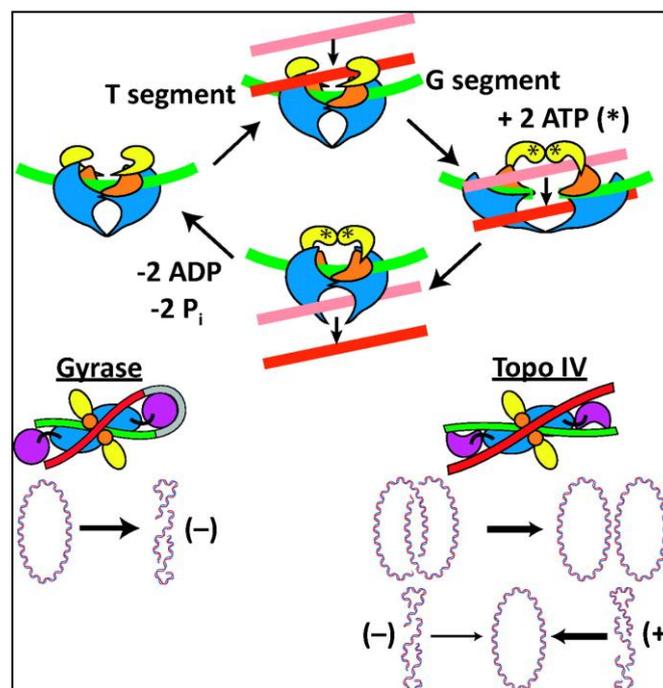
La ADN girasa utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para introducir superenrollamientos negativos en el ADN circular de la bacteria (Corbett, 2004, Champoux, 2001, Gellert, 1976), con el objetivo principal de facilitar la separación de la doble hélice de ADN para mantener la estructura de la horquilla de replicación (Drlica, 1999).

Esta actividad superenrolladora unidireccional es causada por la envuelta/recubrimiento quiral (*chiral wrapping*) del ADN (Liu, 1978a,b) alrededor de un dominio específico del enzima, anterior al paso de la cadena de ADN (Corbett, 2004, Kampranis, 1999, Reece 1991, Ruthenburg, 2005). El súper-enrollamiento negativo del ADN es esencial para la condensación cromosómica relajando la torsión de la cadena durante la replicación, y, promoviendo la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa (Levine, 1998, Wang, 2002).

El complejo entre la enzima y el ADN consiste en, aproximadamente, 130 pb localizadas en el núcleo de la proteína. La unión se realiza mediante enlaces covalentes entre la tirosina (Tyr122) de la subunidad A con 4 bases libres que se generan después de crear una rotura en el ADN. A continuación, y mediante la hidrólisis de ATP (en la subunidad B), la ADN-girasa introduce un enrollamiento negativo en el ADN, relajando la estructura producida por la horquilla de replicación, y volviendo a unir las dos cadenas (Hedde, 2000, Maxwell, 1997, Schmitz, 2002).

Para que la ADN girasa pueda ejercer su acción requiere la presencia de ambas subunidades y de ATP. En concreto, los monómeros A llevan a cabo los cortes en determinados puntos de la molécula de ADN y el posterior cierre de los puntos de ruptura, y los monómeros B inducen los superenrollamientos en torno al núcleo de ARN (Hooper, 1995), se unen al ATP, y participan en la transducción de la energía (Higgins, 1978). Parece que las quinolonas inhiben la acción de la ADN girasa a nivel de la subunidad A, aunque ciprofloxacino, por ejemplo, podría también afectar a la subunidad B. Las quinolonas, al actuar sobre la subunidad A, impiden el cierre de los cortes producidos en el ADN, por lo que se inhibe su replicación. La inhibición de la ADN girasa impide la replicación, por tanto, el efecto de las quinolonas debería ser bacteriostático; pero en realidad, las quinolonas son bactericidas (Jiménez, 1990, Lewin, 1988). Se considera que el mecanismo de acción de las quinolonas es mucho más complejo, ejerce otros efectos sobre la bacteria que no están totalmente elucidados (apartado 1.2.3).

Figura I.8: Mecanismo de paso de ADN a través de topoisomerasas de tipo II (superior), actividades topológicas de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV (inferior). (Imagen tomada de Neuman, 2010)



I.2.1.2. Topoisomerasa IV

Durante mucho tiempo se creyó que la ADN girasa era la responsable de la separación de los cromosomas hijos y del superenrollamiento negativo del ADN; en 1990 se descubrió un homólogo de la girasa, la topoisomerasa IV (Kato, 1990), y se consideró responsable de la decatenación de los cromosomas hijos (figura I.8). Se descubrió que la topoisomerasa IV es también diana de algunas quinolonas, que se creía que actuaban sólo a través de la ADN girasa (Levine, 1988, Zechiedrich, 1995).

La topoisomerasa IV también es una proteína hetero-tetramérica formada por la unión de dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas en este caso en los genes *grIA* y *grIB*, respectivamente, en *S. aureus* (llamados *parC* y *parE* en *Escherichia coli*).

La acción de la topoisomerasa IV, tras haberse finalizado la replicación del ADN, es permitir la segregación de los dos nuevos cromosomas bacterianos en las dos células hijas (Drlica, 1999 y 2008), y, como todas las topoisomerasas, es responsable de la relajación del ADN (Hooper, 1998a, Zechiedrich, 1997). El mecanismo de acción por el cual la topoisomerasa IV desencadena las dos nuevas moléculas de ADN tampoco se conoce en profundidad (Figura I.8).

La secuencia de aminoácidos codificados por los genes *grlA* y *grlB*, de la topoisomerasa IV, es homóloga a la de los codificados por *gyrA* y *gyrB* (de la ADN girasa), respectivamente (Kato, 1990). Secuencias similares se sitúan alrededor de la región de la ADN girasa conocida como región determinante de la aparición de resistencias bacterianas a las quinolonas (QRDR, del inglés *quinolone resistance-determining region*) (Nakamura, 1997). Esta similitud en la secuencia de aminoácidos entre la ADN girasa y la topoisomerasa IV, especialmente en las QRDR, implica que las quinolonas pueden ser capaces, tanto de inhibir la actividad de la topoisomerasa IV, como la de la ADN girasa (Yoshida, 1991).

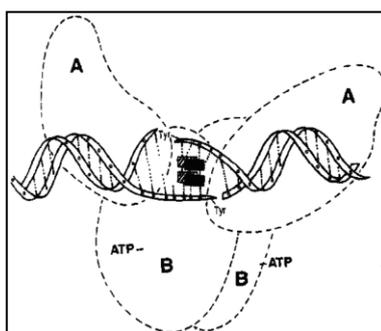
Los microorganismos Gram-positivos de los géneros *Corynebacterium*, *Campylobacter* y *Helicobacter*, y, las micobacterias, no poseen la enzima topoisomerasa IV. En estos microorganismos, la ADN girasa posiblemente asume el papel de la topoisomerasa IV (Manjunatha, 2002).

I.2.2. Modelo de acción/interacción

No se ha elucidado exactamente la manera cómo tiene lugar la interacción entre la quinolona, su enzima diana y el ADN. Existen varios modelos, la mayoría centrados en la ADN girasa (como molécula más estudiada), aunque, dada la alta homología que existe entre las moléculas todos ellos se consideran válidos, también, para la topoisomerasa IV.

1989 - Shen: proponía una unión cooperativa de las quinolonas a fragmentos de ADN monocatenarios. Se distinguirían tres dominios funcionales en la molécula de quinolona: los radicales ceto y carboxilo, que se unirían mediante puentes de hidrógeno al ADN, las posiciones 3 y 4, y la región del radical en N1, que estarían implicados en la agregación entre moléculas de quinolona, y finalmente, el radical situado en la posición 7, que interaccionaría con la subunidad B de la ADN girasa (Fàbrega, 2009).

Figura I.9. Modelo de Shen. Unión cooperativa entre el ADN y la quinolona en la inhibición de la ADN girasa (tomado de Leyva, 2008)



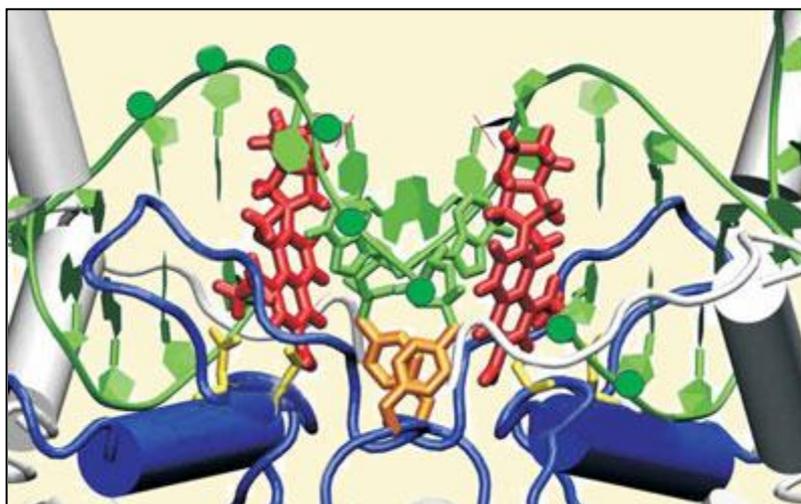
1993 – Maxwell: propuso un modelo en el que las moléculas de quinolonas se unirían a la ADN girasa mediante los radicales ceto y carboxilo de las posiciones 3 y 4. Sugería que uno de estos puntos de unión, en la ADN girasa, sería la Ser-83 (Hiasa, 2000).

1993 – Yoshida: el modelo propone que las quinolonas actúen en la cavidad dentro del complejo ADN-ADN girasa; además, el Mg^{2+} que se supone que está en la cavidad, sería un punto de unión a las quinolonas, mediante los radicales ceto y carboxilo (Hiasa, 2000, Lecomte, 1994).

1993 – Palumbo: Este modelo de interacción (Palumbo, 1993) es el más aceptado en estos momentos: Se propone que, al formar el complejo Topoisomerasa-ADN-Quinolona, la interacción quinolona-ADN no se produce a través de puentes de hidrógeno, sino a través de puentes mediados por un átomo de Mg^{2+} , formándose un complejo cuaternario, se bloquea el enzima y se provoca la muerte celular. Es decir, los radicales en posición 3 y 4 de la molécula de quinolona producirían enlaces con un átomo de Mg^{2+} y éste a su vez se uniría al ADN mediante enlaces con los grupos fosfato de los nucleótidos. Se produciría, también, un apilamiento entre una de las bases de la región monocatenaria de la cadena de ADN y el anillo plano que conforma el núcleo de la molécula de quinolona. En el modelo se propone que los radicales en las posiciones 1 y 7 serían los puntos de unión directa al enzima diana, la ADN-girasa o la topoisomerasa IV (Palumbo, 1993).

De todas maneras, aún se considera que los detalles moleculares no están claros, a pesar de los numerosos estudios realizados (Fàbrega, 2009).

Figura I.10: Dos moléculas de quinolona -moxifloxacino- (rojo) sujetando una cadena de ADN (verde) estrechamente unida a la topoisomerasa IV (azul). (imagen tomada de Laponogov y cols, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2009. DOI:10.1038/nsmb.1604).



En resumen, la acción de las quinolonas consiste en inhibir ambas enzimas, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, formando un complejo ternario entre fármaco, enzima y ADN (*cleavage*) (Shen, 1989), que genera roturas en la doble hélice de ADN (Drlica, 1997), en el que intervienen átomos de Mg^{2+} que podrían conectar el ADN y las posiciones 3 y 4 de las quinolonas (Palumbo, 1993). De igual modo, se cree que el proceso celular que actúa en el complejo formado *in vivo* produce una inhibición de la síntesis del ADN rápida y reversible, un cese del crecimiento, y una inducción de la respuesta SOS; que es un complejo mecanismo de reacción que actúa como respuesta a las acciones que pueden dañar el ADN (Lewin, 1989, Vila, 2005).

A dosis más elevadas de antibiótico, se cree que tiene lugar la muerte celular por una rotura irreparable de la doble hélice de ADN (Kato, 1990, Mizuuchi, 1990). La naturaleza reversible del complejo ternario formado, y la posterior muerte celular justifican los efectos fisiológicos de las quinolonas como agentes bactericidas (Chen, 1996); aunque conviene recordar que esta explicación esta basada en hipótesis (apartado I.2.3). Además, puesto que ambas enzimas tienen funciones distintas en la célula bacteriana, la respuesta a las quinolonas por parte del microorganismo difiere según cual sea la primera diana en cada caso (Drlica, 1997). Esto tiene mucha trascendencia puesto que estudios en *E. coli* han sugerido que la girasa actúa antes de la replicación de la horquilla, mientras que la topoisomerasa IV actúa predominantemente después, de forma que existe un intervalo de tiempo que permite reparar el daño en el ADN inducido por la quinolona (Zechiedrich, 1995). Este escenario predice que la formación del complejo *cleavage* a través de la girasa proporcionaría una muerte rápida de la bacteria, mientras que a través de la topoisomerasa IV sería un proceso más lento (Khodursky, 1998).

I.2.3. Actividad bactericida de las quinolonas

Las quinolonas ejercen una acción bactericida rápida sobre las células bacterianas, pero, su mecanismo de acción exacto no está totalmente claro, a pesar de haber sido ampliamente estudiado (Drlica, 2008). Se sabe que esta actividad bactericida se produce en diferentes grados (de letalidad y tiempo), en función de las condiciones y, según la molécula. Como se ha mencionado anteriormente, una explicación de la muerte celular, en dos pasos, podría ser que al bloquear la acción de las topoisomerasas de tipo II, además de impedir la replicación del ADN (proceso reversible/acción bacteriostática), se impida la reparación de pequeñas roturas de ADN, mediante el sistema SOS, y esto desencadena un proceso de endonucleosis y daño letal irreversible, o acción bactericida (Crumplin, 1975, Drlica, 2008).

Según sean los factores fisiológicos que necesiten las quinolonas para que ejercer su acción bactericida, se definen cuatro mecanismos de acción, conocidos como: A, B, B₁ y C, que varían según la quinolona y el microorganismo considerados (Lewin, 1988, Rattclife, 1984 y 1985). De manera resumida, se puede decir que todas las quinolonas presentan el mecanismo A, y pueden presentar el B y el C.

A continuación, se describen, brevemente, los cuatro mecanismos:

a) El mecanismo **A**, común a todas las quinolonas, requiere para actuar que la bacteria esté multiplicándose, y, que presente síntesis de ARN y proteínas. Las quinolonas clásicas, como el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (Rattclife, 1985, Winshell, 1970) sólo poseen este mecanismo. Las fluoroquinolonas, además, pueden presentar el mecanismo B y el C. (Figura I.11, d ó e).

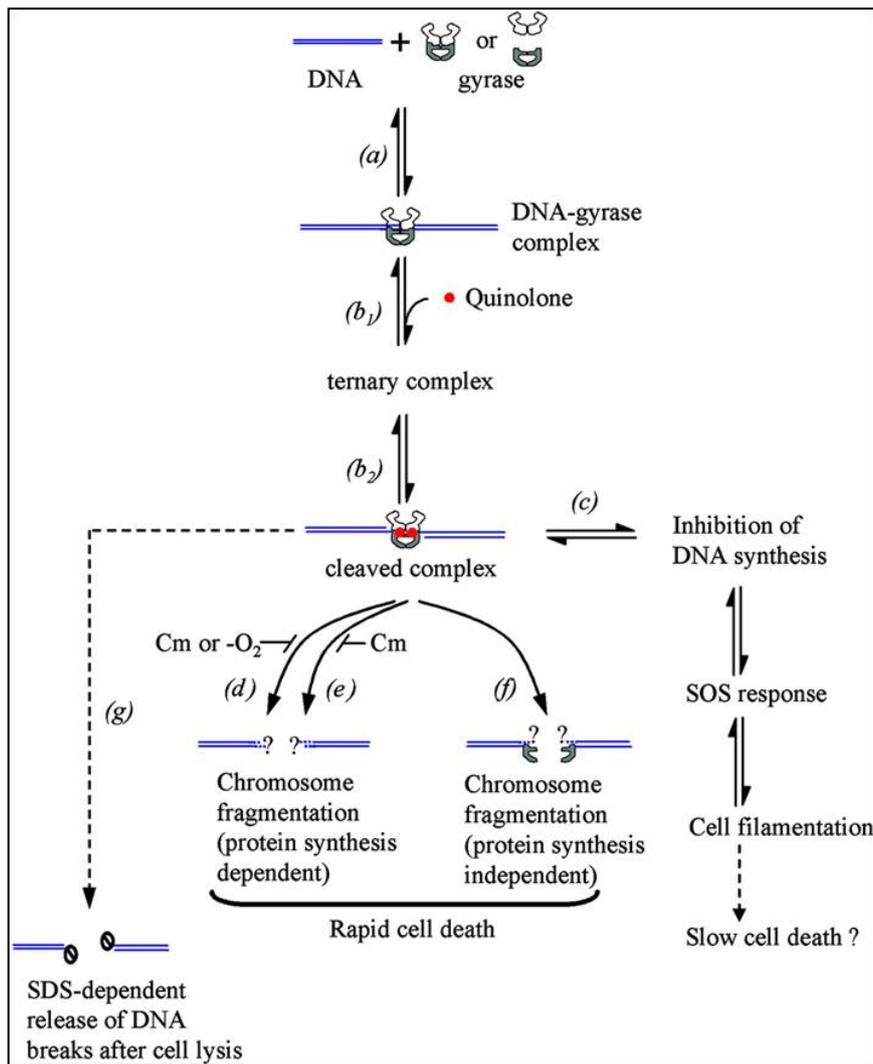
b) El mecanismo **B** no necesita síntesis de proteínas o de ARN en la bacteria para ejercer su efecto bactericida (Crumplin, 1984, Lewin, 1988, Rattclife, 1984). Quinolonas como el ciprofloxacino y el ofloxacino apenas alteran su efecto bactericida a dosis elevadas, en presencia de sustancias que inhiben la síntesis proteica o del ARN (rifampicina, cloranfenicol), e incluso en condiciones anaerobias (Lewin, 1991, Rattclife, 1985, Smith, 1986) (figura I.11, f).

c) Se ha identificado otro mecanismo relacionado únicamente con clinafloxacino, se conoce como **B₁**, y no precisa la síntesis de proteínas o ARN, pero necesita que la bacteria se esté multiplicando (Lewin, 1990) (figura I.11, f).

d) Por último, el mecanismo **C** necesita síntesis de proteínas y ARN para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando (Lewin, 1989). Este mecanismo se ha encontrado en norfloxacino (Rattclife, 1984) y enoxacino (Lewin, 1989) (figura I.11, d ó e).

Se considera que la actividad bactericida puede necesitar una concentración de producto ligeramente más elevada que la necesaria para el bloqueo de la replicación del ADN (figura I.11, c), previa a la inducción de la respuesta SOS, y a la fragmentación del ADN (Drlica, 2008).

Figura I.11. Acción de las quinolonas sobre la girasa A e hipótesis muerte celular (tomado de Drlica, 2008)



El hecho de que una fluoroquinolona presente un mecanismo de acción frente a una especie bacteriana no significa que lo presente frente a todas, puesto que éste depende de la quinolona y del microorganismo estudiado. Está bastante aceptado que la posesión de más de un mecanismo de acción puede explicar el hecho de que las fluoroquinolonas sean más potentes que las quinolonas clásicas, que sólo actúan a través del mecanismo A (Ramón, 1999). Así por ejemplo, Lewin y Smith (Lewin, 1989), han propuesto como posible explicación de la menor actividad bactericida que presenta el ciprofloxacino sobre los estafilococos, en comparación con la actividad que muestra sobre *E. coli*, la ausencia del mecanismo B del ciprofloxacino sobre los primeros.

En resumen, las quinolonas son agentes bactericidas que, como se ha mencionado, inhiben la síntesis replicativa del ADN, pero aunque este mecanismo de acción primario tiene una buena correlación con el efecto bactericida de estos compuestos (Chow 1988, Smith 1986, Zweerink, 1986), la capacidad de inhibir la síntesis del ADN no se considera suficiente para explicar la acción bactericida de las quinolonas.

El entender completamente el porqué del mecanismo que dirige la actividad bactericida de las quinolonas ayudaría en el diseño de nuevos compuestos (Drlica, 2008).

I.2.4. Efecto paradójico de las quinolonas

Las quinolonas, a elevadas concentraciones, muestran generalmente una disminución en su capacidad bactericida comparada a cuando se utilizan concentraciones moderadas. Al evaluar la actividad bactericida de las quinolonas a diferentes concentraciones, en un periodo determinado de tiempo, se puede observar, que la proporción de bacterias supervivientes sigue una respuesta bifásica. En primer lugar, al aumentar la concentración del antibiótico, se incrementa su actividad bactericida hasta alcanzar un máximo, a partir del cual, la letalidad disminuye inversamente a la concentración (Crumplin, 1975).

Este modo particular de acción se ha observado y estudiado en varias especies bacterianas (Crumplin, 1975, Lewin, 1991), y, en un número considerable de quinolonas (Cantón, 1989, Lewin, 1991, Smith, 1995).

En el caso de las quinolonas el efecto paradójico se presenta de forma más generalizada, que en otras familias de compuestos. Se observó este efecto para el ác. nalidíxico en *E. coli* (Winshell, 1970, Crumplin, 1975) y en otras especies de Gram-negativos; y, posteriormente se ha descrito en diversas fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino, el ofloxacino, el enoxacino, el fleroxacino, el lomefloxacino y el norfloxacino, entre otras (Jiménez, 1990, Smith, 1986), lo que hace pensar que es un efecto característico de la familia de compuestos.

La hipótesis más aceptada se basa en la inhibición de la síntesis de ARN y de algunas proteínas en presencia de altas concentraciones de producto (Manes, 1983). Se cree que esta inhibición puede interferir en la eliminación letal de los complejos, que contendrían ácido nalidíxico, y de esta forma, originar el efecto paradójico. Sin embargo, ésta no es una explicación satisfactoria para justificar el comportamiento de quinolonas como ciprofloxacino, puesto que a altas concentraciones estos agentes matan la célula predominantemente de un modo que no se bloquea por la inhibición de la síntesis de proteínas (Chen, 1996). En resumen, no se posee una explicación clara y consensuada, para el efecto paradójico en las quinolonas (Lewin, 1991).

I.3. MECANISMO DE RESISTENCIA

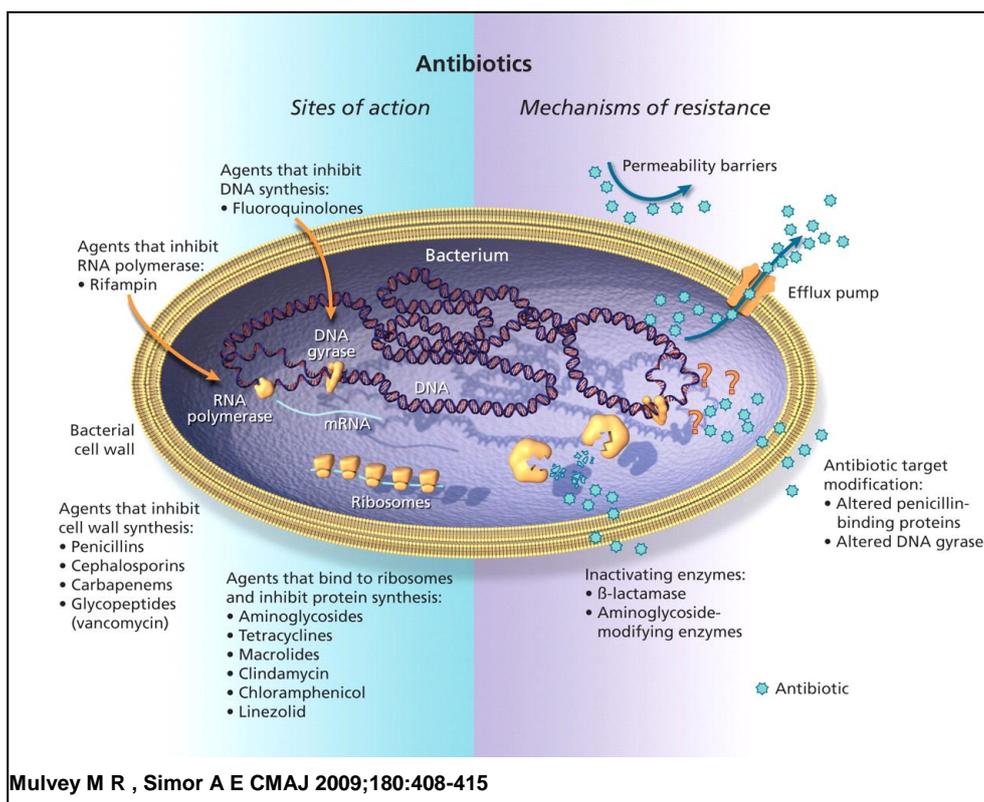
El uso de antibióticos, en general, ha llevado a la aparición de cepas con resistencia o susceptibilidad disminuida a los mismos. El uso elevado de quinolonas, concretamente, ha llevado a la aparición de cepas resistentes a esta familia de compuestos (Ruiz, 2003, Saenz, 2003, Vila, 2001).

Las cepas, de una especie determinada, se consideran resistentes cuando pueden tolerar o sobrevivir en presencia de una concentración de antibiótico superior a la que, en condiciones normales, inhibe a la mayoría de bacterias de su misma especie. Dentro de una misma familia de compuestos, cuando una cepa se hace resistente a uno de ellos, normalmente se ve afectada su susceptibilidad frente a otro antibiótico de la misma familia (apartado I.3.5). Este fenómeno se denomina resistencia cruzada, y en las quinolonas, por ejemplo, tiene especial importancia si los compuestos poseen a la ADN girasa o a la topoisomerasa IV, como diana principal, frente a una especie determinada.

Los mecanismos de adquisición de resistencia a quinolonas son:

- 1) mutaciones cromosómicas en los genes que codifican para las proteínas dianas, o mutaciones que causan menor acumulación del antibiótico dentro de las células, bien sea por una disminución de la entrada o por un flujo de salida superior.
- 2) genes portadores de resistencia, localizados en plásmidos, que pueden afectar tanto a las proteínas diana, como a los mecanismos de acumulación.

Figura I.12: Mecanismos de acción y potenciales mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos (tomado de Mulvey, 2009).



I.3.1. Mutaciones cromosómicas

I.3.1.1. Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas diana

La diana principal será aquella proteína que se altere en primer lugar para la adquisición de resistencia a las quinolonas. De una forma general se considera a la ADN-girasa la diana principal en microorganismos Gram-negativos (Hoshino, 1994, Ruiz, 1995 y 1999, Vila, 1994 y 1995), mientras que en bacterias Gram-positivas la diana principal, mayoritariamente, es la topoisomerasa IV (Ferrero, 1995, Yamagishi, 1996). Así, las primeras mutaciones en Gram-negativos se encuentran en el gen *gyrA*, mientras que en Gram-positivos, normalmente, aparecen en el gen *grlA* para *S. aureus* (Drlica, 1999, Fukuda, 1999).

Aunque, en función del radical de la posición 7 de la quinolona, la diana principal se puede ver modificada (Alovero, 2000), como se ha observado en Gram-positivos, especialmente en *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Fukuda, 1999, Varon, 1999).

Las modificaciones de la diana principal son mutaciones puntuales en los genes que las codifican, y que causan sustituciones en los aminoácidos de la proteína (ADN girasa o topoisomerasa IV). Estos aminoácidos substituidos son relevantes para la interacción entre la quinolona y la diana, y están situados en regiones implicadas en el mecanismo de acción (siglas en inglés QRDR, de *Quinolone-resistance determining region*). Estas sustituciones, y la menor interacción o afinidad de la molécula por su diana que conllevan, ocasionan la pérdida de actividad de la quinolona, a pesar de que la enzima sigue siendo activa (Ruiz, 1995).

La adquisición de resistencia a las quinolonas, en general, es escalonada, y está directamente relacionada con el número de mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas, sobretodo de los genes *gyrA* y *grlA* (Ribera, 2002, Ruiz, 2001, Vila, 1994).

I.3.1.1.1. ADN girasa

I.3.1.1.1.a Gen *gyrA*

Las mutaciones que generan resistencia a las quinolonas, tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos, se localizan principalmente en la región determinante de resistencia a quinolonas de las diferentes dianas, como se ha mencionado, y normalmente primero, en la diana principal.

Las alteraciones descritas en la proteína GyrA de *E. coli* y otras enterobacterias se encuentran situadas en las posiciones 67 y 106 de la QRDR (Yoshida, 1990), región cercana a la Tyr-22, zona de unión entre la ADN girasa y el ADN. Las primeras mutaciones aparecen en el gen *gyrA*, y las posteriores, en el *parC*. La mutación más frecuente es la localizada en Ser-83, que ocasiona un mínimo incremento de CMI para quinolonas como ciprofloxacino (0,125-0,25 mg/L), y una elevada resistencia frente al ác. nalidixico. Dos mutaciones, una en cada diana, *gyrA* y *parC* (Ser80 ó Glu 84), ocasionan una moderada resistencia en ciprofloxacino (1-4 mg/L), y, a partir de dos mutaciones por diana, se convierte la cepa en completamente resistente a quinolonas (8-64 mg/L con dos mutaciones en *gyrA*, y >128 mg/L con dos por gen) (Fàbrega, 2009, Vila, 1994).

Las mutaciones más importantes para conseguir un fenotipo resistente a quinolonas en *E. coli* están en el gen *gyrA*, principalmente en los aminoácidos Ser-83-Leu y Asp-87-Asn (o Val, Tyr o Gly), y en el gen *parC* con cambios Ser-80-Arg (o Ile) y Glu-84-Val (o Gly) (Hiasa, 2002, Nakamura, 1989, Vila, 1994).

En el caso de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* se ha descrito que una mutación puntual en *gyrA* es suficiente para causar incrementos clínicamente relevantes, en su resistencia a las fluoroquinolonas. Esto es debido, adicionalmente, a que poseen una resistencia intrínseca debida a la baja permeabilidad a estos antibióticos y al efecto de las bombas de expulsión, de expresión constitutiva (Fàbrega, 2009, Lambert, 2002).

Como se ha indicado, las mutaciones que generan resistencia a las quinolonas en Gram-positivos se localizan principalmente en la QRDR, que se localiza entre las bases 201 y 321 del gen *gyrA*, o, lo que sería lo mismo, entre los aminoácidos 67 y 107 de la proteína, pudiéndose dar pequeñas variaciones en la localización, en función de los diferentes microorganismos.

La mayor parte de las mutaciones en esta región se concentran en dos aminoácidos, Ser-84 y Glu-88 en *S. aureus*, y posiciones homólogas en otros microorganismos (tabla I.2), responsables de la interacción con la molécula de quinolona. Estos dos aminoácidos son unos de los más conservados entre las diferentes especies de microorganismos.

Otros aminoácidos pertenecientes a esta región también se han visto alterados, aunque con mucha menos frecuencia y algunos de ellos se han obtenido mediante selección de cepas resistentes *in vitro*. Así pues, encontramos también mutaciones en los codones de los aminoácidos Ser-85, o Asp-73 en *S. aureus*, relacionadas con un incremento en la CMI.

Se pensaba que, en Gram-positivos, la ADN girasa no era la diana principal de las quinolonas, sino que era la topoisomerasa IV. Hoy se sabe que, la diana principal depende de la afinidad de cada quinolona por su diana, por lo que, en función de la quinolona, la diana principal puede variar, como en el caso del esparfloxacino, garenoxacino, nadifloxacino y ozenoxacino, compuestos cuya diana principal en los Gram-positivos sí es la ADN-girasa (Hooper, 1999, Ruiz, 2001, Yamakawa, 2002). En el caso de *S. pneumoniae* se ha descrito que la diana principal puede ser tanto la ADN girasa como la topoisomerasa, en función de la quinolona (Pan, 1996, Sierra, 2005).

En los microorganismos como *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium* spp. o *Helicobacter pylori*, que no poseen topoisomerasas IV, una sola mutación en el gen *gyrA* produce un alto nivel de resistencia a ciprofloxacino, mientras que necesita dos mutaciones para ser resistente a moxifloxacino (Ruiz, 2005, Sierra, 2005).

Está demostrado, tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos, que, se necesita más de una mutación para ocasionar resistencia a las quinolonas de alto nivel.

Tabla I.2 Sustituciones de los aminoácidos en GyrA y GrlA, de diferentes especies Gram-negativas y Gram-positivas, asociados a resistencia en quinolonas (Fábrega, 2009)						
Microorganismo	Aminoácidos modificados				CMI (mg/L)	
	GyrA		GrlA		cip	nor
<i>E. coli</i> wt	Ser-83	Asp-87	Ser-80	Glu-84	-	-
	Leu				0,25-4	-
	Leu		Arg		1-4	-
	Leu			Lys	4	-
	Leu	Asn/Tyr			8-128	-
	Leu	Asn	Arg/Ile		4-128	-
<i>Salmonella</i> spp. wt	Leu	Asn/Tyr	Ile	Val/Lys	64-128	-
	Ser-83	Asp-87	Ser-80		-	-
	Phe				0,25-2	-
<i>S. aureus</i> wt		Gly/Tyr			0,125-0,5	-
	Phe		Ile		4	-
	Ser-84	Asp-88	Ser-80	Glu-84	-	-
			Phe		-	4
<i>S. pneumoniae</i> wt	Leu		Phe		-	16
	Leu		Phe	Lys	-	128
	Ser-83	Asp-87	Ser-79	Asp-83	-	-
<i>S. pneumoniae</i> wt			Tyr/Phe		-	8
	Tyr		Tyr		-	64

CMI: concentración mínima inhibitoria, cip: ciprofloxacino, nor: norfloxacino

I.3.1.1.1.b Gen *gyrB*

Se ha descrito que mutaciones en el gen *gyrB* de *E. coli* (Asp-426-Asn y Lys-447-Glu) también contribuyen a la resistencia en quinolonas, aunque básicamente se han detectado en mutantes de laboratorio, con muy poca frecuencia en cepas de origen clínico (Nakamura, 1989, Ruiz, 1987). Estas mutaciones se extrapolan al resto de Enterobacterias (Fábrega, 2009).

En *S. aureus* y otros Gram-positivos, la subunidad B de la ADN-girasa también presenta mutaciones asociadas a la resistencia a las quinolonas, aunque de forma más moderada; la mayor parte de estas mutaciones se presentan en mutantes resistentes obtenidos *in vitro*. Estas mutaciones se sitúan cerca del centro catalítico del enzima y junto al dominio de unión a la subunidad A; probablemente generan cambios conformacionales y evitan o interfieren en la unión de la quinolona con la ADN-girasa.

I.3.1.1.2. Topoisomerasa IV

I.3.1.1.2.a. Gen *parC* (Gen *grlA* en *S. aureus*)

Como se ha mencionado, la topoisomerasa IV suele ser la diana principal de las quinolonas en Gram-positivos, aunque hay quinolonas, en las que es la ADN girasa. De igual manera, las mutaciones que confieren resistencia se concentran en la QRDR, en este caso del gen *grlA*. Esta región está comprendida entre los aminoácidos 67 y 107, y la mayor parte de las mutaciones se concentran en dos aminoácidos, Ser-80 y Glu-84 en *S. aureus*, y en posiciones homólogas en otros microorganismos (tabla I.2) (Ruiz, 2001, Sierra, 2005, Vila, 1996).

Otras mutaciones en la QRDR del gen *grlA*, como serían las encontradas en el codón del aminoácido Ser-81 o en posiciones fuera de la QRDR de *S. aureus* como la Ile-45 o la Ser-52, obtenidas a partir de mutantes resistentes *in vitro*, también se han relacionado con la adquisición de resistencia, aunque lo más frecuente es encontrarlas asociadas a mutaciones en los codones de los aminoácidos 80 y 84 (Sierra, 2005).

I.3.1.1.2.b. Gen *parE* (Gen *grB* en *S. aureus*)

No se habían descrito mutaciones en *parE* de *E. coli* hasta que, se detectó una mutación en la posición A458S, en la que alanina se sustituyó por una serina (Ser→Ala) (Ruiz, 1987). Estas mutaciones se extrapolan al resto de Enterobacterias (Fàbrega, 2009).

La subunidad B de la topoisomerasa IV, en *S. aureus*, también presenta mutaciones asociadas a la resistencia a las quinolonas. Estas mutaciones se presentan en la mayoría de los casos en mutantes resistentes obtenidos *in vitro* y también, igual que en la subunidad B de la ADN girasa, se sitúan cerca del centro catalítico del enzima, y junto al dominio de unión con la subunidad A. El mecanismo por el cual estas mutaciones generarían resistencia sería el mismo que en el caso de la subunidad B de la ADN girasa y, por lo general, estas mutaciones si se encuentran sin asociación con mutaciones en los genes *gyrA* o *grlA* confieren muy bajos niveles de resistencia (Sierra, 2002).

I.3.1.2. Mutaciones en los genes que provocan una reducción en la acumulación intracelular

La disminución de la acumulación de las quinolonas (y de otros antibióticos) en el interior celular se puede asociar con:

a) una regulación positiva *-upregulation-* de algunas proteínas de membrana que pueden facilitar la extrusión de esos agentes. Suelen ser sistemas de expulsión dependientes de energía, que pueden ser específicos para un producto o no selectivos, llamándose entonces *multidrug transporters* (Fàbrega, 2009).

b) una disminución de la permeabilidad, causada, normalmente, por una menor expresión de las porinas, que son proteínas de la membrana externa (sólo en Gram-negativos) que forman canales para facilitar la entrada de compuestos en el interior celular, por difusión pasiva (Jacoby, 2005).

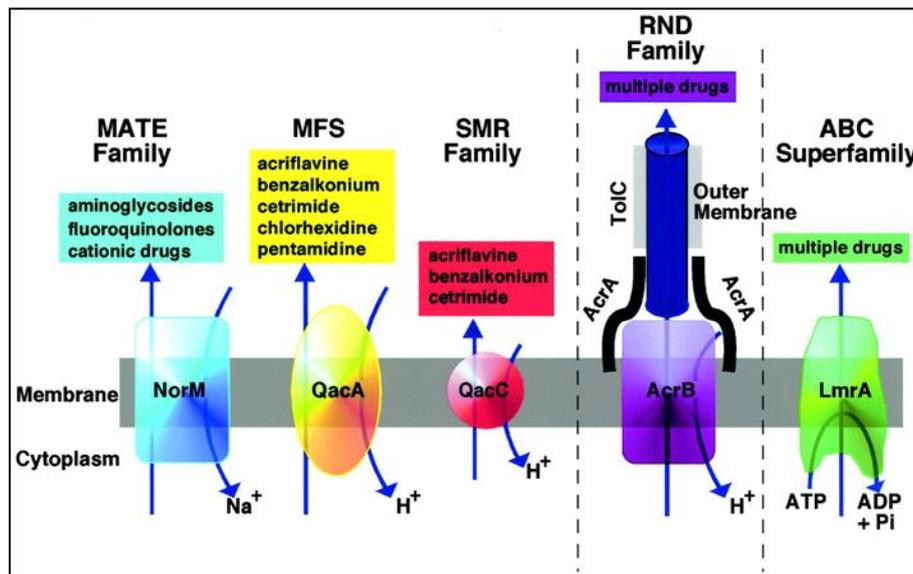
I.3.1.2.1. Sistemas de expulsión activa

Los sistemas de expulsión activa se expresan en todas las células vivas, siendo el número de bombas de flujo, presente en cada especie bacteriana, proporcional al tamaño de su genoma (Vila, 2011).

La función principal de los sistemas de expulsión activa es fisiológica, participan en la excreción de productos como los metabolitos secundarios, o sustancias tóxicas, además de los antibióticos, y, utilizan, como fuente de energía el gradiente de protones, excepto la familia ABC (figura I.13), que utiliza la energía generada por la hidrólisis de ATP (Li, 2004). Parece que, funciones adicionales serían modular la patogenicidad de algunas cepas y/o la supervivencia en algunos nichos (Piddock, 2006).

De acuerdo a la especificidad de su sustrato, pueden ser de expulsión única o múltiple (*single vs multidrug*). Las bombas de flujo específicas de producto, pueden expulsar sólo a un antibiótico, como TetA, que es específico para tetraciclinas (Levy, 1992), y las de expulsión múltiple, pueden expulsar de la célula a diferentes clases de antimicrobianos. Lo más destacable de estos transportadores es el amplio rango de sustancias que una sola proteína puede reconocer (Fàbrega, 2009, Kaatz, 2000, Poole, 2000a y 2000b, Vila, 2011).

Figura I.13 esquema de los diferentes sistemas de expulsión activa en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Tomado de Piddock 2006, imagen de Melinda Brown).



Los transportadores se pueden clasificar en seis clases o familias distintas de sistemas de expulsión activa:

1. Transportadores tipo ABC (ATP-Binding Cassette).

La fuente de energía que utilizan es la hidrólisis del ATP. Los miembros de esta familia están raramente involucrados en la adquisición de resistencia a los antibióticos en Gram-negativos, aunque sí poseen un rol relevante en Gram-positivos (Vila, 2011). Entre los sustratos se encuentran azúcares, aminoácidos, iones, antibióticos, polisacáridos y proteínas (Li, 2004). Estos transportadores ABC consisten en 6 segmentos transmembrana con el dominio ATPasa localizado en el citoplasma celular.

Los otros tipos de bombas de flujo, que se describen a continuación, utilizan el gradiente de protones, como se ha mencionado anteriormente.

2. **MATE** (en inglés, *Multidrug and Toxic compound Extrusion family*). Han sido descritos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y también en células eucariotas. Son proteínas de gran tamaño, presentan 12 segmentos transmembrana y participan en la expulsión de antibióticos al medio extracelular (Brown, 1999, Li, 2004). Algunos representantes de esta familia son NorM, en *Vibrio parahemolyticus* y YdhE en *E.coli*.

3. **MFS** (*Major Facilitator Superfamily*): Estos sistemas de expulsión están formados por proteínas que presentan 12 ó 14 segmentos transmembrana y utilizan el gradiente de protones, como fuente de energía (Saier, 1999, Vila, 2011). Se encuentran en todos los tipos celulares, bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y células eucariotas. En bacterias Gram-negativas están asociados, generalmente, a otras dos proteínas, una proteína de fusión de membrana (MFP, *Membrane Fusion Protein*), y a una proteína de la membrana externa (OMP, *Outer Membrane Protein*). Los principales sustratos para este tipo de bombas son antibióticos, azúcares, metabolitos secundarios y aniones. Estas MFS se encuentran, entre otros, en: *S. aureus* (NorA, QacA, QacB), *S. pneumoniae* (PmrA), *Corynebacterium* (Cmr), *Bacillus* (Bmr, Blt), *E. coli* (MdfA, EmrB) y *Acinetobacter baumannii* (MdfA).

4. **SMR** (*Small Multidrug Resistance*). Estos transportadores son los más pequeños, constituidos por 4 fragmentos transmembrana y probablemente actúen en forma trimérica (Li, 2004, Paulsen, 1996). Sólo se han descrito en procariontes y no se asocian a ninguna proteína. Los sustratos principales suelen ser antibióticos, antisépticos, etidios y tetrafenilfosfatos. Este tipo de transportadores se han descrito por ejemplo en *S. aureus* (QacG, QacH, Smr), *Bacillus* (EbrA) y *E. coli* (EmrE).

5. **RND** (*Resistance-Nodulation Cell division family*). Estos tipos de transportadores son de mayor tamaño que los anteriores, aunque sólo presentan 12 segmentos transmembrana, y también se asocian con MFPs y OMPs (Li, 2004). Los principales sustratos son antibióticos, ácidos grasos, detergentes, y colorantes. Estos sistemas se encuentran en: *E. coli* (AcrB, AcrF), *Pseudomonas aeruginosa* (MexA, MexD, MexF, MexY), *Neisseria* (MtrD) *Stenotrophomonas maltophilia* (SmeB, SmeE) y *Acinetobacter baumannii* (AdeB). Recientemente se ha descrito un sistema RND localizado en un plásmido transmisible (Li, 2004).

6. **Transportadores compuesto/metabolito tipo DMT** (*Drug/Metabolite Transporter*). Estos transportadores engloban a diferentes familias de transportadores secundarios, presentes en bacterias, algas y eucariotas. De algunas de ellas no se conoce claramente su funcionalidad, mientras que, de la superfamilia mayoritaria, la DMT, engloba a la DME (Drug metabolite exporter), que como su nombre implica, están implicados en la expulsión de metabolitos del interior celular (Jack, 2001, Piddock, 2006), y no se conoce que expulsen antibióticos.

Las bombas de flujo más típicas de los Gram-positivos pertenecen principalmente a las familias MSF, aunque también se han detectado pertenecientes a SMR, ABC y MATE (Poole, 2000). La primera bomba de flujo caracterizada en Gram-positivos fue la NorA (MFS), y la primera mutación estaba localizada en el promotor del gen, no permitiendo la unión de un represor (Fàbrega, 2009).

A pesar de que hay pocos trabajos publicados con información clínica sobre la relevancia de la sobreexpresión de estos genes, un estudio reciente cuantifica alrededor de un 50% las cepas clínicas evaluadas que tenían por lo menos un sistema de expulsión, que implicaba resistencia a quinolonas (DeMarco, 2007, Fàbrega, 2009). También está descrita la sobreproducción de distintas bombas de flujo (en el 20% de las cepas que poseían sistemas de expulsión activa para quinolonas), siendo los niveles de NorB y NorC los más predominantes (Kaatz, 2000, Sierra, 2000).

Los sistemas de expulsión caracterizados para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se muestran en la tabla I.3, como se puede observar, no todas las quinolonas se ven afectadas de la misma manera, probablemente, por la acción conjunta de distintas bombas de expulsión (Piddock, 2006, Vila, 2011). La relevancia en Enterobacterias, Gram-negativos no fermentadores y Gram-positivos, como *S. aureus* y *S. pneumoniae*, es muy importante, desde el punto de vista de la pérdida de eficacia de los antibióticos susceptibles de ser expulsados por las distintas familias de transportadores. (Piddock, 2006, Vila, 2011).

Tabla I.3 Bombas de expulsión para fluoroquinolonas en algunas especies bacterianas (Vila, 2011)

Bombas de expulsión cromosómicas				
Microorganismo	Bomba de flujo	Familia MDR	Quinolonas expulsadas	Otros
<i>E. coli</i>	AcrAB	RND	cip	Clor, tet, min, amp, oxa, cef, eri, cla, axi, clin, lin, tri, rif, cv, EtBr, SDS.
	AcrEF	RND	cip, oflo	Clor, tet, tri, eri, clar, azi, clin, lin, cef, oxa, EtBr, SDS
	YdhE	MATE	nor, cip, eno	Clor, fos, trim, EtBr
	MdfA	MFS	nor, cip	Clor, fosf, tri, kan, neo, eri, rif, EtBr
<i>K. pneumoniae</i>	AcrAB	RND	nor, cip, nal,	Clor, tet, tig, min, eri, tri, EtBR
	KmrA	MFS	nor, oflo	Kan, gen, eri, acri, EtBr,
	KdeA	MFS	nor, cip	Clo, dau, acri, EtBr
<i>S. enterica</i>	AcrAB	RND	cip, nal, lev, enr, gat, sara, dan, marb, difl, orb, flum	
	AcrEF	RND	cip, enr, marb	Flor, eri
<i>A. baumannii</i>	AdeIJK	RND	lev, pefl	b-l, clor, tet, eri, linc, fu, Nov, rif, tri, SDS
	AdeABC	RND	spar, oflo, nor, pefl, lev	Kan, tob, ami, cefo, tet, eri, clor, trim, tig
	AdeDE	RNA	cip, oflo, nal	Ami, tet, clor, eri, mero, rif, EtBr
	AbeM	MATE	cip, nor, oflo	Gen, kan, eri, clor, trim, dau, dox, EtBr
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM	RND	Nal	b-l, clor, carb, Nov, trim, tig, sul, EtBr, acrti, cv, SDS
	MexCD-OprJ	RND	Trov	Eri, Cep, b-l, clor, Nov, tri, tet, mac, cv, EtBr, tig, lin, mur
	MexEF-OprN	RND	cip	Clor, tri, aro hidro, tric
	MexXY	RND	nor, ofl	Ag, eri, tet, b-l, tig, mur, acri, eri, EtBr
	PmpM	MATE	Cip, nor	Frad, clore, acri, EtBr, Rod, bzc
	MexVW	RND	Nor, oflo	-
<i>E. faecalis</i>	EmeA	MFS	nor, cip,	EtBr, acri, cbz
	EfrAB	ABC	nor, cip	Dox, arbe, nov, dau, acri, EtBr
<i>E. faecium</i>	EfmA	MFS	nor, cip	Eri, olea, ETBr
<i>S. aureus</i>	NorA	MFS	nor, cip	rod, EtBr, acri, clor, pur
	NorB	MFS	nor, cip, spar, mox	EtBr, cet
	NorC	MFS	nor, cip, spar, mox, gare, prem	-
	SdrM	MFS	nor	EtBr, acri
	MdeA	MFS	cip	Dox, dau, virgi, nov, mup, EtBr, acri, rod, bzc
	MepA	MATE	nor, cip	Tig, acri, bzc, cet, cv, EtBr, rod
<i>S. pneumoniae</i>	Pmr	MFS	nor, cip	EtBr, acri
	PatAB	ABC	nor, cip, lev	EtBr, acri, cet, reser
<i>B. fragilis</i>	BmeABC-1-16	RNDs	cip, nor, gare, lev, mox	b-l, cep, polB, col, bac, vanc, fu, Nov, pur, EtBr, SDS, amp, cefti, tetr
<i>C. difficile</i>	CdeA	MATE	cip, nor	Acri, EtBr
<i>C. jejuni</i>	CmeABC	RND	cip, nor, nal	b-l, eri, rif, tet, clor, gen, tri
<i>H. influenzae</i>	HmrM	MATE	nor	Strep, trim, dau, doxo, acri, ETBr
<i>M. tuberculosis</i>	Rv1634	MFS	nor, cip, ofl, lome	-

cip: ciprofloxacino, nor: norfloxacino, nal: ác. nalidíxico, oflo: ofloxacino, eno: enoxacino, lev: levofloxacino, enr: enrofloxacino, gar: gatifloxacino, sara: sarafloxacino, Dan: danofloxacino, difl: difloxacino, marb: marbofloxacino, orb: orbifloxacino, flum: flumequina, pefl: pefloxacino, spar: sparfloxacino, trov: trovafloxacino, tem: temafloxacino, oxo: ác. Oxolínico, mox: moxifloxacino, gare: garenoxacino, prem: premafloxacino, lom: lomefloxacino, ola: olaquindox

clor: cloranfenicol, tet: tetraciclina, min: minociclina, amp: ampicilina, oxa: oxacilina, cef: cefuroxime, ery: eritromicina, clar: claritromicina, azi: azitromicina, clin: clindamicina, lin: linezolid, trim: trimetoprim, rif: rifampicina, cv: cristal violeta, EtBr, SDS, floe: florfenicol, fosf: fosfomicina, kan: kanamicina, tig: tigeciclina, dau: daunomicina, acri: acriflavina, b-l: beta-lactámicos, fu: ác. fusídico, to: tobramicina, mer: meropenem, cefo: cefotaxime, carb: carbenicilina, sul: sulfonamidas, cep: cefems, mac: macrólidos, aro hid: hidrocarburos aromáticos, tric: triclosan, Frad: fradiomicina, clore: clorhexidina, rod: rodamina, bzc: cloruro de benzalcônio, arbe: arbekacina, rod: rodamina, cet: cetrímide, vir: virginiamicina, mup: mupirocina, res: reserpina, polB: polimixina B, col: colisitina, bac: bacitracina, vanc: vancomicina, amp: ampicilina, cefti: ceftizoxime, gen: gentamicina, tri: triclosan

Aunque la resistencia a quinolonas se deba principalmente a las mutaciones en las dianas, la expresión basal de los genes que codifican para las bombas de expulsión contribuye a la resistencia intrínseca a las fluoroquinolonas, especialmente en los bacilos no fermentadores (Ruiz, 2003). Una muestra de la relevancia de los sistemas de expulsión es que alrededor de un 5-10% de todos los genes bacterianos codifican para proteínas involucradas en sistemas de expulsión (Rouquette-Loughlin, 2003, Saier, 2001, Webber, 2003).

La mayor parte de estos sistemas se expresan de una forma basal, o no se expresan, además de poder ser sobreexpresados, con el consecuente incremento de resistencia. Al aumentar la expulsión de los antibióticos del interior celular, la concentración de producto que puede llegar a su diana de acción es menor, por lo que será necesaria mayor entrada o dosis de producto para conseguir el efecto antibacteriano (Pestova, 2002, Piddock, 2006).

Los mecanismos de resistencia por los que AcrAB, el sistema de transporte más relevante en Enterobacterias, puede sobreexpresarse son aquellos que afectan los genes reguladores que determinan los niveles de estas proteínas. Los genes *acrAB* están regulados por cuatro factores transcripcionales: Rob, MarA y SoxS, activadores, y AcrR, como represor, además de por las condiciones de stress (Abouzeed, 2008, Alekshun, 1997, Barbosa, 2000, Gallegos, 1997, Kern, 1999).

El locus cromosómico *mar* (multiple antibiotic resistance) controla la resistencia a múltiples compuestos, no relacionados estructuralmente, que incluyen antibióticos, desinfectantes, solventes orgánicos y otros productos químicos. Se sabe que el fenotipo Mar es inducido tras exponer a los microorganismos a una serie de compuestos químicos con anillos aromáticos (Alekshun, 1999, Kern, 2000).

Hay estudios que indican que, no se pueden seleccionar cepas de *E. coli* con mutaciones en las dianas para las quinolonas a partir de mutantes deficientes para bombas de flujo, destacando la contribución esencial de los sistemas de expulsión en la resistencia a esta familia de compuestos (Kern, 2000, Oethinger, 2000). En otros trabajos se indica que, a partir de una cepa con mutaciones en *gyrA* o *grlA*, para incrementar la resistencia a quinolonas, antes que nuevas mutaciones en las dianas, se producen siempre mutaciones en los genes *marA* o *soxS* (Kern, 2000).

En resumen, la presencia de bombas de flujo, o la sobreexpresión de sus genes, en algunas especies bacterianas, complementa a las mutaciones en los genes de las proteínas dianas, en el proceso de generación de resistencias de alto grado, además de poder ser asociadas a resistencia a otros antibióticos (Vila, 2011).

I.3.1.2.2. Alteración de las porinas

La disminución de la permeabilidad de los antibióticos al interior celular puede estar causada, en Gram-negativos, por una menor o nula expresión de las porinas, con la consecuente menor penetración y acumulación del antibiótico en el interior celular, y menor inhibición de sus proteínas diana, también (Chen, 2003, Jacoby, 2005, Martínez-Martínez, 2002). En el caso de *E. coli*, con los genes que codifican para OmpF y OmpC infra regulados se obtienen CMI entre 2 y 4 veces superiores para las fluoroquinolonas (Martínez-Martínez, 2002).

Hay especies bacterianas como *A. baumannii* que poseen una resistencia intrínseca a muchos antibióticos, por tener un número muy bajo de porinas, y de un diámetro menor a las de otras bacterias, hecho que contribuye a que sea susceptible a muy pocos antibióticos (Fàbrega, 2009).

La presencia de este mecanismo de resistencia puede coincidir con la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa, al compartir un solo gen regulador, e incrementar la resistencia final de las cepas (Tavio, 2004).

I.3.2. Mutaciones en genes localizados en plásmidos, asociados con resistencia a quinolonas.

Por ser las quinolonas fármacos de origen sintético, se pronosticó, ya desde poco después de su llegada al mercado, que aparecerían genes de resistencia vehiculizados por plásmidos (de transferencia horizontal, antes que mutaciones en sus dianas (transferencia vertical). Con el tiempo se ha visto que no ha ocurrido exactamente así, aunque finalmente se han detectado genes de resistencia a quinolonas en plásmidos (Courvalin, 1990, Martínez, 1998, Martínez-Martínez, 1998).

Hasta hoy, no se han descrito mecanismos de resistencia mediados por plásmidos en bacterias Gram-positivas, pero sí en Gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, que se describen a continuación:

- A) Protección de la diana (Qnr *determinants*) (Jacoby, 2008),
- B) Modificación o inactivación de quinolonas, gen *aac(6')-Ib-cr* codifica para una aminoglicosido acetiltransferasa (Robicsek, 2006)
- C) plásmidos que codifican para genes de bombas de flujo (QepA)

I.3.2.1 Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos y relacionados con las proteínas diana (Qnr)

Este mecanismo está mediado por un gen plasmídico llamado *qnr* (Rodríguez-Martínez, 2003, Tran, 2002). Este gen se detectó en un plásmido conjugativo, en una estructura tipo integrón localizado en una cepa de *E. coli* de origen urinario (Martínez-Martínez, 1998).

A partir de la estructura de Qnr, se postuló que no tendría que ver con un cambio en la acumulación intracelular ni con una inactivación de la quinolona (Fàbrega, 2009). Se observó, a partir de ensayos *in vitro* de DNA-supercoiling, que Qnr protegía la ADN girasa de la inhibición por ciprofloxacino. Esta protección es dependiente de la concentración de Qnr, e inversamente proporcional a las concentraciones de ciprofloxacino (Tran, 2005a). De igual manera, la topoisomerasa IV, la segunda diana de las quinolonas en Enterobacterias, también parece que sea protegida por Qnr de las quinolonas (Fàbrega, 2009). El resultado de la expresión de este péptido Qnr es una resistencia de bajo nivel. Hasta este momento, se han identificado tres genes *qnr*, en *E. coli*, en *K. pneumoniae* y en *Shigella flexneri*.

Este mecanismo de resistencia aumenta la resistencia de las cepas de 4 a 8 veces (Tran, 2005), y complementa a otros mecanismos de resistencia como la adquisición de mutaciones o a los sistemas de expulsión activa (Tran, 2002).

El mecanismo de acción de Qnr se basa en la unión de esta proteína a la ADN girasa; esta unión no requiere la presencia del complejo ADN girasa-Quinolona-ADN para su formación. Se postula que la formación del complejo Qnr-ADN girasa ocurre antes del bloqueo de la ADN girasa por parte de la quinolona. Además, se ha observado una reducción en la formación del complejo en presencia de Qnr (Tran, 2005b).

I.3.2.2 Mecanismos de resistencia mediados por plásmidos y relacionados con modificación de las quinolonas (AAC(6')-Ib-cr)

Se ha detectado un mecanismo de inactivación enzimática de quinolonas codificado por un gen plasmídico. La variante *cr* de *aac(6')-Ib* codifica para una acetiltransferasa que modifica a los aminoglucósidos, y que además, confiere una reducida sensibilidad a ciprofloxacino mediante la N-acetilación de su piperazinil-amina (Robicsek, 2006). Sólo dos cambios en los aminoácidos (Trp-102-Arg y Asp-179-Tyr) de la acetiltransferasa para aminoglucósidos la convierte en susceptible de modificar a ciprofloxacino, las CMI en *E. coli* fueron de 64 mg/L para kanamicina y 3-4 veces superiores para ciprofloxacino.

El efecto de este gen, que solo es capaz de provocar resistencia de bajo nivel a ciprofloxacino, se suma a Qnr, cuando coinciden en la misma bacteria, para obtener una resistencia a ciprofloxacino, cercana a su punto de corte de susceptibilidad/resistencia clínica (1 mg/L) (Fàbrega, 2009).

Se destaca que, en presencia del gen *aac(6')-Ib-cr*, se detecta un aumento sustancial de la frecuencia de selección de mutantes cromosómicos por exposición a ciprofloxacino, además de que, a menudo, se localiza en el mismo elemento genético que el gen para las beta-lactamasas *bla_{CTX-MY}*. En resumen, es un gen que, aunque no promueva un aumento sustancial de la resistencia a ciprofloxacino, él solo, colabora con otros mecanismos de las bacterias para hacerse resistentes a las quinolonas, y es, además, de fácil transmisión horizontal (Fàbrega, 2009).

I.3.2.3 Plásmidos transportadores de genes que codifican para bombas de flujo (QepA)

Recientemente se ha identificado un plásmido, en Enterobacterias (Yamane, 2007) que codifica para una bomba de flujo. QepA presenta similitudes con los transportadores pertenecientes a la familia MFS con 14 fragmentos transmembrana, parece que el gen *qepA* proviene de actinomicetes ambientales (Yamane, 2007). QepA confiere resistencia a fluoroquinolonas hidrofílicas (norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino), se asocia con otros genes de resistencia, y difiere de las bombas de flujo codificadas en los cromosomas de las bacterias, en que normalmente tienen un rango más amplio de sustratos (Vila, 2011, Yamane, 2008). No se ha detectado todavía que puedan expulsar a otro tipo de compuestos, aunque una causa puede ser la reciente aparición de este gen entre los patógenos humanos, con una baja prevalencia, en estos momentos (Kim, 2009, Yamane, 2008). Por otro lado, sí es más prevalente entre las Enterobacterias aisladas en cerdos (Liu, 2008), por lo que se sospecha que, los animales de granja pueden actuar como reservorio de diseminación de estos genes de resistencia, con la amenaza que esto supone. La información disponible hace pensar que el gen *qepA* está en un proceso de diversificación, inmediatamente después de ser transferido a un nuevo huésped, a las bacterias patógenas humanas (Vila, 2011). Este gen es más peligroso, por haberse detectado asociado a los otros dos genes plasmídicos que codifican para resistencia a quinolonas, el *qnrS2* y el *aac(6')-Ib-cr* (Liu, 2008). La presencia de diferentes determinantes plasmídicos para resistencias a quinolonas en un mismo huésped puede facilitar su dispersión entre la población bacteriana (Vila, 2011).

Otro gen que codifica para la bomba de flujo OqxAB se ha detectado en plásmidos, también procedente de bacterias aisladas de animales de granja, con resistencia inicial a olaquinox (Hansen, 2004). Trabajos posteriores demostraron que era una bomba de flujo de la familia RND, capaz de expulsar a quinolonas y a otros antibióticos (Hansen, 2007). Se ha detectado en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* de infecciones en humanos, aunque su distribución es muy baja, de momento. El hecho que se seleccionara en animales, por conferir resistencia a un promotor del crecimiento como olaquinox, es ilustrativo del riesgo de mecanismos de resistencia por selección cruzada entre el uso veterinario y el humano de los antibióticos (Vila, 2011).

Tabla I.4 Bombas de expulsión para fluoroquinolonas codificadas en plásmidos (Vila, 2011)

Bombas de expulsión cromosómicas				
Microorganismo	Bomba de flujo	Familia MDR	Quinolonas expulsadas	Otros
-	QepA	MFS	nor, cip, enr	-
-	OqxAB	RND	ola, cip, nal, nor, flum	bzc, cet, clor, SDS, tric, tri, acri, tet
<small>cip: ciprofloxacino, nor: norfloxacino, nal: ác. nalidixico, enr: enrofloxacino, flum: flumequina, , ola: olaquinox clor: cloranfenicol, tet: tetraciclina, trim: trimetoprim, acri: acriflavina, tric:tricolosan, bzc: cloruro de benzalconio, cet:cetrimide, tri:tricolosan</small>				

I.3.3. Alteración de la expresión de las proteínas dianas

Recientemente, en *S. aureus* se ha descrito que la alteración en la expresión de los genes *gyrA/gyrB* y de *griA/griB* puede alterar la susceptibilidad del microorganismo frente a las quinolonas. En concreto Ince *et al.* (Ince, 2000 y 2003) describen un aumento de resistencia debido a la reducción de la expresión de la Topoisomerasa IV, que presenta una mutación G→A 13pb gen arriba (*upstream*) del codon de inicio de transcripción. Además en el mismo mutante encuentran un incremento de la transcripción de *gyrB*, y de *topB*, postulando que este incremento puede compensar la reducción de la expresión de *parEC*. Las cepas de este estudio son mutantes obtenidos *in vitro*, por lo que aún no se conoce si este sistema de resistencia se da en cepas clínicas, y con qué frecuencia (Ince, 2003).

I.3.4. Mecanismos de transferencia de la resistencia.

Las resistencias generalmente aparecen por mutaciones y posterior selección en presencia de antibiótico, o mediante la adquisición de elementos móviles transmisibles, tales como plásmidos o transposones, integrones, etc. Mecanismos como la transducción, la conjugación o la transformación vehiculizan la adquisición o intercambio de material genético:

Por otro lado, se habla de diseminación vertical cuando la diseminación de la resistencia es por causa de un brote epidémico, como por ejemplo la diseminación de un clon epidémico de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), o se habla de diseminación horizontal cuando hay intercambio genético entre bacterias o adquisición de ADN exógeno, ya sean de la misma especie o de especies diferentes (Berger-Bachi, 2002).

Como se ha mencionado, en el caso de las quinolonas se creía que no se detectarían mecanismos de transmisión de resistencias, ya que las proteínas diana, ADN-girasa y topoisomerasa IV, así como los mecanismos de expulsión activa, se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano. Con el tiempo se ha demostrado que no era así.

En Gram-negativos, se ha descrito la transferencia de resistencia a quinolonas mediada por el gen plásmidico *qnr* (ver punto I.3.2.2), en concreto mediante conjugación y entre las enterobacterias (Fábrega, 2009). En el caso de los estreptococos del grupo viridans y *Streptococcus pneumoniae* se ha descrito la transmisión de resistencia mediante transformación (intra- o inter-recombinación), ya sea *in vitro* o en cepas clínicas, de fragmentos de *gyrA* o *parC* que contienen mutaciones de resistencia (Basalobre, 2003, de la Campa, 2004).

I.3.5. Resistencia cruzada o resistencia disociada entre quinolonas

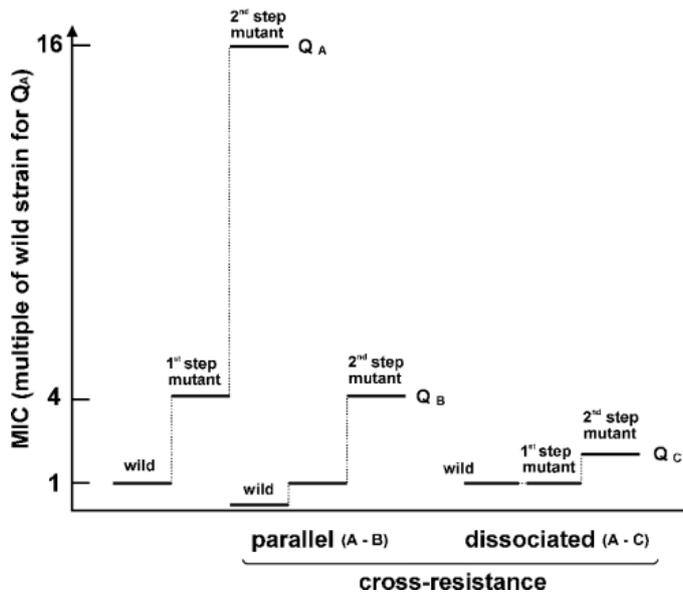
Las resistencias fenotípicas aumentan gradualmente, a consecuencia de la acumulación de mutaciones, y/o de otros mecanismos de resistencia. Si nos focalizamos solamente sobre las mutaciones, se puede afirmar que las mutaciones de primer paso ocurren normalmente sobre la diana principal, mientras que las de segundo paso, pueden acumularse en la diana secundaria, y afectar también la resistencia a las quinolonas.

Los efectos de las mutaciones puntuales en los genes de la girasa A y la topoisomerasa IV sobre el fenotipo de resistencia varían entre especies, y, en función de la quinolona utilizada. Mientras que algunas mutaciones en la diana principal pueden ser suficientes para la adquisición de una resistencia detectable, esto no ocurre siempre así. También, las mutaciones en *griA* de *S. aureus* están asociadas con bajos niveles de resistencia, y las cepas clínicas altamente resistentes suelen poseer varias mutaciones.

Normalmente, en mutantes genéticamente caracterizados, las mutaciones puntuales suelen hacer disminuir la susceptibilidad en 4-8 veces. Aunque las mutaciones de segundo orden, en las dianas secundarias, tienden a afectar menos el fenotipo de resistencia, éste aumenta un nivel más, ejerciendo cada mutación un efecto distinto sobre el fenotipo final.

Algunos autores consideran que, un patrón de resistencia cruzada entre diferentes moléculas puede ser paralelo o disociado. Es decir, paralelo, si aumentan simultáneamente los valores de CMI con las mutaciones de primer paso, o disociado, si la/s mutación/es que para una molécula producen un cambio significativo en su CMI, para otras no (figura I.14) (Sanders, 2001).

Fig. I.14. Resistencia cruzada y resistencia disociada en quinolonas. Q_A y Q_B presentan resistencia cruzada, a pesar de tener, las dos moléculas, una sensibilidad inicial distinta. Las mutaciones A y B, en las dianas provocan cambios similares en las dos moléculas. Q_C muestra una situación de resistencia disociada: la sensibilidad a la molécula C no cambia, a pesar de la adquisición de una primera mutación, y aumenta sólo, después de la adquisición de la segunda mutación (tomado de Bambeke, 2005).



Estas observaciones son importantes, ya que se puede favorecer el uso de compuestos que poseen la resistencia disociada, seleccionando mutantes con menor impacto sobre las CMI, o presentando menores frecuencias de selección de mutaciones resistencias.

Respecto a este punto, moxifloxacino y gatifloxacino, con un grupo metoxi en la posición 8, fueron las primeras quinolonas que se describieron con menor probabilidad de selección de mutantes resistentes (Jones, 2002).

De igual manera, hay especies bacterianas en las que, por sus dianas principales y/o por sus características de resistencia intrínseca, se comportan de manera muy distinta en el incremento de las CMI en mutantes resistentes. Por ejemplo, tomando la figura I.14, se podría decir que las cepas mutantes de *P. aeruginosa* se comportan como el compuesto Q_A, las de *E. coli* como Q_B, y, finalmente, las de *S. aureus* como Q_C.

I.4. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS QUINOLONAS

Las indicaciones terapéuticas de las quinolonas son numerosas y variadas, debido a la elevada potencia antibacteriana, el amplio espectro de acción y al perfil farmacocinético que presentan. Su uso comprende tanto infecciones dentro del ámbito hospitalario como en la práctica clínica ambulatoria o comunidad (Hooper 1998). Sin embargo, el conocimiento de la situación global en enfermedades infecciosas, recomendaría la restricción del uso de estos antimicrobianos a aquellas situaciones en las que el microorganismo presente multirresistencia, la infección se localice en tejidos de acceso difícil para otros fármacos, o, existan contraindicaciones para utilizar otros antibacterianos de primera línea. El motivo de estas precauciones sería el evitar la aparición indiscriminada de mutantes resistentes, y alargar la utilidad de los antibióticos, especialmente de los de amplio espectro como las quinolonas, reservándolos, por las grandes ventajas que aportan, como alternativa a muchas terapias parenterales (Hooper, 2000).

Las principales indicaciones clínicas de las quinolonas son las siguientes:

I.4.1. Infecciones del tracto urinario

Una característica de las quinolonas de primera y segunda generación es su efectividad frente a la mayoría de patógenos implicados en las infecciones urinarias (UTI, siglas en inglés), especialmente Gram-negativos, aunque, también, Gram-positivos (Hooton, 1989). Su eficacia se debe a las elevadas concentraciones que alcanzan en orina, siempre por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), necesarias para eliminar estos microorganismos, además de a su larga vida media que permite administrarlas, en muchos casos, una vez al día (Naber, 2001, Wise, 1986, Wolfson, 1989).

Debido a que también penetran en el tejido prostático y alcanzan concentraciones similares o superiores a las de suero, pueden utilizarse en la prostatitis aguda causada por *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*, pero son menos efectivas si el organismo causante es *Pseudomonas aeruginosa* o *Enterococcus* spp. (Naber, 2001, Wolfson, 1989).

Ciprofloxacino, pefloxacino, ofloxacino y levofloxacino están indicados en el tratamiento de infecciones urinarias crónicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos, incluyendo infecciones como pielitis, pielonefritis, cistitis, colecistitis y aquellas propias de pacientes que siguen diálisis peritoneal (Ronald, 1999, Rose, 1990).

En general, las fluoroquinolonas son adecuadas en la terapia de infecciones del tracto urinario no complicadas, ya que su uso y estudios comparativos con otros antibióticos demuestran que poseen mayor eficacia (Wolfson, 1989). Sin embargo, su uso en el tratamiento de cistitis no complicadas o en la profilaxis de UTI recurrentes en mujeres debe reservarse para casos en los que el uso de agentes alternativos no es recomendable, por problemas de resistencias o limitaciones de los pacientes. De hecho, estos fármacos se utilizan normalmente en infecciones recurrentes graves, en especial si el riñón está afectado, y/o en ancianos, cuando la terapia con antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos y trimetoprim ha fracasado (Fang, 1991). Por otro lado, las fluoroquinolonas, con buena excreción renal, se han convertido en los fármacos de elección en pielonefritis y UTI complicadas.

El beneficio adicional frente a Gram-positivos y anaerobios de la cuarta generación de quinolonas no aporta un valor extraordinario en el tratamiento de las infecciones urinarias, aunque la gravedad y patógeno causal en casos excepcionales puede recomendar su uso. Por tanto, a pesar que gatifloxacino (en su momento) y gemifloxacino han demostrado equivalencia frente a ciprofloxacino en la erradicación de patógenos sensibles, las demostradas eficacia y seguridad de ciprofloxacino y levofloxacino siguen recomendando su utilización en esta indicación (Naber, 2001).

I.4.2. Enfermedades de transmisión sexual (ETS)

Las características farmacocinéticas de las quinolonas junto a su amplio espectro de acción, que cubre la mayoría de patógenos involucrados en las ETS, hacen que puedan utilizarse en esta indicación. Las quinolonas han adquirido un rol significativo en el tratamiento de este tipo de pacientes, en especial por su posología y facilidad de seguimiento, que complementan a su potente eficacia frente a los microorganismos causantes de la gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae*, y del chancro blando, *Haemophilus ducreyi* (WHO, 2001c).

Es igualmente importante, la actividad complementaria que poseen algunas quinolonas frente a otros patógenos genitales como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, aunque no son activas frente al agente causante de la sífilis (*Treponema pallidum*) (Ridgway, 1999, Vall, 2004).

En resumen, las quinolonas se utilizan en el tratamiento de: Uretritis gonocócica no complicada, cervicitis, infecciones por *Chlamydia*, Chancro blando o chancroide. Estas infecciones pueden ser tratadas o con fluoroquinolonas de segunda o tercera generación, en función de su actividad, en monoterapia o combinadas con anti-anaerobios, excepto las de cuarta generación, con espectro ampliado (Cacho, 2001).

Las quinolonas poseen restricciones de uso frente a adolescentes y mujeres embarazadas o bajo riesgo de estarlo. El rol de estos compuestos en el control estratégico de las ETS parece posible, ya que tiene a favor su actividad destacada frente a *N. gonorrhoeae* y, en menor medida, frente a *C. trachomatis*, aunque es necesario confirmarlo con nuevos estudios frente al resto de microorganismos implicados.

La excelente eficacia que presentaban, hace unas décadas, los tratamientos únicos de ciprofloxacino frente a este tipo de infecciones se vio ensombrecida por la aparición de resistencias a las quinolonas debido, posiblemente, a una errónea utilización de las mismas. En estos momentos, esta amenaza debe controlarse con una política sanitaria global que ayude a conservar la eficacia de los antibióticos disponibles, y, a la identificación de nuevos compuestos (Tapsall, 2001).

I.4.3. Infecciones gastrointestinales

Las quinolonas han sido de utilidad para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, desde la aparición del ác. nalidíxico, especialmente en procesos gastroentéricos agudos (Hassan, 1970). Son potentes inhibidores de la mayoría de las bacterias patógenas conocidas del tracto gastrointestinal incluyendo *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* spp. y, *E. coli* enterotoxigénica (Akalin, 1995, Wolfson, 1989).

Cuando se introdujeron, las fluoroquinolonas eran extremadamente activas frente a todas las bacterias patógenas entéricas, y, entre más de 50 y 100 veces más potentes que el ác. nalidíxico (Bryan, 1990, Goodman, 1984, Newman, 1998). Ciprofloxacino era el compuesto más activo, dos o tres veces más, que el resto de compuestos de la familia, aunque se usaban indistintamente las fluoroquinolonas existentes, ya que las concentraciones en el lugar de la infección eran más de 100 veces superiores a las CMI. Con la aparición de cepas con susceptibilidad disminuida, las diferencias entre las distintas quinolonas han adquirido importancia, y su uso está más controlado. CMI superiores a 32 mg/L para el ác. nalidíxico (una sola mutación en *gyrA*) aumentan en 10 veces la CMI de las fluoroquinolonas, aunque suelen estar aún por debajo de su punto de corte de resistencia (Ruiz, 2002, Threlfall, 1999).

Las fluoroquinolonas, después de más de 20 años de uso clínico, están entre los antibióticos recomendados para tratar, por ejemplo, la diarrea del viajero (especialmente con resistencias a trimetoprim-sulfametoxazole), las salmonelosis invasivas o severas, la fiebre entérica por *S. enterica* serovar Paratyphi, el cólera y la shigellosis (Gomi 2001, Khan, 1997, Leibovitz, 2000, Martin, 2006). El desarrollo de resistencias ha limitado su uso en las infecciones por *Campylobacter*, y, pelagra su uso en las fiebres entéricas (Engberg, 2001).

En cambio, está bien valorado el uso de las quinolonas en pacientes inmunocomprometidos, en especial los que reciben quimioterapia, puesto que conlleva una ruptura de la integridad de la mucosa gastrointestinal y el consecuente riesgo de padecer una bacteriemia por bacilos Gram negativos de origen intestinal (Wolfson, 1989). A pesar de las reticencias iniciales al uso de quinolonas en niños con infecciones gastrointestinales, grupo que presenta mayor incidencia de casos, los datos disponibles no muestran, tras su uso en el tratamiento de diarreas severas en niños, efectos tóxicos ni artropatías atribuibles a las quinolonas que comprometan su utilización (Grady, 2003, Grendel, 2008, Leibovitz, 2000, Traa, 2010, WHO 2005).

En general, en infecciones gastrointestinales, se utilizan norfloxacin, ciprofloxacino, pefloxacino y ofloxacino, porque alcanzan buenas concentraciones en el intestino (5 a 10 veces superiores a las plasmáticas), por su capacidad de inhibir de forma selectiva la flora bacteriana aerobia Gram-negativa con poco efecto sobre la flora anaerobia intestinal, y, porque se eliminan parcialmente por la bilis. Este uso de las quinolonas como profilaxis en pacientes neutropénicos y oncológicos debe llevarse a cabo con precaución debido a la aparición de resistencias asociadas a su uso continuado (Akalin, 1995, Krcmery, 1995).

I.4.4. Infecciones respiratorias

Es relevante la susceptibilidad a las fluoroquinolonas de los patógenos respiratorios, tanto Gram negativos (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*) como Gram positivos (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*). Además, las quinolonas de la última generación son activas incluso frente a otros patógenos respiratorios atípicos como *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, y *Mycobacterium tuberculosis* (Ferrara, 2005, Shopsis, 2004).

Las fluoroquinolonas presentan características farmacocinéticas favorables para el tratamiento de infecciones respiratorias causadas por estas bacterias ya que penetran bien en el parénquima pulmonar, fluidos bronquiales y macrófagos alveolares, alcanzando concentraciones similares o superiores a las halladas en suero, lo que asegura su eficacia *in vivo* (Blondeau, 1999, Neuman, 1988).

Se han demostrado distintos grados de eficacia frente a la mayoría de infecciones respiratorias de las quinolonas de segunda, tercera y cuarta generación, como ciprofloxacino, ofloxacino, pefloxacino, enofloxacino, levofloxacino, esparfloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino, gemifloxacino (Hooper, 2000, Lowe, 2000).

Se utilizan ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias superiores y otorrinolaringológicas, como amigdalitis, sinusitis y otitis media (Blondeau, 1999). En el caso de las infecciones en vías respiratorias inferiores (neumonía nosocomial, neumonía adquirida en la comunidad, fibrosis quística, bronquitis aguda) se utilizan esas mismas quinolonas y, en infecciones graves las de última generación (Blondeau, 2008). Moxifloxacino se aprobó por la FDA en 1999 y gemifloxacino en 2003, ambas para neumonías de la comunidad y exacerbación bacteriana aguda de la bronquitis crónica, mientras que moxifloxacino está además aprobado para sinusitis bacteriana aguda. Su eficacia en los estudios clínicos es muy similar a la de los beta-lactámicos con inhibidores de beta-lactamasas y macrólidos, aunque su actividad *in vitro* es superior (Ball, 2000a).

Moxifloxacino y gemifloxacino (Karageorgopoulos, 2009) son las fluoroquinolonas comercializadas con actividad más potente frente a los patógenos respiratorios, como *S. pneumoniae* incluso resistente a penicilina o multiresistente, en comparación con ciprofloxacino. También poseen actividad frente a patógenos atípicos respiratorios, y mayor actividad que ciprofloxacino frente a bacterias anaeróbicas. En cambio, no poseen una excelente actividad frente a MRSA, y son menos activos que ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa*. Poseen muy buena biodisponibilidad por vía oral, y un tiempo de vida media que les permite una sola administración diaria (Blondeau, 2008, Keating, 2004).

El uso apropiado de las quinolonas para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, genera mucha discusión entre los investigadores (Eliopoulos, 2004, Low, 2004, Martínez, 2004,

UNICEF, 2006). Un motivo es la posible emergencia de resistencias a quinolonas, particularmente entre *S. pneumoniae* (Eliopoulos, 2004, Low, 2004), y, más recientemente, entre *H. influenzae* (Nazir, 2004). Aunque en estos momentos, la resistencia global a las quinolonas entre los neumococos es muy baja (< 5%), preocupa el hecho que la incidencia esté aumentando (Low, 2004). De todas maneras, este incremento de resistencia se ha observado frente a aquellas quinolonas que poseen una modesta actividad *in vitro* frente a las cepas (Davidson, 2002, Ross, 2002, Urban, 2001, Workman, 2002). Por tanto, existe la posibilidad que el uso de quinolonas de las últimas generaciones, con potente actividad, pueda retrasar la aparición de resistencias (Andriole, 2005b), a la vez que combatir mejor las infecciones respiratorias para las que se consideran adecuadas.

I.4.5. Infecciones osteoarticulares

El agente causal más común de osteomielitis bacteriana es *Staphylococcus aureus*, aunque también son frecuentes las infecciones polimicrobianas en las que están implicados patógenos Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacteriaceae* (Wolfson, 1989), cada vez más resistentes a la combinación terapéutica de primera opción (β -lactámico más aminoglucósido) (Wolfson, 1989). Una alternativa al tratamiento tradicional es la administración oral de fluoroquinolonas, como ciprofloxacino y ofloxacino, que llegan fácilmente al tejido óseo y presentan un espectro de acción adecuado (Lew, 1999a), la combinación con rifampicina, o compuestos de última generación como moxifloxacino (Keynan, 2004).

Los pacientes con osteomielitis necesitan para su curación una aproximación quirúrgica asociada a un tratamiento profiláctico con antibiótico de larga duración. Excepto rifampicina y las quinolonas, los antibióticos penetran con dificultad en el hueso, y los niveles son bastante bajos. Para obtener tasas de curación aceptables, el tratamiento, normalmente parenteral, debe prolongarse durante varias semanas. Las quinolonas presentan ventajas para el tratamiento de este tipo de infecciones, debido a su buena biodisponibilidad oral, sus niveles en tejido óseo por encima de las CMI de las especies patógenas implicadas y sus relativamente escasos efectos tóxicos (Lew, 1999b), además de la disminución del coste del tratamiento.

I.4.6. Infecciones de la piel y estructuras relacionadas (SSSIs)

Las infecciones de la piel y estructuras relacionadas (SSSIs, siglas en inglés) agrupan a un amplio rango de indicaciones clínicas con diversos grados de severidad (no complicadas – uSSSIs- y complicadas –cSSSIs-). Las infecciones de piel y de estructuras relacionadas representan una buena parte de las enfermedades infecciosas (Giordano, 2007), y son responsables aproximadamente del 10% de todas las admisiones hospitalarias (CDC, 2001).

La terapia antimicrobiana ha demostrado ser claramente beneficiosa tanto para la cura de las infecciones como para la prevención de la progresión y dispersión de la infección, aunque hay algunas excepciones que no necesitan tratamiento antibiótico.

Las fluoroquinolonas son unos antibióticos potentes y con amplio espectro, y, las nuevas quinolonas, como se ha mencionado, poseen actividad elevada frente a los patógenos Gram-positivos, actividad frente a bacterias anaeróbicas y se mantienen activos frente a bacilos Gram-negativos. Varias fluoroquinolonas han sido evaluadas en el tratamiento de uSSSs y cSSSIs. Las tasas de curación clínica se consideraron equivalentes a las de los comparadores, sugiriendo un rol para el tratamiento de estas infecciones con quinolonas, en combinación o no, con antibióticos anti-anaerobios.

El alcance de las SSSI es amplio, tanto por las estructuras anatómicas afectadas como por los patógenos involucrados, y se dividen en dos categorías: no complicadas y complicadas (FDA, 1998).

En la categoría de SSSIs no complicadas o uSSSIs estarían los abscesos simples, impétigo, forunculosis y celulitis; las heridas traumáticas sobreinfectadas se pueden considerar en este grupo, cuando la infección está causada por bacterias comensales de la piel aprovechando

lesiones cutáneas. Estas infecciones son típicamente monomicrobianas y causadas por bacterias Gram-positivas, normalmente por *S. aureus* y *Streptococcus* del grupo A (DiNubile, 2004).

Las cSSSIs normalmente incluyen capas o estructuras inferiores de la piel, o, coexisten en pacientes con inmunosupresión u otras comorbilidades (Nichols, 1999). Se incluyen en esta categoría: absesos, heridas y quemaduras infectadas, mordeduras de animales infectadas e infecciones del pie diabético. Las infecciones complicadas pueden incluir subtipos no complicados, pero que estén en localizaciones anatómicas que predispongan a la combinación con infecciones polimicrobianas (DiNubile, 2004). Otras entidades como fascitis necrotizante e infecciones que implican materiales prostéticos se tratan de manera separada, por su naturaleza especial.

Las uSSSIs están causadas normalmente por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, y la terapia empírica, normalmente con cefalosporinas de primera generación, se dirige sólo frente a estos microorganismos Gram-positivos sensibles (Guay, 2003). Las fluoroquinolonas como levofloxacino, gatifloxacino y moxifloxacino están todas aprobadas por la FDA para uSSSI, pero debido a su amplio espectro y potencia se reservan normalmente para infecciones en las que las cepas sean resistentes a los antibióticos de primer uso (Martin, 2004, Raghavan, 2004, Stevens, 2005).

En los últimos años, la emergencia de cepas MRSA, primero de origen hospitalario (HAMRSA), y, a partir de mediados de los 90, también de origen no hospitalario o ambulatorio (CAMRSA), ha conducido a modificar el tratamiento de, incluso, las infecciones no complicadas. Por MRSA se entienden aquellas cepas que son resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos, incluyendo a penicilinas y cefalosporinas (Crawford, 2007). Las CAMRSA son más virulentas aunque menos multiresistentes que las HAMRSA, por tanto, sensibles a fármacos frente a los que las HAMRSA son resistentes, como clindamicina. La transmisión de CAMRSA entre miembros de una misma comunidad o nicho es más fácil. En algunas localizaciones, las cepas de MRSA representan más del 50% de los *S. aureus* aislados de uSSSIs (Frazee, 2005). Los tratamientos antibióticos empíricos son diferentes en función de la procedencia de la cepa, y, dependen de la severidad de la patología, del tipo de cepa y de la epidemiología de la zona geográfica.

El abordaje inicial de SSSIs por MRSA, con pus y sin síntomas asociados de infección sistémica, debe ser realizar un desbridamiento y drenaje, con o sin tratamiento antibiótico, siempre en función del área de la lesión (Daum, 2007). En ocasiones, en infecciones de impétigo, el tratamiento tópico es suficiente con bacitracina, mupirocina, ác. fusídico o retapamulina, por ejemplo, siempre y cuando se obtenga una rápida mejoría (Gentry, 2007, Jones, 2006).

En el caso de considerar adecuado un tratamiento empírico oral, con los beta-lactámicos descartados, no está claro cuál debe ser la primera opción. Las quinolonas, de las primeras generaciones, pueden seguir siendo activas, aunque se compromete su actividad en algunos casos, y es mejor asegurar la sensibilidad de las cepas, mientras que se pueden seleccionar trimetoprim/sulfametoxazole, clindamicina y las tetraciclinas. En el caso de linezolid o rifampicina, deberían ser reservados, al igual que las quinolonas de cuarta generación, para no incrementar las resistencias o asegurar la eficacia en infecciones más graves o con gérmenes multiresistentes (Daum, 2007, Fiebelkorn, 2003, Frazee, 2005, Weber, 2003). Se podrían añadir otros antibióticos, de uso exclusivamente parenteral, como vancomicina, daptomicina o tigeciclina (Daum, 2007), al tratamiento no de primera línea.

De igual manera, al ser las cepas de CAMRSA muy frecuentes en absesos y otras infecciones con pus, es muy importante valorar qué infecciones pueden controlarse sólo con desbridamiento, drenaje y antiséptico, en pacientes inmunocompetentes (Lee, 2004). Por otro lado, un abordaje para disminuir la posibilidad de infección sistémica por MRSA, son las terapias de descolonización, que se realizan en aquellos casos que se considera necesario para evitar infecciones sistémicas tras cirugías o en pacientes de riesgo; estudios publicados indican que la descolonización es efectiva, aunque normalmente, también transitoria (Huang, 2006, Ridenour, 2007).

En cSSSIs, además de las bacterias Gram-positivas como patógenos más frecuentes (Rennie, 2003), se detecta mayor incidencia de bacterias Gram-negativas y anaeróbicas (Yee, 2005). Los Gram-negativos suelen incluir a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterobacter cloacae* (Rennie, 2003). Adicionalmente, la flora entérica, normalmente enterococos y anaerobios, es más importante cuando la piel infectada está en la mitad inferior del cuerpo (File, 1995). Los anaerobios más comúnmente aislados son típicamente de las especies *Prevotella*, *Bacteroides*, y *Peptostreptococcus*, y pueden llegar a representar el 10% de los causantes de las infecciones (Giordano, 2005).

Muchos de los pacientes con cSSSI son tratados a nivel hospitalario con antibióticos endovenosos, aunque no hay consenso respecto a la terapia empírica (Rhagavan, 2004). Los antibióticos más frecuentemente utilizados son cefalosporinas de amplio espectro y la combinación de penicilina/inhibidor de penicilinasas. Moxifloxacino, de amplio espectro incluyendo a anaerobios, está indicada para el tratamiento de este tipo de infecciones, y se puede utilizar como monoterapia (Rhagavan, 2004).

Un uso moderadamente restringido a infecciones más graves, posiciona favorablemente a las fluoroquinolonas (Fernández-Obregón, 2005) en el tratamiento de úlceras infectadas de decúbito, abscesos subcutáneos, celulitis (Hooper, 2000), y otras infecciones de piel graves y/o recurrentes, como el pie diabético y heridas quirúrgicas sobreinfectadas (Karchmer, 1999). Ciprofloxacino se puede utilizar para cSSSIs por *P. aeruginosa* y Enterobacterias. Ofloxacino para infecciones por Gram-positivos y temafloxacino para infecciones por anaerobios (Gentry, 1991). Moxifloxacino ha demostrado igual eficacia que cefalexina frente a SSSIs, a una concentración menor y con un tratamiento de 7 días, una vez al día, respecto a 7 días, tres veces al día (Parish, 2001).

Moxifloxacino, es un buen ejemplo de fármaco eficaz en este tipo de infecciones complicadas, una dosis única diaria, fácil transición a terapia oral y excelente perfil de seguridad. Sin embargo, en paralelo al reconocimiento de la eficacia de las quinolonas, la prudencia médica y de las autoridades sanitarias no recomienda utilizar a estos antibióticos como primera opción, por su eficacia frente a patógenos Gram-negativos, que no tienen fácil tratamiento, y, se prefiere reservarlos como monoterapia frente a aquellas infecciones polimicrobianas en las que se sospeche la presencia de bacterias Gram-negativas, y/o anaerobios, junto a los Gram-positivos típicos (Gorwitz, 2006, FDA, 2005).

En resumen, con el aumento de la prevalencia de infecciones por CAMRSA, el tratamiento de las SSSIs requiere el conocimiento de la epidemiología en las zonas determinadas, aunque se sugiere un límite arbitrario mínimo de un 10% de MRSA en los *S. aureus* causantes de SSSIs. Por tanto, la terapia frente a este tipo de infecciones debe ir dirigida por los resultados de susceptibilidad de los cultivos o por la sensibilidad de las cepas, idealmente, antes del inicio del tratamiento (Gorwitz, 2006, FDA, 2005).

I.4.7. Infecciones intraabdominales y pélvicas

La terapia antimicrobiana es imprescindible para el control y tratamiento de las infecciones intraabdominales y pélvicas relacionadas, especialmente, con intervenciones quirúrgicas. La relevante disminución de la morbilidad ha sido debida a la potencia de los antibióticos disponibles, especialmente las quinolonas (Nord, 1999, Solomkin, 1992).

Escherichia coli, *Bacteroides fragilis* y otras especies de *Bacteroides* son los patógenos más comunes asociados con las infecciones gastrointestinales, además de bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (Solomkin, 2010). Las quinolonas pueden utilizarse en el tratamiento de infecciones intraabdominales (peritonitis, absceso intraabdominal, pancreatitis), ginecológicas (endometritis, enfermedad inflamatoria pélvica) y andrológicas (prostatitis, epididimitis), aunque, si se utilizan ciprofloxacino o levofloxacino, deben administrarse con metronidazol (Solomkin, 1998), o reemplazar con las quinolonas de la última generación activas también frente a bacterias anaeróbicas, como moxifloxacino y clinafloxacino (Nord 1999, Solomkin 2001 y 2010).

La seguridad y eficacia del tratamiento con quinolonas, apoyada en su buena farmacocinética y farmacodinamia en el tejido abdominal inflamado, en este tipo de infecciones está bien documentada en estudios y en su uso clínico (Falagas, 2007).

I.4.8. Infecciones del Sistema Nervioso Central

Las quinolonas tienen dos propiedades importantes que sugieren que pueden ser apropiadas para el tratamiento de infecciones del Sistema Nervioso Central (CNS): una excelente actividad *in vitro* frente a los patógenos de las meninges más frecuentes (*H. influenzae*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*), y, una buena penetración en los espacios extravasculares, incluyendo el fluido cerebroespinal (CSF) (Andes, 1999, Chowdhury, 2000).

Las concentraciones que se consiguen en CSF se correlacionan directamente con la potencia *in vivo* de cada molécula, y la actividad bactericida se correlaciona con la potencia *in vitro*, justificando el uso selectivo de estos productos en las meningitis bacterianas causadas por Gram-negativos sensibles (Stahl, 1986), y, aunque con menores datos, por Gram-positivos sensibles (Schmidt, 1993).

Las quinolonas no deben usarse empíricamente como fármacos de primera elección, sino sólo para *P. aeruginosa* multiresistentes (Wong-Beringer, 1997, Lambert, 2002), o, cuando la respuesta a los beta-lactámicos sea lenta (Sanders, 1988). De igual manera, el uso de las quinolonas está parcialmente contraindicado en niños, aunque ciprofloxacino se considera adecuado en el tratamiento de infecciones graves en pacientes pediátricos, cuando el beneficio se considera que supera al riesgo (Price, 2000, Saez-Llorens, 2002, Workman, 1999).

Por tanto, las fluoroquinolonas tienen un rol limitado en la terapia en meningitis bacterianas (Lutsar, 1998, Sanders, 1988), sin suplantar, a los regímenes de primera elección, aunque ciprofloxacino puede ser utilizado con éxito en la erradicación del estatus de portador de meningococo, reemplazando a rifampicina en esta indicación para adultos, y quizás en niños (Gaunt, 1988). Las nuevas quinolonas, además de abordar infecciones causadas por Gram-positivos sensibles, pueden hacer la misma función en la erradicación del estatus de portador nasofaríngeo de *H. influenzae*.

I.4.9. Endocarditis

El espectro y las características farmacocinéticas de las quinolonas las han posicionado en el grupo de compuestos con utilidad para el tratamiento de endocarditis bacterianas, patologías de elevada morbi-mortalidad (Gudiol, 2009). En particular, las nuevas generaciones de quinolonas, al poseer un espectro *in vitro* que cubre a los organismos asociados con las formas particularmente recalcitrantes como *S. aureus* (MSSA y MRSA), *P. aeruginosa* y *Coxiella burnetti* se posicionan como agentes prometedores para tratar este tipo de infecciones (Eliopoulos, 1984, Raoult, 1999, Yebra, 1990). Algunas de estas formas de endocarditis bacterianas se han asociado con fallos terapéuticos de los tratamientos estándar (Karchmer, 1985, Reyes, 1983).

En este tipo de infecciones, los modelos animales han sido de extrema utilidad, especialmente por la dificultad de asegurar la esterilización de las vegetaciones infectadas con $>10^7$ - 10^9 bacterias/g de tejido, y en presencia de un cuerpo extraño, como suelen ser los catéteres. Son infecciones complicadas de tratar por diversos motivos: hay antibióticos para los que es difícil atravesar la barrera mecánica de las vegetaciones infectadas, y algunas especies están en fase metabólica de crecimiento aparentemente inactiva, por lo que se reduce la eficacia de los antibióticos cuya diana es la pared celular (Durack, 1982, Galani, 2009, García-de-la-Maria, 2010, Marco, 2008).

Se están estudiando los nuevos antibióticos frente a Gram-positivos y las nuevas quinolonas como agentes prometedores en este tipo de infección, a pesar de la amplia utilización de otros

fármacos como vancomicina (Anguita-Alonso, 2006, Galani, 2009, García-de-la-Maria, 2010, Marco, 2008). Se considera una posible ventaja, de las nuevas quinolonas, su actividad bactericida dosis dependiente, que normalmente se mantiene en presencia de inóculos elevados y en fase estacionaria de crecimiento. Las quinolonas suelen mantenerse activas a pH ácido (microambiente en abscesos metastáticos, complicación de las endocarditis bacterianas), y distribuyen bien a través de las vegetaciones cardíacas en modelos experimentales (Anguita-Alonso, 2006). Otro punto a favor de las quinolonas es que suelen actuar sinérgicamente con las defensas del organismo. No se consideran tratamientos de primera elección pero, desde ofloxacin en combinación con doxiciclina para *Coxiella* spp, ciprofloxacino en endocarditis por *Legionella* spp., o las nuevas quinolonas para endocarditis por *Mycoplasma*, con tratamientos de hasta 6 meses, son eficaces en el control de esta patología. Para el tratamiento empírico de algún subtipo de endocarditis se recomienda ciprofloxacino con vancomicina y gentamicina (ESC, 2009, Que, 2011).

I.4.10. Infecciones oculares y otorrinolaringológicas

Las quinolonas presentan una buena actividad frente a los patógenos más frecuentes oculares, son bien toleradas, y se alcanzan concentraciones terapéuticas en lágrimas, córnea y el humor acuoso, tras aplicaciones tópicas (Barza, 1991). Se dispone de formulaciones oftálmicas de diversas fluoroquinolonas (como ciprofloxacino, ofloxacin y levofloxacino), y se usan comúnmente, como gotas oculares, para el tratamiento de infecciones oculares externas, como conjuntivitis y queratitis (infección de la córnea), y, está en discusión su uso en endoftalmitis (infección del humor vítreo y/o del humor acuoso) (Calleghan, 2003, Rubinstein, 2003).

Estudios en humanos con conjuntivitis o queratitis muestran similar eficacia a los tratamientos de primera elección (tetraciclinas), aunque la excepción son las conjuntivitis por *Chlamydia*, en las cuales funcionan mejor las quinolonas (Rubinstein, 2003).

Las quinolonas administradas sistémicamente alcanzan concentraciones terapéuticas en los tejidos oculares externos (anteriores), y la combinación de tratamientos tópicos y sistémicos puede conseguir mayores concentraciones en la córnea y en humor acuoso, que únicamente la terapia tópica (Donnenfeld, 1997, Ozturk, 1999). En función de la quinolona, la penetración en el humor vítreo tras tratamiento sistémico proporciona concentraciones superiores a la CMI de muchos de los patógenos causantes de endoftalmitis. La inyección intraocular es la ruta de administración seleccionada para el tratamiento de esta infección. Mientras que el rol de la terapia adyuvante con antibióticos sistémicos es incierto, la combinación de las quinolonas por vía intraocular y oral se ha utilizado en estas infecciones (Maichuk, 1998, Miller, 2003, Okhravi, 1997, Parkkari, 1995).

Esta habilidad para conseguir mayores concentraciones en el humor vítreo y en el humor acuoso, cuando se usan simultáneamente quinolonas tópicas y sistémicas, sugeriría que esta terapia combinada podría ser considerada para pacientes con queratitis bacteriana. La combinación de quinolonas tópicas y orales podría ayudar a mantener concentraciones terapéuticas, cuando el cumplimiento pelagra debido a la necesidad de administraciones frecuentes (p.ej. nocturnas). Por otro lado, sólo las quinolonas lipofílicas muestran una buena penetración en el humor vítreo en ausencia de inflamación (Rubinstein, 2003).

Los datos en estudios animales parecen apuntar que la administración sistémica de quinolonas, usadas como terapia adyuvante de las endoftalmitis, puede ser mejor que la intraocular, y sobretodo, puede ser muy prudente y ventajoso usar quinolonas que posean tanto una buena penetración ocular como actividad antiestafilocócica (Barza, 1991).

Por otro lado, las infecciones del oído, nariz y garganta son las más comunes entre las infecciones no hospitalarias, y las quinolonas son una opción terapéutica muy valorada para el tratamiento de algunas de las infecciones otorrinolaringológicas. Las ventajas de esta familia de compuestos son la disponibilidad de formulaciones orales y tópicas, su baja toxicidad y la excelente penetración en las secreciones nasales, la saliva y el hueso (Barza, 1988).

Las fluoroquinolonas orales son los fármacos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Las quinolonas tópicas son ideales para la otitis media supurativa crónica, y la otorrea por perforación del tímpano. Sin embargo, las quinolonas sistémicas no están indicadas para la otitis media no necrotizante, y, tampoco se recomiendan como terapia inicial para la otitis media, la sinusitis, o la faringotonsilitis (Rubin, 1988). De hecho, se han incluso descrito casos de bacteremia por neumococos después de una terapia fallida con ciprofloxacino (Frieden, 1990).

Por otro lado, ciprofloxacino se ha utilizado para controlar y erradicar la carga nasal de *Neisseria meningitidis*, frente a la que posee una buena actividad, al igual que está recomendada rifampicina (CDC, 1997).

I.4.11. Septicemias e Infecciones en Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs)

Las fluoroquinolonas se utilizan para el tratamiento de infecciones hospitalarias en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), por su potente actividad frente a bacterias Gram-negativas resistentes, por su actividad frente a enterococos resistentes a vancomicina (principalmente en Estados Unidos), y por su baja asociación con las colitis por *C. difficile*, aunque hay cierta controversia en esta última afirmación (Rubinstein, 2003).

Sin embargo, el amplio uso de las fluoroquinolonas en las UCI de algunos hospitales, ha llevado a un aumento de la proporción de microorganismos resistentes (Carmeli, 1999, Coronado, 1995, Villers 1998), y, por tanto, a un cambio de estrategia antibiótica. Por otro lado, en aquellas zonas donde se mantenga la actividad de estos compuestos, está justificado su uso, y a la vez su consideración prudente para el tratamiento empírico de infecciones hospitalarias (Mulvey, 2009).

El uso profiláctico de las quinolonas en los pacientes inmunosuprimidos ya no se recomienda, sino que reservan para infecciones declaradas. En estos momentos, por ejemplo, las fluoroquinolonas levofloxacino y moxifloxacino, con su actividad mejorada frente a Gram-positivos, se utilizan como tratamientos alternativos en las septicemias, en función de la resistencia de los patógenos implicados, la presencia de microorganismos asociados, comorbilidades de los pacientes, etc, aunque no son de primera elección. Quizás gemifloxacino o alguna otra molécula, con mayor potencia frente a Gram-positivos multiresistentes, puedan ser alternativas útiles para el tratamiento de este tipo de infecciones (Fung-Tomc, 2000, Kang, 2004).

En los últimos años, ha habido un aumento en el número de enfermedades y patologías que se tratan en las UCIs, y también, un aumento de la prevalencia y severidad de las infecciones hospitalarias. Se considera a las UCI como el punto de encuentro entre las infecciones hospitalarias y las adquiridas en la comunidad, o en ambiente no hospitalario (Livermore, 2009). La septicemia, en particular, está comúnmente asociada a la presencia de una vía parenteral; un 10% de los pacientes ingresados en UCIs con catéteres intravenosos, durante más de 72 horas, desarrollan una infección sistémica (Rubinstein, 2003). En un reciente corte de prevalencia de un día realizado en 1.265 UCI de 75 países (Vincent, 2009) cerca del 20% de los 14.414 pacientes tenían diagnóstico de bacteriemia o infección relacionada con catéter vascular (BP/BRC). En España, los datos recogidos por el registro ENVIN-HELICS del año 2010 indican que las BP/BRC, excluidas las bacteriemia secundarias a otros focos, constituyen aproximadamente el 17% de las infecciones controladas por el registro (SEMICYUC, 2011).

Patógenos causantes comunes son *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*, ambos normalmente resistentes a meticilina, aunque, en pacientes neutropénicos con profilaxis antibiótica tienen mayor relevancia las especies de Gram-negativos (Lautenbach, 2001, Mermel, 2001). Entre los Gram-negativos ha aumentado significativamente la resistencia a antibióticos, como las fluoroquinolonas y los beta-lactámicos (cefalosporinas, en particular), por lo que se recomienda dirigir la terapia hacia los patógenos teniendo muy en cuenta la epidemiología y su probable perfil de resistencia (Gudiol, 2009).

Además, el aumento de la emergencia y transmisión de cepas multiresistentes en los hospitales, que están bajo presión antibiótica, coincide con la disminución de los antibióticos disponibles para combatirlas (Kollef, 2000). En muchas UCI, el 100% de los pacientes reciben profilaxis antibiótica cuando superan las 48h de ingreso, y se puede hablar de una incidencia total de las infecciones adquiridas en la UCI del 20,3% (Alvarez-Lerma, 2005, Legras, 1998).

En general, los microorganismos patógenos más frecuentemente asociados en infecciones hospitalarias en UCI son Enterobacterias (34,4%), *Staphylococcus aureus* (30,1%, un 60% de MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (28,7%), estafilococos coagulasa negativos (19,1%) y hongos (17,1%) (Vincent, 1995). Dentro de cada uno de ellos, la resistencia a los antibióticos es distinta entre países y entre hospitales.

La etiología más frecuente de las bacteremias por catéter son *Staphylococcus coagulasa-negativos* (SCN), que causan cerca del 40% de todos los episodios (Sánchez-García, 2011), el 72% de las producidas por grampositivos. *Staphylococcus epidermidis* causa aproximadamente dos tercios de las bacteremias primarias y relacionadas con catéter, por SCN, el 25% del total. Se considera que el origen habitual de estos es la piel circundante y las conexiones de los catéteres (Harbarth, 2002, Vincent, 2009).

Para los patógenos Gram-negativos resistentes, las fuentes más comunes en las UCI son las infecciones del tracto respiratorio y del tracto urinario. La neumonía ocurre entre un 9-20% de los pacientes que requieren ventilación mecánica, con una mortalidad asociada entre el 20-80% (Hanberger, 1999). Estas infecciones están causadas en un 75-90% de las veces por Gram-negativos, como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* con beta-lactamasas de espectro ampliado, y *Stenotrophomonas maltophilia*, entre otros, normalmente resistentes a más de un antibiótico. Los patrones de resistencia a las fluoroquinolonas, y a algunos antibióticos, en general, varían ampliamente entre hospitales, y por tanto, las recomendaciones del tratamiento antibiótico han de ser diferentes entre ellos.

La terapia empírica inicial deber ser eficiente al máximo frente a los posibles patógenos, hasta disponer de la identificación y perfil de susceptibilidad de los mismos, el retraso en la terapia eficaz en infecciones graves produce un aumento significativo de la mortalidad (Kollef, 2000).

I.4.12. Otros usos

I.4.12.1. Quinolonas en Pediatría

Los antibióticos son los agentes terapéuticos más utilizados en pediatría, la mayoría para tratar infecciones comunes como otitis media, faringitis, neumonía y otras infecciones respiratorias que se diagnostican a nivel ambulatorio. En muchos de estos casos, la prescripción es inapropiada y la sobreutilización o mal uso de antibióticos, un problema especialmente preocupante en este grupo de la población (Rossignoli, 2005, Mangione-Smith, 2005). Otras infecciones como las de piel y tejidos asociados, tracto genitourinario, huesos y articulaciones, o del sistema nervioso central son tratados a nivel hospitalario, dentro de políticas de control antibiótico más rigurosas (Chavez-Bueno, 2009).

Ciprofloxacino es la única quinolona aprobada para su uso en niños, y lo es en infecciones complicadas del tracto urinario, pielonefritis y post-exposición a ántrax por inhalación (Chavez-Bueno, 2009). Otras quinolonas aprobadas en adultos como levofloxacino, ofloxacino y norfloxacino, y de más reciente aparición, como gemifloxacino y moxifloxacino, se utilizan, sólo esporádicamente en niños, aunque cada vez se dispone de más datos de su uso como agentes de segunda o tercera opción en infecciones graves (Chien, 2005, Pinon, 2010). En general, los datos de farmacocinética en niños son muy escasos, aunque el aumento de su uso en infecciones en niños con fibrosis quística o otitis media aguda están ayudando a su mejor conocimiento (Leibovitz, 2006). De hecho, como primera opción, se administran básicamente en niños con infecciones sistémicas muy graves o con infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística.

El uso de las quinolonas en niños se vió limitado por la aparición de artropatías en estudios con animales juveniles (Leibovitz, 2006, Stahlmann, 1999). Existe mucha información preclínica sobre la aparición de artropatías en animales de experimentación, debido a la toxicidad articular de las quinolonas y la afectación de los cartílagos en animales jóvenes (Forsythe, 2007, Leibovitz, 2006). A pesar de que la patogénesis no se conoce completamente, está demostrada en animales jóvenes, aunque no se ha demostrado la asociación con aparición de artropatías irreversibles tras su utilización en niños (Forsythe, 2007). De todas maneras, aunque la asociación es débil, es prudente su uso en pediatría si hay otras alternativas terapéuticas disponibles con mayor seguridad (Forsythe, 2007, Leibovitz, 2006).

Es de destacar que, a pesar de su uso limitado en pediatría, se estima que se realizan, sólo en Estados Unidos, más de medio millón de prescripciones anuales de quinolonas en pacientes menores de 18 años. Se espera que, la recopilación de datos sobre la eficacia y la seguridad de esta familia de compuestos, en población infantil, se vea aumentada, también, por la mayor exigencia de las autoridades regulatorias, en todo el mundo, para que las compañías farmacéuticas realicen el desarrollo clínico de los nuevos fármacos en población pediátrica (EMA, 2006a, UNICEF, 2006).

En este sentido, se dispone de datos de un estudio observacional (Yee, 2002) que incluía a más de 6.000 pacientes menores de 19 años tratados con ofloxacino o ciprofloxacino, y a 15.073 tratados con azitromicina, en el que no se objetivaron diferencias significativas en la frecuencia de lesiones en los cartílagos de crecimiento (0,82% en los tratados con fluoroquinolonas y del 0,78% en los tratados con azitromicina) (Gurguí, 2003, Nydert, 2011).

Por tanto, se considera que el uso de las quinolonas en niños debe limitarse a infecciones con fibrosis quística, infecciones muy graves, meningitis neonatal por Gram-negativos resistentes, infecciones por *Salmonella* o *Shigella*, otitis media supurativa crónica, algunos casos de otitis media aguda complicada (Barone, 2011, Committee on Infectious Diseases, 2006, Leibovitz, 2006, Mandell 2002). Es importante adoptar precauciones para evitar, en base a los cada vez más numerosos datos de seguridad de estos compuestos en niños, el uso masivo en el tratamiento de infecciones respiratorias, que podría acelerar el problema de la resistencia en neumococos (Leibovitz, 2006).

En resumen, los datos disponibles indican que las fluoroquinolonas no causan, o lo hacen muy raramente (en el peor de los casos), artropatías o anomalías óseas en niños, son bien toleradas y, en tercer lugar, son efectivas. Por tanto, las autoridades científicas y regulatorias recomiendan que se considere, cuidadosamente, el uso de esta familia de compuestos valorando los riesgos y beneficios en las siguientes infecciones (Aradottir, 1999, Hooper, 2003):

- exacerbación broncopulmonar en pacientes con fibrosis quística
- pacientes inmunosuprimidos
- infecciones complicadas del tracto urinario por MDR
- Sepsis o meningitis neonatal, especialmente por Gram-negativos resistentes
- infecciones por Gram-negativos multiresistentes en pacientes inmunosuprimidos que necesiten una terapia prolongada por vía oral.
- Osteomielitis crónica
- Otitis media crónica supurativa por *P. aeruginosa*, u otitis media crónica aguda que no responda a antibióticos de primera elección.
- Infecciones por micobacterias multiresistentes
- Infecciones gastrointestinales por especies de *Salmonella* o *Shigella*, multiresistentes.

Como se ha mencionado, algunas fluoroquinolonas han sido seguras y efectivas en el tratamiento de grupos seleccionados de pacientes pediátricos. La experiencia en este tipo de pacientes está aumentando, y las quinolonas han entrado a formar parte de los recursos antibióticos para el tratamiento de infecciones pediátricas consideradas graves o potencialmente graves por su difícil tratamiento. Un punto a no olvidar, en base a lo ocurrido con el uso de beta-lactámicos en niños, es el aumento de resistencias debido al mal uso, que no debe incrementarse para las quinolonas.

I.4.12.2. Quinolonas en la Tercera Edad

Las quinolonas son antibióticos ampliamente utilizados en la población general, con la única excepción o extremada precaución en la población pediátrica, por tanto, también la población anciana se beneficia de las características de esta familia de compuestos (Andriole, 2005a, Neralla, 2004, Rajagopalan, 2001). En pacientes de edad, precisamente por estar polimedicados y con mayor número de comorbilidades asociadas, son necesarios antibióticos potentes que presenten un espectro bacteriano moderadamente amplio con una acción bactericida rápida, que pueda controlar las infecciones rápidamente, debido a que suele haber un retraso en el diagnóstico, que puede resultar fatal en muchos casos (Neralla 2004, Nicole, 1999, Pea, 2006).

Se destacan de las quinolonas sus excelentes características farmacocinéticas, su buena penetración en los tejidos del pulmón y fluidos asociados, su óptima biodisponibilidad y la posibilidad de simplificar su uso, con una sola dosis diaria. Por otro lado, la reducción de la estancia hospitalaria, con menor posibilidad de adquirir infecciones, además de su excelente tolerabilidad representan ventajas potenciales sobre terapias con otras familias de antibióticos, aunque es importante monitorizar la aparición de resistencias entre los patógenos asociados, especialmente en neumococos (Anzueto, 2006, Capitano 2004, Ferrara, 2007), porque ya han incrementado su resistencia a los antibióticos de primera elección (Finch, 2002, Fogarty, 2005, Petitpretz, 2001).

Las fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino, son ampliamente utilizadas para el tratamiento de varios tipos de infecciones bacterianas (Ferrero, 2000, Loeb, 2003, Stahlmann, 2010). En general, esta familia de antibióticos se considera segura y bien tolerada. Hay estudios comparativos que han evaluado la eficacia del uso de quinolonas en ancianos respecto a poblaciones de menos de 65 años y, aunque la edad no parece disminuir su buena tolerabilidad, los efectos adversos específicos de estos antibióticos deben tenerse en consideración al seleccionar el tratamiento (Nicolle, 1999, Schmidt, 2006, Stahlmann, 2010).

Estudios farmacocinéticos con quinolonas han demostrado ciertas alteraciones en población anciana; las observaciones más frecuentes son el aumento de las concentraciones plasmáticas y del área bajo la curva, que se atribuyen, en primer lugar, a la pérdida de masa corporal de alrededor de un 10-15% en ancianos (Nicolle, 1999, Pea, 2006), y en segundo lugar, a la función renal, que disminuye claramente con la edad. Las quinolonas de excreción renal (p.ej. ofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino) deben ajustarse solamente si hay una reducción del aclaramiento relevante de la creatinina (Ferrara, 2007, Nicolle 1999, Stahlmann, 2010).

Las reacciones del tracto gastrointestinal, como náuseas, dispepsia, vómitos o diarrea, están entre los efectos adversos más frecuentemente registrados durante la terapia con fluoroquinolonas, a pesar de que, causan diarrea con mucha menor frecuencia que otras clases de antibióticos (Stahlmann, 2010). Las reacciones de hipersensibilidad en la piel, ocurren con menor frecuencia, también, que con beta-lactámicos, y, en cambio, preocupan especialmente los efectos adversos sobre el sistema nervioso central en pacientes de avanzada edad. Dados los efectos de estimulación sobre el CNS de las quinolonas, los pacientes deben ser monitorizados cuidadosamente para este tipo de síntomas, ya que, por ejemplo, signos de posibles efectos adversos como confusión, debilidad, pérdida de apetito, temblores o depresión podrían ser erróneamente atribuidos a la edad y no reportados como debidos al tratamiento (Cuhna, 2001, Stahlmann, 2010). Por otro lado, las quinolonas pueden causar prolongación del intervalo QT y se debe evitar su uso en pacientes con riesgo cardiovascular (Morganroth, 2005). La posibilidad de tendinitis o rotura de tendones está reconocida como un efecto adverso provocado por las quinolonas, que puede ocurrir durante el tratamiento o, unos meses después, en la población anciana (Burkhardt, 2004).

A pesar de que la población anciana posee mayor riesgo de efectos adversos debido a las comorbilidades y al hecho de estar polimedicados (Rajagopalan, 2001), no se ha detectado un claro aumento de efectos adversos relacionados con el uso de quinolonas, respecto a grupos de menor edad (Andriole, 2005, Nicolle, 1999); aunque deben tomarse precauciones y realizar

un seguimiento, tanto de la seguridad como de la eficacia (BTS, 2001, Ferrara, 2007, Stahlmann, 2010).

I.4.12.3. Quinolonas en Veterinaria

Los antibióticos se usan principalmente en animales domésticos, y de manera muy excepcional en animales salvajes. Dentro de los animales domésticos, no se destaca el caso de los animales de compañía, sino el de los animales de alimentación. Estos animales están en grupos muy numerosos y, normalmente, densamente confinados. Los animales productores de carne, además, suelen ser sacrificados antes de llegar a una etapa de madurez física, por lo que, en estas condiciones la aparición y la fácil transmisión de infecciones se ven altamente favorecidas. Es frecuente el tratamiento antibiótico de la totalidad de la población, como uso terapéutico, cuando se detectan síntomas de infección en unos pocos. Los síndromes más corrientes que requieren terapia antibiótica son neumonía y diarrea. También es común el uso profiláctico previo a situaciones que pueden provocar procesos infecciosos, como movimientos o mezclas de animales. Y, finalmente, mencionar que, aunque no las quinolonas, sí hay antimicrobianos que se utilizan para promover el crecimiento y engorde de los animales productores de carne o derivados.

La aparición de resistencias bacterianas en los microorganismos patógenos animales y en bacterias zoonóticas depende del uso que se haga de los antibióticos (Van den Bogaard, 2000) y se monitoriza menos intensivamente que las que cursan las infecciones en humanos (Wray, 2000).

Las fluoroquinolonas son efectivas, y se usan para el tratamiento y la prevención de un amplio rango de infecciones bacterianas tanto en animales de compañía como de producción ganadera, y, en muchos países, son medicamentos de prescripción médica. El ác. nalidíxico fue la primera quinolona utilizada clínicamente en animales, aunque, de acuerdo a la información disponible, ya no se utiliza (FDA, 1998, EMA, 2010). Subsiguientes quinolonas, de las sintetizadas entre los años 1960 y 1970 (ác. oxolínico y flumequine), se usan todavía en veterinaria en algunos países, mientras que las más modernas que se introdujeron en la década de los 90, antes que la administración americana Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicinal Agency regularan un uso apropiado de las mismas (FDA 1998 y 1999, EMA 2006b y 2010). Aún así, la producción mundial de quinolonas para su uso en veterinaria, en el año 1997, era de 120 toneladas en Europa, EEUU, Japón y Korea del Sur, 470 toneladas en China, mientras que el consumo de quinolonas para uso humano, el mismo año, fue de 800 toneladas (WHO, 1998).

La resistencia a las fluoroquinolonas en patógenos humanos está aumentando desde hace unos años, y la resistencia en bacterias zoonóticas, causadas por el uso de las quinolonas en animales, es un problema de salud pública, ya que se trata de una familia importante de antibióticos en humanos. Se ha detectado un aumento de resistencia a las fluoroquinolonas en aquellos patógenos causantes de infecciones que se tratan con estos compuestos, como *E.coli* (Sumano, 1998), y no en los que son tratados con otras familias de antibióticos, como *Mycoplasma*, *Streptococcus* o *Haemophilus* (Hannan, 1997, Waites, 2004). Las dos zoonosis más comunes de origen alimentario en el mundo son la campilobacteriosis y la salmonelosis (WHO, 2001a), en la población sana suelen ser autolimitantes, y en población vulnerable o en infecciones complicadas como la bacteriemia es necesario un tratamiento, normalmente con quinolonas. La resistencia de bajo nivel en cepas de *Salmonella* spp., y, la de alto nivel en cepas de *Campylobacter* spp. causantes de infecciones en humanos han emergido, en parte, por el uso de quinolonas en animales de alimentación. Hay informes que apuntan a un aumento de la morbilidad y de la mortalidad debido a estas resistencias (WHO, 2000). Por tanto, existe una necesidad para preservar la eficacia de las quinolonas en humanos, y su utilización en veterinaria debe evitarse, cuando existan alternativas terapéuticas. Si se reduce la presión antibiótica selectiva disminuirán también las bacterias resistentes a fluoroquinolonas en los animales de alimentación (WHO, 2001b).

I.5. EFECTOS ADVERSOS, INTERACCIONES Y RECOMENDACIONES DE USO DE LAS QUINOLONAS

I.5.1. Efectos adversos

En general, las fluoroquinolonas son fármacos bien tolerados y seguros, aunque poseen efectos secundarios adversos, la mayoría leves, aunque relativamente frecuentes. Se consideran un grupo con un buen balance beneficio/riesgo ya que además, pueden ser utilizados por vía oral o parenteral, permitiendo así la terapia secuencial (Nydert, 2011). Algunos de estos efectos adversos están asociados, especialmente, a esta familia de fármacos, y otros, a la estructura particular de cada quinolona (Bolon, 2009, Zhanel, 2002). Los problemas más comunes son de tipo gastrointestinal, como náuseas, vómitos y diarreas, en un 3-6% de los pacientes. Otros efectos adversos más serios pero menos frecuentes, incluyen efectos sobre el sistema nervioso central (dolor de cabeza, confusión y somnolencia), fototoxicidad, cardiotoxicidad y hepatotoxicidad, y algunos de ellos han llevado a retirar fármacos del mercado o a suspender su desarrollo clínico. El uso de las quinolonas, en principio, está restringido a población adulta (mayores de 18 años) y a mujeres no embarazadas (Bhasin, 2005, Zhanel, 2002).

Frecuentemente, los efectos adversos decrecen con la reducción de la dosis y la duración de la terapia con quinolonas. Es necesaria la interrupción del tratamiento tan sólo del 1-3% de los pacientes (Hooper, 1998b). Las reacciones adversas más frecuentes son las que afectan al tracto gastrointestinal, sistema nervioso central (SNC) y piel.

En los últimos años, se han retirado o restringido el uso de varias fluoroquinolonas (Frothingham, 2004, Ramirez, 2002) incluyendo a temafloxacino (1992, por anemia hemolítica, fallo renal, disfunción hepática y hipoglicemia) (Bhasin, 2005), grepafloxacino y sparfloxacino (Ball, 2000c) (debido a prolongación del intervalo QT) y trovafloxacino (hepatotoxicidad). Gatifloxacino se ha asociado tanto con la hipoglicemia como con la hiperglicemia (Park-Wyllie, 2006), y la discontinuación de este producto ha llevado a la mejora en el conocimiento de la homeostasis de la glucosa (Bhasin, 2005, Van Bambeke, 2009).

Debido a que la estructura de las quinolonas es, prácticamente, la misma, algunos efectos adversos pueden ser asignados a las distintas partes de la molécula básica (Bolon, 2009, Domagala, 1994, Hooper, 2003).

Los **efectos gastrointestinales** más comunes son las náuseas, seguido por dolor abdominal, emesis, diarrea y dispepsia. Estas manifestaciones son leves, transitorias y se presentan en el 3-6% de los pacientes (Wolfson 1991). Se han descrito en todas las quinolonas y por el momento no se ha asociado ninguna estructura aislada a estos efectos gastrointestinales (Bolon, 2009, Domagala, 1994).

Uno de los efectos adversos que suelen provocar los antibióticos por su afectación de la flora bacteriana gastrointestinal es la diarrea. La flora comensal de los intestinos, durante el proceso de eliminación de los antibióticos, se ve reducida, especialmente si se trata de productos de espectro amplio (que cubran anaerobios) y bactericida. La colitis asociada a *C. difficile* (Sprandel, 2003) es común, y, se ha visto aumentada con el uso de quinolonas de cuarta generación, especialmente por su actividad anti-anaerobios (Khurana, 2004).

Los **efectos adversos a nivel del SNC** aparecen en el 0,9-4,4% de los pacientes. Los más frecuentes son mareos, cefaleas, inquietud, depresión, insomnio y somnolencia (Wolfson, 1991). En casos muy raros se observan alteraciones de la coordinación motora, convulsiones, trastornos visuales, reacciones psicóticas y alteraciones del gusto, olfato y oído (Ball, 2000c). Estos efectos se han asociado a una acción directa de la quinolona sobre receptores cerebrales, concretamente sobre los receptores activados por el ácido γ -aminobutírico (GABA), un inhibidor de la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis de la célula nerviosa cerebral de los mamíferos, desplazándolo y dando lugar a la estimulación del SNC. Las concentraciones, a las que esta unión al receptor GABA_A tiene lugar, son generalmente elevadas comparadas con las que se alcanzan en tejidos, y confiere la mayor influencia en el

grado de unión al receptor GABA. Esta unión de la quinolona al receptor del GABA parece depender del radical en posición 7 de la molécula de quinolona (Lipsky, 1999, Stahlmann, 2002); en un extremo de máxima unión, estarían las quinolonas con una cadena lateral voluminosa, y en el otro las piperacinas no sustituidas. Sin embargo, el conocimiento de estos datos es insuficiente debido a que *in vivo* se debe considerar además, la penetración en el cerebro y niveles en plasma a las dosis terapéuticas (Ball, 2000c, Bolon, 2009, Van Bambeke, 2009).

En resumen, las quinolonas deben administrarse con precaución en pacientes que hayan sufrido crisis epilépticas o con alteraciones preexistentes del SNC que impliquen una disminución del umbral convulsivo, como accidentes cerebrovasculares o traumas craneoencefálicos. Por otra parte, estos efectos adversos pueden potenciarse por interferencia con otros fármacos, como se comentará más adelante.

Pueden aparecer reacciones cutáneas de **hipersensibilidad** como prurito, eritema o urticaria se han observado en un 0,5-2% de los pacientes, ya que estos compuestos aumentan la sensibilidad a la luz (Lieu, 1997), son de carácter leve o moderado, y cesan al suspender el tratamiento.

La principal reacción cutánea de las quinolonas es la **fotosensibilidad**, que parece ser un efecto de clase, puesto que existe una dosis y un nivel de exposición que causa **fototoxicidad** para la mayoría de los compuestos descritos (Domagala, 1994). Aparece como erupción eritematosos, fotodermatitis bullosas, urticaria o quemaduras solares, por ejemplo, con lomefloxacin, enoxacin y esparfloxacin (Zhanel, 2002). De todas formas, no todas las moléculas presentan el mismo grado de fototoxicidad. Esta fototoxicidad se ha relacionado con los radicales situados en la posición 8 de las moléculas de quinolona (Hayashi 2004, Sprandel 2003); y se produce debido a que las moléculas de quinolonas se degradan cuando se encuentran expuestas a la radiación ultravioleta, y generan oxígeno libre y radicales que causan daño tisular (Ramírez, 2002, Stahlmann, 2002).

Las quinolonas, como familia, poseen un riesgo fototóxico, aunque existan diferencias significativas entre la fototoxicidad de las distintas moléculas, y debe evitarse la exposición a la luz ultravioleta durante el tratamiento y hasta cinco días después de finalizado (Lipsky, 1999, Ramírez, 2002).

Un efecto adverso relacionado con las quinolonas son las alteraciones de los cartílagos de las articulaciones o **artropatías**. Estas lesiones, con dosis que se encuentran en rango de las usadas en la clínica habitual, se han detectado principalmente en estudios con animales jóvenes (Stahlmann, 2002), y se observa una erosión irreversible en los cartílagos de las articulaciones. Por este motivo, su uso está contraindicado como tratamiento prolongado en pacientes en crecimiento, como niños, adolescentes, mujeres embarazadas (principalmente durante el primer trimestre) y mujeres lactantes (Lode, 2001). En adultos, se han descrito con muy poca frecuencia (Stahlmann, 2010, Wolfson 2001). En algunos casos, después de varios meses de tratamiento con estos antibióticos, se ha observado tendinitis aquiliana y tendencia a la ruptura tendinosa (Harrel, 1999). Su uso debe, pues, evitarse en pacientes con antecedentes de alteraciones de este tipo, además de en pacientes de edad y con uso concomitante de corticoesteroides (Lipsky, 1999, Sprandel, 2003, Stahlmann, 2002).

La **toxicidad renal** es poco frecuente, aunque en un bajo número de pacientes se ha desarrollado hematuria, nefritis intersticial o fallo renal agudo (Ball, 1995, Wolfson 2001). Algunas reacciones inesperadas, como episodios de hemólisis, fallo renal e hipoglucemia después de las comidas se describieron con temafloxacin, y fueron los causantes de su retirada del mercado.

Otro de los efectos adversos que también han motivado la retirada del mercado de algunas moléculas de quinolona son de tipo cardiotóxico. En general, se ha detectado una incidencia muy baja de **efectos cardiovasculares**, con casos de hipotensión y taquicardias, muy dependiente de la estructura de cada molécula, y debidos a la prolongación del intervalo QTc (Lode, 1989, Stahlmann, 1999). Varios estudios *in vitro* con animales han demostrado que las quinolonas inhiben un gen, *eag*, relacionado con los canales de potasio (HERG) que se

relacionan con arritmias (Owens, 2001, Sprandel, 2003, Stahlmann, 1999). Dos de las quinolonas que se retiraron por efectos cardiotoxicos son esparfloxacino y grepafloxacino. El empleo de estas quinolonas debe, por tanto, evitarse en pacientes tratados simultáneamente con fármacos que prolonguen dicho intervalo y/o que presenten alteraciones del ritmo cardíaco, hipocalemia o insuficiencia cardíaca congestiva (Blondeau, 1999, EMA, 2006c).

La **hepatotoxicidad** es otro de los efectos adversos relacionados con las de quinolonas (2 ó 3 % de los pacientes). Se asocia a un incremento en las transaminasas y la fosfatasa alcalina a nivel sérico, que generalmente se recupera al abandonar el tratamiento. Sólo un muy bajo porcentaje de pacientes puede presentar serios problemas hepáticos como hepatitis, necrosis hepática o fallo hepático (Lipsky, 1999). Trovafloxacino se retiró debido a este efecto adverso.

Otros efectos adversos detectados, y que han causado la retirada de gatifloxacino, es la **hipoglicemia/hiperglicemia**. Estos efectos se detectaron inicialmente con gatifloxacino y ciprofloxacino en pacientes que recibían tratamiento oral para la diabetes, especialmente sulfonilureas. A pesar que se ha descrito hipoglicemia con otras fluoroquinolonas, como levofloxacino y moxifloxacino, los efectos han sido leves.

Por el momento, las fluoroquinolonas parecen tener un potencial bajo para inducir **cáncer o mutaciones**, como han demostrado varios ensayos realizados *in vitro* o con animales para estudiar la mutagenicidad o daño cromosómico (Smart, 2008). Sin embargo, las fluoroquinolonas son potentes inhibidores de la topoisomerasa II bacteriana, por lo que pueden inhibir topoisomerasas eucariotas y de este modo producir toxicidad celular y clastogenicidad. No obstante, las topoisomerasas del tipo II de las células de los mamíferos son unas mil veces menos sensibles a la acción inhibitoria de las quinolonas que la girasa bacteriana, y no se ha descrito en el ser humano ningún efecto carcinogénico, probablemente porque la enzima humana es, estructural y funcionalmente, distinta (Suto, 1992).

En resumen, las fluoroquinolonas son esencialmente un grupo de antibacterianos bien tolerado, cuyos beneficios sobrepasan claramente sus desventajas en un amplio ámbito de indicaciones terapéuticas. Debido a sus efectos adversos e interacciones, su empleo está contraindicado en enfermos con historia previa de sensibilidad a sustancias de estructura quinoleínica, insuficiencia hepática grave, embarazadas, niños y adolescentes hasta el final de su desarrollo, y en personas de edad avanzada que tengan alguna lesión en el sistema nervioso central (Nydert, 2011). Además deben tenerse en cuenta las posibles interacciones bacteriológicas y farmacológicas al co-administrarlas con otros fármacos. Su eficacia clínica ha sido el mayor determinante para que estos compuestos hayan tenido éxito en el mercado a pesar de su posible toxicidad. Sin embargo, el menor potencial de los efectos adversos de algunos de estos compuestos ha conducido a su amplia utilización, en detrimento de otros con mayor posibilidad de efectos secundarios.

Al tener, las diferentes generaciones de fluoroquinolonas un espectro de actividad muy similar, la elección debería basarse en las diferencias en términos de eficacia y seguridad o tolerabilidad (Van Bambeke, 2005). La mayoría de las reacciones adversas que originan estos agentes son leves y reversibles al interrumpir el tratamiento, pero estos efectos pueden asociarse a una mortalidad y morbilidad significativa, como ocurrió en el caso de trovafloxacino y temafloxacino (Bertino, 2000). Por tanto, continúa la posibilidad del desarrollo de fluoroquinolonas más seguras e incluso más activas por medio de modificaciones químicas tanto en el núcleo como en los sustituyentes de cada posición (Domagala, 1994, Van Bambeke, 2005).

Aunque no es fácil, el esfuerzo en conocer mejor los mecanismos que provocan los efectos adversos para prevenir o disminuir la resistencia a las quinolonas es de primordial importancia, al igual que corregir los malos usos de estos antibióticos con el objetivo de frenar la resistencia a quinolonas.

I.5.2. Interacciones

Se han descrito numerosas interacciones entre quinolonas y otros fármacos, cuya importancia depende del derivado que se considere, que se resumen a continuación.

La interacción más importante resulta de la administración simultánea de algunas quinolonas, que inhiben el citocromo CYP-450, con derivados de la **xantina** como la **cafeína** y, en mayor medida, la **teofilina** (muy utilizada en el tratamiento del asma), que puede ocasionar una reducción en la metabolización de estos fármacos, disminución del aclaramiento, y, dar lugar una intoxicación teofílica (Ball, 2000c, Blondeau, 1999, Lode 2001). Debido a que el asma se complica, a menudo, con infecciones respiratorias, es frecuente el uso combinado de quinolonas y teofilina, por lo que debe prestarse especial atención al metabolismo de la misma. Estructuralmente, las interacciones quinolona-teofilina dependen, principalmente, de la naturaleza del sustituyente en posición 7, pero también se ven influenciadas por el sustituyente de la posición 1, y en menor medida, por el de 8. Las interacciones más importantes se producen con sustituyentes pequeños no voluminosos, como piperacina y pirrolidinas, conforme aumenta el tamaño del sustituyente la interacción es menor (Bertino, 2000).

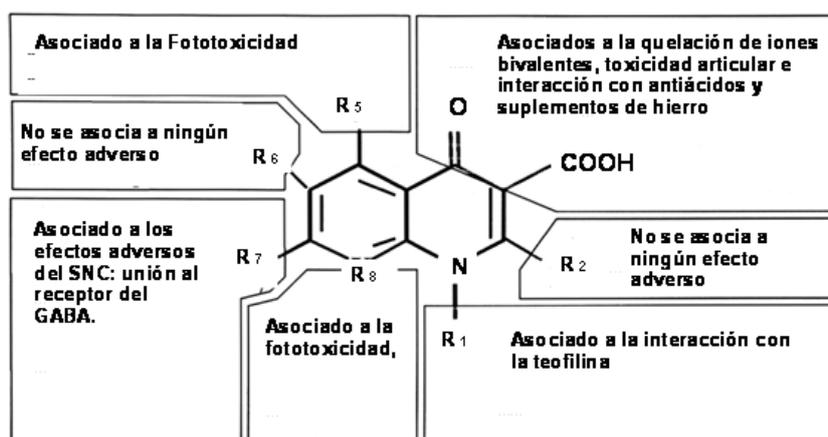
Por otro lado, la administración conjunta de fluoroquinolonas y productos que contengan **cationes multivalentes** (iones metálicos) provoca una disminución de la absorción intestinal debido a la formación de complejos insolubles, y una reducción de la biodisponibilidad (Zhanell, 2002). La quelación con cationes metálicos ha sido descrita en el 22-76% de pacientes y es una de las interacciones que afecta a las quinolonas de modo general, aunque parece más importante para las quinolonas que presentan menor número de sustituyentes en la estructura básica y en el anillo piperacínico como ciprofloxacino, norfloxacino y enoxacino (Dalhoff, 2001). En cualquier caso, debe evitarse la administración simultánea de estos antibióticos y, por ejemplo, preparados polivitamínicos que contengan sales de hierro, zinc u otros cationes metálicos, así como antiácidos que contengan sales de magnesio, aluminio o calcio (Shiba, 1995). Aunque, si es necesaria la co-administración debería espaciarse entre 2 y 4 horas.

Una de las interacciones más importantes de las quinolonas se presenta con fármacos como la **warfarina** y la **digoxina**. Estos no deberían asociarse con las fluoroquinolonas que prolongan el intervalo QT, por la posible aparición de arritmias y/o problemas cardiacos (Bertino, 2000).

Por otro lado, la administración conjunta de quinolonas y algunos **antiinflamatorios no esteroideos** (AINE) potencia su efecto convulsivante por una posible competencia con los receptores GABA o sinergia en la inhibición de la unión a los receptores del GABA (De Sarro, 2001). Esta interacción no se produce en quinolonas de tercera y cuarta generación (Stein, 1999). Parece que el grupo de la posición 7 confiere la mayor influencia en los efectos sobre el SNC potenciados por los AINE, de forma que la relación estructura-efectos secundarios es paralela a la de los efectos adversos de las quinolonas, a nivel del SNC (De Sarro, 2001).

En resumen, se puede decir que los radicales en 2 y en 6 no se han asociado a ningún efecto adverso, la posición 1 controla las interacciones con la teofilina y toxicidad genética, los radicales en posiciones 3 y 4 están involucrados en la interacción con antiácidos y en la quelación de iones bivalentes como el Mg^{2+} , Ca^{2+} . Las posiciones 5 y 8 se han relacionados con los efectos de fototoxicidad, y, por último, la posición 7 se cree responsable de los efectos adversos a nivel del sistema nervioso central, ya que este radical es el que interacciona con el receptor del GABA (Rubinstein, 2001).

Fig. I.15. Relación estructura de las quinolonas con los efectos adversos y las interacciones



I.5.3. Recomendaciones de uso de las quinolonas

Las fluoroquinolonas se introdujeron con grandes expectativas a mediados de los ochenta ya que ciprofloxacino era la respuesta a las necesidades médicas en las infecciones por Gram-negativos, y a continuación, el hecho que cubrieran a los neumococos multiresistentes hizo a estos compuestos cada vez más deseados. Modificaciones en la estructura básica de las quinolonas hizo que aumentara su espectro antibacteriano y su potencia, al mismo tiempo que su biodisponibilidad, posicionando a las quinolonas como antibióticos de gran utilidad para el tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias y bacteremias. Siempre y cuando esta familia de compuestos sea utilizada par el tratamiento del tipo adecuado de pacientes la efectividad de la misma se mantendrá en las próximas décadas. En el caso contrario, se deberán dejar de utilizar pronto. Como siempre, las bacterias son más inteligentes que los humanos, y aproximaciones rigurosas y prácticas se necesitarán para conservar a los antibióticos como agentes útiles, y no como descubrimientos del pasado. Las quinolonas no son, ni serán, una excepción a esta regla que obliga a un uso prudente y responsable de los antibióticos.

Las fluoroquinolonas son antibióticos potentes utilizados normalmente en infecciones urinarias e infecciones del tracto respiratorio. Estos fármacos raramente se recomiendan como antibióticos de primer uso (Nydert, 2011). Las fluoroquinolonas respiratorias (gemifloxacino, levofloxacino y moxifloxacino) han aumentado su espectro en Gram-positivos, incluyendo mejor cobertura de *S. pneumoniae*. Estos antibióticos se usan generalmente en las infecciones respiratorias, en lugar de ciprofloxacino, en las que haya fracasado el tratamiento de primera línea (Bolon 2009, Saravolatz, 2003).

Se detecta un aumento de resistencias en organismos como *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *C. difficile*, *N. gonorrhoeae*, MRSA, MSSA, *E. coli* y enterobacterias (Bolon, 2009, Saravolatz, 2003). Debido a la prevalencia de los gonococos resistentes (>10% aislamientos), no se pueden recomendar las quinolonas para el tratamiento de las uretritis y cervicitis gonocócicas (Cbignell, 2009). Las guías europeas y americanas sólo indican el uso de ciprofloxacino, en dosis única, para pacientes con sensibilidad demostrada. Se recomienda el uso prudente de las fluoroquinolonas para prevenir el aumento de resistencias.

Las situaciones clínicas generales en las que se justifica el uso de quinolonas se resumen en:

- Infecciones urinarias: pielonefritis o infecciones complicadas por *E. coli* o enterobacterias con alergia a los betalactámicos, si no se pueden utilizar aminoglucósidos; y prostatitis por *E. coli* o enterobacterias sensibles.
- Gastroenteritis: Diarrea del viajero e infecciones por *Salmonella* en pacientes inmunodeprimidos, en ancianos o con formas complicadas.
- Infecciones respiratorias: neumonías de comunidad con criterios de ingreso en alergia a los betalactámicos, uso reciente de betalactámicos o criterios de sospecha de infecciones por *Pseudomonas*. También en neumonías nosocomiales (asociados a otros antibióticos) y exacerbaciones de EPOC graves o en pacientes con riesgo de infección por *Pseudomonas*.
- Infecciones osteoarticulares: osteomielitis o artritis séptica causada por enterobacterias, *Pseudomonas* o *S. aureus* con sensibilidad demostrada (generalmente asociadas a otros antibióticos).
- Neutropenia febril: paciente neutropénico con riesgo bajo con fiebre.

Tabla I.5. Usos clínicos aprobados para las fluoroquinolonas (de Andriole, 2005)	
Producto	Indicaciones aprobadas
Ciprofloxacino	Cistitis agudas no complicadas en mujeres (uso oral, sólo)
	UTIs
	Prostatitis bacteriana crónica
	Gonorrea uretral y cervical no complicadas
	SSSIs
	Infecciones de huesos y articulaciones
	Diarrea infecciosa (uso oral sólo)
	Fiebre tifoidea (uso oral sólo)
	Infecciones gastrointestinales complicadas, en combinación con metronidazol
	Sinusitis aguda
	RTI de vías bajas
	Neumonía nosocomial (uso endovenoso sólo)
	Terapia empírica para pacientes con neutropenia febril, en combinación con piperacillin sódico (sólo uso endovenoso)
	Antrax inhalado (post-exposición)
UTIs complicadas y pielonefritis en pacientes de hasta 17 años	
Levofloxacino	UTIs no complicadas
	UTIs complicadas
	Pielonefritis agudas
	Prostatitis bacteriana crónica
	uSSSIs
	cSSSIs
	Sinusitis maxilar aguda
	Exacerbación bacteriana aguda de la bronquitis crónica
	CAP
Neumonía nosocomial	
Moxifloxacino	Sinusitis bacteriana aguda
	Exacerbación bacteriana aguda de la bronquitis crónica
	CAP
	uSSSIs
Gemifloxacino	Exacerbación bacteriana aguda de la bronquitis crónica
	CAP

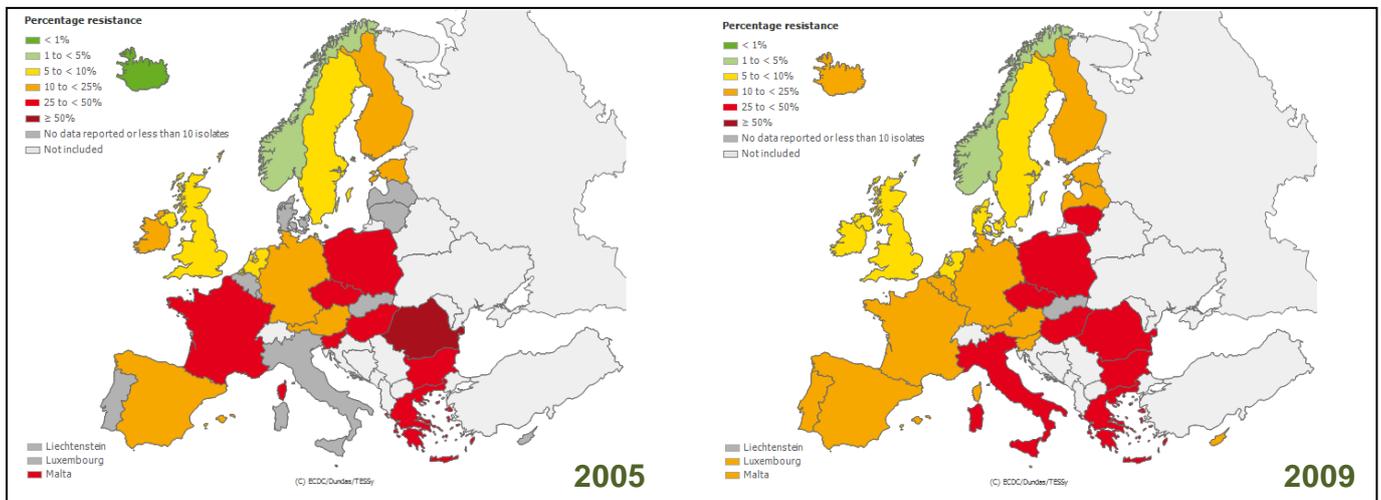
I.6. EPIDEMIOLOGÍA E INCREMENTO DE LAS RESISTENCIAS BACTERIANAS EN CLÍNICA

La resistencia a los antibióticos, por parte de algunas bacterias multiresistentes, se ha convertido en un problema global, de difícil solución (Hawkey, 2009, Livermore, 2009).

Los factores clave para ello han sido el aumento del uso de antibióticos (tanto en medicina humana, como veterinaria) y, la movilidad de las personas (Hawkey, 2009). También han colaborado el aumento de las infecciones, cada vez más difíciles de combatir: el aumento de la esperanza de vida, la mayor supervivencia en pacientes comprometidos (prematuros, inmunodeprimidos o traumáticos), o que han sufrido intervenciones invasivas (ventilación mecánica, catéteres, prótesis, cirugías) (Karageorgopoulos, 2009).

Las bacterias han mostrado, desde siempre, una habilidad espectacular de adaptación a los cambios del medio. El uso creciente de antibióticos, durante las pasadas décadas, ha originado la emergencia y dispersión de varios mecanismos de resistencia antibiótica entre algunas bacterias (Levy, 2004, Karageorgopoulos, 2009). Algunos de estos patógenos, los más exitosos, han conseguido ser resistentes a múltiples antibióticos y, poseen la capacidad de diseminarse en el ambiente hospitalario, causando infecciones nosocomiales, o de distribuirse y posicionarse entre las infecciones bacterianas de la comunidad (Boucher, 2009, Perron, 2008). Estos patógenos son, principalmente, MRSA, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y *S. pneumoniae* multiresistente, respecto a los cocos Gram-positivos, y, las bacterias no fermentadoras y Enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro ampliado, entre los Gram-negativos (Karageorgopoulos, 2009).

Figura I.16. Presencia (%) de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a fluoroquinolonas en Europa, en los países participantes en el European Surveillance System / ecdc. (<http://ecdc.europa.eu>).



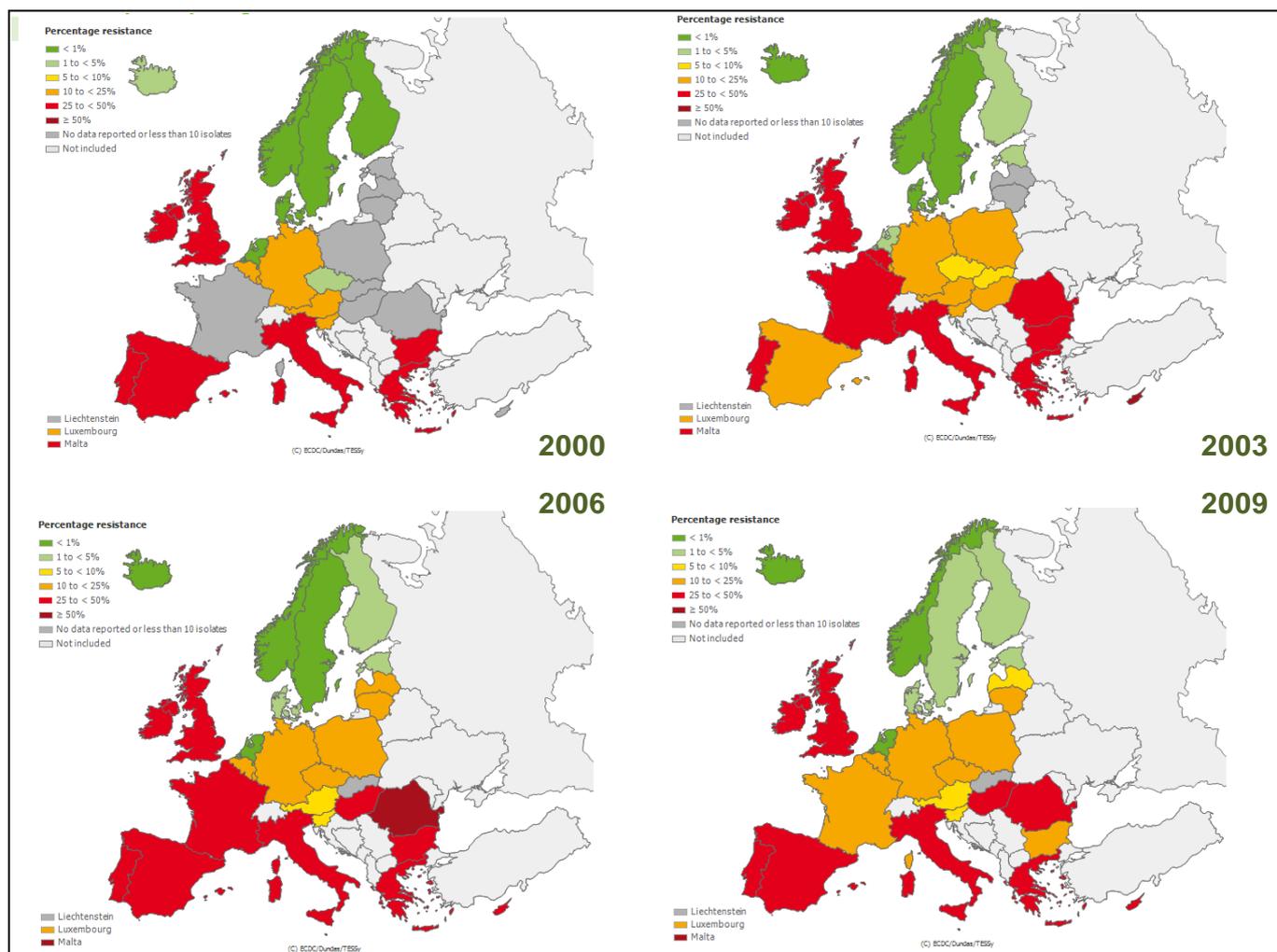
Esta falta de tratamiento a las infecciones bacterianas aumenta la morbilidad, la mortalidad y los costes económicos de las terapias frente a las enfermedades infecciosas (Hawkey, 2009). Existen variaciones geográficas considerables en la distribución y prevalencia de distintos patógenos resistentes, debido a diferencias en el uso de antibióticos, tanto, por ejemplo, entre Europa y Estados Unidos, como entre los diferentes países europeos. Está aumentando la preocupación de que no se disponga de antibióticos efectivos para el tratamiento de algunas infecciones en los próximos años (Livermore, 2009), concretamente, la situación actual es que la amenaza se está controlando frente a Gram-positivos resistentes, porque existen tratamientos eficaces, mientras que está aumentando respecto a Gram-negativos (Livermore, 2009, Obritsch, 2005, Vila, 1999).

Diferentes organismos internacionales, como el *Centre for Diseases Control* (CDC, EEUU, www.cdc.gov/drugresistance) y el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance), realizan el seguimiento de la distribución de un número creciente de especies patógenas resistentes, tales como *Acinetobacter*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Streptococcus del grupo B* y, *Streptococcus pneumoniae*.

En el aumento de las resistencias a los antibióticos han contribuido, también, otros actores como son las bacterias comensales de la flora intestinal humana y animal. Estas bacterias, resistentes a antibióticos muchas veces, pueden causar infecciones oportunistas (Streit, 2006), y, además, actuar como reservorio de genes de resistencia, que distribuyen a las bacterias patógenas humanas (Hawkey, 2009). Algunos genes de resistencia a antibióticos tienen un origen ambiental, en bacterias de plantas y animales, y otras veces, tanto los antibióticos lanzados al medio ambiente, como la contaminación con algunos productos químicos, colaboran en el aumento de la multiresistencia, por transmisión de plásmidos, o por la selección de un tipo específico de integrones, que contribuyen a la dispersión de genes de resistencia mediante transferencia horizontal (Gaze, 2005, Hawkey, 2009). Por tanto, no sólo el uso y el mal uso de antibióticos en la medicina humana y en la veterinaria están sumando para aumentar el problema de la resistencia a los antibióticos.

Evaluando el problema en Gram-positivos, por ej., respecto a las cepas de MRSA, hay, comercializados y en desarrollo, nuevos tratamientos activos (daptomicina, linezolid y tigeciclina, telavancina, ceftobiprole, ceftarolina y dalbavancina) (Livermore 2009). Ligeramente más problemática es la situación con enterococos, especialmente en endocarditis por cepas con elevada resistencia a aminoglicósidos, ya que son necesarios fármacos bactericidas eficaces; se dispone de daptomicina, telavancina y razupenem. Frente a enterobacterias, destacar que el problema de las beta-lactamasas de espectro ampliado está aumentando, y hay dificultades en encontrar las combinaciones efectivas de antibióticos e inhibidores de las beta-lactamasas. Frente a las bacterias no-fermentadoras, como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, éstas acumulan resistencias múltiples, y no hay, en estos momentos, ningún fármaco en desarrollo que permita pensar en una solución completamente eficaz. Y finalmente, *Neisseria gonorrhoeae* se considera un problema creciente ya que están aumentando las resistencias a los fármacos disponibles por vía oral, lo que complicará el tratamiento y provocará un aumento de fallos terapéuticos.

Figura I.17. Evolución de la resistencia (%) a meticilina en *S. aureus* en Europa (entre los años 2000 y 2009), en los países participantes en el European Surveillance System / ecdc. (<http://ecdc.europa.eu>).

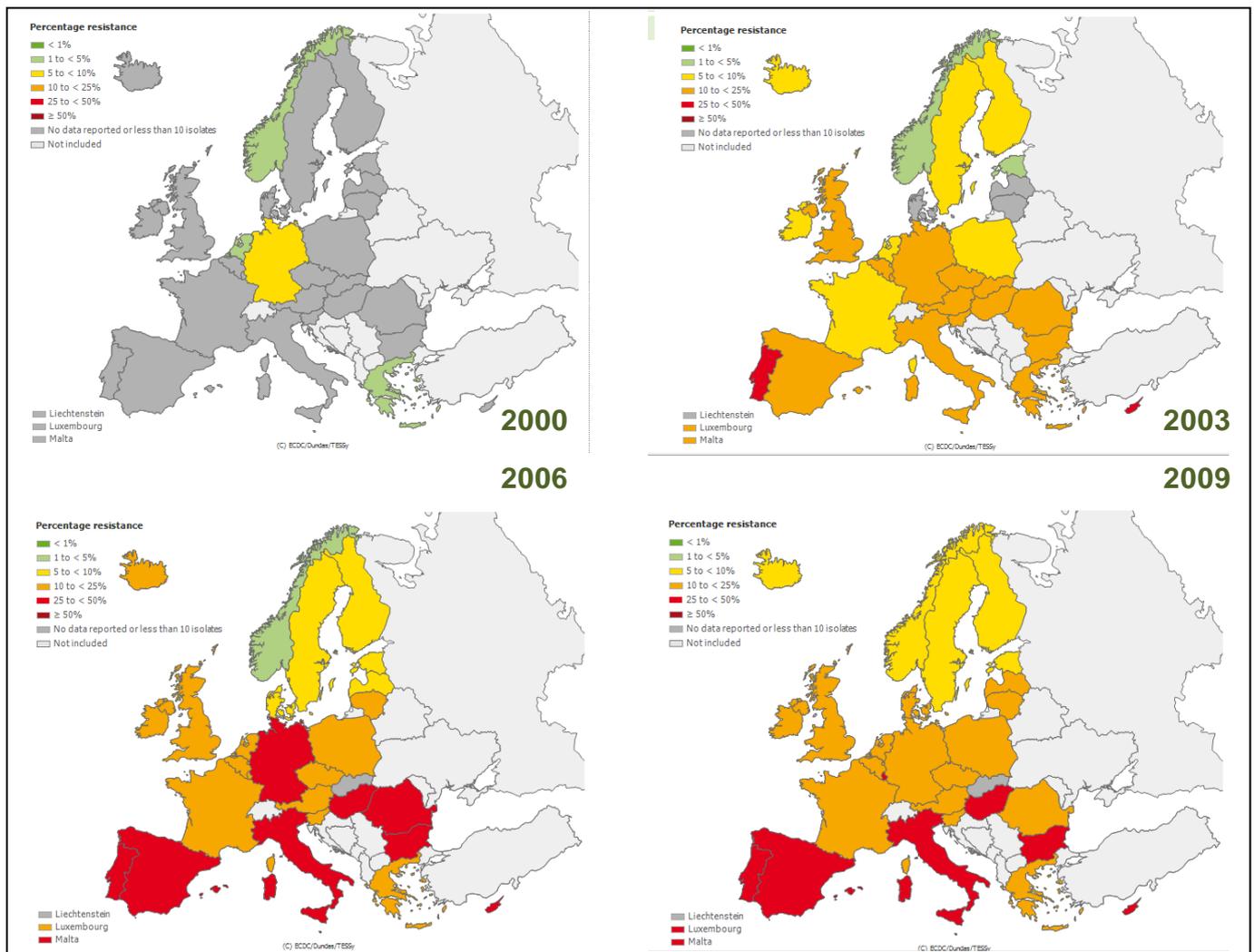


En resumen, a pesar de la envergadura del problema, aún se pueden tratar muchas infecciones bacterianas, y parece, que hay pocas probabilidades de no poder tratar, en un futuro cercano, las infecciones por cepas resistentes de estafilococos o estreptococos. También, parecen controladas las endocarditis por enterococos resistentes, como se ha mencionado anteriormente (Livermore, 2009). Como se puede observar en la figura I.17 se ha frenado la prevalencia de cepas de MRSA en algunos países europeos.

Sí que, en cambio, existe mayor preocupación con los patógenos Gram-negativos multiresistentes, y parece una amenaza posible la llegada de un futuro sin antibióticos eficaces frente a algunas cepas. Es frecuente detectar, enterobacterias sólo susceptibles a carbapenems, tigeciclina y polimixina, con un aumento de la resistencia a carbapenem, también, por KPC y MBLs.

De igual manera, está aumentando la frecuencia de infecciones urinarias causadas por *E. coli* productoras de betalactamas de espectro ampliado y resistentes a quinolonas, sin posibilidad de tratamiento por vía oral. (Livermore 2009). En el caso de las bacterias no fermentadoras, las cepas resistentes a carbapenems son comunes, disponiendo sólo de tigeciclina y polimixinas como los últimos antibióticos activos, aunque, sin ser éstos ideales. Y en último lugar, aparecen para complicar la situación en Gram-negativos, las cepas de gonococos que están incrementando las resistencias a todos los antibióticos orales disponibles, dejando tratamientos endovenosos, como única solución, que distan mucho de ser ideales para este tipo de infecciones.

Fig. I.18. Evolución de la resistencia (%) a fluoroquinolonas en *E. coli* en Europa (entre los años 2000 y 2009), en los países participantes en el European Surveillance System / ecdc. (<http://ecdc.europa.eu>).



A pesar de que, se puedan aplicar soluciones globales rigurosas para controlar el problema de las resistencias, como se ha venido haciendo en los últimos años, la realidad nos indica que existe una demanda dramática de antibióticos frente a Gram-negativos. La solicitud de antibióticos anti-Gram-positivos resistentes, realizada hace unos años, parece que ha tenido éxito. Por el contrario, se esperan resultados diametralmente opuestos para la alerta existente frente a Gram-negativos resistentes, ya que las características de este tipo de bacterias hacen que las resistencias intrínsecas se sumen a las causadas por la presión antibiótica, generando un problema más difícil de solucionar. Se considera que, en algunos casos, podrían ser relativamente útiles algunas combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas, pero es difícil pensar que se pueda disponer de antibióticos que sean efectivos frente a todas las cepas. El resultado podría ser una, lentamente creciente, minoría de infecciones por Gram-negativos que sería imposible tratar, junto a una serie de infecciones multiresistentes en pacientes gravemente enfermos, que recibirían un tratamiento empírico erróneo, con el consecuente aumento de las resistencias y de la mortalidad (Kollef, 2000, Livermore 2009).

Independientemente de los mecanismos de supervivencia de las bacterias, las presiones, tanto clínicas como comerciales, para el uso de antibióticos, tanto en humanos como en veterinaria, y, la movilidad global de personas y alimentos, va a contribuir a la dispersión de aquellos clones de bacterias MDR o de genes de resistencia (Hawkey, 2009), a pesar de las iniciativas para el uso prudente de antibióticos. Y, probablemente, como ha sido hasta ahora, la

resistencia a los antibióticos, por parte de las bacterias, va a ir a mayor velocidad que el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos para controlarlas, por lo que es necesario enlentecer al máximo la dispersión de las infecciones bacterianas sin tratamiento.

I.6.1 Nuevos tratamientos & Enfoque al tratamiento de las uSSSIS

En la búsqueda de nuevos antibacterianos existen varias posibilidades: seleccionar compuestos específicamente activos frente a cepas resistentes de bacterias Gram-positivas, básicamente MRSA con otras resistencias (aunque ya se ha mencionado que esta necesidad está moderadamente cubierta); buscar compuestos con actividad frente a patógenos Gram-negativos resistentes (enterobacterias, no-fermentadores, y *fastidious*), que es prioritario, aunque muy difícil; o intentar que identificar compuestos sean activos frente a microorganismos Gram-positivos resistentes, que cubran el máximo posible de patógenos Gram-negativos, y que sean activos frente a anaerobios y patógenos atípicos. Con este tercer abordaje se podría contribuir a obtener antibióticos que se puedan administrar en casos graves, en los que se necesite un cubrimiento empírico de cualquier patógeno, básicamente a partir de una sospecha inicial de infección por Gram-positivos, a la espera de los resultados microbiológicos que focalizaran el tratamiento antibiótico, ya que un retraso en la terapia efectiva, en infecciones severas, se ha asociado con un aumento de la mortalidad (Fernández-Obregón, 2005).

Además de las infecciones graves, existe un número importante de infecciones leves, de más fácil tratamiento, aunque no por ello menos importantes en la fotografía global de incremento de resistencias bacterianas (Caelli, 2000). Entre estas infecciones leves, se destacan las no complicadas de piel y estructuras relacionadas, que pueden estar causadas por patógenos resistentes (incremento de MRSA, resistente a quinolonas, a vancomicina, a antibióticos tópicos, etc) (Bass, 1997); si no se combaten o erradican bien, además de empeorar la infección y necesitar terapias antibióticas más agresivas, pueden dispersarse entre la población, como ha ocurrido con las cepas de MRSA adquiridas en la comunidad (Gosbell, 2007).

Otra aproximación, en la búsqueda de nuevos antibióticos, podría ser, el intentar posicionar a compuestos activos frente a los patógenos causantes de infecciones uSSSIs (Nichols, 1999). El objetivo sería que pudieran, como antibióticos tópicos y con abordajes menos agresivos que los tratamientos sistémicos, contribuir a la erradicación o a frenar su dispersión, independientemente de la especie bacteriana y de la resistencia inicial a otros fármacos, tanto tópicos como sistémicos (Fernández-Obregón, 2005, Leyden, 1992).

La emergencia de MRSA en la comunidad hace necesario el volver atrás en las prácticas de selección de los antibióticos, se debería descartar el tratamiento empírico y utilizar el perfil de sensibilidad, para conseguir eliminar eficazmente el patógeno causante de la infección (Fernández-Obregón, 2005). En el caso de algunas uSSSIs, que por un lado son leves, pero por el otro, pueden estar causadas por cepas resistentes y con mecanismos de virulencia y de transmisión de genes de resistencia nada despreciables (CA-MRSA), hacen que se deba disponer de antibióticos eficaces, por si las primeras medidas de control o descolonización no fueran suficientes.

Los antibióticos tópicos que se utilizan para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* MRSA y/o MSSA (Bishop, 2007, Gosbell, 2004) son los siguientes:

Bacitracina (normalmente formulada con neomicina, y/o polimixinaB), infecciones no complicadas por MSSA o MRSA. Eficaz en impétigo (Dillon, 1989). Menos eficaz que rifampicina en descolonización nasal (McAnally, 1984).

Ác.fusídico: ampliamente utilizado en infecciones no complicadas por *S. aureus*, muchas cepas de MRSA y MSSA son sensibles (Spelman, 1999), aunque existe un incremento de la resistencia, que se considera esporádica y/o epidémica, que debe controlarse (Bishop, 2007, Peeters, 2002, Ravenscroft, 2000, Weston, 2000).

Mupirocina: es el producto mayoritariamente utilizado para el tratamiento de infecciones leves o uSSSIs, gran parte de las cepas de MSSA y MRSA son sensibles a este producto (Turnidge, 1996), y ha demostrado eficacia en múltiples tipos de uSSSIs, como impétigo, heridas infectadas, eczema sobreinfectado, úlceras de pie diabético, (Bass, 1997, Breneman, 1990, Dacre, 1983, Dux, 1986, Leyden, 1990 y 1992, Wilkinson 1988). Se utiliza, también, eficazmente para la erradicación de la colonización nasal por MSSA y MRSA, aunque se producen recaídas por re-inoculación o re-infección, separadas en el tiempo (Dacre, 1983). Al igual que para el ác. fusídico, han aparecido resistencias a mupirocina, asociadas a resistencias a otros antibióticos en cepas de MRSA (Udo, 1994), y en algunos brotes, con elevados valores de CMI para mupirocina, se ha visto que los genes se localizan en plásmidos, permitiendo una rápida diseminación entre cepas (Pawa, 2000). Se considera la epidemiología de la resistencia a mupirocina como esporádica (Bishop, 2007), aunque fallos terapéuticos implican el agravamiento de la infección y el tratamiento sistémico.

La mupirocina es un antibiótico bacteriostático, aunque se considera bactericida a las concentraciones que se alcanzan tras su administración tópica. Su concentración mínima bactericida (CMB) frente a patógenos relevantes en SSSI, se considera que es entre 8 y 30 veces mayor que su concentración mínima inhibitoria (CMI) (Bass, 1997).

Neomicina: es un antibiótico que se utiliza con gran frecuencia, aunque prácticamente, no existen estudios clínicos analizando su eficacia. Se ha demostrado una elevada hipersensibilidad al producto (Bajaj, 1986).

Retapamulina: Es el agente antiestafilocócico más nuevo incorporado al mercado de los antibióticos tópicos (Bishop, 2007), con un mecanismo de acción diferente al resto de antibióticos que se utilizan en humanos, aunque no en los introducidos en veterinaria, con anterioridad (tiamulina y valnemulina) (Bishop, 2007, Jones, 2006b). Posee una excelente actividad frente a Gram-positivos, incluyendo a los resistentes a mupirocina, y se ha aprobado su uso en impétigo (Estados Unidos y Europa), y en infección secundaria de heridas traumáticas, de extensión reducida (Europa).

Mupirocina es el tratamiento tópico más utilizado, es efectivo en el tratamiento de uSSSIs, también por MRSA, y ha funcionado en la erradicación de la colonización por MRSA, tras aplicación intranasal (Boyce, 2001). El desbridamiento y desinfección de las heridas, se debe valorar siempre, como primera opción; en caso de ser necesaria la terapia antibiótica, debe tenerse en cuenta que las cepas de los patógenos de piel han incrementado la resistencia a los antibióticos tópicos, además de a algunos sistémicos.

Por tanto, a la terapia por vía tópica de las SSSIs por MRSA se le debe exigir el mismo grado de eficacia que a una por vía sistémica (Dillon, 1989, Gosbell, 2004). La curación de la infección vendrá condicionada por la sensibilidad de la cepa al antibiótico, por la actividad bactericida del mismo, y el acceso del producto al lugar de la infección; acompañado, por supuesto, del cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. En caso de duda sobre las especies involucradas en la infección o de su sensibilidad, la terapia combinada con distintos antibióticos, tanto tópicos como sistémicos, será la mejor opción para controlar la infección y evitar el desarrollo de resistencias (Gosbell, 2004).

La investigación de los patrones de administración de los productos, también es importante, ya que acortar el número de días o reducir el número de aplicaciones diarias puede incrementar el cumplimiento, y por tanto, la curación. El utilizar el tipo de formulación más cómodo y con menor número de efectos secundarios, también contribuirá a mejorar el cumplimiento, en esta dirección. El disponer de antibióticos tópicos potentes y eficaces, evitará las complicaciones asociadas a tener que utilizar la terapia sistémica (Fernández-Obregón, 2005).

I.7. OZENOXACINO

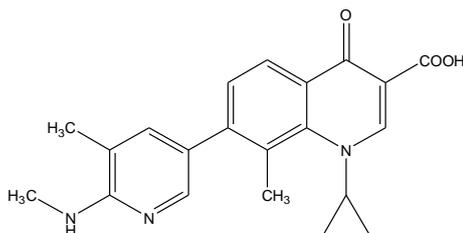
I.7.1. Nomenclatura

Nombre químico (IUPAC): 1-Ciclopropil-8-metil-7-(5-metil-6-metilamino-3-piridinil)-4-oxo-1,4-dihidro-3-carboxiquinolona.

INN (International non-proprietary name): Ozenoxacin.

Otros códigos: GF-001001-00, T-3912, M-2151.

I.7.2. Estructura



Fórmula molecular: $C_{21}H_{21}N_3O_3$

Peso molecular: 363.41

I.7.3. Características Físico-Químicas

Ozenoxacino es un compuesto ópticamente inactivo, con una solubilidad muy baja en agua, insoluble en solventes orgánicos y ligeramente soluble en soluciones ácidas y básicas. Ozenoxacino es un compuesto extremadamente lipófilo ($\log P > 5$), no higroscópico, y que no presenta polimorfismo en las condiciones normales de práctica química y galénica.

I.7.4. Características enfocadas al desarrollo

Con las características de hidrofobicidad del producto, y la actividad microbiológica que se le presupone, por ser una quinolona con el sustituyente en la posición 7 similar al de garenoxacino, el de la posición 1 igual que ciprofloxacino, y un radical muy pequeño en la posición 8, además de no poseer ningún flúor ni radical halógeno, ni en 6 ni en ninguna posición, se enfoca la investigación del producto, además de a explorar su espectro antibacteriano, al uso tópico en infecciones de piel y estructuras relacionadas.

III.7 BIBLIOGRAFÍA

I.7. BIBLIOGRAFÍA

- Abouzeed, Y.M., Baucheron, S. y Cloeckert, A.** 2008. *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(77):2428-2434.
- Akalin, H.E.** 1995. Role of quinolones in the treatment of diarrhoeal diseases. *Drugs*, **49**(Suppl 2):128-131.
- Alekshun, M. N. y Levy, S.B.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**:2067–2075.
- Alekshun, M. N. y Levy, S.B.** 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol*, **7**:410–413.
- Alovero, F. L., Pan, X.S., Morris, J.E., Manzo, R.H. y Fisher, L.M.** 2000. Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:320-325.
- Alvarez-Lerma, F., Palomar Martínez, M., Olaechea Astigarraga, P., Insausti Ordeñana, J., Bermejo Fraile, B., Cerda Cerda, E., de vigilancia de infección nosocomial en UCI, Grupo de estudio.** 2005. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos. Informe del año 2002. *Med Intensiva*, **29**:1-12.
- Andes, D.R. y Craig, W.A.** 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in meningitis. *Infect Dis Clin N Am*, **13**:595-618.
- Andersson, M. I. y MacGowan, A.P.** 2003. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother*, **51**:1-11.
- Andriole, V.T., Haverstock, D.C. y Choudhri, S.H.** 2005a. Retrospective analysis of the safety profile of oral moxifloxacin in elderly patients enrolled in clinical trials. *Drug Saf*, **28**:443–52.
- Andriole V.T.** 2005b. Quinolones: Past, present and future. *Clin Infect Dis*, **41**:S113-S119.
- Anguita-Alonso, P., Rouse, M.S., Piper, K.E., Steckelberg, J.M. y Patel, R.** 2006. Garenoxacin Treatment of Experimental Endocarditis Caused by Viridans Group Streptococci. *Antimicrob Agents and Chemother*, **50**(4): 1263-1267.
- Anzueto, A., Niederman, M.S., Pearle, J., Marcos, I., Restrepo, A. H. y Choudhri, S.H. for the Community-Acquired Pneumonia Recovery in the Elderly Study Group.** 2006. Community-acquired pneumonia recovery in the elderly (CAPRIE): efficacy and safety of moxifloxacin therapy versus that of levofloxacin. *Clin Infect Dis*, **42**:73–81.
- Appelbaum, P. C. y Hunter, P.A.** 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*, **16**:5-15.
- Aradottir, E. y Yogev, R.** 1999. The use of fluoroquinolones in pediatrics: a reassessment. *Semin Pediatr Infect Dis*, **10**: 31-37.
- Arlington Medical Resources. Hospital Antibiotic Market Database [online]** 2004. Accessed on 25 July 2006. URL: <http://www.amr-data.com/>
- Bajaj, A.K. y Gupka, S.C.** 1986. Contact hypersensitivity to topical antibacterial agents. *Int J Dermatol*, **25**:103-105.
- Ball, P.** 1998. The quinolones: history and overview: in *The Quinolones*, 2nd ed. Andriole, V.T. (ed). San Diego, CA, USA; Academic Press, pp. 1-28.
- Ball, P.** 2000a. New antibiotics for community-acquired lower respiratory tract infections: improved activity at a cost?. *Int J Antimicrob Agents*, **16**:263-272.
- Ball, P.** 2000b. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother*, **46**:17-24.
- Ball, P.** 2000c. Safety of the new fluoroquinolones compared with ciprofloxacin. *J Chemother*, **12**(1):8-11.
- Barone, A.** 2011. Antibacterial prophylaxis in neutropenic children with cancer. *Pediatr Rep*, **3**:e3.
- Barbosa, T. M. y Levy, S.B.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J Bacteriol*, **182**:3467–3474.
- Barret, J.F.** 2000. Moxifloxacin Bayer. *Curr Opin Invest Drugs*, **1**: 45-51.
- Barza, M.** 1988. Pharmacokinetics and efficacy on the new quinolones in infections on the eye, ear, nose and throat. *Rev Infect Dis*, **10**(1):S241-S247.

- Barza, M.** 1991. Use of quinolones for the treatment of eye and ear infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **10**(4):296-303.
- Basalobre, L., Ferrándiz, M.J., Liñares, J. y Tubau, F.** 2003. Viridans Group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase genes to *S. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**:2072-2081.
- Bass, J.W., Chan, D.S., Creamer, K.M. y cols.** 1997. Comparison of oral cephalexin, topical mupirocin and topical bacitracin for treatment of impetigo. *Pediatr Infect Dis J*, **16**:708-710.
- Basuri, T.S., Vishal, M. y Prachi, T.** 2011. Quinolones in 2011. *J Pharm Res*, **4**(4):1294-1297.
- Berger-Bachi, B.** 2002. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol*, **292**:27-35.
- Bertino J.Jr. y Fish D.** 2000. The safety profile of the fluoroquinolones. *Clin Ther*, **22**:798-817.
- Bhasin, R., Arce, F.C. y Pasmantier, R.** 2005. Hypoglycemia associated with the use of gatifloxacin. *Am J Med Sci*, **330**:250-253.
- Bhavnani, S.M. y Ballow, C.H.** 2000. New agents for Gram-positive infections. *Curr Opin Microbiol*, **3**:528-534.
- Bishop, E.J. y Howden, B.P.** 2007. Treatment of *Staphylococcus aureus* infections: new issues, emerging therapies and future directions. *Expert Opin Emerging Drugs*, **12**(1):1-12.
- Blondeau, J.M.** 1999. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin Ther*, **21**: 3-40.
- Blondeau, J.M., Hansen, G., Metzler, K.L., Borsos, S., Irvine, L.B. y Blanco, L.** 2003. *In vitro* susceptibility of 4903 bacterial isolates to gemifloxacin and advanced fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents*, **22**:147-154.
- Blondeau, J.M. y Tillotson, G.** 2008. Role of gemifloxacin in the management of community-acquired lower respiratory tract infections. *Int J Antimicrob Agents*, **31**:299-306.
- Bogaerts, P., Berhin, C., Nizet, H., Glupczynski, Y.** 2006. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter*, **11**(5):441-445.
- Bolon, M.K.** 2009. The newer fluoroquinolones. *Infect Dis Clin North Am*, **23**:1027-1051.
- Boyce, J.M.** 2001. MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection. *J Hosp Infect*, **48**(A):S9-S14.
- Breneman, D.L.** 1990. Use of mupirocin ointment in the treatment of secondarily infected dermatoses. *J Am Acad Dermatol*, **22**:886-892.
- Brown, M. H., Paulsen, I.T. y Skurray, R.A.** 1999. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol*, **31**:394-395.
- Bryan, J.P., Watres, C., Sheffield, J., Krieg, R.E., Perine, P.L. y Wagner, K.** 1990. *In vitro* activities of tosufloxacin, temafloxacin, and A-56620 against pathogens of diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**:368-370.
- Bryskier, A. y Chantot, J.-F.** 1995. Classification and structure-activity relationship of fluoroquinolones. *Drugs*, **49**:16-28.
- [BTS] British Thoracic Society Standards of Care Committee BTS** 2001. Guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Thorax*, **56**:1-64.
- Burkhardt, O., Köhnlein, T., Pap, T. y cols.** 2004. Recurrent tendinitis after treatment with two different fluoroquinolones. *Scand J Infect Dis*, **36**:315-316.
- Cacho, J., Sanz, F., Blanco, M.A. y Grupo de ETS-Perinatal de SMMC.** 2001. La enfermedad silenciosa por *Chlamydia trachomatis*: necesidad urgente de detección y tratamiento en mujeres. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **19**:419-421.
- Caelli, M., Porteous, J., Carson, C.F., et al.** 2000. Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp Infect.*; **46**:236-237.
- Calleghan, M.C., Ramírez, R., Kane, S.T., Cochran, D.C. y Jensen, H.** 2003. Antibacterial activity of the fourth-generation fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against ocular pathogens. *Advances Ther*, **20**(5):246-252.
- de la Campa, A.G., Basalobre, L., Ardanuy, C., Fenoll, A. y Liñares, J.** 2004. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *S. pneumoniae* clones, Spain. *Emerg Infect Dis*, **10**:1751-1759.
- Capitano, B., Mattoes, H.M., Shore, E. y cols.** 2004. Steady-state intrapulmonary concentrations of moxifloxacin, levofloxacin, and azithromycin in older adults. *Chest*, **125**:965-973.

- Cbignell, A.** 2009. European (IUSTI/WHO) Guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoeae in adults. *Int J of STD & AIDS*, **20**:453-457.
- [CDC], Centers for Disease Control and Prevention.** 1997. Control and prevention of meningococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep*, **46**(RR5):1-10.
- [CDC], Center for Disease Control.** 2001. Incidence of soft tissue infections: San Francisco General Hospital—1996–2000. *MMWR*, **50**:381–384.
- Cecchetti, V., Fravolini, A., Lorenzini, M.C., Tabarrini, O., Terni, P. y Xin, T.** 1996. Studies on 6-aminoquinoloneose: synthesis and antibacterial evaluation. *J Med Chem*, **39**:436-445.
- Chen, C.R., Malik, M., Snyder, M. y Drlica, K.** 1996. NA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J Mol Biol*, **258**: 627-637.
- Chen, F. J., Lauderdale, T.L., Ho, M. y Lo, H.J.** 2003. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, **9**:265-271.
- Champoux, J.J.** 2001. *DNA* topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**:369-413.
- Chavez-Bueno, S. y Stull, T.L.** 2009. Antibacterial agents in Pediatrics. *Infect Dis Clin N Am*, **23**:865-880.
- Chien, S., Wells, T.G., Blumer, J.L., Kearns, G.L., Bradley, J.S., Bocchini, J.A., Natarajan, J., Maldonado, S. y Noel, G.J.** 2005. Levofloxacin pharmacokinetics in children. *J Clin Pharmacol*, **5**(2):153-160.
- Chow, R.T., Dougherty, T.J., Fraimow, H.S., Bellin, E.Y. y Miller, M.H.** 1988. Association between early inhibition of DNA synthesis and the MICs and MBCs of carboxyquinolone antimicrobial agents for wild-type and mutant [*gyrA* nfxB(*ompF*) *acrA*] *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother*, **32**:1113-1118.
- Chowdhury, M.H. y Tunkel, A.R.** 2000. Antibacterial agents in infections of the central nervous system. *Infect Dis Clin N Am*, **14**:391-408.
- Chu, D.T.W., Fernandes, P.B., Claiborne, A.K., Shen, L. y Pernet, A.G.** 1988. Structure-activity relationships in quinolone antibacterials: design, synthesis and biological activities of novel isothiazoloquinolones. *Drugs Exp Clin Res*, **14**:379-383.
- Chu, D. T. y Fernandes, P.B.** 1989. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, **33**:131-135.
- Chu, D.T.W.** 1996. The future role of quinolones. *Exp Opin Ther Patents*, **6**:711-737.
- Chu, C., Su, L.H., Chu, C.H., Baucheron, S., Cloeckert, A. y Chiu, C.H.** 2005. Resistance to fluoroquinolones linked to *gyrA* and *parC* mutations and overexpression of *acrAB* efflux pump in *Salmonella enterica* serotype Cholerasuis. *Microb Drug Resist*, **11**:248-253.
- Committee on Infectious Diseases.** 2006. The use of systemic fluoroquinolones. *Pediatrics*, **118**:1287-1292.
- Corbett, K.D., Shultzaberger, R.K. y Berger, J.M.** 2004. The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(19):7293-7298.
- Courvalin, P.** 1990. Plasmid-mediated 4-quinolone resistance: a real or apparent absence?. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**:681-684.
- Crawford, S.E., Boyle-Vavra, S. y Daum, R.S.** 2007. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: Hooper, D., Scheld, M. eds. *Emerging Infections*. Vol.7. Washington, DC.: ASM Press. 157-179.
- Crumplin, G.C. y Smith, J.T.** 1975. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrob Agents Chemother*, **8**:251-261.
- Cunha, B.A.** 2001. Pneumonia in the elderly. *Clin Microbiol Infect*, **7**:581–588.
- Dacre, J.E., Emmerson, A.M. y Jenner, E.A.** 1983. Nasal carriage of gentamicin and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with topical pseudomonic acid. *Lancet*, **II**:1036-1037.
- Dalhoff, A.** 2001. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of the C-8 methoxy quinolone moxifloxacin and the C-8 chlorine quinolone BAY y 3118. *Clin Infect Dis*, **32**(Suppl 1): S16-S22.
- Daum, R.S.** 2007. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, **357**(4):380-390.
- Davidson, R., Cavalcanti, R., Brunton, J.L. y cols.** 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N Engl J Med*, **346**:747-750.

- Davies, T.A., Kelly, L.M., Pankuch, G.A., Credito, K.L., Jacobs, M.R. y Appelbaum, P.C.** 2000. Antipneumococcal activities of gemifloxacin compared to those of nine other agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:304-310.
- De Sarro, A. y De Sarro, G.** 2001. Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. *Curr Med Chem*, **8**: 371-384.
- Dean, F., Krasnow, M.A., Otter, R., Matzuk, M.M., Spengler, S.J. y Cozzarelli, N.R.** 1982. *Escherichia coli* type-I topoisomerases: Identification, mechanism and role in recombination. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, **47**: 769-777.
- DeMarco, C.E., Cushing, L.A., Frempong-Manso, E. y Kaatz, G.W.** 2007. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**:3235-3239.
- DiGate, R.J. y Marians, K.J.** 1992. *Escherichia coli* topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA. *J Biol Chem*, **267**:20532-20535.
- Dillon, Jr. H.C.** 1989. Topical and systemic therapy for pyodermas. *Int J Dermatol*, **19**:443-451.
- Dinardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. y Wright, A.** 1992. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutation in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**:43-52.
- DiNubile, M.J. y Lipsky, B.A.** 2004. Complicated Infections of skin and skin structure infections: When infection is more than skin deep. *J Antimicrob Chemother*, **53**:37-50.
- Drlica, K., Engle, E.C. y Manes, S.H.** 1980. DNA gyrase on the bacterial chromosome: possibility of two levels of action. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**: 6879-6883.
- Drlica, K. y Zhao, X.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**:377-392.
- Drlica, K.** 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol*, **2**:504-508.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J. y Zhao, X.** 2008. Quinolone-mediated bacterial cell death. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(2):385-392.
- Domagala, J.M.** 1994. Structure-activity and structure-side effect relationship for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother*, **33**:685-706.
- Donnenfeld, E.D., Perry, H.D., Snyder, R.W., Moadel, R., Elsky, M. y Jones, H.** 1997. Intracorneal, aqueous humor and vitreous humor penetration of topical and oral ofloxacin. *Arch Ophthalmol*, **115**:173-176.
- Durack, D.T.** 1982. Experimental bacterial endocarditis. II. Survival of a bacteria in endocardial vegetations. *Br J Exp Pathol*, **53**:50-53.
- Dux, P.H., Fields, L. y Pollock, D.** 1988. Two percent topical mupirocin *versus* systemic erythromycin and dicloxacillin in primary and secondary skin infections. *Curr Ther Res Clin Exp*, **40**:933-940.
- Eliopoulos, G.M., Gardella, A. y Moellering Jr., R.C.** 1984. *In vitro* activity of ciprofloxacin, a new carboxyquinolone antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**:331-335.
- Eliopoulos, GM.** 2004. Quinolone resistance mechanisms in pneumococci. *Clin Infect Dis*, **38**(Suppl 4):350-356.
- EMA. European Medicines Agency.** 2006a. EC 1901/2006 regulation.
- EMA. European Medicines Agency.** 2006b. Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals. Precautions for use in the SPC regarding prudent use guidance. EMEA/CVMP/416168/2006.
- EMA. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; Committee for Proprietary Medicinal Products.** 2006. Points to consider: the assessment of the potential for QT interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products [online] 2006c. Accessed 10 April 2006. URL: www.coresearch.biz/regulations/cpmp.pdf
- EMA. European Medicines Agency.** 2010. Science Medicines Health. Opinion following an article 35 referral for all veterinary medicinal products containing quinolones including fluoroquinolones intended for use in food-producing species. EMA/186029/2010.
- Engberg, J., Aarestrup, F.M., Taylor, D.E., Gerner-Smidt, P. y Nachamkin, I.** 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis*, **7**:24-34.
- Engle, E.C., Manes, S.H. y Drlica, K.** 1982. Differential effects of antibiotics inhibiting gyrase. *J Bacteriol*, **149**: 92-98.

- ESC Guidelines. The task force on the prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis of the European Society of cardiology (ESC).** 2009. Guidelines on the prevention, diagnosis and treatment on infective endocarditis (new version 2009). *European Heart J*, **30**:2369–2413.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giral, E. y Vila, J.** 2009. Mechanism of action and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*, **2**(1):40-61.
- Falagas, M.E., Matthaiou, D.K. y Bliziotis, I.A.** 2007. Systematic review: fluoroquinolones for the treatment of intra-abdominal surgical infections. *Alimen Pharm Ther*, **25**(2):123-131.
- Fang, G, Brennen C, y Wagener, M.** 1991. Use of ciprofloxacin versus use of aminoglycosides for therapy of complicated urinary tract infection: Prospective, randomised clinical and pharmacokinetic study. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**:1849-1855.
- [FDA] Food and Drug Administration.** 1998. New animal drug approvals. *Vet Newsl*, **13**:1.
- [FDA] Food and Drug Administration.** 1999. Sarafloxacin for poultry: withdrawal of approval of NADAs. *Fed Regist*, **66**:21282.
- [FDA] Food and Drug Administration.** 2005. Guidance for industry: uncomplicated skin and skin structure infections—Developing antimicrobial drugs for therapy [online] 1998. Accessed 10 April 2005. URL: www.fda.gov/cder/guidance/2566dft.pdf.
- Fernández-Obregón, A.C., Rohrbach, J., Reichel, M.A. y Willis, C.** 2005. Current use of anti-infectives in dermatology. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **3**(4):557-591.
- Ferrara, A.M.** 2005. New fluoroquinolones in lower respiratory tract infections and emerging patterns of pneumococcal resistance. *Infection*, **33**:106–114.
- Ferrara, A.M.** 2007. A brief review of moxifloxacin in the treatment of elderly patients with community-acquired pneumoniae (CAP). *Clin Interv Aging*, **2**(2):179–187.
- Ferrero, L., B. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of gyrA and grlA mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother*. **39**:1554-1558
- Ferrero, F., Ossorio, M., Erikson, P. y Duran, A.** 2000. *Mycoplasma pneumoniae* en niños con neumonía. *Arch Argent Pediatr*, **98**:12-17.
- Fiebelkorn, K.R., Crawford, S.A., McElmeel, M.L. y Jorgensen, J.H.** 2003. Practical disc diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, **41**:4740–4744.
- File, T.M. Jr, y Tan, J.S.** 1995. Treatment of skin and soft-tissue infections. *Am J Surgery*, **169**(5A Suppl):27S–33S.
- Finch, R., Schürmann, D., Collins, O., Kubin, K., McGivern, J., Bobbaers, H., Izquierdo, J.L., Nikolaidis, P., Ogunbare, F., Raz, R., Zuck, P. y Hoeffken, G.** 2002. Randomized controlled trial of sequential intravenous (i.v.) and oral moxifloxacin compared with sequential i.v. and oral co-amoxiclav with or without clarithromycin in patients with community-acquired pneumonia requiring initial parenteral treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:1746–1754.
- Fogarty, C., Grossman, C., Williams, J., Haverstock, D., y Church, D.** 1999. Efficacy and safety of moxifloxacin vs clarithromycin for community-acquired pneumonia. *Infect Med*, **16**:748–763.
- Forsythe, C.T. y Ernst, M.T.** 2007. Do fluoroquinolones commonly cause arthropathy in children?. *CJEM*, **9**:459-462.
- Frazee, B.W., Lynn, J., Charlebois, E.D., Lambert, L., Lowery, D., y Perdreau-Remington, F.** 2005. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in emergency department skin and soft tissue infections. *Ann Emerg Med*, **45**:311–320.
- Frieden, T.R. y Mangi, R.J.** 1990. Inappropriate use of oral ciprofloxacin. *JAMA* **264**:1438-1440
- Frothingham, R.** 2004. Quinolone safety and efficacy more important than potency. *Emerg Infect Dis*, **10**:156-157.
- Fukuda, H. y Hiramatsu, K.** 1999. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:410-412.
- Fung-Tomc, J.C., Minassian, B., Kolek, B., Huczko, E., Aleksunes, L., Stickle, T., Washo, T., Gradelski, E., Valera, L. y Bonner, D.P.** 2000. Antibacterial spectrum of a novel des-Fluoro(6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:3351-3356.
- Galani, L., Pefanis, A., Sakka, V., Iliopoulos, D., Donta, I., Triantafyllidi, H., Skiadas, I., Karayiannakos, P. y Giamarellou, H.** 2009. Successful treatment with moxifloxacin of experimental aortic valve endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*, **33**(1):65-69.

- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. y Ramos, J.L.** 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**:393-410.
- García-de-la-María, C., Marco, F., Armero, Y., Soy, S., Moreno, A., del Río, A., Almela, A.M., Cervera, C., Ninot, S., Falces, C., Mestres, C.A., Gatell, J.M., Jiménez de Anta, M.T., Miró, J.M. y the Hospital Clínic Experimental Endocarditis Study Group.** 2010. Daptomycin is effective for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant and glycopeptide-intermediate *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**(7):2781-2786.
- Gaunt, P.N. y Lambert, B.E.**, 1998. Single-dose ciprofloxacin for the eradication of pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother*, **21**:489-496.
- Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M. y cols.** 2005. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**:1802-1807.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H. y Nash, H.A.** 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **73**: 3872-3876.
- Gemmell, C.G., Edwards, D.I., Fraise, A.P., Gould, F.K., Ridgway, G.L., y Warren, R.E.** 2006. Guidelines for the prophylaxis y treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother*, **57**:589-608.
- Gendrel, D. y Cohen, R.** 2008. Bacterial diarrheas and antibiotics: European recommendations. *Arch Pediatr*, **15** (1):S93-S96.
- Gentry, L.O.** 1991. Review of quinolones in the treatment of infections of the skin and skin structure. *J Antimicrob Chemother*, **28**:97-110.
- Gentry, D.R., Rittenhouse, S.F., McCloskey, L. y Holmes, D.J.** 2007. Stepwise exposure of *Staphylococcus aureus* to pleuromutilins is associated with stepwise acquisition of mutations in *rplC* and minimally affects susceptibility to retapamulin. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**:2048-2052.
- Giordano, P., Weber, K., Gesin, G. y Kubert, J.** 2007. Skin and skin structure infections: treatment with newer generation fluoroquinolones. *Ther Clin Risk Manag*, **3**(2):309-317.
- Gomi, H., Jiang, Z.D., Adachi, J.A., Ashley, D., Lowe, M., Verenkar, M.P., Steffen, R. y DuPont, H.L.** 2001. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of bacterial enteropathogens causing traveler's diarrhea in four geographic regions. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**:212-216.
- Goodman, L.J., Fliegelman, R.M., Trenholme, G.M. y Kaplan, R.L.** 1984. Comparative *in vitro* activity of ciprofloxacin against *Campylobacter* spp. and other bacterial enteric pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**:504-506.
- Gosbell, I.B.** 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: impact on dermatology practice. *Am J Clin Dermatol*, **5**:239.
- Gorwitz, R.J., Jernigan, D.B., Powers, J.H., y Jernigan, J.A.** 2006. Strategies for clinical management of MRSA in the community: Summary of an experts' meeting convened by the Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved October 11, 2007, from http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/CAMRSA_ExpMtgStrategies.pdf
- Grady, R.** 2003. Safety profile of quinolone antibiotics in the pediatric population. *Pediatr Infect Dis J*, **22**(12):1128-1132.
- Guay, D.** 2003. Treatment of bacterial skin and skin structure infections. *Expert Opin Pharmacother*, **4**:1259-1275.
- Gudiol, F., Aguado, J.M., Pascual, A., Pujol, M., Almirante, B., Miró, J.M., Cercenado, E., Domínguez, M.A., Soriano, A., Rodríguez-Baños, J. y Bouza, E.** 2009. Documento consenso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, sobre el tratamiento de la bacteremia y la endocarditis causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **27**(2):105-115.
- Gurguí, M.** 2003. Nuevas quinolonas. *Med Clin (Barc)*, **120**(12):458-459.
- Gutierrez-Zufiaurre, N.** 2004. Relación entre la estructura, la actividad y los efectos adversos de la quinolonas. *Rev Esp Quimioter*, **17**:232-243.
- Hannan, P.C., Windsor, G.D., de Jong, A., Schmeer, N. y Stegemann, M.** 1997. Comparatives susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**:2037-2040.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A.H., Sorensen, S.J.** 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(9):3332-3337.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmolle, M. y Sorensen, S.J.** 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*, **60**:145-147.

- Harbarth, S., Ferriere, K., Hugonnet, S., Ricou, B., Suter, P. y Pittet, D.** 2002. Epidemiology and prognostic determinants of bloodstream infections in surgical intensive care. *Arch Surg*, **137**:1353-1359.
- Harrel, R.M.** 1999. Fluoroquinolone-induced tendinopathy: What do we know?. *South Med J*, **92**:622-625.
- Hassan, A., Wahab, M.F., Farid, Z. y el-Rooby, S.** 1970. Treatment of typhoid and paratyphoid fever with nalidixic acid. *J Trop Med Hyg*, **73**:145-147.
- Hayashi, N., Y. Nakata, y Yazaki, A.** 2004. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**:799-803.
- Hawkey, P.M. y Jones, A.M.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob. Chemother*, **64**(1):i3-i10.
- Heddle, J. G., Barnard, F.M., Wentzell, L.M. y Maxwell, A.** 2000. The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids*, **19**:1249-1264.
- Hiasa, H. y Shea, M.E.** 2000. DNA-gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem*, **275**:34780-34786.
- Higgins, N.P., Peebles, C.L., Suguino, A. y Cozzarelli, N.R.** 1978. Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**:1773-1777.
- Higgins, P. G., Fluit, A.C. y Schmitz, F.-J.** 2003. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current Drug Targets*, **4**:181-190.
- Hooper, D.C.** 1995. Quinolones mode of action. *Drugs*, **49**(Suppl2):10-15.
- Hooper, D. C.** 1998a. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and antitopoisomerase resistance. *Clin.Infect.Dis.* **27 Suppl 1**:S54-S63.
- Hooper, D.C.** 1998b. Clinical applications of quinolones. *Biochim Biophys Acta*, **1400**(1-3):45-61.
- Hooper, D. C.** 1999. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*, **58**(Suppl 2):6-10.
- Hooper, D.C.** 2000. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis*, **30**:243-254.
- Hooper, D.C.** 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis*, **2**:530-538.
- Hooton, T.M., Latham, R.H., Wong, E.S., Johnsn, C., Roberts, P.L. y Stamm, W.E.** 1989. Ofloxacin vs trimetropim-sulfamethoxazole for treatment of acute cystitis. *Antimicrob Agents Chemother*, **33**:1308-1312.
- Hoshino, K., Kitamura, A., Morrissey, I., Sato, K., Kato, J., y Ikeda, H.** 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**(11): 2623-2627.
- Hu, X.E., Kim, N.K., Gray, J.L., Almsteed, J.I.K., Seibel, W.L., y Ledoussal, B.** 2003. Discovery of (3S)-Amino-(4R)-ethylpiperidinyl quinolones as potent antibacterial agents with a broad spectrum of activity against resistant pathogens. *J Med Chem*. **46**:3655-3661.
- Huang, S.S., Yokoe, D.S., Hinrichsen, V.L. y cols.** 2006. Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriemia. *Clin Infect Dis*, **43**:971-978.
- Ince, D. y Hooper, D.C.** 2000. Mechanisms and frequency of resistance to premafloxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug target interactions. *Antimicrob Agents Chemother*. **44**:3344-3350.
- Ince, D. y Hooper, D.C.** 2003. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J Bacteriol* **185**:6883-6892.
- Jack, D.L., Yang, N.M. y Saier, M.H.** 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem*, **268**:3620-3639.
- Jacoby, G.A.** 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, **41**:S120-S126.
- Janssens, J.P.** 2005. Pneumonia in the elderly (geriatric) population. *Curr Opin Pulm Med*, **11**:226-230.
- Jiménez, T., Cantón, E., Ramón, M.S. y Gobernado, M.** 1990. Estudio cinético de la actividad bactericida de lomefloxacin sobre *S. aureus* Sa-1 y *P. aeruginosa* Psa-1. *Rev Esp Quimioterap*, **3**:357-361.
- Jones, M. E., Critchley, I.A., Karlowsky, J.A., Blosser-Middleton, R.S., Schmitz, F.-J., Thornsberry, C. y Sahm, D.F.** 2002. *In vitro* activities of novel nonfluorinated quinolones PGE 9262932 and PGE 9509924 against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, with defined mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:1651-1657.

- Jones, R.N., Li, Q., Kohut, B., Biedenbach, D.J., Bell, J. y Turnidge, J.D.** 2006a. Contemporary antimicrobial activity of triple antibiotic ointment: a multistep study of recent clinical isolates in the United States and Australia. *Diag Microbiol Infect Dis*, **54**:63-71.
- Jones, R.N., Fritsche, T.R., Sader, H.S. y Ross, J.E.** 2006b. Activity of retapamulin (SB-275833), a novel pleuromutilin, against selected resistant Gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**:2583-2586.
- Jorgensen, J.H., Weigel, L.M., Ferrano, M.J., Swendson y Tenover, J.M.** 1999. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* loci. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:329-334.
- Kaatz, G. W., Seo, S.M., O'Brien, L., Wahiduzzaman, M. y Foster, T.J.** 2000. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:1404-1406.
- Kampranis, S.C., Bates, A.D. y Maxwell, A.** 1999. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(15):8414-8419.
- Kang, C.I., Kim, H.B. y Choe, K.-W.** 2004. Risk factors for ciprofloxacin resistance in bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, **10**(1):71-76.
- Karageorgopoulos, D.E. y Falagas, M.E.** 2009. New antibiotics: optimal use in current clinical practice. *Int J Antimicrob Agents*, **34S**:S55-S62.
- Karchmer, A.W.** 1985. Staphylococcal endocarditis. Laboratory and clinical basis for antibiotic therapy. *Am J Med*, **78**:116-127.
- Karchmer, A.W.** 1999. Fluoroquinolone treatment of skin and skin structure infections. *Drugs*, **58**(2):82-84.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Higara, S., y Suzuki, H.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**:393-404.
- Keating, G.M. y Scott, L.J.** 2004. Moxifloxacin: a review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*, **64**:2347-2377.
- Kern, W. V., Oethinger, M., Jellen-Ritter, A.S. y Levy, S.B.** 2000. Nontarget gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:814-820.
- Kevan, L. y Wang, J.C.** 1980. Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base-pairs of deoxyribonucleic acid and $\alpha_2\beta_2$ protein core. *Biochemistry*, **19**:5229-5234.
- Keynan, D.N., Feldbrin, O. y Poch, F.Z.** 2004. Concentrations of moxifloxacin in serum and synovial fluid, and *in vivo* bactericidal activity against arthritis-causing pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **48**(4):283-286.
- Khan, W.A., Seas, C., Dhar, U., Salam, M.A. y Bennish, M.L.** 1997. Treatment of shigellosis. V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **126**:697-703.
- Kim, O.K., Barret, J.F. y Ohemeng, K.** 2001. Advances in DNA gyrase inhibitors. *Exp Opin Invest Drugs*, **10**:199-212.
- King, D. E., Malone, R. y Lilley, S.H.** 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician*, **61**:2741-2748.
- Khodursky, A.B. y Cozzarelli, N.R.** 1998. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem*, **273**:27668-27677.
- Kollef, M.H.** 2000. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, **31**(4):S131-S138.
- Krcmery, V. Jr.** 1995. The use of quinolones as therapy in granulocytopenic cancer patients. Comparison with other antimicrobials. *Drugs*, **49**(Suppl 2):139-143.
- Khurana, A., Vinayek, N., Recco, R.A., Go, E.S. y Zaman, M.M.** 2004. The incidence of *Clostridium difficile*-associated and non-*C. difficile*-associated diarrhea after use of gatifloxacin and levofloxacin in an acute-care facility. *Clin Infect Dis*, **39**:602-603.
- Lambert, P.A.** 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*, **95**(41):22-26.
- Laponogov, I., Sohi, M.K., Veselkov, D.A., Pan, X., Sawhney, R., Thompson, A.W., McAuley, K.E., Fisheryark, R. y Sanderson, M.R.** 2009. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat Struct & Mol Biol*, **16**:667-669.

- Lautenbach, E., Strom, B.L., Bilker, W.B., Patel, J.B., Edelstein, P.H. y Fishman, N.O.** 2001. Epidemiological Investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, **33**:1288-1294.
- Lecomte, S., Baron, M.H., Chenon, M.T., Coupry, C. y Moreau, N.J.** 1994. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**(12):2810–2816.
- Ledoussal, B., Almstead, J.K. y Flaim, C.P.** 1999. Novel fluoroquinolone, structure-activity and design of new potent and safe agents. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco 1999. F-544.
- Lee, M.C., Rios, A.M., Aten, M.F., Mejias, A., Cavuoti, D., McCracken, G.H. Jr. y cols.** 2004. Management and outcomes of skin and soft tissue abscesses caused by community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J*, **23**:123–127.
- Leibovitz, E., Janco, J. Piglansky, L., Press, J., Yagupsky, P., Reinhart, H., Yaniv, I. y Dagan, R.** 2000. Oral ciprofloxacin vs. intramuscular ceftriaxone as empiric treatment of acute invasive diarrhea in children. *Pediatr Infect Dis J*, **19**:1060-1067.
- Leibovitz, E.** 2006. The use of fluoroquinolones in children. *Curr Opin Pediatr*, **18**:64-70.
- Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H. y Brundage, .P.** 1962. 1,8-naphthyridine derivatives. A new clas of chemotherapeutic agents. *J Med Chem*, **5**:1063-1065.
- Levine, C., Hiasa, H. y Marians, K.J.** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta-Genet Struct Express*, **1400**:29-43.
- Levy, S.B.** 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**:695-703.
- Levy, S.B. y Marshall, B.** 2004. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat Med*, **10**(12): S122–S129.
- Lew, D.P. y Waldvogel, F.A.** 1999a. Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. *Drugs*, **58**(Suppl 2):85-91.
- Lew, D.P. y Waldvogel, F.A.** 1999b. Quinolones and osteomyelitis: state-of-the-art. *Drugs*, **49**(Suppl 2):100-111.
- Lewin, C.S. y Smith, J.T.** 1988. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, **22**(Suppl C):1-8.
- Lewin, C.S., Howard, B.M., Ratcliffe, N.T. y Smith, J.T.** 1989. 4-quinolones and the SOS response. *J Med Microbiol*, **29**:139-144.
- Lewin, C.S. y Amyes, S.G.B.** 1990. Bactericidal action of PD127391, an enhanced spectrum quinolone. *J Med Microbiol*, **33**: 67-70.
- Lewin, C.S., Morrissey, I. y Smith J.T.** 1991. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in anaerobic environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **10**(4):240-248.
- Leyden, J.J.** 1990. Mupirocin: a new topical antibiotic. *J Am Acad Dermatol*, **22**:879-883.
- Leyden, J.J.** 1992. Review of mupirocin ointment in the treatment of impetigo. *Clin Pediatr*, **31**:549-553.
- Leyva, S. y Leyva, E.** 2008. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol Soc Quím Méx*, **2**(1):1-13.
- Li, X. Z. y Nikaido, H.** 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, **64**:159-204.
- Lieu, P.K., Tok, S.C., Ismail, N.H. y Chng, H.H.** 1997. Ciprofloxacin-induced cutaneous vasculitis. *Allergy*, **52**(5):593-594.
- Lipsky, B. A. y C. A. Baker.** 1999. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents. *Clin Infect Dis*, **28**:352-364.
- Liu, J.H., Deng, Y.T., Zeng, Z.L., Gao, J.H., Chen, I. y Chen, Z.L.** 2008. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolated from pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**:2992-2993.
- Liu, L.F. y Wang, J.C.** 1978a. DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell*, **15**:979-984.
- Liu, L.F. y Wang, J.C.** 1978b. *Micrococcus luteus* DNA gyrase: active components y a model for its supercoiling of DNA. *Proc Nati Acad Sci USA*, **75**:2098-2102.
- Livermore, D.M.** 2009. Has the era of untreatable infections arrived?. *J Antimicrob Chemother*, **64**: i29–i36.

- Llorente, B., Leclerc, F. y Cedergren, R.** 1996. Using SAR and QSAR analysis to model the activity and structure of the quinolone-DNA complex. *Bio Med Chem*, **4**:61-71.
- Lode, H.** 2001. Evidence of different profiles of side effects and drug-drug interactions among the quinolones-the pharmacokinetic standpoint. *Chemotherapy*, **47**(Suppl 3): 24-31.
- Loeb, M.** 2003. Pneumonia in older persons. *Clin Infect Dis*, **37**:1335-1339.
- Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W.M., y Yu, E.W.** 2008. Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(9):3052-3060.
- Low, D.E.** 2004. Quinolone resistance among pneumococci: therapeutic and diagnostic implications. *Clin Infect Dis*, **38**(Suppl 4):357-362.
- Lowe, M.N. y Lamb, H.M.** 2000. Gemifloxacin. *Drugs*, **59**:1137-1147.
- Lustar, I.A., McCracken, G.H. y Friendland, I.R.** 1998. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis*, **27**:1117-1129.
- Mandell, L. A., Peterson, L.R., Wise, R., Hooper, D., Low, D.E., Schaad, U.B., Klugman, K.P. y Courvalin, P.** 2002. The battle against emerging antibiotic resistance: Should fluoroquinolones be used to treat children?. *Clin Infect Dis*, **35**:721-727.
- Mangione-Smith, R., Wong, L., Elliot, M.N., McDonald, L. y Roski, J.** 2005. Measuring the quality of antibiotic prescribing for upper respiratory infections and bronchitis in 5 US health plans. *Arch Pediatr Adolesc Med*, **159**:751-757.
- Maichuk, I., Vakhova, E.S. y Kononenko, A.** 1998. Lomefloxacin in treatment of infectious eye diseases. *Antibiot Khimioter*, **43**:32-35.
- Manes, S.H., Pruss, G.J. y Drlica, K.** 1983. Inhibition of RNA synthesis by oxolinic acid is unrelated to average DNA supercoiling. *J Bacteriol*, **155**: 420-423.
- Manjunatha, U. H., Dalal, M., Chatterji, M., Radha, D.R., Visweswariah, S.S. y Nagaraja, V.** 2002. Functional characterisation of mycobacterial DNA gyrase: an efficient decatenase. *Nucleic Acids Res*, **30**:2144-2153.
- Marco, F., García de la María, C., Armero, Y., Amat, E., Soy, D., Moreno, A., del Río, A., Almela, M., Mestres, C.A., Gatell, J.M., Jiménez de Anta, M.T., y Miró, J.M.** 2008. Daptomycin is effective in treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant and glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(7):2538-2543.
- Martin, S.J. y Zeigler, D.G.** 2004. The use of fluoroquinolones in the treatment of skin infections. *Expert Opin Pharmacother*, **5**(2):237-246.
- Martin, L.J., Flint, J., Ravel, A., Dutil, L., y Ratnam, S.** 2006. Antimicrobial resistance among *Salmonella* and *Shigella* isolates in five Canadian provinces (1997 to 2000). *Can J Infect Dis Med Microb*, **17**(4):243-250.
- Martinez, J.K., Alonso, A., Gómez-Gómez, J.M. y Baquero, F.** 1998. Quinolone resistance by mutations in chromosomal gyrase genes: Just the tip of the iceberg?. *J Antimicrob Chemother*, **42**:683-688.
- Martinez, F.J.** 2004. Monotherapy versus dual therapy for community-acquired pneumonia in hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, **38**(Suppl 4):328-340.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A. y Jacoby, G.A.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, **351**:797-799.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Conejo, M.C., Garcia, I., Joyanes, P., Domenech-Sanchez, A. y Benedi, V.J.** 2002. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:3926-3932.
- Maxwell, A.** 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol*, **5**:102-109.
- McAnally, T.P., Lewis, M.R., y Brown, D.R.** 1984. Effect of rifampicin and bacitracin on nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2**:422-426.
- Mermel, L.A., Farr, B.M., Sheretz, R.J. y Raad, I.I.** 2001. Guidelines for the management of intravascular related infections. *Clin Infect Dis*, **32**:1249-1272.
- Miller, M.H. y Mayers, M.** 2003. Treatment of eye infections. *Quinolone Antimicrobial Agents*. 3rd edition. Edited by David C. Hooper and Ethan Rubinstein. P. 291-309. ASM Press, Washington, D.C.
- Mizuuchi, K., Fisher, L.M., O'Dea, M.H. y Gellert, M.** 1980. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**:1847-1851.

- Morganroth, J., Dimarco, J.P., Anzueto, A., Niederman, M.S. y Choudhri, S.A.** 2005. A randomized trial comparing the cardiac rhythm safety of moxifloxacin vs levofloxacin in elderly patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Chest*, **128**:3398–3406.
- Morham, S.G., Kluckman, K.D., Voulomanos, N. y Smithies, O.** 1996. Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol Cell Biol*, **16**(12): 6804-6809.
- Morrissey, I.** 2010. Non-published manuscript. RR-100842-01. Grupo Ferrer Internal Archives.
- Mulvey, M.R. y Simor, A.E.** 2009. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?. *Can Med Ass J*, **180**(4):408-415.
- Murillo, O., Doménech, A., García, A., Tubau, F., Cabellos, C., Gudíol, F. y Ariza, J.** 2006. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**(12):4011-4017.
- Naber, K. G. y Adam, D.** 1998. Classification of fluoroquinolones. *Intern J Antimicrob Agents*, **10**:255-257.
- Naber, K.G.** 2001. Which quinolones are suitable for the treatment of urinary tract infections?. *Int J Antimicrob Agents*, **17**:331-341.
- Nakamura, S.** 1997. Mechanisms of quinolone resistance. *J Infect Chemother*, **3**:128-138.
- Nazir, J., Urban, C., Mariano, N., Burns, J., Tommasulo, B., Rosenberg, C., Segal-Maurer, S., y Rahal, J.J.** 2004. Quinolone-resistant *Haemophilus influenzae* in a long-term care facility: clinical and molecular epidemiology. *Clin Infect Dis*, **38**:1564-1569.
- Neralla, S. y Meyer, K.C.** 2004. Drug treatment of pneumococcal pneumonia in the elderly. *Drugs Aging*, **21**:851–64.
- Neuman, M.** 1998. Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clin Pharmacokin*, **14**:96-121.
- Neuman, K.C.** 2010. Evolutionary twist on topoisomerases: Conversion of gyrase to topoisomerase IV. *PNAS*, **107**(52):22363-22364.
- Nichols, R.L.** 1999. Optimal treatment of complicated skin and skin structure infections. *J Antimicrob Chemother*, **44**:19–23.
- Nicolle, L.E.** 1999. Quinolones in the aged. *Drugs*, **58**(2):49-51.
- Nord, C.E.** 1999. Use of newer quinolones for the treatment of intraabdominal infections: Focus on ciprofloxacin. *Infection*, **27**(3):166-172.
- Nydert, P., Lindemaim, S. y Nemeth, A.** 2011. Off-label drug use evaluation in paediatrics – applied to ciprofloxacin when use as treatment of cholangitis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, **20**(4):393-398.
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., y Jung, R.** 2005. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacother*, **25**(10):1353-1364.
- Oethinger, M., Kern, W. y Levy, S.B.** 2000. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:10-13.
- Okhravi, N., Towler, H.M., Hykin, P., Matheson, M. y Lightman, S.** 1997. Assessment of a standard treatment protocol on visual outcome following presumed bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol*, **81**:719-725.
- Owens, R. C., Jr.** 2001. Risk assessment for antimicrobial agent-induced QTc interval prolongation and torsades de pointes. *Pharmacotherapy*, **21**:301-319.
- Ozturk, F., Kortunay, S., Kurt, E., Ilker, S.S., Basci, N.E. y Bozkurt, A.** 1999. Penetration of topical and oral ciprofloxacin into the aqueous and vitreous humor in inflamed eyes. *Retina*, **19**:218-222.
- Palumbo, M., Gatto, B., Zagotto, G. y Palu, G.** 1993. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol*, **1**:232-235.
- Pan, X. S., Ambler, J., Mehtar, S. y Fisher, L.M.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**:2321-2326.
- Parish, L.C., Routh, H.B., Miskin, B. y cols.** 2001. Moxifloxacin versus cephalexin in the treatment of uncomplicated skin infections. *Int J Clin Pract*, **54**:497-503.
- Park-Wyllie, L.Y., Juurlink, D.N., Kopp, A., Shah, B.R., Stukel, T.A., Stumpo, C. y cols.** Outpatient gatifloxacin therapy and dysglycemia in older adults. *N Engl J Med*, **354**:1352-1361.

- Parkkari, M., Paivarinta, H. y Salminen, L.** 1995. The treatment of endophthalmitis after cataract surgery: review of 26 cases. *J Ocul Pharmacol Ther*, **11**:349-359.
- Paterson, D.L.** 2004. "Collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*, **38**(Suppl 4):341-345.
- Paulsen, I. T., Brown, M.H. y Skurray, R.A.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*, **60**:575-608.
- Pawa, A., Noble, W.C. y Howell, S.A.** 2000. Co-transfer of plasmids in association with conjugative transfer of mupirocin or mupirocin and penicillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **49**:1103-1107.
- Pea, F., Pavan, F., Lugatti, E. y cols.** 2006. Pharmacokinetic and pharmaco-dynamic aspect of oral moxifloxacin 400 mg/day in elderly patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Clin Pharmacokinet*, **45**:287-295.
- Peeters, K.A., Mascini, E.M., Blok, H.E. y Sanders, C.J.** 2002. Increase in rate of resistance to fusidic acid among *Staphylococcus aureus* isolates from patients admitted with atopic dermatitis. *Ned Tijdschr Geneesk*, **146**:2100-2101.
- Perron, G.G., Quessy, S. y Bell, G.** 2008. A Reservoir of Drug-Resistant Pathogenic Bacteria in Asymptomatic Hosts. *PLoS*, **3**(11): e3749.
- Perry, C.M., Balfour, J.A.B. y Lamb, H.M.** 1999. Gatifloxacin. *Drugs*, **58**:683-696.
- Pestova, E., Millichap, J.J., Noskin, G.A., y Peterson, L.R.** 2000. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother*; **45**:583-590.
- Pestova, E., Millichap, J.J., Siddiqui, F., Noskin, G.A. y Peterson, L.R.** 2002. Non-PmrA-mediated multidrug resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, **49**:553-556.
- Perry, C.M., Balfour, J.A.B. y Lamb, H.M.** 1999. Gatifloxacin. *Drugs*, **58**:683-696.
- Peterson, L. R.** 2001. Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis*, **33**:S180-S186.
- Petitpretz, P., Arvis, P., Marel, M., Moita, J., Urueta, J. y CAP5 Moxifloxacin Study Group.** 2001. Oral moxifloxacin vs high-dosage amoxicillin in the treatment of mild-to-moderate, community-acquired, suspected pneumococcal pneumonia in adults. *Chest*, **119**(1):185-195.
- Piddock, L.J., Jonhson, M., Ricci, V. y Hill, S.L.** 1998. Activities of new fluoroquinolones against fluoroquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2956-2960.
- Piddock, L.J., Jin, Y.F., Ricci, V. y Asuquo, A.E.** 1999. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:61-71.
- Piddock, L.J.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microb Rev*, **19**:382-402.
- Pinon, M., Scolfaro, C., Bignamini, E., Cordola, G., Esposito, I, Milano, R., Mignone, F., Bertaina, C. y Tovo, P.-A.** 2010. Two pediatric cases of multidrug-resistant tuberculosis treated with linezolid and moxifloxacin. *Pediatrics*, **126**(5):e1253-e1256.
- Poole, K.** 2000a. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2233-2241.
- Poole, K.** 2000b. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**:2595-2599.
- Price, E.H., de Louvoius, J. y Workman, M.R.** 2000. Antibiotics for *Salmonella* meningitis in children. *J Antimicrob Chemother*, **46**:653-655.
- Que, Y.-A. y Moreillon, P.** 2011. Infective endocarditis. *Nature Rev Cardiol*, **8**:322-336.
- Raghavan, M. y Linden, PK.** 2004. Newer treatment options for skin and soft tissue infections. *Drugs*, **64**(15):1621-1642.
- Rajagopalan, S. y Yoshikawa, T.T.** 2001. Antimicrobial therapy in the elderly. *Med Clin North Am*, **85**:133-147.
- Ramirez, J. A., Morrissey, I. y Ambler, J.E.** 2002. Clinician's manual on serious infections and fluoroquinolones. Science Press. December 2002. ISBN: 9781858739533/1858739535.
- Ramón, M.S., Cantón, E., Pemán, J., Pastor, A. y Martínez, J.P.** 1999. Mechanisms of action of quinolones against staphylococci and relationship with their *in vitro* bactericidal activity. *Chemotherapy*, **45**:175-182.

- Raoult, D., Houpiqian, P., Tisot Dupont, H., Riss, J.M., Arditi-Djiane, J. y Brouqui, P.** 1999. Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. Arch Intern Med, **159**:167-173.
- Ratcliffe, N.T. y Smith, J.T.** 1984. Ciprofloxacin and ofloxacin exhibit a rifampicin-resistant bactericidal mechanism not detectable in other 4-quinolone antibacterial agents. J Pharm Pharmacol, **36**:59.
- Ratcliffe, N.T. y Smith, J.T.** 1985. Norfloxacin has a novel bactericidal mechanism unrelated to that of other 4-quinolones. J Pharm Pharmacol, **37**:2P-93P.
- Ravenscroft, J.C., Layton, A. y Barnham, M.** 2000. Observations on high levels of fusidic acid resistant *Staphylococcus aureus* in Harrogate, North Yorkshire, UK. Clin Ep Dermatol, **25**(4):327-330.
- Reece, R.J. y Maxwell, A.** 1991. The C-terminal domain of *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. Nucleic Acids Res, **19**:1399-1405.
- Rennie, R.P., Jones, R.N., Mutnick, A.H. y cols.** 2003. Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the Sentry antimicrobial surveillance program. Diagn Microbio Infect Dis, **45**:287-293.
- Reyes, M.P. y Lerner, A.M.** 1983. Current problems in the treatment of infective endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis, **5**:314-321.
- Ridgway, G.L.** 1999. Quinolones in sexually transmitted diseases: state of the art. Drugs, **58**(Suppl 2):92-95.
- Ribera, A., Domenech-Sanchez, A., Ruiz, J., Benedi, V.J., Jimenez de Anta, M.T. y Vila, J.** 2002. Mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs are not relevant for quinolone resistance in epidemiological unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Microb Drug Resist, **8**:245-251.
- Ridenour, G., Lampen, R., Federspiel, J., Kritchevsky, S., Wong, E. y Climo, M.** 2007. Selective use of intranasal mupirocin and chlorhexidine bathing and the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection among intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol, **28**:1155-1161.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A. y Hooper, D.C.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med, **12**:83-88.
- Rodriguez-Martinez, J. M., A. Pascual, I. Garcia, y Martinez-Martinez, L.** 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. J Antimicrob Chemother, **52**:703-706.
- Ronald, A.** 1999. The quinolones and renal infection. Drugs, **58**(Suppl 2):96-98.
- Rose, T.F., Ellis-Pegler, R., Collins, J. y Small, M.** 1990. Oral pefloxacin mesylate in the treatment of continuous ambulatory peritoneal dialysis associated peritonitis: An open non-comparative study. J Antimicrob Chemother, **25**:853-859.
- Ross, J.J., Worthington, M.G. y Gorbach, S.L.** 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. N Engl J Med, **347**:65-67.
- Rossignoli, A., Clavenna, A., y Bonati, M.** 2007. Antibiotic prescription and prevalence rate in the outpatient paediatric population: analysis of surveys published during 2000-2005. Eur J Clin Pharmacol, **63**:1099-1106.
- Rouquette-Loughlin, C., Dunham, S.A., Kuhn, M., y Shafer, W.M.** 2003. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. J Bacteriol, **185**:1101-1106.
- Roychoudhury, S. y B. Ledoussal.** 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. Curr Drug Targets Infect Disord, **2**:51-65.
- Rubin, J., Yu, V.L. y Stool, E.** 1988. Malignant external otitis in children. J Pediatr, **113**:965-970.
- Rubinstein, E.** 2001. History of quinolones and their side effects. Chemotherapy, **47**(Suppl 3):3-8.
- Ruiz, J., Marco, F., Goni, P., Gallardo, F., Mensa, J., Trilla, A., Jimenez, D.A. y Vila, J.** 1995. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother, **36**:737-738.
- Ruiz, J., Goni, P., Marco, F., Gallardo, F., Mirelis, B., Jimenez, D.A. y Vila, J.** 1998. Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. Microbiol Immunol, **42**:223-226.
- Ruiz, J., Capitano, L., Nuñez, L., Castro, D., Sierra, J.M., Hatha, M., Borrego, J.J. y Vila, J.** 1999. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol, and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish. J Antimicrob Chemother. **43**:699-702.
- Ruiz, J., Sierra, J.M., De Anta, M.T. y Vila, J.** 2001. Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained *in vitro*. Intern J Antimicrob Agents, **18**:107-112.

- Ruiz, J., Gómez, M., Navia, M.M., Ribera, A., Sierra, J.M., Marco, F., Mensa, J. y Vila, J.** 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **42**:257-261.
- Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother*, **51**:1109-1117.
- Ruthenburg, A.J., Graybosch, D.M., Huetsch, J.C. y Verdine, G.L.** 2005. A superhelical spiral in the *Escherichia coli* DNA Gyrase A C-terminal domain impacts unidirectional supercoiling bias. *J Biol Chem*, **280**: 26177-26184.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazoga, M., Vila, J. y Torres, C.** 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**:3996-4001.
- Sáez-Llorens, X., McCoig, C., Feris, J., Vargas, S.L., Klugman, K.P., Hussey, G.D., Frenck, R.W., Falleiros-Carvalho, L-H., Arguedas, A.G., Bradley, J., Arrieta, A.C., Wald, E.R., Pancorbo, S., McCracken, G.H., Marques, S.R. y Trovan meningitis Study Group.** 2002. Quinolone treatment for pediatric bacterial meningitis: a comparative study of trovafloxacin and ceftriaxone with or without vancomycin. *Pediatr Infect Dis J*, **21**(1):14-22.
- Sánchez García, M.** 2011. Bacteriemia primaria y bacteriemia relacionada con catéter por estafilococos coagulasa-negativos. ¿Una complicación sin importancia?. *Med Intensiva*, **35**:206-207.
- Sanders, W.E.** 1988. Efficacy, safety, and potential economic benefits of oral ciprofloxacin in the treatment of infections. *Rev Infect Dis*, **10**:528-543.
- Sanders, C.C.** 2001. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clin Infect Dis*, **32**(Suppl 1):S1-S8.
- Saier, M. H. Jr., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., Liu, J., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Tseng, T.T. y Virk, P.S.** 1999. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **1**:257-279.
- Sanders, W.E.** 1988. Efficacy, safety, and potential economic benefits of oral ciprofloxacin in the treatment of infections. *Rev Infect Dis*, **10**:528-543.
- Saravolatz, L.D. y Leggett, J.** 2003. Gatifloxacin, gemifloxacin and moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, **37**:1210-1215.
- Schmitz, F.-J., y Tauber, M.G.** 1993. Pharmacodynamics of antibiotics in the therapy of meningitis: infection model observations. *J Antimicrob Chemother*, **31**:61-70.
- Schmitz, F.-J., Higgins, P.G., Mayer, S., Fluit, A.C. y Dalhoff, A.** 2002. Activity of quinolones against Gram-positive cocci: Mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **21**:647-659.
- Shiba, K., Sakamoto, M., Nakazawa, Y. y Sakai, O.** 1995. Effects of antiacid on absorption and excretion of new quinolones. *Drugs*, **49**(Suppl 2):360-361.
- Sierra, J. M., Ruiz, J., Jiménez De Anta, M.T. y Vila, J.** 2000. Prevalence of two different genes encoding NorA in 23 clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, **46**:145-146.
- Sierra, J. M., Marco, F., Ruiz, J., Jiménez De Anta, M.T. y Vila, J.** 2002. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, **8**:781-790.
- Sierra, J. M., Martínez-Martínez, L., Vázquez, F., Giralt, E. y Vila, J.** 2005. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**:1714-1719.
- Schmidt I. M., y Lode H.** 2006. Treatment of pneumonia in elderly patients. *Expert Opin Pharmacother*, **7**:499-507.
- Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N., O'Donnell, T.J., Chu, D.W., Cooper, C.S., Rosen, T. y Pernet, A.G.** 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry*, **28**:3886-3894.
- Shopsin, B., Zhao, X., Kreiswirth, B.N. y cols.** 2004. Are the new quinolones appropriate treatment for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*?. *Int J Antimicrob Agents*. **24**(1):32-34.
- Smart DJ.** 2008. Genotoxicity of topoisomerase II inhibitors: an anti-infective perspective. *Toxicology*, **254**(3):192-198.
- Smith, J.T.** 1986. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanism of resistance. *J Antimicrob Chemother*, **18**(Suppl D): 21-29.

- Solomkin, J.S., Hemsell, D.L., Sweet, R., Tally, F. y Bartlett, J.** 1992. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of intraabdominal infections. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administrations. Clin Infect Dis, **15**(1):S33-S42.
- Solomkin, J.S., Dellinger, E.P., Bohnen, J.M. y Rostein, O.D.** 1998. The role of oral antimicrobials for the management of intra-abdominal infections. New Horiz, **6**(2 Suppl):S46-S52.
- Solomkin, J.S., Wilson, S.E., Christou, N.V., Rotstein, O.D., Dellinger, E.P., Bennion, R.S., Pak, R. y Tack, K.** 2001. Results of a clinical trial of clinafloxacin versus imipenem/cilastatin for intraabdominal infections. Ann Surg, **233**: 79-87.
- Solomkin, J.S., Mazuski, J.E., Bradley, J.S. y cols..** 2010. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infections in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the selection of anti-infective agents for complicated intra-abdominal infections. <http://www.idsociety.org/content.aspx?id=4430#ia>. Accessed March, 24, 2010.
- Spelman, D.** 1999. Fusidic acid in skin and soft tissue infections. Int J Antimicrob Agents, **12**(2):S59-S66.
- Sprandel, K. A. y Rodvold, K.A.** 2003. Safety and tolerability of fluoroquinolones. Clin Cornerstone, **Suppl 3**:S29-S36.
- Srivenugopal, K.S., Lockshon, D. y Morris, D.R.** 1984. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. Biochemistry, **23**:1899-1906.
- Stahl, J.P., Croize, J., Lefebvre, M.A., Bru, J.P., Guyot, A., Leduc, D., Fourtillan, J.B., y Micoud, M.** 1986. Diffusion of ofloxacin into the cerebrospinal fluid in patients with bacterial meningitis. Infection, **14**:S254-S255.
- Stahlmann, R. y Lode, H.** 1999. Toxicity of quinolones. Drugs, **58**(2):37-42.
- Stahlmann, R.** 2002. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. Toxicol.Lett. **127**:269-277.
- Stahlmann, R. y Lode, H.** 2010. Safety considerations of fluoroquinolones in the elderly: an update. Drugs Aging. **27**(3):193-209.
- Stein, G.E.** 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer fluoroquinolones. Clin Infect Dis, **23**(Suppl 1):S19-S24.
- Stevens, D.L., Bisno, A.L. y Chambers, H.F.** 2005. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. Clin Infect Dis, **41**:1373-1406.
- Streit, J.M., Jones, R.N., Toleman, M.A., Stratchounski, L.S. y Fritsche, T.R.** 2006. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). Int J Anti microb Agents, **27**(5):367-375.
- Suh, B. y Lorber, B.** 1995. Quinolones. Med Clin North Am, **79**:869-894.
- Sumano, L.H., Ocampo, C.L., Brumbaugh, G.W. y Lizarraga, R.E.** 1998. Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. Br Poult Sci, **139**:42-46.
- Suto, M.J., Domagala, J.M., Roland, G.E., Mailloux, G.B. y Cohen, M.A.** 1992. Fluoroquinolones: relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity, and antimicrobial activity. J Med Chem, **35**(25):4745-4750.
- Taléns-Visconti, R., Garrigues, T.M. y Cantón, E.** 2002. Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismo de acción y resistencia. Rev Esp Quimioterap, **15**(4):313-324.
- Tapsall, J.** 2001. Antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae, WHO/CDS/CSR/2001.3. World Health Organizations, Geneva, Switzerland.
- Tavio, M. M., Vila, J., Perilli, M., Casanas, L.T., Macia, L., Amicosante, G. y Jimenez de Anta, M.T.** 2004. Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. J Med Microbiol, **53**:1119-1122.
- Threlfall, E.J. Ward, R.L., Skinner, J.A., Smith, H.R. y Lacey, S.** 1999. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* and treatment failure. Lancet, **353**:1590-1591.
- Traa, B.S., Walker, C.L.F., Munos, M. y Black, R.** 2010. Antibiotics for the treatment of dysentery in children. Int J Epidemiol, **39**:i70-i74.
- Tran, J. H. y Jacoby, G.A.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc Natl Acad Sci USA, **99**:5638-5642.
- Tran, J. H., Jacoby, G.A. y Hooper, D.C.** 2005a. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrob Agents Chemother, **49**:118-125.

- Tran, J. H., Jacoby, G.A. y Hooper, D.C.** 2005b. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**:3050-3052.
- Trucksis, M. y Depew, R.** 1981. Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**:2164-2168.
- Tse-Dinh, Y.C. y Wang, J.C.** 1986. Complete nucleotide sequence of the topA gene encoding *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Mol Biol*, **191**:321-331.
- Turnidge, J.D., Nimmo, G.R. y Francis, G.** 1996. Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals. *Med J Aust*, **164**(2):68-71.
- Udo, E.E., Pearman, J.W., y Grubb, W.B.** 1994. Emergence of high-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect*, **26**(3):157-165.
- UNICEF, WHO.** 2006. Pneumonia: the forgotten killer of children. New York: United Nations Children's Fund.
- Urban, C., Rahman, N., Zaho, X. y cols.** 2001. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* associated with levofloxacin therapy. *J Infect Dis*, **184**:794-798.
- Vall, M.**, 2004. Infecciones de transmisión sexual causadas por *Chlamydia trachomatis*. Consideraciones epidemiológicas. *Ginec Obstetr Clin*, **5**(4):237-238.
- Van Bambeke, F., Michot, J.-M., Van Eldere, J., y Tulkens, P.M.** 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect*, **11**:256-280.
- Van Bambeke, F. y Tulkens, P.M.** 2009. Safety profile on the respiratory fluoroquinolone moxifloxacin: comparison with other fluoroquinolones and other antibacterial classes. *Drug Saf*, **32**:359-378.
- Van den Bogaard, A.E. y Stobberingh, E.E.** 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents*, **14**:327-335.
- Varon, E., Janoir, C., Kitzis, M.D. y Gutmann, L.** 1999. ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:302-306.
- Vasquez, J.E., Walker, E.S., Franzus, B.W., Overbay B.K., Reagan, D.R. y Sarubbi, F.A.** 2000. The epidemiology of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Veterans Affairs hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **21**(7):459-464.
- Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giral, y d. A. Jimenez.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother*. **38**:2477-2479.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., Marcos, A. y Jimenez de Anta, M.T.** 1995. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **39**:1201-1203.
- Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, y Jimenez de Anta, M.T.** 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **40**:491-493.
- Vila, J., Ruiz, J., Goni, P. y Jimenez de Anta, M.T.** 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, **39**:757-762.
- Vila, J., Vargas, M., Casals, C., Urassa, H., Mshinda, H., Schelleberg, D. y Gascon, J.** 1999. Antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children under the age of 5 years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**:3022-3024.
- Vila, J., Vargas, M., Ruiz, J., Espasa, M., Pujol, M., Corachan, M., Jimenez de Anta, M.T. y Gascon, J.** 2001. Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. *J Med Microbiol*, **50**:996-1000.
- Vila, J., Sanchez-Cespedes, J., Sierra, J.M., Piqueras, M., Nicolás, E., Freixes, J. y Giral, E.** 2005. Design and antibacterial evaluation of new ciprofloxacin derivatives for multiresistant Gram-negative bacteria. *J Med Chem*,
- Vila, J., Fàbrega, A., Roca, I., Hernández, A., y Martínez, J.L.** 2011. Efflux pumps as an important mechanism for quinolone resistance. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol*, **77**:165-233.
- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, y cols.** 1995 The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*, **274**:639-44.
- Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A. y Martin, C.D.** 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, **302**:2323-2329.
- Waites, K. y Talikington, D.** 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol. Rev*, **17**:697-728.

- Wang, J.C.** 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol*, **55**:523-533.
- Wang, J.C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, **65**:635-692.
- Wang, J.C.** 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspectives. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**:430-440.
- Weber, S.G., Gold, H.S., Hooper, D.C., Karchmer, A.W. y Carmeli, Y.** 2003. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *Emerg Infect. Dis*, **9**(11):1415-1422.
- Webber, M. A. y Piddock, L.J.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, **51**:9-11.
- Weston, V.C., Boswell, T.C., Finch, R.G. y cols.** 2000. Fusidic acid cream for impetigo emergence of resistance to fusidic acid limits its use. *BMJ*, **324**(7350):1394.
- Winshell, E.B. y Rosenkraz, H.S.** 1970. Nalidixic acid the metabolism of *E. coli*. *J Bacteriol*, **104**:1168-1175.
- Wilkinson, R.D., y Carey, W.D.** 1988. Topical mupirocin versus topical neosporin in the treatment of cutaneous infections. *Int J Dermatol*, **27**:514-515.
- Wigley, D.B.** 1995. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **24**:185-208.
- Wise, R., Lister, D., McNulty, M., Griggs, D. y Andrews, J.M.** 1986. The comparative pharmacokinetics of five quinolones. *J Antimicrob Chemother*, **18**(D):71-81.
- Wolfson, J.S. y Hooper, D.C.** 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microb. Clin. Microb. Ver.* **2**:378-424
- Wolfson, J.S. y Hooper, D.C.** 1991. Overview of fluoroquinolone safety. *Am J Med*, **91**(6A):153-161.
- Workman, G.W. y Bennett, S.P.** 1999. Fatal meningitis due to levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, **29**:1599-1600.
- World Health Organization.** 1998. Use of quinolones in food animals and potential impact on public health. Report and proceedings of a WHO meeting, Geneva, Switzerland, 2-5 June 1998. WHO/EMC/ZDI 98.12. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** 2000. Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO Consultation, 5-9 June 2000. WHO/CDS/CSR/APH/2000.4. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** 2001a. The increasing incidence of human Campylobacteriosis. Report and Proceeding from a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2001. WHO/CDS/CSR/APH/2001.07. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** 2001b. WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO/CDS/DSR/2001.02. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** 2001c. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. WHO/HIV_AIDS/2001.01. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization.** 2005. Department of Child and Adolescents Health and Development. 2005. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* Type 1. Geneva, Switzerland.
- Wray, C. y Gnanou, J.C.** 2000. Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *Int J Antimicrob Agents*, **14**:291-294.
- Yamagishi, J., Kojima, T., Oyamada, Y., Fujimoto, K., Hattori, H., Nakamura, S. y Inoue, M.** 1996. Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**:1157-1163.
- Yamakawa, T., Mitsuyama, J. y Hayashi, K.** 2002. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J Antimicrob Chemother*, **49**:455-465.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K, Konda; T., y Arakawa, Y.** 2007. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**:1564-1566.
- Yebra, M., Ortigosa, J., Albarran, y Crespo M.G.** 1990. Ciprofloxacin in a case of Q fever endocarditis. *N Engl J Med*, **323**:614.

Yee, C.L., Duffy, C., Gerbino, P.G., Stryker, S. y Noel, G.J. 2002. Tendon or joint disorders in children after treatment with fluoroquinolones or azithromycin. *Pediatr Infect Dis J*, **6**:525-529.

Yee, S.Y., Kuti, J.L. y Nicolau, D.P. 2005. Antimicrobial management of complicated skin and skin structure infections in the era of emerging resistance. *Surg Infect*, **6**:2.

Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M. y Nakamura, S. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**:1647-1650.

Yoshida, T., Yamamoto, Y., Orita, H., Kakiuchi, M., Takahashi, Y., Itakura, M., Kado, N., Mitani, K., Yasuda, S., Kato, H. y Itoh, Y. 1996. Studies on quinolone antibacterials. IV. Structure-activity relationships of antibacterial activity and side effects for 5- or 8-substituted and 5,8-disubstituted-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **44**:1074-1085.

Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B. y Cozzarelli, N.R. 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **11**:2580-2592.

Zhanel, G.G., Ennis, L., Vercaigne, L., Walkty, A., Gin, A.S., Embil, J., Smith, H. y Hoban, D.J. 2002. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs*, **62**:13-59.

Ziegler, C., Stary, A., Mailer, H., Dopp, W., Gebhart, W. y Soltz-Szots, J. 1992. Quinolones as an alternative treatment of chlamydial, mycoplasma and gonococcal urogenital infections. *Dermatology*, **185**:128-131.

Zweerink, M.M. y Edison, A. 1986. Inhibition of *Micrococcus luteus* DNA gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxylic acids. *Antimicrob Agents Chemother*, **29**:598-601.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS de trabajo:

El progresivo y alarmante incremento de las resistencias a los antibióticos actualmente disponibles hace necesaria la investigación de nuevos compuestos, tanto de agentes pertenecientes a grupos químicos conocidos pero con propiedades mejoradas, y por lo tanto que aporten ventajas clínicas diferenciales como de antibióticos con nuevo mecanismo de acción. La familia de antibióticos con estructura química quinolónica se conoce desde hace más de 30 años. Más de 10 compuestos pertenecientes a ella se encuentran hoy en día en uso clínico, sin embargo, sólo uno de ellos se ha utilizado en el tratamiento tópico de las infecciones de piel y estructuras relacionadas (SSSIs).

Como se ha comentado con anterioridad las infecciones de la piel y estructuras relacionadas, siguen representando una parte importante de las enfermedades infecciosas y son responsables, aproximadamente, del 10% de todas las admisiones hospitalarias.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el perfil de actividad de ozenoxacino resulta idóneo para proponer a este compuesto como quinolona de uso tópico en el tratamiento de las infecciones de piel y estructuras relacionadas (SSSIs).

II.2. OBJETIVO general:

Investigar el potencial de un nuevo compuesto con propiedades antimicrobianas para su uso como antibiótico tópico en el tratamiento de infecciones de piel y estructuras relacionadas.

II.3. OBJETIVOS específicos:

II.3.1. Evaluación de la actividad *in vitro* de ozenoxacino y estudio de su espectro de acción entre diferentes grupos de bacterias.

II.3.2. Evaluación de la actividad de ozenoxacino frente a cepas de especies bacterianas que normalmente son responsables de las infecciones de piel y tejidos asociados, incluyendo cepas resistentes a otros antibióticos (especialmente de uso dérmico).

II.3.3. Estudio de la actividad bactericida de ozenoxacino y de su perfil en las curvas de letalidad.

II.3.4. Aproximación al estudio del mecanismo de acción de ozenoxacino

II.3.4.1. Actividad frente a cepas de *S. aureus* con mutaciones en los genes de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR)

II.3.4.2. Evaluación de un posible efecto de bombas de flujo en la actividad frente a cepas de *S. aureus*.

II.3.4.3. Generación de cepas con sensibilidad disminuida a ozenoxacino

II.3.4.3.1. Mutantes espontáneos

II.3.4.3.2. Mutantes obtenidos tras pases sucesivos en presencia de antibiótico. Caracterización genética e influencia de bombas de flujo

II.3.5. Evaluación de la eficacia de ozenoxacino en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en roedores

II.3.6. Absorción transdérmica de ozenoxacino

II.3.6.1. *In vitro* (Célula de Franz)

II.3.6.2. *In vivo* (rata, *minipig* y humanos)

CAPÍTULO III. PERFIL DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE OZENOXACINO

APARTADO III.1. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

En este capítulo se describe la evaluación de la actividad *in vitro* de ozenoxacino y el estudio de su espectro de acción frente a varios grupos de bacterias, incluyendo especies que normalmente son responsables de las infecciones de piel y tejidos asociados, y cepas resistentes a otros antibióticos (especialmente de uso dérmico).

La actividad antibacteriana *in vitro* del compuesto había sido demostrada inicialmente frente a un número muy reducido de cepas de colección. El propósito de esta parte de la Memoria es investigar las propiedades de ozenoxacino frente a más de 1200 cepas bacterianas mayoritariamente clínicas obtenidas en hospitales de varios continentes. Para facilitar la sistematización y discusión de los resultados, la experimentación realizada se ha dividido en un total de cuatro estudios que se describen a continuación.

III.1. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.1. Microorganismos

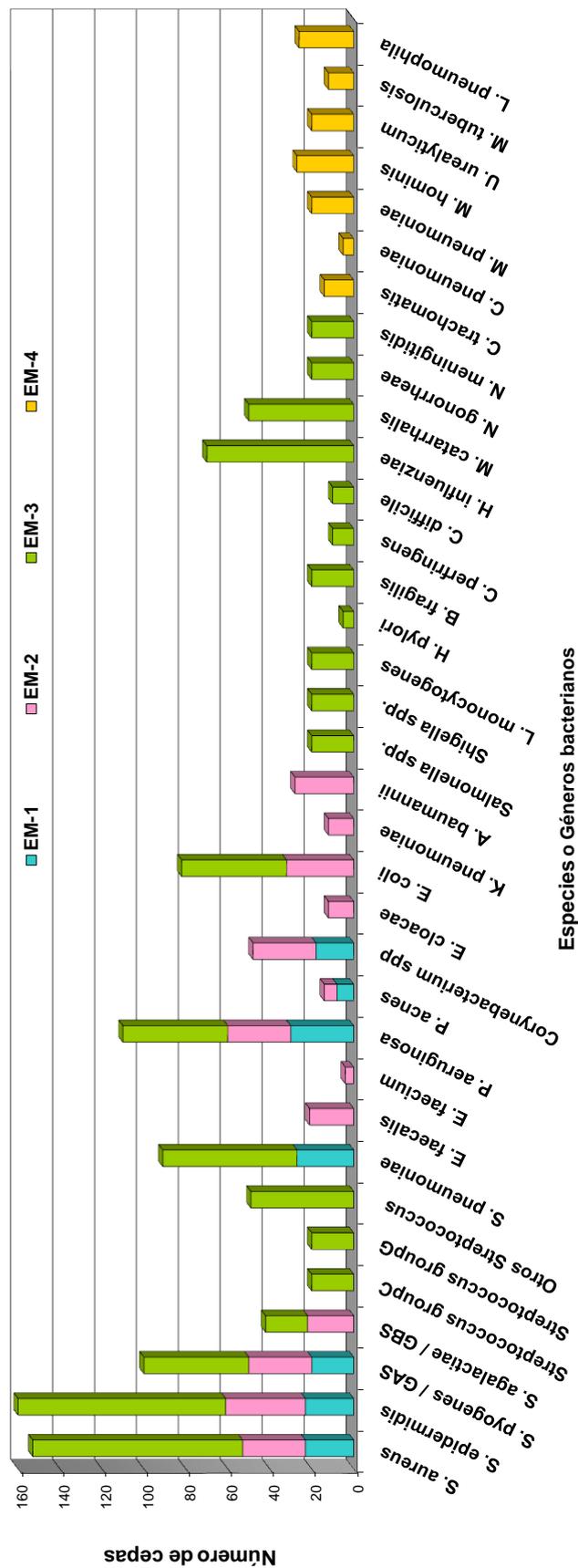
Las 1330 cepas estudiadas se agrupan en cuatro estudios:

Estudio	# Cepas (Total 1207)	Origen de las cepas	Procedencia de las cepas
EM-1	141	Clínico	H.Clínic BCN y Hospital Universitario de Sevilla
EM-2	291	Clínico	H.Clínic BCN
EM-3	775	Clínico	Mundial (tipadas por Quotient Bioresearch, GB)
EM-4	123	Clínico y de colección	Mundial (tipadas por Quotient Bioresearch, GB)

Las cepas se recolectaron en función de varios criterios: en EM-1 y EM-2, los géneros y especies bacterianas seleccionados fueron, de entrada, especies patógenas comúnmente causantes de infecciones de piel y estructuras relacionadas, principalmente Gram-positivos. En EM-3 y EM-4 se incluyeron, también, especies causantes de otros tipos de infecciones de tratamiento sistémico, y con distintos perfiles de resistencia a antibióticos, con el objetivo de profundizar en el espectro de acción del producto.

En las tablas siguientes se especifican las especies y el número de cepas de cada especie utilizadas en los cuatro estudios de determinación de CMI, y, en el apartado de resultados se completa la información sobre las distintas cepas. En total 1207 cepas bacterianas (141, 291, 775 y 123, por estudio) se recolectaron y se utilizaron para evaluar la actividad *in vitro* de ozenoxacino, en los cuatro ensayos que forman este capítulo.

Figura III.1. Distribución y número de las cepas, de las distintas especies bacterianas, utilizadas en cada estudio (EM-1, EM-2, EM-3 y EM-4).

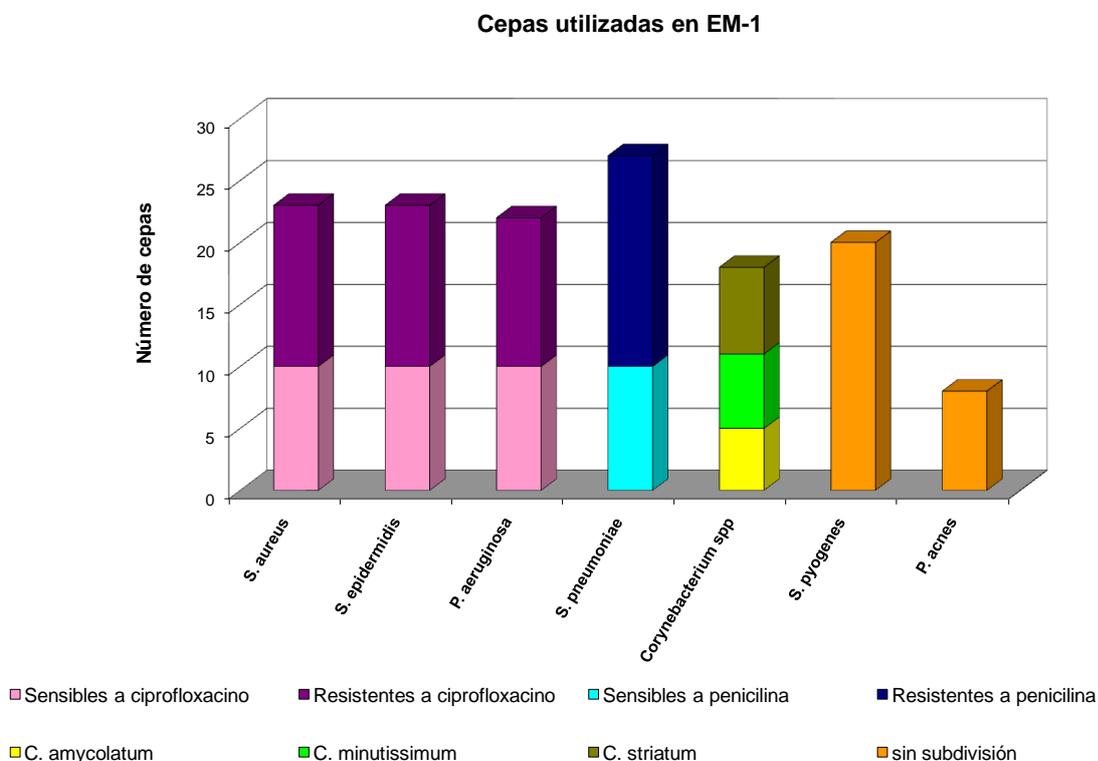


III.1.1.1 Estudio EM-1

Las 141 cepas utilizadas en EM-1 fueron aisladas durante el periodo 2001-2002, y cedidas por los departamentos de microbiología del Hospital Clínic de Barcelona y del Hospital Universitario de Sevilla.

De las 23 cepas de *Staphylococcus aureus* (SA) incluidas en este estudio, 10 eran sensibles a meticilina (MSSA) y sensibles a ciprofloxacino (cipS), y las otras 13 eran resistentes a meticilina (MRSA) y a ciprofloxacino (cipR). De las 23 cepas de *Staphylococcus epidermidis* (SE), 10 eran sensibles a meticilina (MSSE) y sensibles a ciprofloxacino, y las otras 13 eran resistentes a meticilina (MRSE) y a ciprofloxacino. De las 27 cepas de *Streptococcus pneumoniae* (SP) incluidas en este estudio, 10 eran sensibles a penicilina (PSSP), y las otras 17 eran resistentes a penicilina (PRSP). De las 22 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 10 de ellas eran sensibles a ciprofloxacino y las otras 12 resistentes. Se incluyeron también 18 cepas de *Corynebacterium* spp pertenecientes a tres especies distintas (5 cepas de *C.amycolatum*, 6 cepas de *C.minutissimum* y 7 cepas de *C.striatum*) y 8 cepas de *Propionibacterium acnes*.

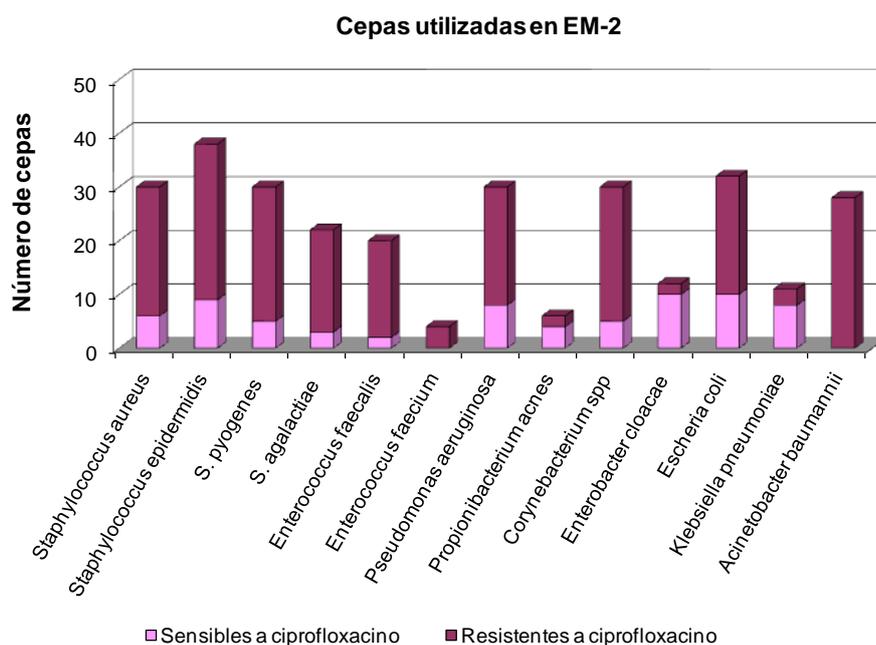
Figura III.2. Cepas del estudio EM-1.



III.1.1.2 Estudio EM-2

En EM-2 las 291 cepas fueron aisladas (2003-2005) a partir de muestras de heridas y úlceras infectadas usando métodos convencionales y las bacterias aisladas se identificaron con ensayos bioquímicos estándar. Se incluyeron en el estudio los siguientes microorganismos, con mayoría de cepas resistentes a ciprofloxacino: *Staphylococcus aureus*, tanto sensibles como resistentes a meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium* spp. y *Propionibacterium acnes*.

Figura III.3. Cepas del estudio EM-2.



III.1.1.3 Estudio EM-3

En el tercer estudio, la evaluación de la actividad de ozenoxacino y de otros diez antibióticos se llevó a cabo, frente a las siguientes 775 cepas bacterianas aisladas entre los años 2004-2006, de las que se detalla su origen, en la tabla III.2.

Figura III.4. Cepas del estudio EM-3.

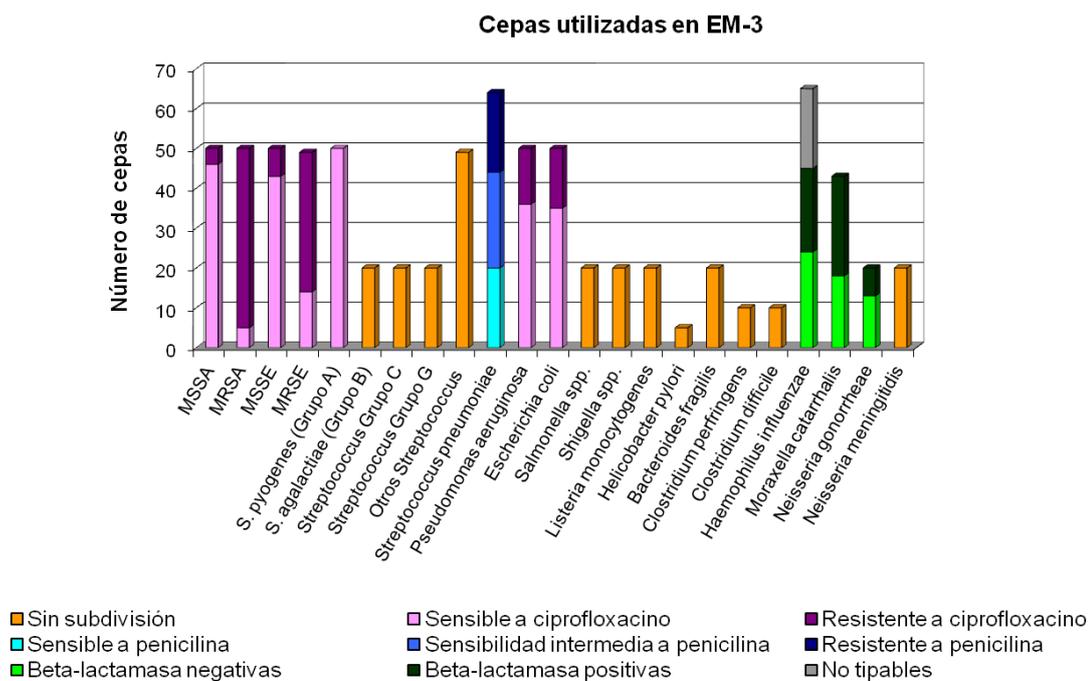
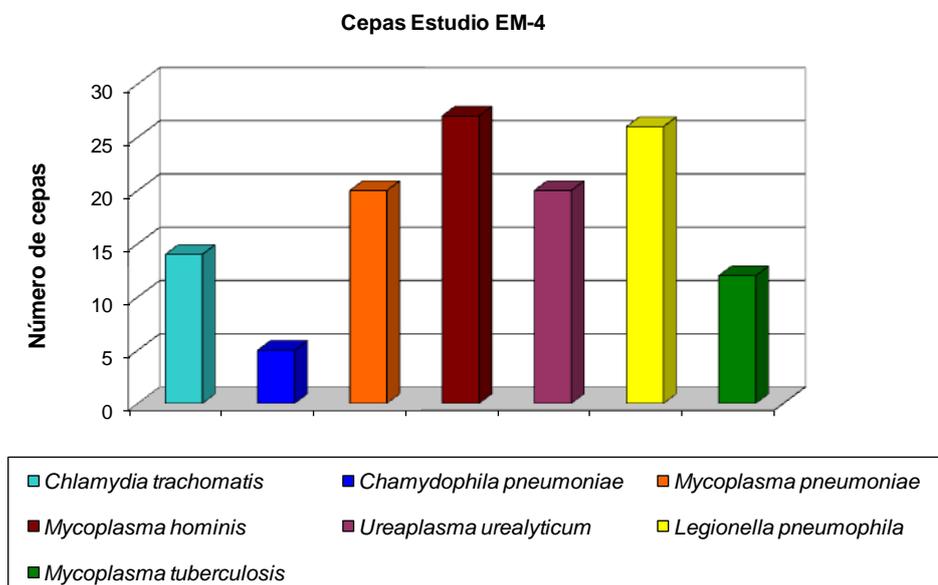


Tabla III.2. Características de las cepas del estudio EM-3		
Cepas	Origen de las cepas	Procedencia geográfica
100 <i>Staphylococcus aureus</i> (50 MRSA, 50 MSSA)	clínico: pacientes con septicemias, infecciones de piel y tejidos blandos (SSTI) o respiratorias (RTI)	centros de todo el mundo, durante 2005-6.
100 cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (50 MRSE y 50 MSSE)	clínico: pacientes con septicemias, SSTI o RTI	centros de todo el mundo, durante 2005-6.
50 Streptococci del Grupo A.	clínico pacientes con septicemias o SSTI,	centros Europeos, durante 2004-5
20 Streptococci del Grupo B		
20 Streptococci del Grupo C		
20 Streptococci del Grupo G		
10 <i>Streptococcus constellatus</i> , 10 cepas de <i>Streptococcus bovis</i> 10 <i>Streptococcus mitis</i> 10 <i>Streptococcus sanguis</i> 10 <i>Streptococcus oralis</i>	clínico: pacientes con septicemia	centros Europeos, durante 2004-5,
60 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (20 cepas sensibles a penicilina G, 20 con resistencia intermedia y 20 resistentes)	clínico: pacientes con septicemias, infecciones de piel y tejidos blandos (SSTI) o infecciones del tracto respiratorio (RTI),	centros de todo el mundo, durante 2005-6.
20 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).	
50 <i>Escherichia coli</i>	clínico: pacientes con septicemias o infecciones del tracto respiratorio (RTI),	centros de todo el mundo, durante 2005-6.
50 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	clínico pacientes con septicemias, SSTI o RTI,	centros de todo el mundo, durante 2005-6
20 cepas de <i>Salmonella</i> spp.	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-
20 cepas de <i>Shigella</i> spp.	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-
70 <i>Haemophilus influenzae</i> (25 cepas Beta-lactamasa positivas, 25 Beta-lactamase negativas y 20 no-tipables)	clínico: pacientes con RTI,	centros de todo el mundo, durante 2005-6.
50 <i>Moraxella catarrhalis</i> (25 cepas Beta-lactamasa positivas y 25 negativas)	clínico: pacientes con RTI	centros de Gran Bretaña durante 2005-6.
20 cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-
20 cepas de <i>Neisseria meningitidis</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-
5 cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-
20 cepas de <i>Bacteroides fragilis</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-
10 cepas de <i>Clostridium difficile</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).	-

III.1.1.4 Estudio EM-4

Se ensayaron las siguientes especies bacterianas, con 123 cepas, mayoritariamente, de colección. Estos microorganismos se encuentran asociados a infecciones respiratorias y del tracto genital.

Figura III.5. Cepas del estudio EM-4.



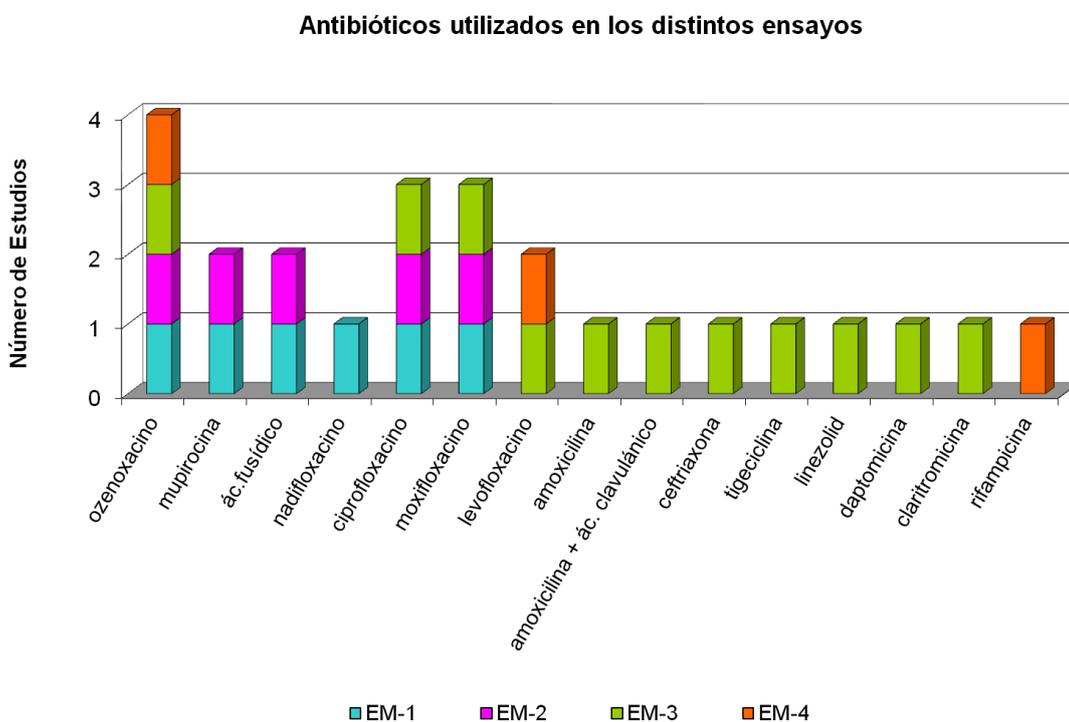
Cepas	Origen
14 cepas de <i>Chlamydia trachomatis</i>	cepas clínicas aisladas en Gran Bretaña, 10 en 2003/4, 1 en 2001, 1 en 1999 y dos con anterioridad al 1997
26 cepas de <i>Legionella pneumophila</i>	cepas clínicas, 15 aisladas en 1999 (10 GB, 3 Suecia & 2 Hungría), 10 aislados en España en 2005 y la cepa de referencia NCTC 11192.
5 cepas de <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).
20 cepas de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).
27 cepas de <i>Mycoplasma hominis</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).
20 cepas de <i>Ureaplasma urealyticum</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).
10 cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	colección de Quotient Bioresearch (GB).

III.1.2 Productos

La actividad *in vitro* de ozenoxacino se comparó con la de los compuestos listados a continuación, seleccionados con los siguientes criterios:

- antibióticos de uso dérmico para el tratamiento de infecciones de piel y estructuras relacionadas: mupirocina, ác.fusídico y nadifloxacino.
- otras quinolonas, todas fluoradas: ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y nadifloxacino.
- antibióticos de uso común para el tratamiento de infecciones sistémicas: amoxicilina, sola o con ác.clavulánico, ceftriaxona, tigeciclina, linezolid, daptomicina y claritromicina, además de las fluoroquinolonas mencionadas anteriormente y rifampicina para *M. tuberculosis*.

Figura III.6. Antibióticos utilizados en EM-1, EM-2, EM-3 y EM-4.



Los antibióticos utilizados en estos cuatro estudios fueron de origen comercial o se sintetizaron en el Dpto. de Química Médica de Ferrer.

- Ozenoxacino (Química Médica, Ferrer, Barcelona, España. Lote A044247B). Se prepara una solución madre de 1280 mg/L (o de 3200 mg/L, para los microorganismos *fastidious*) incorporando el producto en polvo a agua destilada estéril (10% del volumen final) para conseguir una suspensión a la que se añade NaOH 1N (8% del volumen final). Se agita hasta que el producto en polvo esté visiblemente disuelto y luego se lleva hasta el volumen final con agua destilada estéril. Sucesivas diluciones se realizan en agua destilada estéril y se utiliza el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- Ciprofloxacino (Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, GB. Lote 6226X). La solución madre de 640 mg/L se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- Las soluciones madre de 1600 mg/L ó de 640 mg/L de levofloxacino (Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, GB. Lote 1238030) se preparan en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 640 mg/L de moxifloxacino (Bayer AG, Wuppertal, Alemania. Lote BXR3FDB) se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 1280 mg/L de amoxicilina (Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, GB. Lote 112K0481) se prepara en tampón fosfato 0,05M a pH 7.5. Las diluciones sucesivas se realizan en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 640 mg/L de ácido clavulánico (GlaxoSmithKline, Marty-le-Roi, Francia. Lote BN95) se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI. Para testar amoxicilina-ác.clavulánico, amoxicilina y ác. clavulánico se mezclan en proporción 2:1 respectivamente.
- La solución stock de 640 mg/L de claritromicina (ICE Healthcare, Berks, GB. .Lote CL133) se prepara en metanol. Las diluciones sucesivas se realizan en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI
- La solución stock de 640 mg/L de ceftriaxone (Sigma Aldrich; Gillingham, Dorset, GB. Lote 105K0522) se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 640 mg/L de tigeciclina (Wyeth Pharmaceuticals, Taplow, GB. Lote RB5603) se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 1280 mg/L de linezolid (Pfizer AG, Zurich, Suiza. Lote 1000933645) se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 1280 mg/L de daptomicina (Cubist Pharmaceuticals, Lexington, MA, EEUU. Lote CDCX01) se prepara en agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo

requerido para las determinaciones de las CMI. Para la determinación de las CMI de daptomicina, todos los medios de cultivo se suplementan con 50 mg/L de Ca⁺⁺.

- La solución stock de 5120 mg/L de mupirocina (Grupo Ferrer, Barcelona, España. Lote T01) se prepara en agua destilada estéril (biblio) –95% de etanol y un 5% de agua destilada estéril-. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 1280 mg/L de ácido fusídico (Sigma Chemical, St Louis, MO, EEUU. Lote T04) se prepara en 95% de etanol y un 5% de agua destilada estéril. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 640 mg/L de rifampicina (Cubist Pharmaceuticals, Lexington, MA, EEUU. Lote CDCX01) se prepara en metanol. Las diluciones sucesivas se realizan también en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.
- La solución stock de 640 mg/L de nadifloxacina (Grupo Ferrer, Barcelona, España. Lote T07) se prepara en DMSO. Las diluciones sucesivas se realizan en agua destilada estéril y en el medio de cultivo requerido para las determinaciones de las CMI.

III.1.3 Determinación de la actividad de ozenoxacino y los productos comparativos (concentraciones mínimas inhibitorias o CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antibiótico que previene el crecimiento de las bacterias, valorado visualmente. Esta determinación se realiza bajo unas condiciones estándares de preparación del inóculo, de los productos a testar y de la incubación de ambos, en función de las características de los microorganismos (Andrews, 2001, CLSI 2006a y 2006b / www.CLSI.org).

En función de los resultados obtenidos para los distintos antibióticos, y de acuerdo a la disponibilidad, o no, de puntos de corte definidos de las distintas especies bacterianas (www.eucast.org), se consideraron las cepas como sensibles o resistentes a los distintos antibióticos, y como tales se reportaron y analizaron los resultados frente al resto de productos.

III.1.3.1 Determinación de las CMI – Estudio EM-1

El estudio de la actividad de los antibióticos se realizó mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), por el método de dilución en agar siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standard Institute M7-A4*. (CLSI, 1998, anteriormente NCCLS)

El agar Mueller-Hinton (MHA; MERCK KGaA, Alemania) se utilizó para las siguientes especies bacterianas: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas* spp., y *Corynebacterium* spp. El medio MHA se suplementó con un 5% de sangre desfibrinada de cordero (Oxoid, España) para soportar el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, mientras que el medio utilizado para determinar las CMI para *Propionibacterium acnes* fue el agar de Wilkins-Chalgren (MHA; MERCK KGaA, Alemania). Se prepararon las placas de agar con las distintas concentraciones de los antibióticos a testar, que fueron, tal y como se indica en el apartado anterior, ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, nadifloxacino, mupirocina y ác.fusídico (desde 0,004 mg/L hasta 128 mg/L).

Se preparó un inóculo en solución salina con una turbidez equivalente a la escala estándar McFarland 0,5, a partir un cultivo fresco (*overnight*) en placas de agar. Todas las cepas se testaron a un inóculo final de 10⁴ UFC/spot, que se depositó sobre las placas de agar con antibiótico, utilizando un inoculador Multipoint (Denley-Tech, Suiza). Se incubaron las placas sembradas a 35°C durante 18-24h en condiciones de aerobiosis, excepto las de *S. pneumoniae*

que se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ (Anaerocult C; MERCK KgaA, Alemania), y las cepas de *P. acnes* se incubaron a 35°C durante 72h en condiciones anaeróbicas (Anaerocult A; MERCK KgaA, Alemania).

III.1.3.2 Determinación de las CMI – Estudio EM-2

En este ensayo, se utilizó, para la determinación de las CMI, el método de microdilución de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI, M7-A4 (CLSI, 1998) utilizando caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes (MHA; MERCK KGaA, Alemania). Se preparan suspensiones de 2 mL en suero salino, equivalentes a un estándar McFarland 0,5, a partir de cultivos frescos de una noche en placas con agar sangre. Las diluciones se preparan 1:10 hasta obtener un inóculo final de 5·10⁵ UFC/mL. Las microplacas se incuban durante 18-20h a 35°C, en condiciones anaeróbicas.

Las cepas estándares de control del método se incluyeron en los distintos ensayos, tal y como recomienda la metodología, y fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

III.1.3.3 Determinación de las CMI – Estudio EM-3

La determinación de la CMI para las bacterias aeróbicas se realizó por microdilución en caldo, y se llevó a cabo igual que en el estudio anterior, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute M7-A7 y M45-A (CLSI, 2006a y 2006b) para las diferentes especies bacterianas testadas (CLSI).

Para *N. gonorrhoeae*, *H. pylori* y las bacterias anaeróbicas, La determinación de las CMI se realizó mediante la técnica de dilución en agar, de acuerdo a los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute M11-A6 y M7-A7 (CLSI, 2004 y 2006a).

III.1.3.4 Determinación de las CMI – Estudio EM-4

Para *C. pneumoniae* y *C. trachomatis*, la determinación de las CMI se realizó en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos *micro-tissue*, de fondo plano, (*96-well flat bottom micro-titre tissue culture plates*) utilizando una línea de cultivo celular McCoy, en un medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) (CLSI, 2003). Las inclusiones se demostraron por tinción de las capas celulares en el fondo plano de cada pocillo. La CMI es la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente la formación de inclusiones normales.

Para *Mycoplasma* spp y *U. urealyticum*, la determinación de las CMI se llevó a cabo utilizando el método de microdilución en medio líquido en caldo base para *Mycoplasma* (Oxoid Ltd, Hampshire, GB), preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para *M. tuberculosis*, la determinación de las CMI se realizó de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute para el método de dilución en agar (NCCLS M24-A).

Para *L. pneumophila*, la determinación de las CMI se llevó a cabo utilizando la técnica de incorporación en agar bacteriológico suplementado con extracto de levadura, caldo BCYE para *Legionella* y agar sangre de caballo.

Página en blanco

APARTADO III.2. RESULTADOS

III.2. RESULTADOS

El análisis de los datos se resume de manera descriptiva determinando el rango de las CMI, y las CMI₉₀ y la CMI₅₀, que son las mínimas concentraciones que inhiben el crecimiento visible del 90% y del 50% de las cepas, respectivamente. Se determina la media geométrica, en el caso de disponer de menos de 10 cepas por grupo, en lugar de la CMI₉₀ y la CMI₅₀.

Los resultados se presentan en tablas, con la totalidad de los antibióticos y de las cepas evaluadas por estudio, o con subgrupos de cepas agrupadas por su perfil de resistencia a algunos antibióticos. En las figuras se representan las CMI₉₀ o los valores individuales para cada cepa.

A partir de los resultados de este estudio se analiza, en los diferentes subgrupos, la presencia de cepas con resistencia o sensibilidad disminuida (www.eucast.org) a mupirocina, ác.fusídico y/o a fluoroquinolonas, y la actividad de ozenoxacino frente a las mismas.

III.2.1. Resultados EM-1

La tabla III.4 muestra los rangos de CMI y los valores de CMI, para todos los antibióticos testados, que inhiben el crecimiento del 50% y 90% de las 141 cepas evaluadas en este estudio, pertenecientes tanto a especies de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.

Tabla III.4. Estudio EM-1 – Actividad antibacteriana de ozenoxacino y otros antibióticos				
Organismo (número de cepas)	Compuestos	Rango de CMI (mg/L)	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)
S. aureus sensible a meticilina y a ciprofloxacino (10)	ozenoxacino	0,004	0,004	0,004
	ciprofloxacino	0,25-1	0,5	1
	ác.fusídico	0,03-0,06	0,06	0,06
	mupirocina	0,015-0,125	0,06	0,125
	nadifloxacino	0,015-0,03	0,03	0,03
	moxifloxacino	0,03-1	0,06	0,06
S. aureus resistente a meticilina y a ciprofloxacino (13)	ozenoxacino	0,06-0,125	0,125	0,125
	ciprofloxacino	8-32	32	32
	ác.fusídico	0,06	0,06	0,06
	mupirocina	0,03-128	0,06	1
	nadifloxacino	1	1	1
	moxifloxacino	1-2	1	2
S. epidermidis sensible a meticilina y a ciprofloxacino (10)	ozenoxacino	0,004-0,06	0,008	0,013
	ciprofloxacino	0,125-0,25	0,125	0,25
	ác.fusídico	0,03-16	0,125	0,125
	mupirocina	0,03-0,125	0,06	0,125
	nadifloxacino	0,03-0,06	0,03	0,06
	moxifloxacino	0,06-4	0,06	0,06
S. epidermidis resistente a meticilina y a ciprofloxacino (13)	ozenoxacino	0,03-0,25	0,125	0,125
	ciprofloxacino	4-128	32	32
	ác.fusídico	0,06-16	0,06	0,25
	mupirocina	0,03-128	0,06	2
	nadifloxacino	0,25-2	1	1
	moxifloxacino	0,5-4	1	1
S. pyogenes (20)	ozenoxacino	0,03-0,5	0,06	0,5
	ciprofloxacino	1-4	2	4
	ác.fusídico	16	16	16
	mupirocina	0,125-4	0,25	4
	nadifloxacino	0,06-4	0,5	4
	moxifloxacino	0,125-2	0,25	2
S. pneumoniae sensible a penicilina (10)	ozenoxacino	0,03-0,5	0,06	0,5
	ciprofloxacino	1-4	2	4
	ác.fusídico	8-16	16	16
	mupirocina	0,250-4	1	4
	nadifloxacino	0,5-4	1	4
	moxifloxacino	0,125-2	0,25	2
S. pneumoniae resistente a penicilina (17)	ozenoxacino	0,03-0,5	0,06	0,5
	ciprofloxacino	1-4	2	4
	ác.fusídico	8-16	16	16
	mupirocina	0,250-4	1	4
	nadifloxacino	0,5-4	1	4
	moxifloxacino	0,125-2	0,25	2
Pseudomonas aeruginosa sensible a ciprofloxacino (10)	ozenoxacino	0,5-1	1	1
	ciprofloxacino	0,125-2	0,125	0,25
	ác.fusídico	64-128	128	128
	mupirocina	64-128	128	128
	nadifloxacino	1-16	2	2
	moxifloxacino	0,5-32	1	2
Pseudomonas aeruginosa resistente a ciprofloxacino (12)	ozenoxacino	16-128	32	128
	ciprofloxacino	2-64	16	64
	ác.fusídico	64-128	128	128
	mupirocina	64-128	128	128
	nadifloxacino	16-128	64	128
	moxifloxacino	4-128	32	128
Propionibacterium acnes (8) (* valores de media geométrica)	ozenoxacino	0,016-0,03	-	0,02*
	ciprofloxacino	0,5-1	-	0,65*
	ác.fusídico	0,125-1	-	0,39*
	mupirocina	0,5-128	-	64*
	nadifloxacino	0,03-0,25	-	0,10*
	moxifloxacino	0,125-0,5	-	0,39*
Corynebacterium spp. (18)	ozenoxacino	0,008-1	0,25	1
	ciprofloxacino	0,06-128	32	128
	ác.fusídico	0,004-0,5	0,03	0,25
	mupirocina	128	128	128
	nadifloxacino	0,004-8	1	8
	moxifloxacino	0,008-16	2	16

Ozenoxacino ha sido el producto más potente *in vitro* frente a todas las especies testadas de bacterias Gram-positivas, con igual actividad que el ác.fusídico frente a los subgrupos de *S. aureus* resistentes a meticilina y resistentes a ciprofloxacino (CMI₉₀ ozenoxacino 0,125 mg/L y fusídico 0,06 mg/L) y *S. epidermidis* resistentes a meticilina y a ciprofloxacino (ozenoxacino 0,125 mg/L y fusídico 0,25 mg/L).

La CMI₉₀ de ozenoxacino frente a cepas de MSSA ha sido entre 7 y 250 veces menor que la de los comparativos; frente a cepas de MRSA ha sido entre 8 y 256 veces menor que la de ciprofloxacino, mupirocina, nadifloxacino y moxifloxacino, y, comparable a la del ácido fusídico.

Todas las cepas de MSSA sensibles a ciprofloxacino, lo fueron también al resto de antibióticos testados, mientras que entre las MRSA resistentes a ciprofloxacino algunas cepas poseían una CMI para mupirocina, por encima del punto de corte de sensibilidad (1 mg/L), con un rango de 0,03-128 mg/L y una CMI₉₀ de 1 mg/L.

La actividad antibacteriana de ozenoxacino frente a cepas de *S. epidermidis* sensibles a ciprofloxacino ha sido entre 4 y 20 veces mayor que la de sus comparativos, y frente a cepas de *S. epidermidis* resistentes a ciprofloxacino similar a ác.fusídico, y mejor que el resto de productos.

Para las cepas de *S. epidermidis*, resistentes a meticilina y a ciprofloxacino, también se detectan cepas con sensibilidad disminuida a mupirocina, con una CMI₉₀ de 2 mg/L, mientras que para ác.fusídico, aparecen cepas con CMI de 16 mg/L, tanto entre las sensibles como entre las resistentes a meticilina y ciprofloxacino, aunque su CMI₉₀ permanece con valores de 0,125-0,25 mg/L. Las CMI₉₀ para ozenoxacino y estos dos subgrupos de *S. epidermidis* son de 0,013 y 0,125 mg/L, respectivamente.

La actividad de ozenoxacino frente a *S. pyogenes* ha sido también entre 4 y 32 veces mayor que la de los otros productos testados, con una CMI máxima de 0,5 mg/L, independientemente de la resistencia detectada a otros antibióticos. Todos los valores de CMI para el ácido fusídico han sido de 16 mg/L, mientras que la CMI₉₀ de mupirocina ha sido de 4 mg/L; estas cepas se podrían considerar no susceptibles tanto a fusídico como a mupirocina.

La actividad de ozenoxacino frente a *S. pneumoniae* (tanto sensible como resistente a penicilina) ha sido también entre 4 y 32 veces mayor que la de los comparativos, con CMI máximas de 0,5 mg/L y mínimas de 0,03 mg/L.

Ozenoxacino presenta la mayor actividad frente a las 8 cepas de *P. acnes* estas cepas, con un rango de actividad entre 0,016 y 0,03 mg/L. Los tres antibióticos tópicos, nadifloxacino, ác.fusídico y mupirocina presentan medias de 0,1, 0,39 mg/L y 6 mg/L, respectivamente, y moxifloxacino y ciprofloxacino de 0,39 y 0,65 mg/L. La actividad de ozenoxacino es aproximadamente cuatro veces mejor que el resto de compuestos, excepto frente a mupirocina, frente a la que se encuentran muchas cepas con sensibilidad reducida.

La actividad antibacteriana de ozenoxacino (CMI₉₀ 1mg/L) frente a las 18 cepas de *Corynebacterium* spp. fue ligeramente inferior a la del ácido fusídico (4 veces), mientras que, tanto el resto de quinolonas como mupirocina, no presentaban actividad.

En el caso de la única especie de bacterias Gram-negativas testada en este estudio, *P. aeruginosa*, sólo las quinolonas han presentado actividad frente al subgrupo de cepas sensibles a ciprofloxacino; ciprofloxacino ha sido el producto más activo (CMI₉₀ igual a 0,25 mg/L) mientras que ozenoxacino, y las otras dos fluoroquinolonas nadifloxacino y moxifloxacino han presentado CMI₉₀ de 1, 2 y 2 mg/L, respectivamente. Ninguno de los productos testados ha sido activo frente a las cepas de *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacino.

En los resultados de este estudio se observa que, en ninguno de los casos, nadifloxacino presenta mayor actividad que ozenoxacino, con CMI que difieren en 2-3 diluciones.

Página en blanco

En todos los subgrupos de cepas, se ha mantenido la actividad de ozenoxacino, con CMI máximas de 0,5 mg/L y mínimas de 0,004 mg/L, independientemente de la resistencia a otros antibióticos.

III.2.2. Resultados del Estudio EM-2

En las tablas III.5 y III.6 se detallan los resultados en forma de CMI₅₀, CMI₉₀, rango y media geométrica de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina para las 293 cepas estudiadas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las cepas, para la presentación de los resultados, se subdividen en sensibles y resistentes a ciprofloxacino.

En las tablas III.7-III.12 se detalla la actividad de ozenoxacino, y de los otros antibióticos, frente a aquellas cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes* que poseen resistencia o sensibilidad disminuida a mupirocina, ácido fusídico y/o a las dos fluoroquinolonas utilizadas en este estudio.

En las figuras III.7-III.19 se representa gráficamente la distribución de las CMI para cada una de las distintas especies bacterianas; de manera global por especies, y, por separado las cepas sensibles o resistentes a ciprofloxacino, y en el caso de *S. aureus*, sensibles o resistentes a metilicina. Las figuras permiten valorar la potencia, el rango de actividades y el espectro de acción de los diferentes antibióticos frente a las especies testadas.

Tabla III.5		Estudio EM-2 / Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino frente a cepas clínicas aisladas de heridas (I)																				
Organismos (# CipS, # CipR)		ANTIBIÓTICOS																				
		OZENOXACINO mg/L									CIPROFLOXACINO mg/L									MOXIFLOXACINO mg/L		
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g					
CipS	CipR	-	0,06	0,002-0,004	0,0036	-	-	0,002-0,004	0,0036	-	-	1	1	-	-	0,03-0,25	0,0979					
CipS	CipR	0,125	0,125	0,002-0,25	0,0339	128	256	4-512	50,29	4	16	4-512	50,29	4	16	0,25-32	3,24					
CipS	CipR	-	0,06	0,008-0,016	0,0086	-	-	0,25-0,5	0,315	-	-	0,25-0,5	0,315	-	-	0,125-0,25	0,1350					
CipS	CipR	0,06	0,25	0,004-1	0,0602	32	256	4-256	28,39	4	16	4-256	28,39	4	16	0,25-64	4,10					
CipS	CipR	-	0,25	0,06	0,06	-	-	0,5-1	0,707	-	-	0,5-1	0,707	-	-	0,125	0,125					
CipS	CipR	0,25	64	0,06-128	0,674	8	64	2-256	12,22	2	32	2-256	12,22	2	32	0,5-64	3,17					
CipS	CipR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
CipS	CipR	-	-	2-128	13,45	-	-	256-1024	512	-	-	256-1024	512	-	-	32-128	76,11					
CipS	CipR	-	0,06	0,008-0,25	0,0317	-	-	1-2	1,26	-	-	1-2	1,26	-	-	0,25-0,5	0,3969					
CipS	CipR	0,125	0,125	0,008-0,125	0,0411	4	8	2-8	3,46	0,5	0,5	2-8	3,46	0,5	0,5	0,25-1	0,4321					
CipS	CipR	-	0,06	0,03-0,06	0,0357	-	-	0,5-1	0,8409	-	-	0,5-1	0,8409	-	-	0,03-1	0,2475					
CipS	CipR	0,06	0,5	0,03-0,5	0,0999	2	8	2-16	3,08	0,5	2	2-16	3,08	0,5	2	0,25-2	0,817					
CipS	CipR	-	1	0,001-0,125	0,0178	-	-	0,25-16	0,5	-	-	0,25-16	0,5	-	-	0,06-2	0,3758					
CipS	CipR	1	2	0,03-4	0,6231	64	512	2-512	62,25	16	32	2-512	62,25	16	32	0,5-64	8,22					
CipS	CipR	0,5	1	0,125-2	0,4061	0,25	1	0,25-1	0,4061	0,06	0,125	0,25-1	0,4061	0,06	0,125	0,03-0,125	0,065					
CipS	CipR	-	-	2-16	5,66	-	-	4-512	45,25	-	-	4-512	45,25	-	-	2-64	11,31					
CipS	CipR	0,125	0,25	0,016-2	0,1647	0,5	1	0,125-1	0,4353	0,125	0,25	0,125-1	0,4353	0,125	0,25	0,06-0,5	0,1761					
CipS	CipR	32	128	0,25-128	38,66	128	512	2-512	120,18	64	256	2-512	120,18	64	256	0,5-256	49,74					
CipS	CipR	-	-	0,125-4	0,5453	-	-	0,125-1	0,4585	-	-	0,125-1	0,4585	-	-	0,06-0,5	0,2281					
CipS	CipR	-	-	2-32	6,3496	-	-	2-128	10,08	-	-	2-128	10,08	-	-	1-64	5,04					
CipS	CipR	-	-	1-4	1,6818	-	-	0,25-1	0,7711	-	-	0,25-1	0,7711	-	-	0,125-0,5	0,3535					
CipS	CipR	8	128	1-128	14,56	8	512	2-1024	21,92	4	512	2-1024	21,92	4	512	0,5-512	10,62					
CipS	CipR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
CipS	CipR	8	32	0,06-32	7,42	512	512	128-512	441,33	32	128	128-512	441,33	32	128	0,25-512	50,80					
CipS	CipR	-	-	0,016-0,06	0,0260	-	-	0,25-1	0,5946	-	-	0,25-1	0,5946	-	-	0,125-0,5	0,2102					
CipS	CipR	-	-	0,03-0,06	0,0424	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	0,5-1	0,7071					

Tabla III.6		Estudio EM-2 / Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a cepas clínicas aisladas de heridas (II)																	
Organismos (# CipS, # CipR)	CIP*	ANTIBIÓTICOS																	
		OZENOXACINO mg/L						Ac. FUSÍDICO mg/L						MUPIROCINA mg/L					
		CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Media g						
Staphylococcus aureus (6,24)	CipS	-	-	0,002-0,004	0,0036	-	-	0,125-32	1,26	-	-	0,016-0,125	0,0312						
	CipR	0,06	0,125	0,002-0,25	0,0339	0,125	4	0,03-8	0,232	1	4	0,03-8	0,612						
Staphylococcus epidermidis (9,29)	CipS	-	-	0,008-0,016	0,0086	-	-	0,06-64	0,624	-	-	0,016-0,125	0,065						
	CipR	0,06	0,25	0,004-1	0,0602	0,125	32	0,06-64	0,6568	16	128	0,125-128	8,59						
Enterococcus faecalis (2,18)	CipS	-	-	0,06	0,06	-	-	0,5-2	1	-	-	64	64						
	CipR	0,25	64	0,06-128	0,674	128	512	2-512	48,88	128	256	64-256	118,51						
Enterococcus faecium (0,4)	CipS	-	-	-	13,45	-	-	-	-	-	-	-	-						
	CipR	-	-	2-128	13,45	-	-	64-512	215,27	-	-	64-512	256						
Streptococcus agalactiae (3,19)	CipS	-	-	0,008-0,25	0,0317	-	-	2-32	6,35	-	-	0,5-2	1,26						
	CipR	0,06	0,125	0,008-0,125	0,0411	32	64	0,5-64	17,85	2	2	1-2	1,86						
Streptococcus pyogenes (5,25)	CipS	-	-	0,03-0,06	0,0357	-	-	8-64	22,63	-	-	0,125-0,5	0,2102						
	CipR	0,06	0,5	0,03-0,5	0,0999	16	16	8-16	13,07	1	2	0,125-4	0,8909						
Corynebacterium spp.(5,25)	CipS	-	-	0,001-0,125	0,0178	-	-	0,004-64	0,0637	-	-	64-128	97,01						
	CipR	1	2	0,03-4	0,6231	0,016	16	0,008-64	0,0674	128	256	64-256	135,30						
Enterobacter cloacae (10,2)	CipS	0,5	1	0,125-2	0,4061	256	256	256-512	147,03	256	512	256-512	337,79						
	CipR	-	-	2-16	5,66	-	-	256-512	362,04	-	-	512	512						
Escherichia coli (10,22)	CipS	0,125	0,25	0,016-2	0,1647	64	1024	64-1024	157,59	256	256	256	274,37						
	CipR	32	128	0,25-128	38,66	256	1024	64-1024	329,39	512	512	256-512	496,12						
Klebsiella pneumoniae (8,3)	CipS	-	-	0,125-4	0,5453	-	-	32-512	139,58	-	-	256-512	279,17						
	CipR	-	-	2-32	6,3496	-	-	512-1024	645,08	-	512	256-512	406,37						
Pseudomonas aeruginosa (8,22)	CipS	-	-	1-4	1,6818	-	-	128-1024	469,50	-	-	64-128	79,11						
	CipR	8	128	1-128	14,56	512	1024	256-1024	599,36	128	128	32-128	90,51						
Acinetobacter baumannii (0,28)	CipS	-	-	0,06-32	7,42	-	-	256-512	499,48	-	-	-	-						
	CipR	8	32	0,016-0,06	0,0260	512	512	0,03-16	0,2913	-	-	-	-						
Propionibacterium acnes (4,2)	CipS	-	-	0,03-0,06	0,0424	-	-	1-4	2	-	-	32-128	64						
	CipR	-	-	0,03-0,06	0,0424	-	-	1-4	2	-	-	64-128	90,51						

En la tabla III.5, se puede observar que ozenoxacino ha presentado los menores valores de CMI, y por tanto, mayor actividad, frente a todas las cepas de bacterias Gram-positivas testadas, tanto si son sensibles como resistentes a ciprofloxacino. Ozenoxacino es, en todos los casos, diez veces más potente cuando se trata de cepas sensibles a ciprofloxacino que cuando son cepas resistentes a ciprofloxacino, aún así mantiene unas CMI₉₀ inferiores a 1 mg/L, excepto en el caso de *E. faecalis* (64 mg/L) y *Corynebacterium* spp (2 mg/L).

En cambio, frente a *P. acnes*, ozenoxacino no ha modificado su excelente actividad en función de si las cepas son resistentes o no a ciprofloxacino, y, ha sido entre uno y dos órdenes de magnitud más potente que ciprofloxacino, moxifloxacino y ác.fusídico, y entre tres y cuatro, que mupirocina.

Frente a las cepas de gram-negativos testadas (*E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*), las tres quinolonas han mostrado una actividad similar para las cepas sensibles a ciprofloxacino, siendo moxifloxacino el producto más potente; ozenoxacino posee unos valores máximos de CMI de 2-4 mg/L, mientras que ciprofloxacino los posee de 1 mg/L y moxifloxacino de 0,5 mg/L. Ozenoxacino presenta una buena actividad frente a las cepas cuando son sensibles a ciprofloxacino, y es diez veces menos activo cuando las cepas son resistentes a ciprofloxacino, excepto en las de *E. coli* que es cien veces menor. De las tres quinolonas testadas, con actividad muy similar, moxifloxacino es ligeramente mejor frente a *E. cloacae*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, y frente a *Acinetobacter baumannii*, destacar que ozenoxacino es la quinolona con mejor actividad, con un rango de 0,06-32 mg/L, siendo todas las cepas testadas resistentes a ciprofloxacino.

En el caso de las cepas de Gram-negativos resistentes a ciprofloxacino, todas las quinolonas han perdido su actividad, ya que ha aumentado su CMI entre 10 y 100 veces.

En la tabla III.6, con los resultados equivalentes para ozenoxacino, ác.fusídico y mupirocina, se puede observar que ozenoxacino ha presentado la mayor actividad frente a todas las cepas, tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas testadas, independientemente de su resistencia a ciprofloxacino. Sólo frente a *Corynebacterium* spp. resistente a ciprofloxacino, el ác.fusídico ha sido entre 5 y 10 veces más activo que ozenoxacino, en el resto de especies, ozenoxacino ha sido entre 10 y 1000 veces más potente que el ác.fusídico y mupirocina.

En las tablas siguientes (III.7-III.12) se detalla la actividad de ozenoxacino frente a las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes* que poseen resistencia o sensibilidad disminuida a mupirocina, ácido fusídico y/o a las dos fluoroquinolonas utilizadas en este estudio (www.eucast.org).

En la tabla III.7, se puede observar que entre las cepas de *S. aureus* sensibles a metilicina (Oxa*) cuatro cepas (31%) han presentado resistencia a fusídico, dos de ellas con valores de 32 mg/L (en negrita, CMI >1 mg/L), y, ninguna de las cepas ha presentado sensibilidad disminuida a mupirocina. En cambio, 7 de las cepas (54%) han sido resistentes a ciprofloxacino, (sombreado y negrita, CMI > 1 mg/L), y las 6 cepas restantes han presentado una CMI para ciprofloxacino de 1 mg/L. Las CMI para ozenoxacino son muy potentes y con un rango muy estrecho de actividad (0,002-0,004 mg/L, en las cepas sensibles a ciprofloxacino, y 0,002-0,016 mg/L, en las resistentes).

Tabla III.7. Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a MSSA						
Oxa*	Cepas	CMI (mg/L)				
		ozenoxacino	ciprofloxacino	moxifloxacino	ác.fusídico	mupirocina
S	S.a-1	0,004	1	0,125	32	0,016
S	S.a-2	0,004	1	0,125	32	0,016
S	S.a-3	0,004	1	0,25	0,25	0,03
S	S.a-5	0,002	1	0,06	0,125	0,016
S	S.a-11	0,004	1	0,03	0,5	0,06
S	S.a-12	0,004	1	0,125	0,25	0,125
S	S.a-4	0,008	4	1	0,125	0,06
S	S.a-6	0,016	16	1	0,25	0,125
S	S.a-7	0,002	4	0,25	0,06	0,03
S	S.a-8	0,008	8	2	0,125	0,06
S	S.a-9	0,008	4	0,5	8	0,125
S	S.a-10	0,016	4	1	2	0,06
S	S.a-13	0,002	8	1	0,06	0,03

En la tabla III.8, se observa que todas las cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (Oxa*) han sido resistentes a ciprofloxacino, y excepto una, a moxifloxacino (sombreado y negrita), que 3 cepas (18%) han sido resistentes, también, al ác.fusídico (negrita), y, que 11 (65%) no han sido sensibles a mupirocina, aunque sin llegar al punto de corte definido de resistencia (negrita). A pesar de la resistencia a ciprofloxacino y moxifloxacino de las cepas de este subgrupo MRSA, las CMI para ozenoxacino se han mantenido bajas, entre 0,004 y 0,25 mg/L.

Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a MRSA						
Oxa*	Cepas	CMI (mg/L)				
		ozenoxacino	ciprofloxacino	moxifloxacino	ác.fusídico	mupirocina
R	S.a-14	0,125	256	8	8	2
R	S.a-15	0,125	512	16	4	0,5
R	S.a-16	0,06	32	2	0,125	1
R	S.a-17	0,06	128	4	0,06	2
R	S.a-18	0,06	128	4	0,06	1
R	S.a-19	0,06	128	4	0,06	2
R	S.a-20	0,125	512	16	0,25	4
R	S.a-21	0,06	128	4	0,5	4
R	S.a-22	0,06	64	2	0,125	0,5
R	S.a-23	0,125	256	16	0,03	8
R	S.a-24	0,06	128	8	0,125	2
R	S.a-25	0,004	8	0,5	0,125	0,5
R	S.a-26	0,06	256	8	0,125	2
R	S.a-27	0,125	128	32	0,03	4
R	S.a-28	0,06	64	8	0,5	1
R	S.a-29	0,25	256	8	2	2
R	S.a-30	0,06	128	8	0,06	2

Se presentan, en las dos tablas siguientes III.9 y III.10, los valores individuales de CMI para las cepas de *S. epidermidis* en función de su sensibilidad o resistencia a ciprofloxacino; para estas cepas no se ha realizado la determinación de sensibilidad o resistencia a metilina.

De entre las 9 cepas sensibles a ciprofloxacino, tres han sido resistentes a fusídico (33%, negrita) y todas han sido sensibles a mupirocina. De entre las 29 *S. epidermidis* resistentes a ciprofloxacino (sombreado y negrita), 13 han presentado resistencia a ác.fusídico (45%) y sólo

8 (28%) han sido sensibles a mupirocina, 13 con sensibilidad intermedia y 8 posiblemente resistentes a mupirocina (≥ 128 mg/L), o por lo menos, no sensibles.

Tabla III.9. Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a <i>S. epidermidis</i> sensibles a ciprofloxacino					
CMI (mg/L)					
Cepas	ozenoxacino	ciprofloxacino	moxifloxacino	ác.fusídico	mupirocina
S.e-24	0,008	0,5	0,25	64	0,06
S.e-25	0,008	0,5	0,125	0,125	0,06
S.e-26	0,008	0,25	0,125	0,125	0,03
S.e-27	0,008	0,5	0,125	0,125	0,06
S.e-29	0,016	0,25	0,125	32	0,125
S.e-30	0,008	0,25	0,125	0,06	0,06
S.e-35	0,008	0,25	0,125	0,06	0,06
S.e-36	0,008	0,25	0,125	0,125	0,06
S.e-37	0,008	0,25	0,125	8	0,125

Tabla III.10. Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a <i>S. epidermidis</i> resistentes a ciprofloxacino					
CMI (mg/L)					
Cepas	Ozenoxacino	ciprofloxacino	moxifloxacino	ác.fusídico	mupirocina
S.e-10	0,004	2	0,5	0,125	0,125
S.e-11	0,06	8	4	0,06	2
S.e-12	0,008	8	2	0,06	2
S.e-13	0,004	8	0,25	0,06	2
S.e-14	0,004	2	0,5	32	0,125
S.e-15	0,25	128	8	0,06	64
S.e-16	0,06	16	8	0,06	8
S.e-17	0,06	16	4	0,125	16
S.e-18	0,06	8	2	0,06	4
S.e-19	0,125	32	4	0,06	16
S.e-20	0,125	32	4	0,25	16
S.e-21	1	128	64	32	128
S.e-22	1	128	64	32	128
S.e-23	0,125	32	16	0,25	64
S.e-1	0,06	256	8	0,06	128
S.e-2	0,06	256	8	0,5	128
S.e-3	0,06	256	8	32	128
S.e-6	0,125	256	16	64	128
S.e-28	0,125	8	4	0,125	0,5
S.e-4	0,004	4	0,5	2	0,125
S.e-5	0,03	256	8	32	128
S.e-31	0,06	4	2	0,06	0,5
S.e-32	0,06	2	0,5	4	0,125
S.e-33	0,25	128	8	0,06	64
S.e-34	0,125	8	4	0,125	0,5
S.e-7	0,125	256	4	0,125	64
S.e-8	0,125	256	16	64	128
S.e-9	0,03	32	8	2	32
S.e-38	0,06	8	1	4	1

Ozenoxacino ha sido el producto más activo en todos los casos, con unos valores de CMI muy bajos en las cepas sensibles a ciprofloxacino (rango 0,008-0,016 mg/L) y se ha mantenido entre 0,004 y 1 mg/L para las cepas resistentes a ciprofloxacino.

En las cepas de *S. epidermidis*, tanto si son sensibles como resistentes a ciprofloxacino, la mayoría de cepas son sensibles al ác. fusídico, aunque hay una proporción de cepas resistentes (CMI entre 0,06 y 64 mg/L).

En este grupo de cepas de *S. epidermidis* se han encontrado, por primera vez, cepas multiresistentes a distintos fármacos (ác.fusídico, mupirocina, ciprofloxacino y moxifloxacino) frente a las cuales ozenoxacino ha mantenido una muy buena actividad. Hay 11 cepas resistentes a las fluoroquinolonas y no sensibles a mupirocina, y 7 cepas resistentes a las fluoroquinolonas y al ác. fusídico que, además, no son sensibles a mupirocina; frente a todas ellas las CMI de ozenoxacino van de 0,03 a 1 mg/L.

Como puede observarse en las dos tablas siguientes, III.11 y III.12, todas (100%) las cepas de *S. pyogenes* han presentado CMI elevadas para el ác.fusídico, un 83% de las cepas con CMI superiores a 1 mg/L para ciprofloxacino, un 20% han sido resistentes a moxifloxacino, y sólo hay 7 cepas (23%), que no han sido sensibles a mupirocina. Los valores para ozenoxacino se han mantenido entre 0,03 y 0,06 mg/L para cepas con CMI bajas para ciprofloxacino, y entre 0,03 y 0,5 mg/L para cepas con CMI superiores a 1 para ciprofloxacino. La máxima CMI para ciprofloxacino ha sido de 16 mg/L, mientras que su CMI₉₀ ha sido de 8 mg/L, muy inferior a los valores de 256 mg/L que han presentado las cepas de *Staphylococcus* spp..

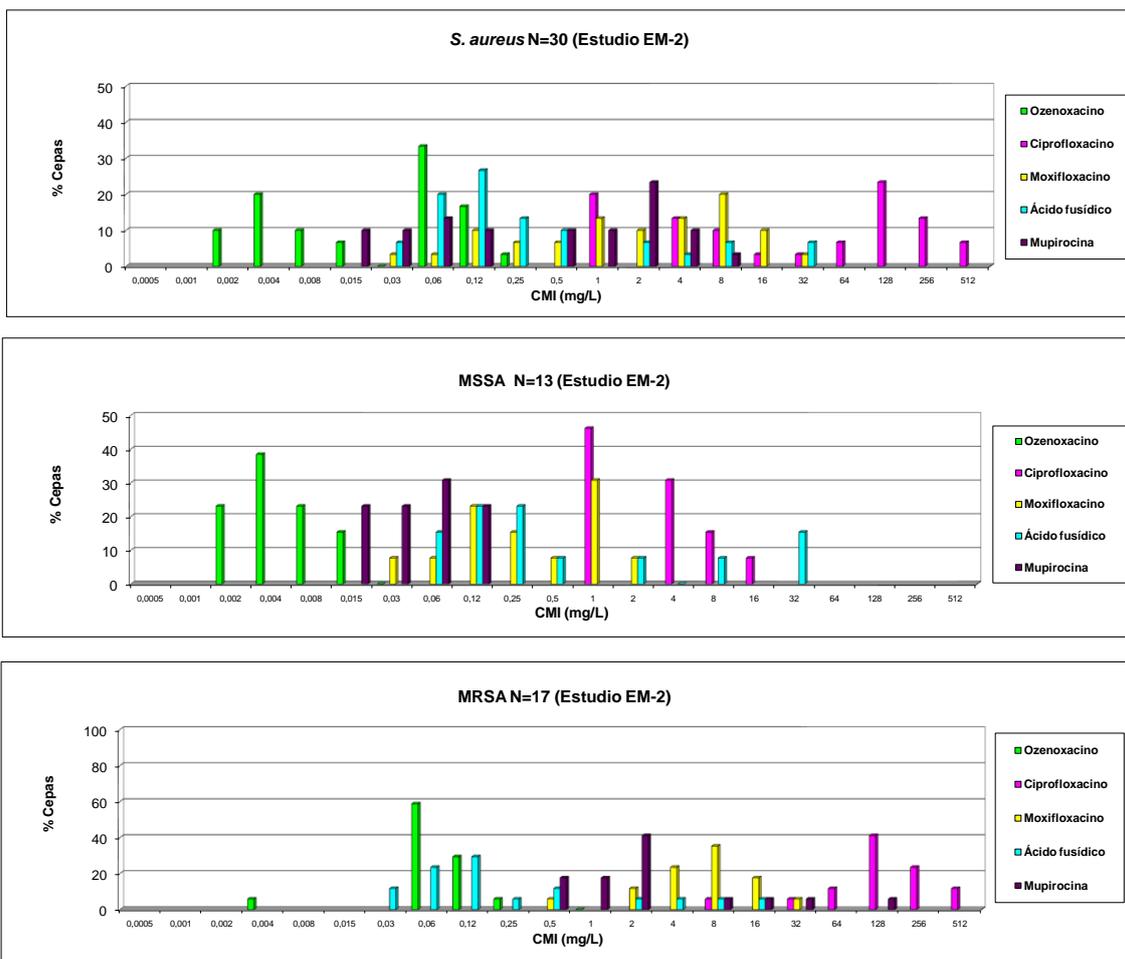
Tabla III.11. Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a <i>S. pyogenes</i> con CMI ≤1 mg/L para ciprofloxacino					
Cepas	CMI (mg/L)				
	ozenoxacino	ciprofloxacino	moxifloxacino	ác.fusídico	mupirocina
S.p-1	0,03	1	0,5	64	0,25
S.p-3	0,06	1	0,5	16	0,125
S.p-6	0,03	1	0,5	16	0,25
S.p-9	0,03	0,5	0,03	16	0,25
S.p-11	0,03	1	0,25	8	0,5

Tabla III.12. Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico y mupirocina frente a <i>S. pyogenes</i> con CMI >1 mg/L para ciprofloxacino					
Cepas	CMI (mg/L)				
	ozenoxacino	ciprofloxacino	moxifloxacino	ác.fusídico	mupirocina
S.p-2	0,125	4	1	8	2
S.p-4	0,03	2	0,5	16	0,125
S.p-5	0,06	2	1	16	0,5
S.p-7	0,125	8	2	16	1
S.p-8	0,06	2	1	8	0,5
S.p-10	0,03	2	0,5	16	0,5
S.p-12	0,06	2	0,5	16	0,5
S.p-13	0,06	2	0,5	8	0,5
S.p-14	0,06	2	0,5	8	0,5
S.p-15	0,5	4	2	16	2
S.p-16	0,25	4	1	16	1
S.p-17	0,5	4	2	16	2
S.p-18	0,03	2	0,5	16	0,5
S.p-19	0,125	8	2	16	4
S.p-20	0,25	16	2	16	4
S.p-21	0,125	2	1	8	2
S.p-22	0,5	4	2	16	2
S.p-23	0,5	4	1	8	1
S.p-24	0,06	2	0,5	16	0,5
S.p-25	0,06	2	0,5	16	1
S.p-26	0,03	4	0,25	16	1
S.p-27	0,125	4	0,5	16	1
S.p-28	0,06	2	0,5	8	0,5
S.p-29	0,06	2	0,5	16	0,5
S.p-30	0,06	2	0,5	8	0,25

En las figuras III.7-III.19 se presenta la distribución de los datos de actividad de los distintos productos, en función del perfil de sensibilidad de las cepas, a metilina en el caso de *S. aureus*, y a ciprofloxacino, en el caso del resto de especies. Si existe punto de corte definido para ciprofloxacino, según EUCAST, se utiliza, y si no, se separan las cepas con CMI para ciprofloxacino >1 mg/L.

Resultados *S. aureus* (global, MSSA y MRSA)

Figuras III.7.1, III.7.2 v III.7.3

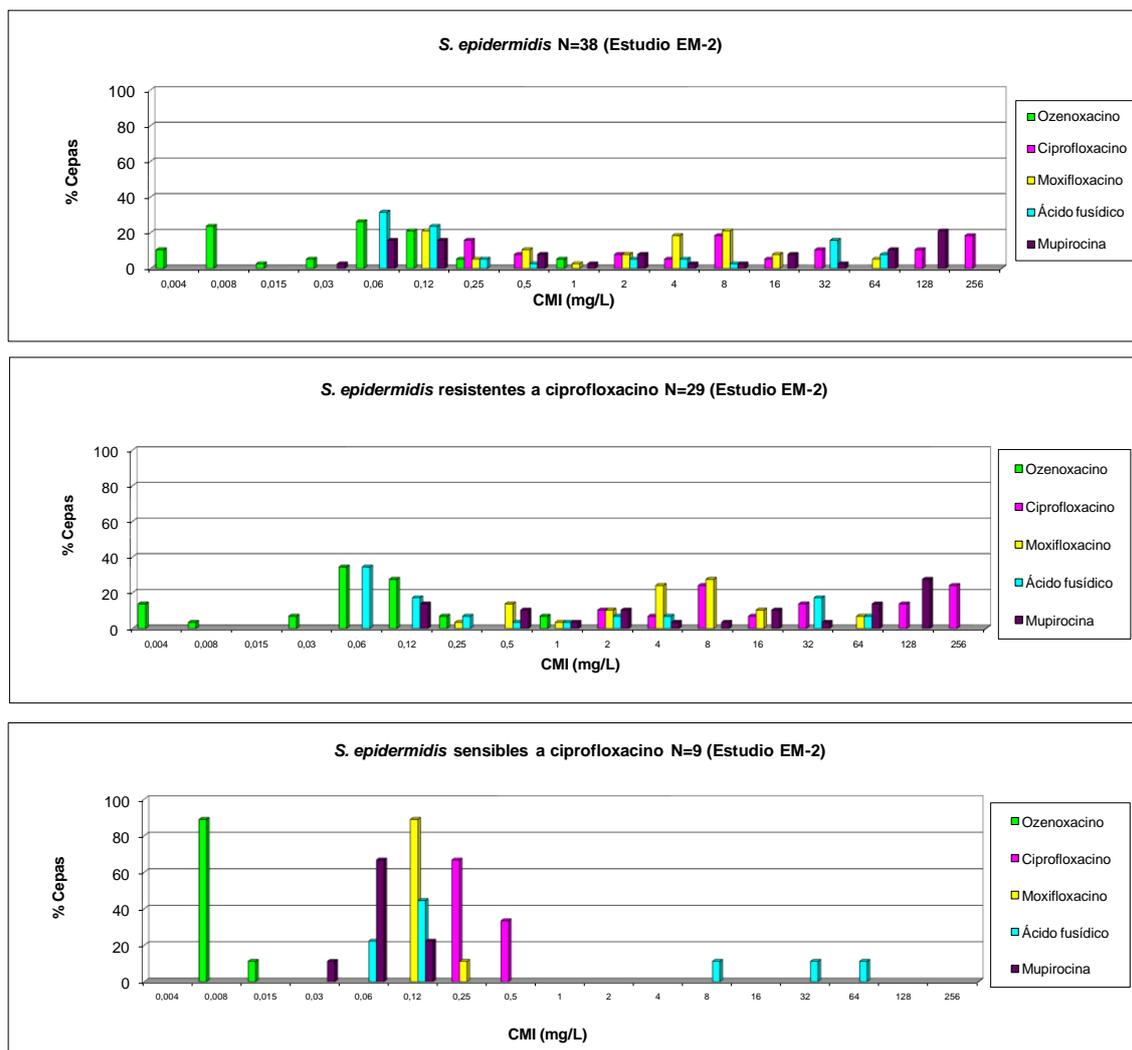


En el caso de las 30 cepas de *S. aureus* (tablas III.5 y III.6), sólo 6 de las 13 MSSA han sido sensibles a ciprofloxacino (46%), con CMI de 1mg/L, mientras que las 7 MSSA restantes (54%) han sido resistentes a ciprofloxacino, y también la totalidad de las 17 cepas de MRSA.

En la primera figura, III.7.1, con todas las cepas de *S. aureus*, se observa que el producto más activo ha sido ozenoxacino, el menos activo ciprofloxacino, y que, tanto el ácido fusídico, como mupirocina y moxifloxacino han presentado un rango de CMI muy amplio desde 0,03 a 8-32 mg/L. En la segunda figura, III.7.2, que representa los valores para las cepas de MSSA, se observa que ozenoxacino ha sido el producto más activo con CMI entre 0,002 y 0,004 mg/L, a pesar de la menor susceptibilidad a ciprofloxacino de estas cepas (6 con CMI para ciprofloxacino de 1 mg/L y 7 cepas con valores superiores, por tanto, resistentes). Mupirocina ha presentado una buena actividad y moxifloxacino ha sido claramente mejor a ciprofloxacino frente a estas cepas. El ácido fusídico ha presentado un rango muy amplio de CMI, con 4/13 cepas resistentes, hasta valores de 32 mg/L. En la tercera figura, III.7.3, con las cepas MRSA, que además de resistentes a meticilina, son también todas resistentes a ciprofloxacino y todas menos una a moxifloxacino, se destaca que ozenoxacino ha presentado los valores de CMI más bajos (entre 0,004 y 0,125 mg/L) y que el ácido fusídico ha sido más eficaz frente a las cepas MRSA que a las MSSA con 4/17 (23%) cepas resistentes, mupirocina ha perdido, en cambio, actividad detectándose cepas con susceptibilidad disminuida (CMI > 1 mg/L).

Resultados *S. epidermidis* (global, sensibles y resistentes a ciprofloxacino).

Figuras III.8.1, III.8.2 y III.8.3



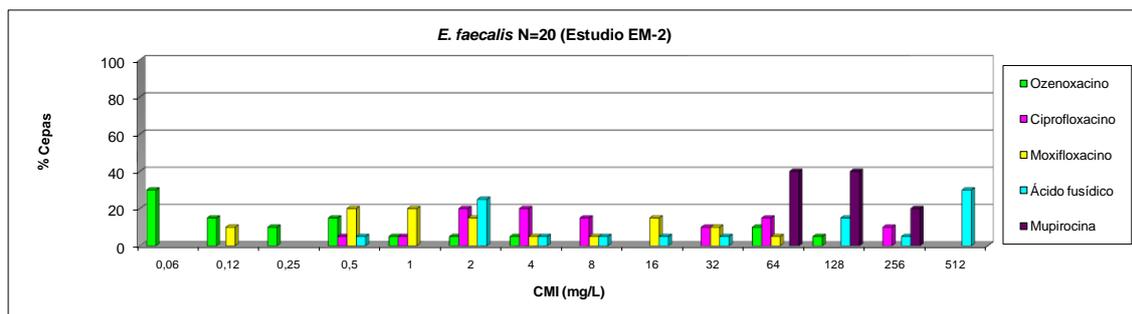
Como se observa en las tablas y figuras previas, ozenoxacino ha sido el producto más activo, con CMI entre 0,008-0,015 mg/L para las cepas sensibles a ciprofloxacino y 0,004-1 mg/L para las cepas resistentes a ciprofloxacino.

Las cepas sensibles a ciprofloxacino han presentado las CMI más bajas para todos los antibióticos, excepto para el ácido fusídico. Mupirocina también ha presentado mayor actividad (0,03-0,125 mg/L) frente a las cepas sensibles a ciprofloxacino que frente a las cepas resistentes a esta fluoroquinolona (0,5-128 mg/L), a pesar de tener mecanismos de acción completamente distintos. Los resultados para moxifloxacino se han situado paralelos a los de ciprofloxacino, con una clara su resistencia cruzada, aunque con valores algo más bajos.

Los valores de CMI para el ácido fusídico no se han modificado, prácticamente, en ninguno de los grupos estudiados. Para las cepas sensibles a ciprofloxacino se han detectado dos subpoblaciones, una sensible entre 0,06-0,125 mg/L y otra resistente entre 8-64 mg/L, mientras que para las cepas resistentes a ciprofloxacino las CMI se han repartido entre 0,06 y 64 mg/L.

Resultados *E. faecalis* (global)

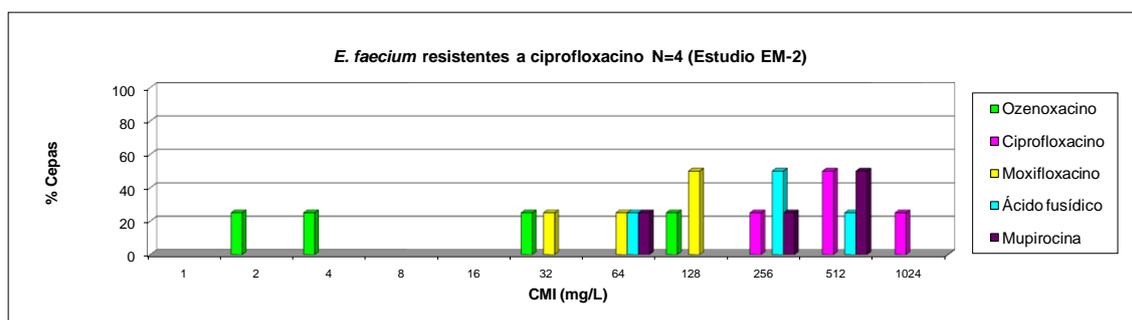
Figura III.9



Todas las cepas, menos dos, de *Enterococcus faecalis* han sido resistentes a ciprofloxacino (90%, CMI >2 mg/L), con CMI muy elevadas para el resto de antibióticos, incluyendo tanto a moxifloxacino, como ácido fusídico (una cepa de 0,5 y el resto 2-512 mg/L) y mupirocina (64-256 mg/L). Sólo ozenoxacino ha presentado 14/20 (70%) cepas con valores inferiores a 1 mg/L, aunque se han detectado tres cepas con CMI de 64-128 mg/L, con valores, también, elevados para ciprofloxacino (32-64mg/L), moxifloxacino (8-32 mg/L), ácido fusídico (128-512 mg/L) y mupirocina (64-256 mg/L).

Resultados *E. faecium* (global)

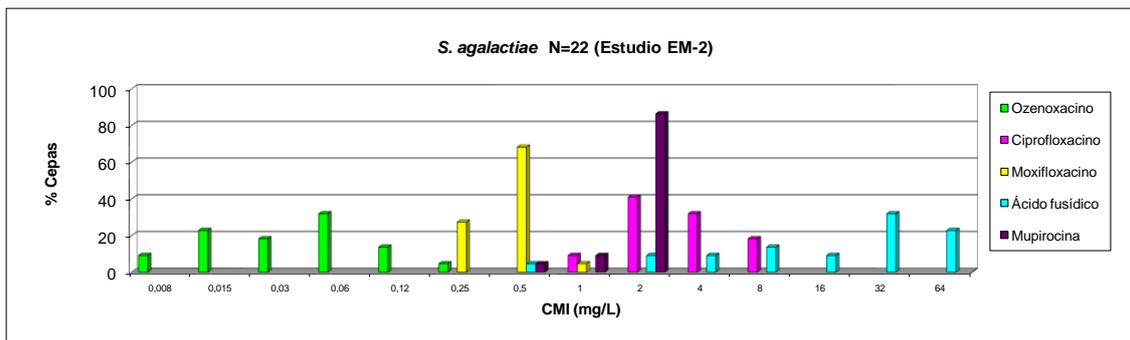
Figura III.10.



Sólo se han podido testar cuatro cepas de *Enterococcus faecium*, todas con valores de CMI muy elevados para todos los antibióticos y resistentes a ciprofloxacino (>2 mg/L). No hay definidos puntos de corte de susceptibilidad y resistencia, para ácido fusídico y *Enterococcus* spp., ni para moxifloxacino ni mupirocina. En la figura se observa que las CMI para todos los productos han sido muy elevadas, superiores a 16 mg/L en todos los casos, excepto para ozenoxacino, cuyo rango ha sido de entre 2 y 128 mg/L.

Resultados *S. agalactiae* (global)

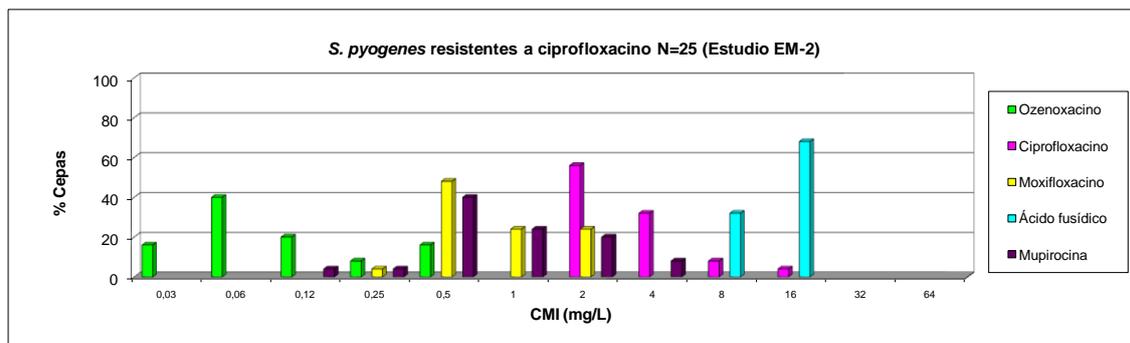
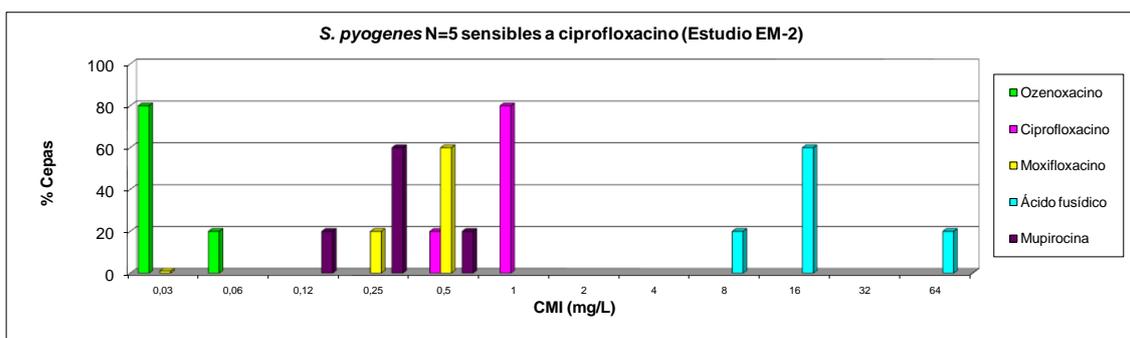
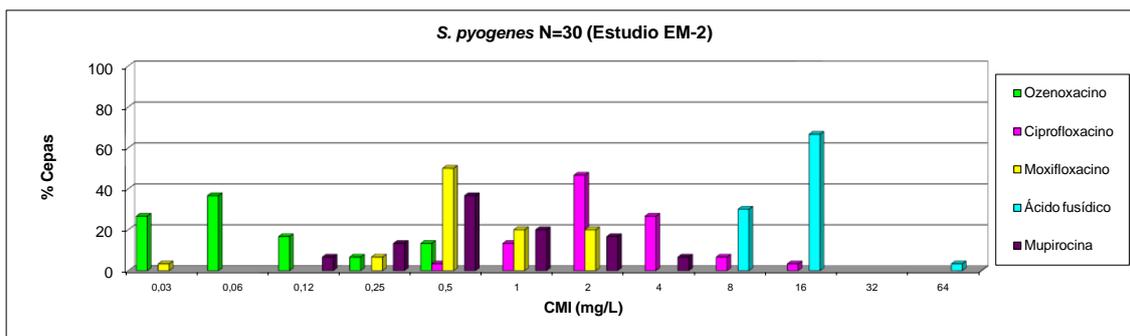
Figura III.11



Frente a *S. agalactiae*, estreptococcus beta-hemolítico del grupo B, la actividad de ozenoxacino se ha detectado con CMI muy bajas (entre 0,008 y 0,25 mg/L), muy por debajo de las de los otros productos, moxifloxacino (entre 0,25-1 mg/L), ciprofloxacino (entre 1-8 mg/L), mupirocina (entre 0,5 y 2 mg/L) y, el menos activo ha resultado ser el ác.fusídico (entre 0,5-64 mg/L).

Resultados *S. pyogenes* (globales, sensibles y resistentes a ciprofloxacino)

Figuras III.12.1, III.12.2 y III.12.3

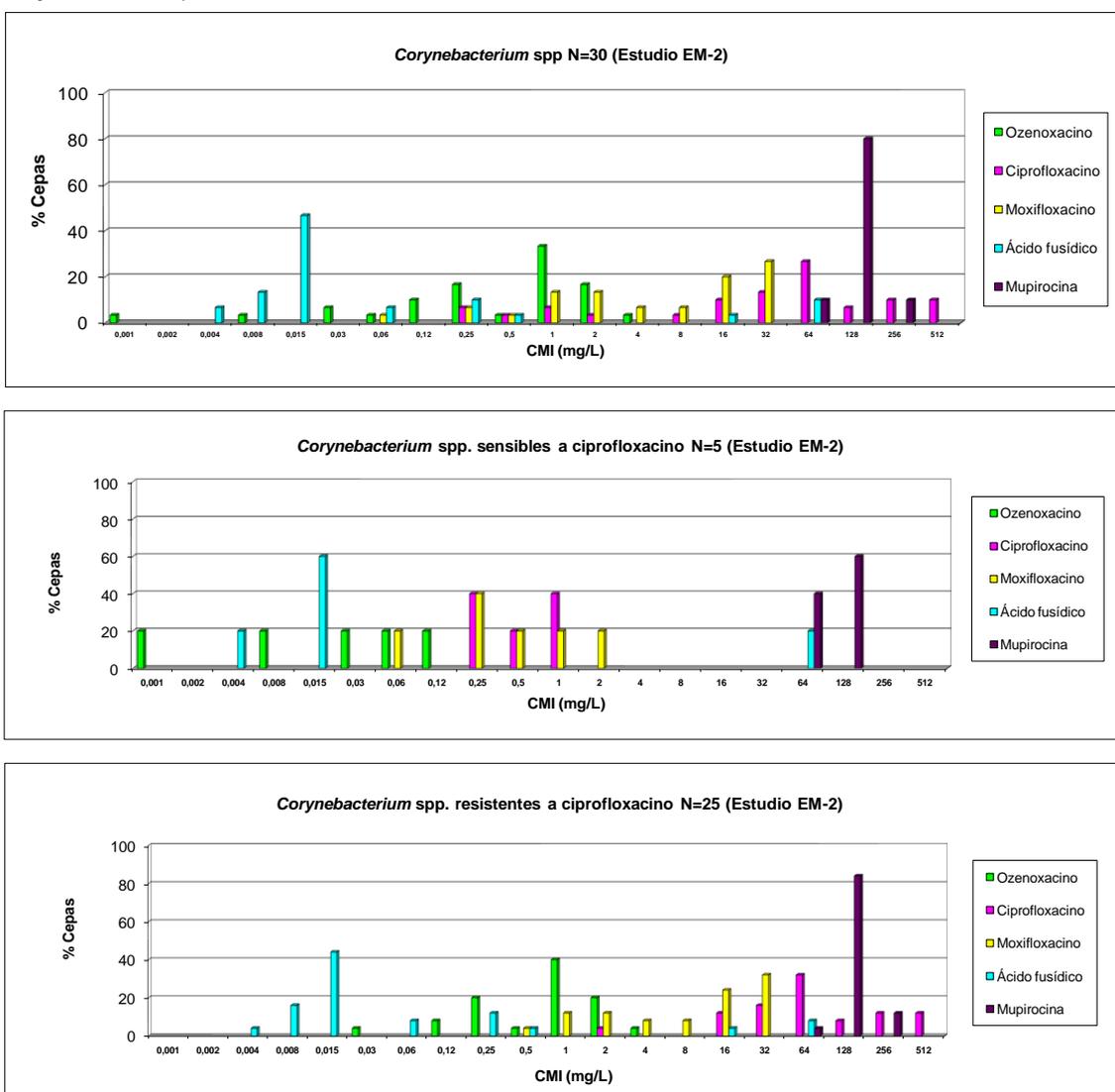


Para *S. pyogenes*, en general, como se observa en la primera gráfica, ozenoxacino ha sido el producto más activo, con los valores de las CMI más bajos (0,03-0,5 mg/L), mientras que el ácido fusídico ha sido el antibiótico con menor actividad, con las CMI más elevadas (8-64 mg/L). De nuevo, para las cepas sensibles a ciprofloxacino, ozenoxacino se ha desmarcado con CMI de entre 0,03-0,06 mg/L y mupirocina ha presentado, también, sus mejores valores (entre 0,12 y 0,5 mg/L), a pesar de no tener relación sus mecanismos de acción. Moxifloxacino se ha mantenido por debajo de 1 mg/L y el ácido fusídico ha presentado muy poca actividad, con valores entre 8 y 64 mg/L.

Para las cepas con CMI para ciprofloxacino por encima de 1mg/L, ozenoxacino se ha mantenido por debajo de 1mg/L (0,03-0,5 mg/L), moxifloxacino por debajo de 4 mg/L (0,25-2mg/L), mupirocina ha presentado CMI entre 0,125-4 mg/L, y el ácido fusídico entre 8 y 16 mg/L.

Resultados *Corynebacterium* spp. (globales, sensibles y resistentes a ciprofloxacino)

Figuras III.13.1, III.1.2 y III.13.3

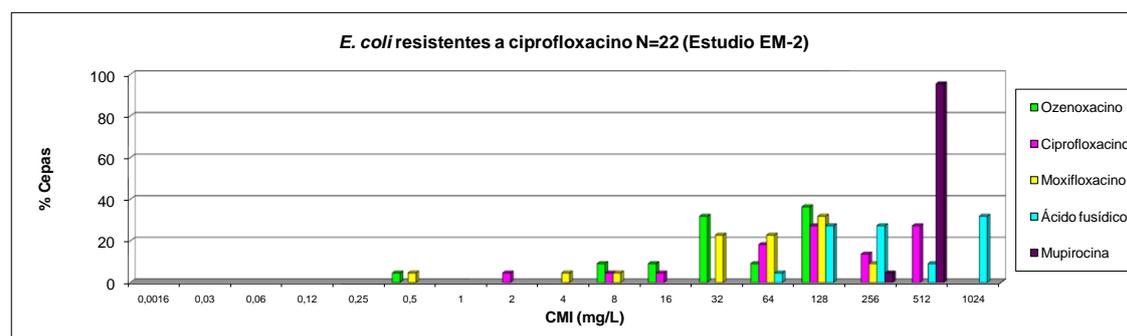
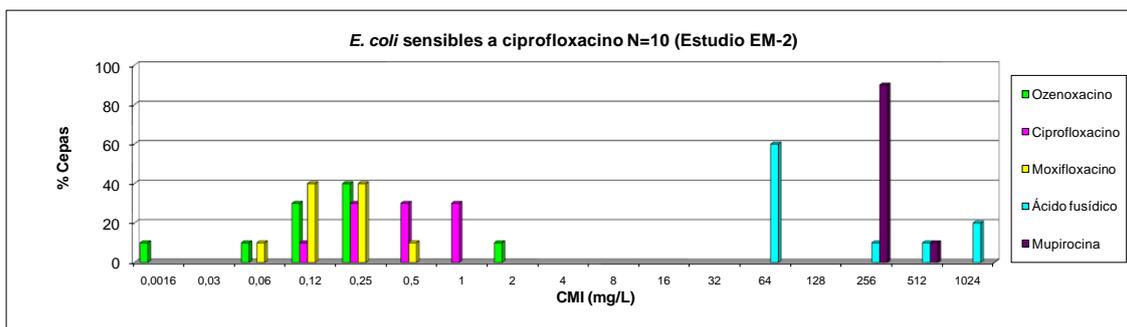
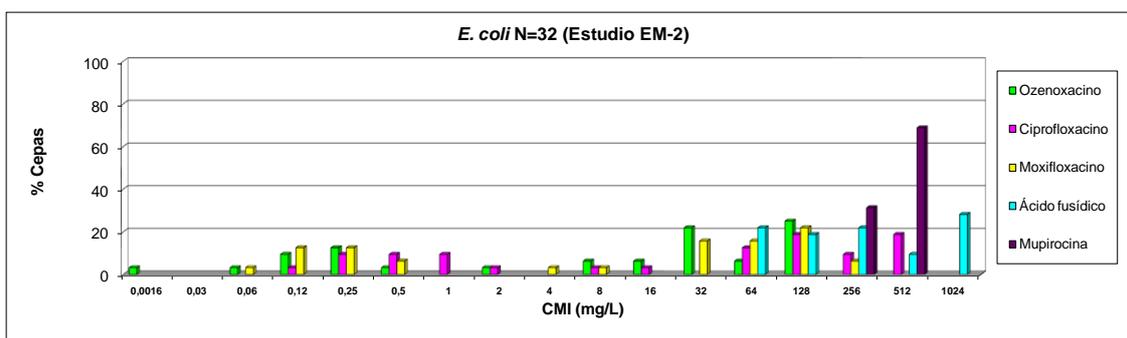


No hay puntos de corte, de sensibilidad y resistencia, definidos para *Corynebacterium* spp., pero se observa que mupirocina no ha presentado actividad, con CMI entre 64-512 mg/L, que el ác.fusídico ha mantenido dos subpoblaciones, una, frente a la que posee una muy buena actividad (entre 0,004-0,5 mg/L), y otra, aparentemente residual, con CMI entre 16-64 mg/L, esto hace que su CMI₉₀ haya sido de 16 mg/L y su CMI₅₀ de 0,016 mg/L.

Ozenoxacino ha demostrado una buena actividad, con CMI entre 0,001-0,12 mg/L para las cepas con CMI para ciprofloxacino inferiores a 2 mg/L, y con CMI de entre 0,03 y 4 mg/L, CMI₉₀ de 2 y CMI₅₀ de 1 mg/L, para las que han presentados CMI más elevadas para ciprofloxacino; de igual manera se ha comportado moxifloxacino, aunque con valores siempre superiores a los de ozenoxacino (0,06-2 mg/L y 0,5-32 mg/L).

Resultados cepas de *E. coli* (globales, sensibles y resistentes a ciprofloxacino)

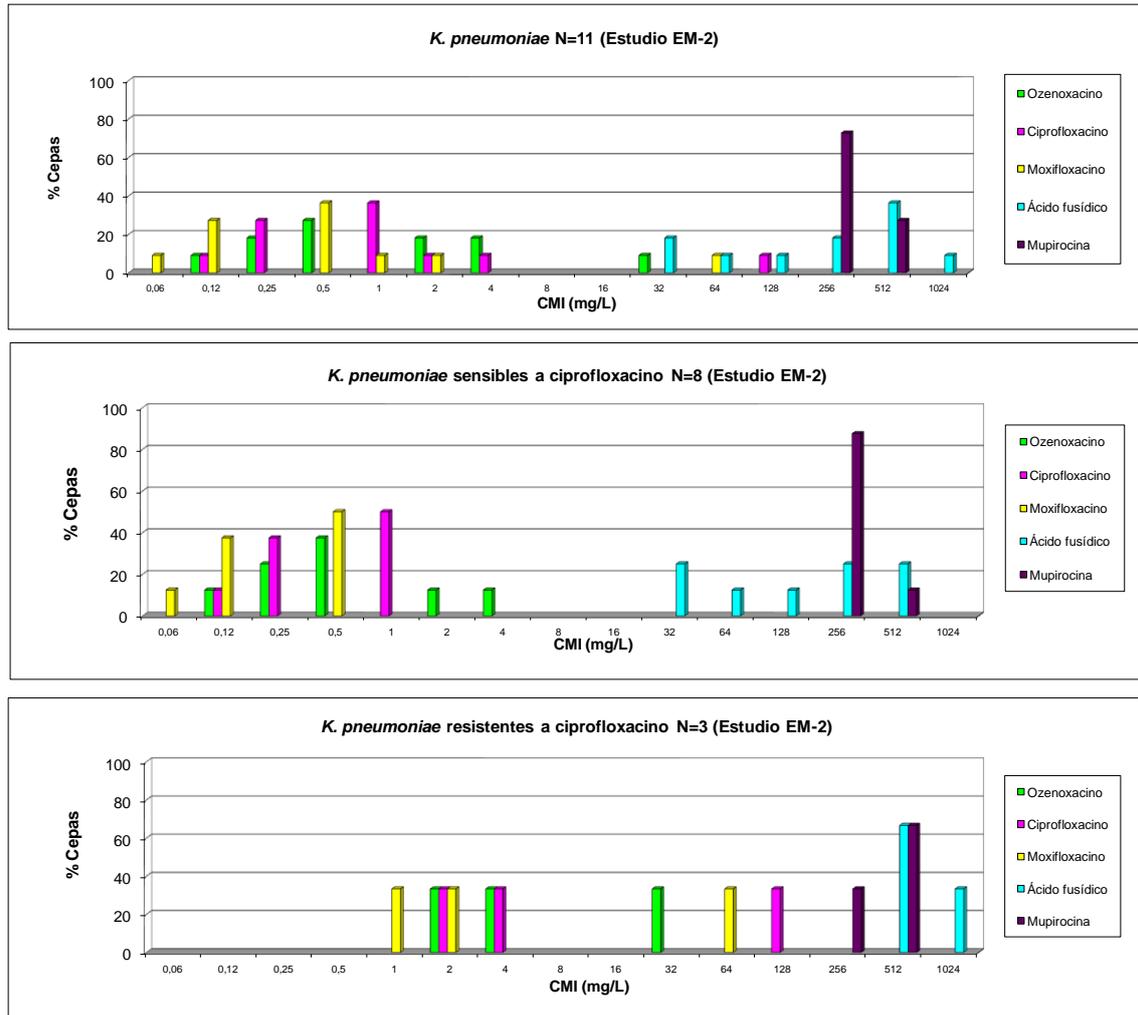
Figuras III.14.1, III.14.2 y III.14.3



Frente a bacterias Gram-negativas, tanto el ác.fusídico como la mupirocina no poseen actividad, y los valores de CMI detectados han sido de entre 64-1024 mg/L y 256-512 mg/L, respectivamente. Las quinolonas utilizadas han mostrado actividad frente a las cepas sensibles a ciprofloxacino, con las mejores CMI, aunque también con el rango más amplio, para ozenoxacino, seguido de moxifloxacino y ciprofloxacino. Para las cepas resistentes a ciprofloxacino, que son la mayoría 22/32 (69%), también ozenoxacino (0,5-128 mg/L) y moxifloxacino (0,5-256 mg/L), han perdido su actividad.

Resultados cepas de *K. pneumoniae* (global, sensibles y resistentes a ciprofloxacino)

Figuras III.15.1, III.15.2 y III.15.3

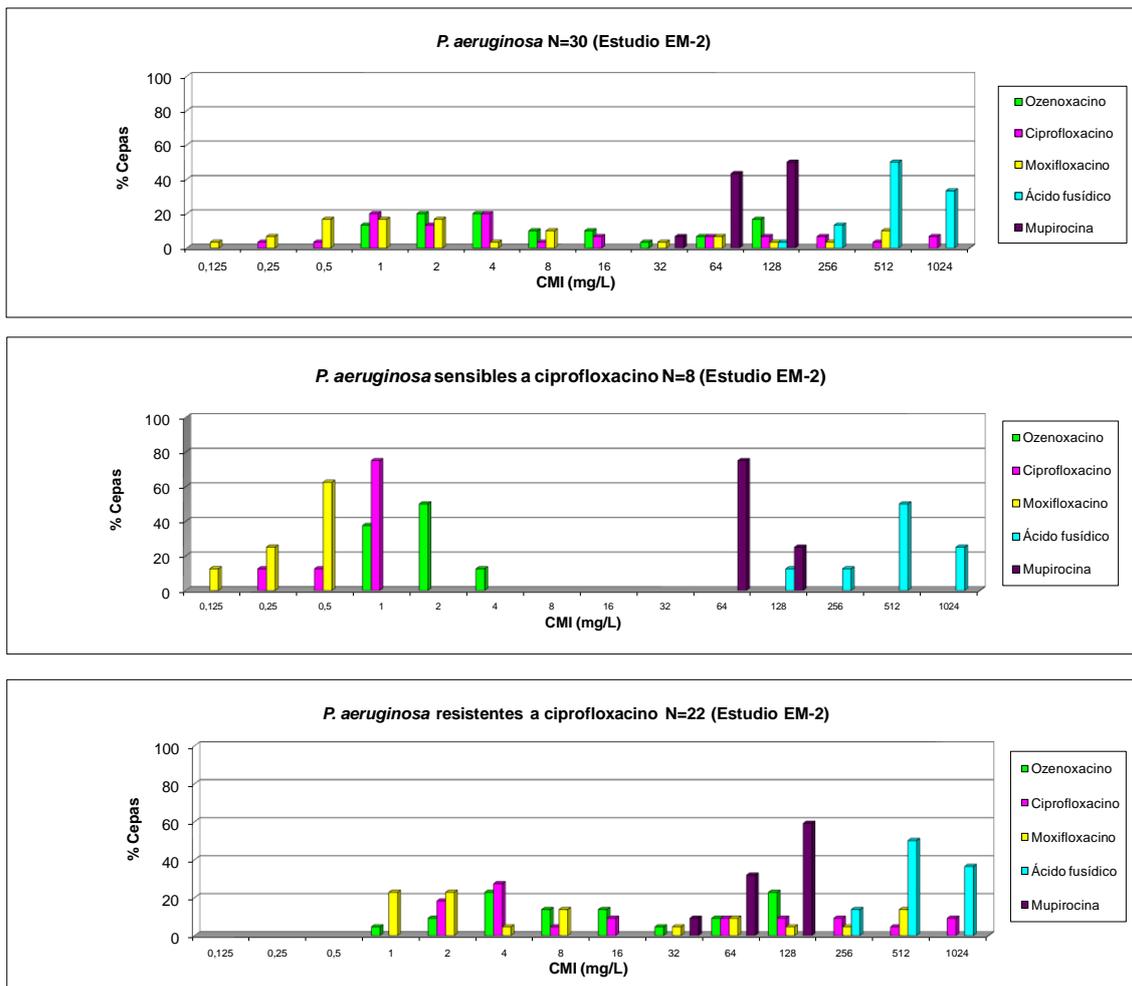


En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, tampoco ni el ác.fusídico ni la mupirocina han presentado actividad frente a estas cepas de bacterias Gram-negativas, con CMI de entre 32-1024 mg/L y 256-512 mg/L.

Entre las cepas de *K. pneumoniae* se ha detectado menor proporción de cepas resistentes a ciprofloxacino (3/11, 27%), frente a éstas, también moxifloxacino y ozenoxacino han perdido su actividad (1-64 mg/L y 2-32 mg/L, respectivamente); frente a las cepas sensibles a ciprofloxacino (73%), moxifloxacino ha mostrado la mejor actividad (0,125-4 mg/L)) seguida de ciprofloxacino (0,125-1 mg/L) y ozenoxacino (0,125-4 mg/L).

Resultados cepas *P. aeruginosa* (globales, sensibles y resistentes a ciprofloxacino)

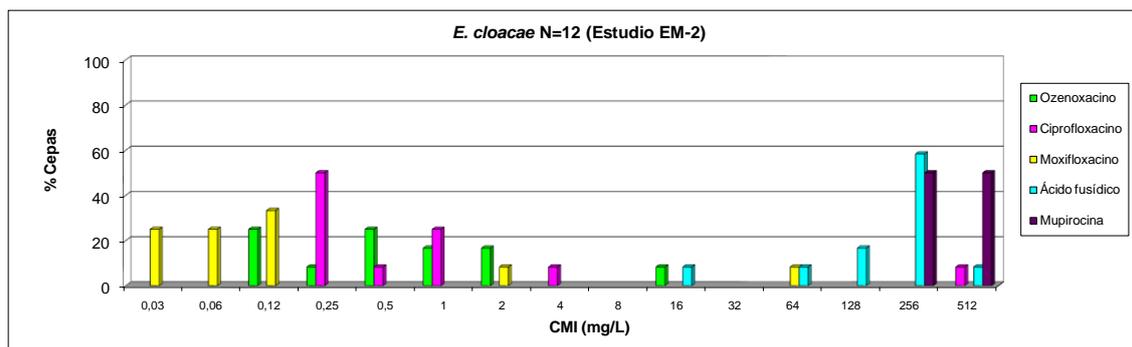
Figuras III.16.1, III.16.2 y III.16.3



En el caso de *P. aeruginosa*, sólo un 27% de las cepas (8/30) han sido sensibles a ciprofloxacino, y, frente a éstas, moxifloxacino ha presentado la mejor actividad seguida de ciprofloxacino y ozenoxacino. Frente a las cepas resistentes a ciprofloxacino (73%), con CMI entre 2 y 1024 mg/L, tanto ozenoxacino como moxifloxacino han perdido su actividad, con rangos de 1-128 mg/L y 1-512 mg/L, respectivamente. Los valores de CMI para mupirocina han ido de 32-128 mg/L y para el ác.fusídico entre 128-1024 mg/L.

Resultados de *Enterobacter cloacae*

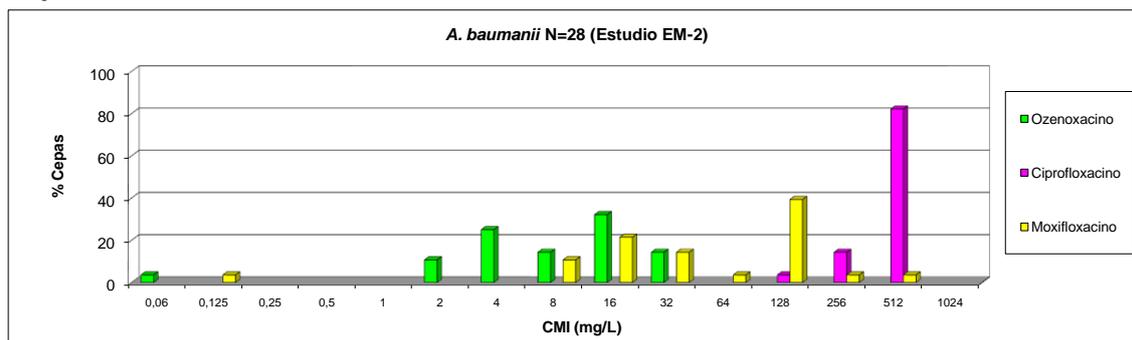
Figuras III.17



El ác.fusídico y la mupirocina no han presentado actividad frente a las cepas de *E. cloacae* analizadas, con CMI entre 16-512 mg/L y 256-512 mg/L, respectivamente. Las quinolonas han demostrado actividad frente a estas cepas, se han detectado 2/12 (17%) resistentes a ciprofloxacino (CMI de 4 y 64 mg/L) que, también, han presentado valores muy altos para ozenoxacino (2 y 16 mg/L) y moxifloxacino (2 y 64mg/L). Para el resto de cepas (83%), sensibles a ciprofloxacino, moxifloxacino ha sido el antibiótico más activo (0,03-0,125 mg/L), seguido de ozenoxacino (0,125-1 mg/L) y ciprofloxacino (0,25-1 mg/L).

Resultados de *A. baumannii*

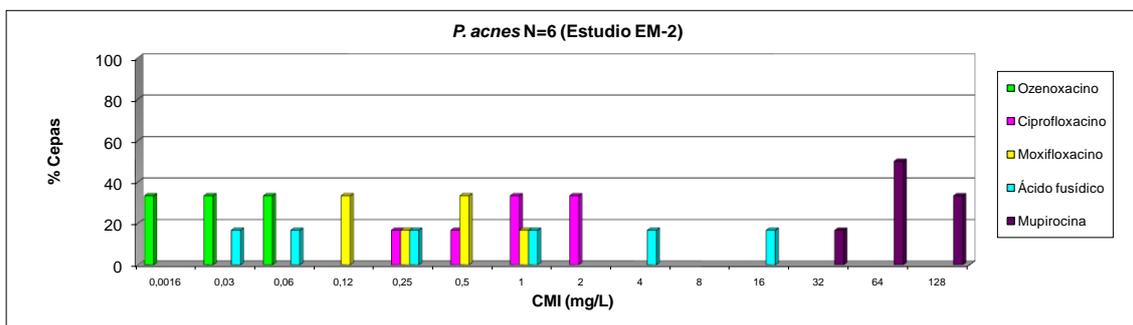
Figuras III.18



Las cepas de *A. baumannii* incluidas en este estudio no procedían de infecciones de piel, pero se incluyeron para valorar la actividad de ozenoxacino frente a las mismas. Se puede observar que, ozenoxacino, ha sido la quinolona que posee mayor actividad, aunque sus CMI han sido, en todos los casos, superiores a 2 mg/L, excepto para una cepa (4%) que ha sido de 0,05mg/L.

Resultados *P. acnes*

Figuras III.19



Ozenoxacino ha sido el producto más activo frente a las 6 cepas de *P.acnes* testadas con CMI entre 0,0016-0,06 mg/L. Mupirocina ha presentado unas CMI por encima de 32 mg/L, y algunas cepas han presentado CMI para el ác.fusídico de entre 0,03 y 1 mg/L, mientras que se ha detectado una cepa con CMI de 4mg/L y otra con 16mg/L. Tanto moxifloxacino como ciprofloxacino han presentado CMI intermedias entre 0,12-1 y 0,25-2 mg/L, respectivamente.

III.2.3. Resultados del Estudio EM-3

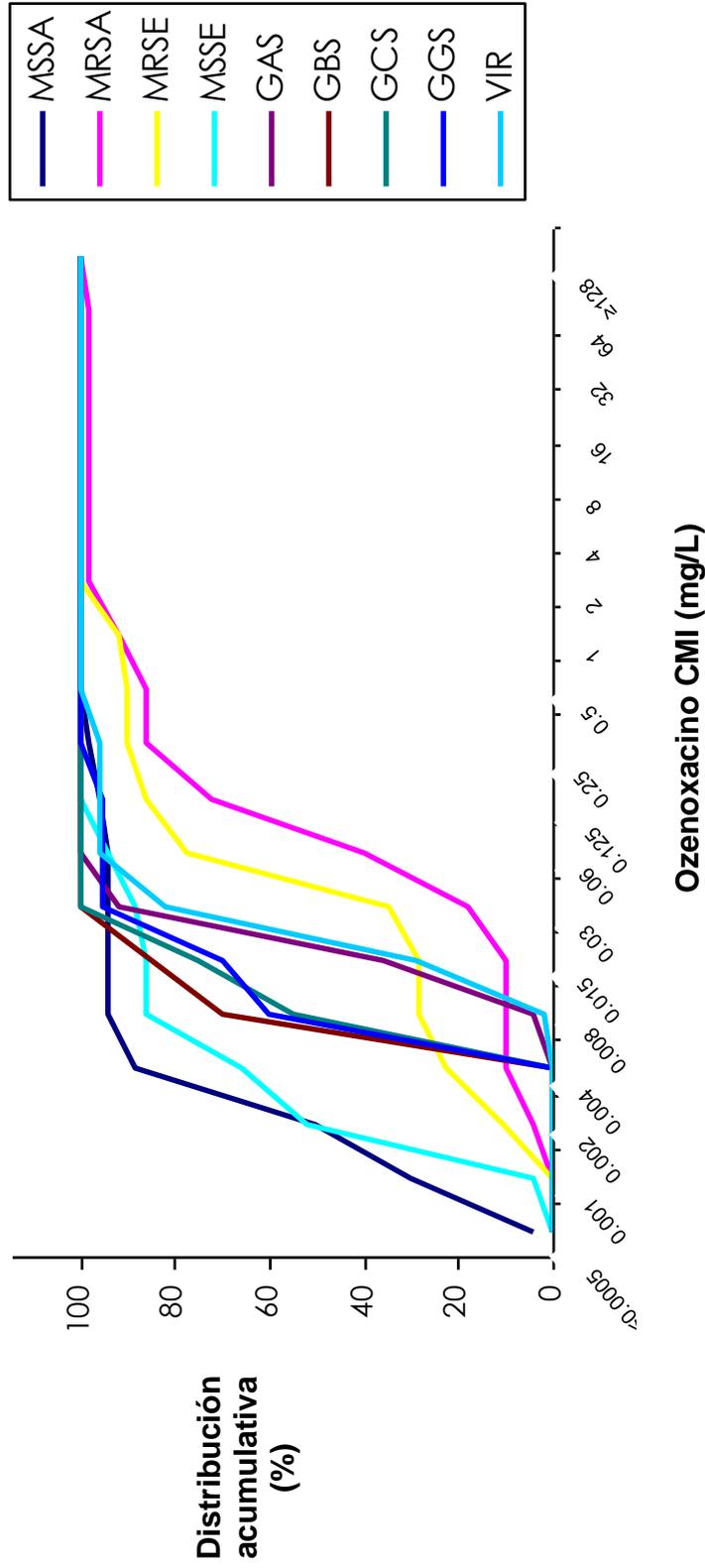
La distribución de las CMI y el resumen de los datos para ozenoxacino y los 10 antibióticos usados como comparadores, frente a cepas mayoritariamente de origen clínico, se muestran en las figuras y tablas siguientes. Algunas de estas especies bacterianas están normalmente involucradas en infecciones de la piel y de estructuras relacionadas (SSSIs).

Se presentan seis tablas resumen de todos los datos (III.14, III.21, III.32, III.37, III.42 y III.48), con los valores de MIC₉₀ y rangos para los distintos subgrupos de especies bacterianas: *Staphylococcus* spp (III.14), *Streptococcus* spp. (III.21), Gram-negativos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (III.32), *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *Neisseria* spp. (tabla III.37), *L. monocytogenes*, *H. pylori*, *B. fragilis* y *Clostridium* spp. (III.42), y finalmente, patógenos atípicos (III.48).

Las celdas de las tablas, que muestran la distribución de las CMI, pueden estar coloreadas en función de si las concentraciones han sido testadas o no (gris), la CMI es inferior a la mínima concentración testada (amarillo), o es superior a la máxima concentración testada (azul).

El nombre de los antibióticos, en las tablas, se abrevia. Ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LEV), moxifloxacino (MOX), amoxicilina (AMOX), ceftriaxona (CEF), amoxicilina más ác. clavulánico (AMCL), ozenoxacino (OZN), tigeciclina (TIG), linezolid (LNZ), daptomicina (DAP) y claritromicina (CLA).

Figura III.20



En la figura III.20 se observa el porcentaje acumulado de la distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias de ozenoxacino frente a las cepas evaluadas de las siguientes especies o grupos de bacterias: MSSA y MRSA, *Staphylococcus aureus* (sensible y resistente a meticilina), MSSE y MRSE, *Staphylococcus epidermidis* (sensible y resistente a meticilina), GAS, GBS, GCS, GGS y VIR, estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, B, C, G y viridans.

El 100% de las cepas de todos los grupos poseen unas CMI para ozenoxacino inferiores a 0,5 mg/L, excepto en MRSA y MRSE. Para MRSE, el 100% de las cepas están por debajo de 4mg/L y la CMI₉₀ es de 1mg/L (tabla III.14). En MRSA, ozenoxacino presenta igual CMI₉₀ de 1mg/L, aunque se ha detectado una cepa multiresistente que posee una CMI de ≥128 mg/L.

En la tabla III.13 se observan, en los *Staphylococcus* analizados (100 cepas de *S. aureus* y 100 de *S. epidermidis*), las proporciones de cepas con resistencia o susceptibilidad a ciprofloxacino. Los resultados muestran una asociación entre sensibilidad a meticilina y a ciprofloxacino, y una asociación entre la resistencia a estos dos antibióticos, en las tablas III.14 y III.15 se presenta la actividad de todos los antibióticos testados frente a estas cepas.

Tabla III.13. Estudio EM-3 / <i>Staphylococcus</i> spp. según susceptibilidad a meticilina		
Organismos (n)	# de cepas sensibles a ciprofloxacino (%)	# de cepas resistentes a ciprofloxacino (%)
<i>S. aureus</i> MSSA (50)	46 (92%)	4 (8%)
<i>S. aureus</i> MRSA (50)	5 (10%)	45 (90%)
<i>S. epidermidis</i> MSSE (50)	43 (86%)	7 (14%)
<i>S. epidermidis</i> MRSE (49)	14 (29%)	35 (71%)

En la tabla III.14 se observan los resultados de actividad antibacteriana (CMI₉₀ y rango) de los antibióticos frente a las cepas del género *Staphylococcus*.

Tabla III.14. Estudio EM-3 / Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus</i> spp. según susceptibilidad a meticilina y ciprofloxacino		Antibióticos CMI ₉₀ y Rango (mg/L)									
Organismos (n)	CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCV	OZN	TIG	LNZ	DAP	CLA
S. aureus MSSA (50)	1	0,5	0,12	16	8	1	0,008	0,25	2	0,25	≥64
	0,12-≥64	0,06-≥64	≤0,015-16	0,12-≥64	0,5-8	0,12-2	≤0,0005-0,5	0,06-0,5	1-4	0,06-0,5	≤0,03-≥64
cipS (46)	0,5	0,375	0,06	16	6	1	0,004	0,25	2	0,25	≥64
	0,12-1	0,06-0,5	≤0,015-0,12	0,12-≥64	0,5-8	0,12-2	≤0,0005	0,06-0,5	1-4	0,06-0,5	≤0,03-≥64
cipR (4)	32	16	4	3,36	4,76	0,5	0,10	0,14	2	0,21	2,77
	≥64	≥64	0,25-16	1-32	4-8	0,25-1	0,008-0,5	0,12-0,25	2	0,12-0,5	0,12-≥64
S. aureus MRSA (50)	≥64	≥64	32	≥64	≥64	≥64	1	0,25	2	0,5	≥64
	0,5-≥64	0,25-≥64	0,06-≥64	8-≥64	16-≥64	4-≥64	0,002-≥128	0,06-1	1-4	0,12-1	0,12-≥64
cipS (5)	0,66	0,25	0,069	≥64	55,7	8	0,003	0,18	2	0,327	0,65
	0,5-1	0,25	0,06-0,12	≥64	32-≥64	8	0,002-0,004	0,12-0,25	1-4	0,12-1	0,12-≥64
cipR (45)	≥64	≥64	32	≥64	≥64	≥64	1	0,4	2	0,5	≥64
	16-≥64	4-≥64	1-≥64	8-≥64	16-≥64	4-≥64	0,03-≥128	0,06-1	1-4	0,12-1	≥64
S. epidermidis MSSE (50)	4	4	1	0,5	4	0,25	0,06	0,25	1	0,5	≥64
	0,06-≥64	0,06-16	≤0,015-4	0,03-2	0,5-4	0,03-0,5	0,001-0,12	0,03-0,5	0,25-1	0,06-1	≤0,03-≥64
cipS(43)	0,25	0,25	0,06	0,5	4	0,25	0,008	0,25	1	0,5	≥64
	0,06-0,5	0,06-0,5	≤0,015-0,25	0,06-2	0,5-4	0,03-0,25	0,001-0,008	0,03-0,5	0,5-1	0,06-1	≤0,03-≥64
cipR (7)	19,5	7,25	1,64	0,3	2	0,15	0,07	0,15	0,45	0,25	8,73
	4-≥64	4-16	0,5-2	0,12-1	1-4	0,06-0,5	0,03-0,12	0,06-0,25	0,25-0,5	0,25	0,06-≥64
S. epidermidis MRSE (49)	≥64	≥64	32	32	≥64	8	1	0,5	1	0,5	≥64
	0,12-≥64	0,12-≥64	0,03-≥64	0,03-32	2-≥64	0,03-16	0,002-2	0,015-0,5	0,5-2	0,06-0,5	≤0,03-≥64
cipS(14)	0,25	0,25	0,06	27,2	27,2	2	0,008	0,25	1	0,25	≥64
	0,12-1	0,12-0,5	0,03-0,12	0,25-32	4-32	0,25-2	0,002-0,008	0,03-0,5	0,5-1	0,06-0,5	0,06-≥64
cipR (35)	≥64	≥64	32	16	≥64	8	1,6	0,5	1	0,4	≥64
	4-≥64	2-≥64	1-≥64	0,03-16	2-≥64	0,03-8	0,03-2	0,015-0,5	0,5-2	0,12-0,5	≤0,03-≥64

En la tabla III.14 se detallan los resultados para los distintos subgrupos de cepas. La actividad de ozenoxacino se ha destacado de la del resto de antibióticos frente a las cepas de MSSA. Los valores de CMI₉₀ y de rango para ozenoxacino (0,008 mg/L y 0,0005-0,5 mg/L) han sido los más bajos, a mucha distancia, de los del resto de antibióticos. La gran mayoría de las cepas (94%) han presentado una CMI para ozenoxacino por debajo de 0,008 mg/L, y sólo el 6% restante ha obtenido una CMI entre 0,125-0,5 mg/L. Estas cepas, con una CMI algo superior, son las que han presentado CMI para ciprofloxacino superiores a 64 mg/L. El 92% de las cepas de MSSA han sido sensibles a ciprofloxacino (92%). Frente a las cepas de MSSA no sensibles a ciprofloxacino (8%), las CMI para ozenoxacino han sido comparables a las de daptomicina y tigeciclina, y mejores que las del resto de compuestos, habiendo sido cien veces más activo que ciprofloxacino, sesenta y cuatro veces mejor que levofloxacino y dieciséis veces mejor que moxifloxacino.

Frente a todas las cepas de MRSA sensibles a ciprofloxacino (10%) ozenoxacino ha sido más activo que el resto de comparativos con CMI tan bajas como 0,002 mg/L y se ha comportado como en el grupo anterior de MSSA sensibles a ciprofloxacino, con CMI entre diez y diez mil veces inferiores a las del resto de antibióticos. Frente a las cepas mayoritarias de MRSA resistentes a fluoroquinolonas (90%), las CMI de ozenoxacino han sido comparables a los compuestos más activos, daptomicina y tigeciclina. Estos tres antibióticos han sido más potentes que el resto de compuestos, ozenoxacino ha sido sesenta y cuatro veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y treinta y dos veces más activo que moxifloxacino. En este subgrupo, de los once antibióticos testados, siete de ellos han obtenido CMI₉₀ de 32-≥64 mg/L, entre ellos, las tres fluoroquinolonas. Frente a las cepas mayoritarias de MRSA resistentes a ciprofloxacino (90%), las CMI de ozenoxacino han sido comparables a los compuestos más activos, daptomicina y tigeciclina, habiendo sido más potente que el resto de compuestos. Tigeciclina y daptomicina han presentado los mejores valores, tanto de CMI₉₀ (0,275 y 0,5 mg/L) como de rango (0,06-1 y 0,12-1 mg/L), y a continuación, ozenoxacino con una CMI₉₀ de 1mg/L y un rango de 0,03-≥128 mg/L, seguido de linezolid (2 mg/L y 1-4 mg/L). Ozenoxacino ha sido sesenta y cuatro veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y treinta y dos veces más activo que moxifloxacino. Ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino han obtenido una CMI₉₀ para MRSA de ≥64, ≥64 y 32mg/L, respectivamente, vs 1 mg/L para ozenoxacino.

En la tabla III.14 se observa que, ozenoxacino ha sido el compuesto más activo frente a las cepas de *S. epidermidis* sensibles a meticilina, los valores de CMI₉₀ y rango han sido inferiores a los del resto de compuestos (0,06 mg/L y 0,001-0,125 mg/L), seguido de amoxicilina con ác.clavulánico (0,25mg/L y 0,03-0,5 mg/L), tigeciclina (0,25 mg/L y 0,03-0,5 mg/L), daptomicina (0,5 mg/L y 0,06-1 mg/L) y amoxicilina sola (0,5 mg/L y 0,03-2 mg/L), por delante de las fluoroquinolonas, ceftriaxona, linezolid y claritromicina.

Un 86% de estas cepas han sido sensibles a ciprofloxacino y el comportamiento de ozenoxacino ha sido el mismo que para todos los subgrupos de bacterias gram-positivas sensibles a ciprofloxacino, una actividad marcadamente superior a la del resto de compuestos, con CMI tan bajas como 0,001mg/L una CMI₉₀ de 0,06 mg/L mil veces inferior a la de otros antibióticos, como claritromicina, y cien veces a la de ciprofloxacino y levofloxacino, como reflejan también las figuras III.25 y III.26. Frente a las cepas de MSSE resistentes a ciprofloxacino (14%), las CMI para ozenoxacino fueron comparables a las de daptomicina, linezolid y tigeciclina pero mejor que las del resto de compuestos incluyendo sesenta y cuatro veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y dieciséis veces mejor que moxifloxacino.

En la tabla III.14 se observa que tigeciclina, daptomicina y ozenoxacino han sido los compuestos más activos frente a las cepas de *S. epidermidis*, resistentes a meticilina (MRSE). Los valores de CMI₉₀ y rango han sido muy similares entre ellos, aunque ozenoxacino ha presentado una CMI de hasta 0,002mg/L (0,5 mg/L y 0,015-0,5 mg/L, 0,5 mg/L y 0,06-0,5 mg/L y 1 mg/L y 0,002-2 mg/L, respectivamente), seguidos de linezolid (1 mg/L y 0,5-2 mg/L) y el resto de antibióticos con CMI₉₀ superiores a 8 mg/L y máximos no definidos. El 71% de estas cepas han sido resistentes a ciprofloxacino, y para este subgrupo todos los antibióticos menos tigeciclina, daptomicina, ozenoxacino y linezolid, han obtenido una CMI₉₀ entre 8 y ≥64 mg/L. Ozenoxacino ha sido sesenta y cuatro veces más potente que ciprofloxacino y levofloxacino, y treinta y dos veces más que moxifloxacino.

Tabla III.15.		Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) sensibles a meticilina.																	
Antibióticos	Porcentaje de cepas con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	4,0	16,0	4,0	6,0	20,0	18,0	8,0	16,0	6,0	2,0	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	12,0	18,0	30,0	34,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ceftriaxona						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	6,0	80,0	12,0	0,0	0,0	0,0	
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	10,0	24,0	52,0	6,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	6,0	
Clarithromicina						8,0	8,0	28,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,0	
Daptomicina						0,0	2,0	24,0	68,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ozenoxacino	4,0	26,0	20,0	38,0	6,0	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Levofloxacino						0,0	0,0	4,0	30,0	48,0	8,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	94,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Moxifloxacino						10,0	32,0	44,0	6,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	60,0	32,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada					Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada				

Figura III.21

S.aureus sensible a meticilina N=50 (Estudio EM-3)

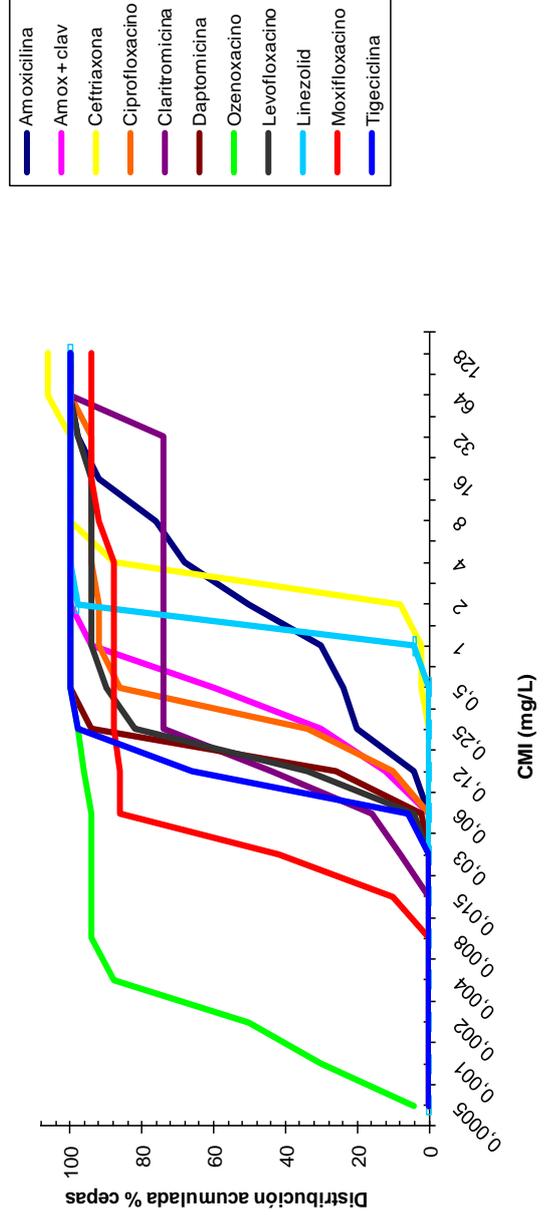
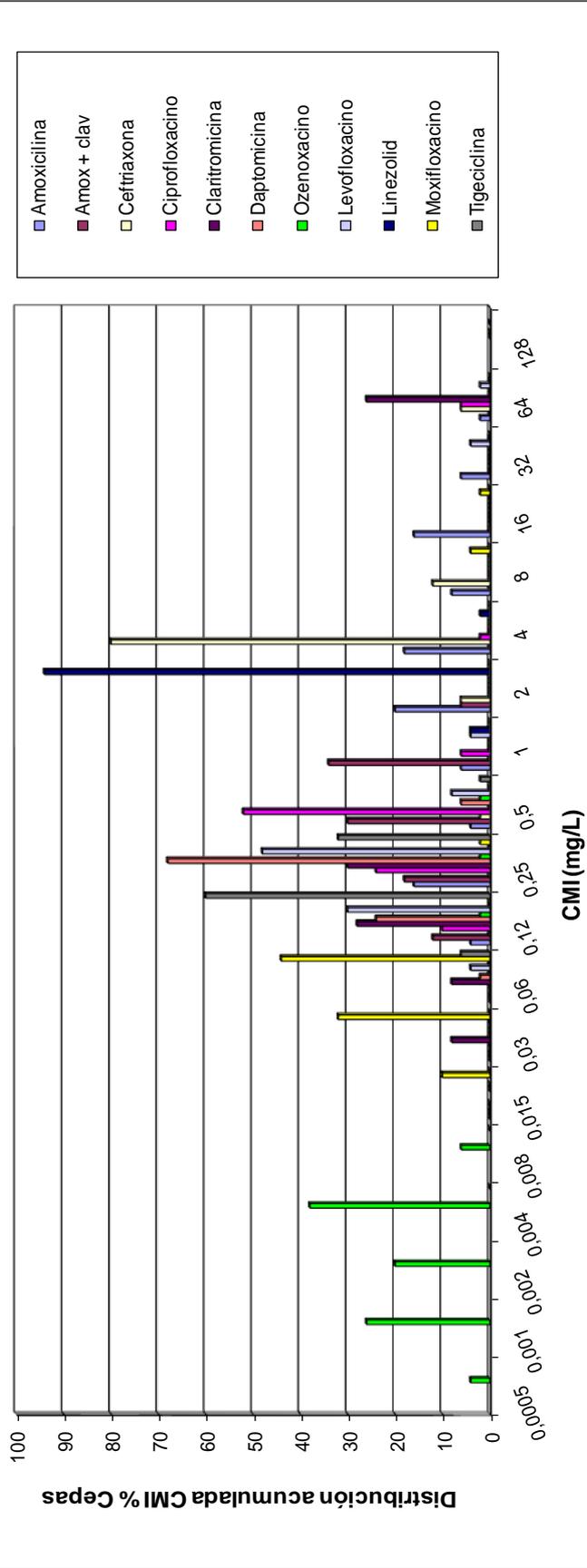


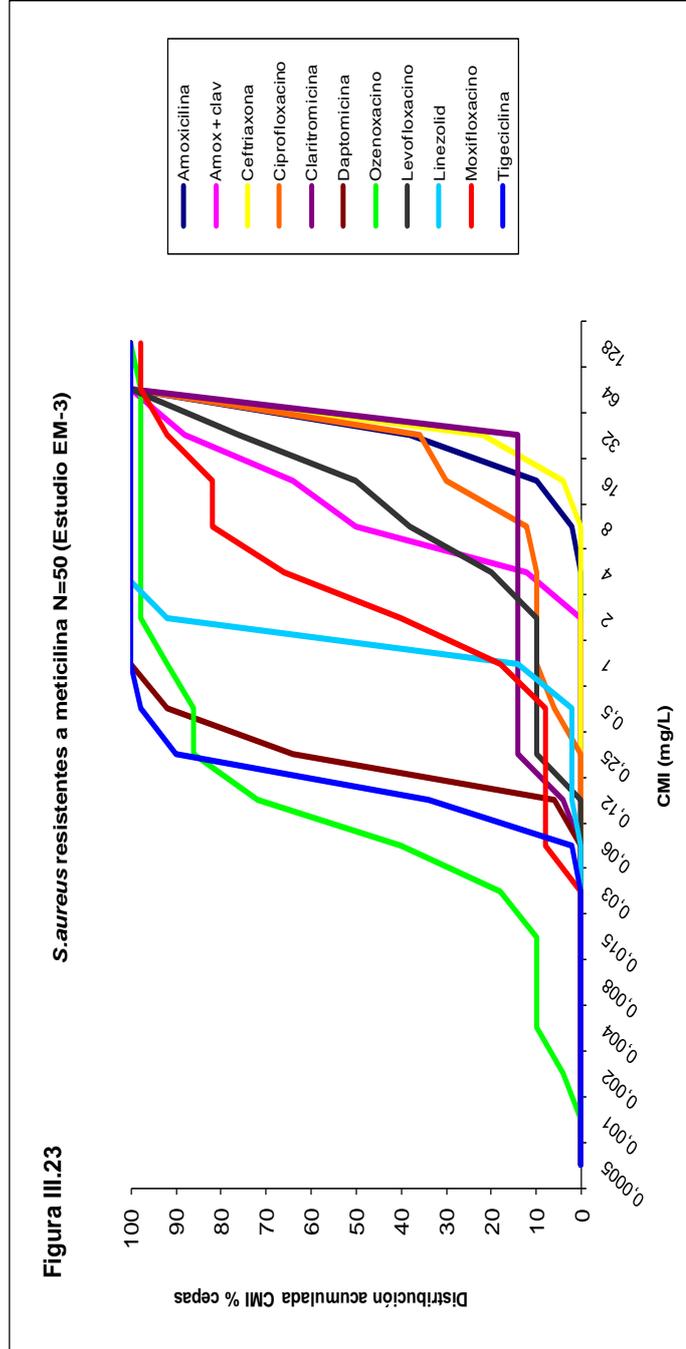
Figura III.22 **S. aureus** sensible a la meticilina N=50 (Estudio EM-3)

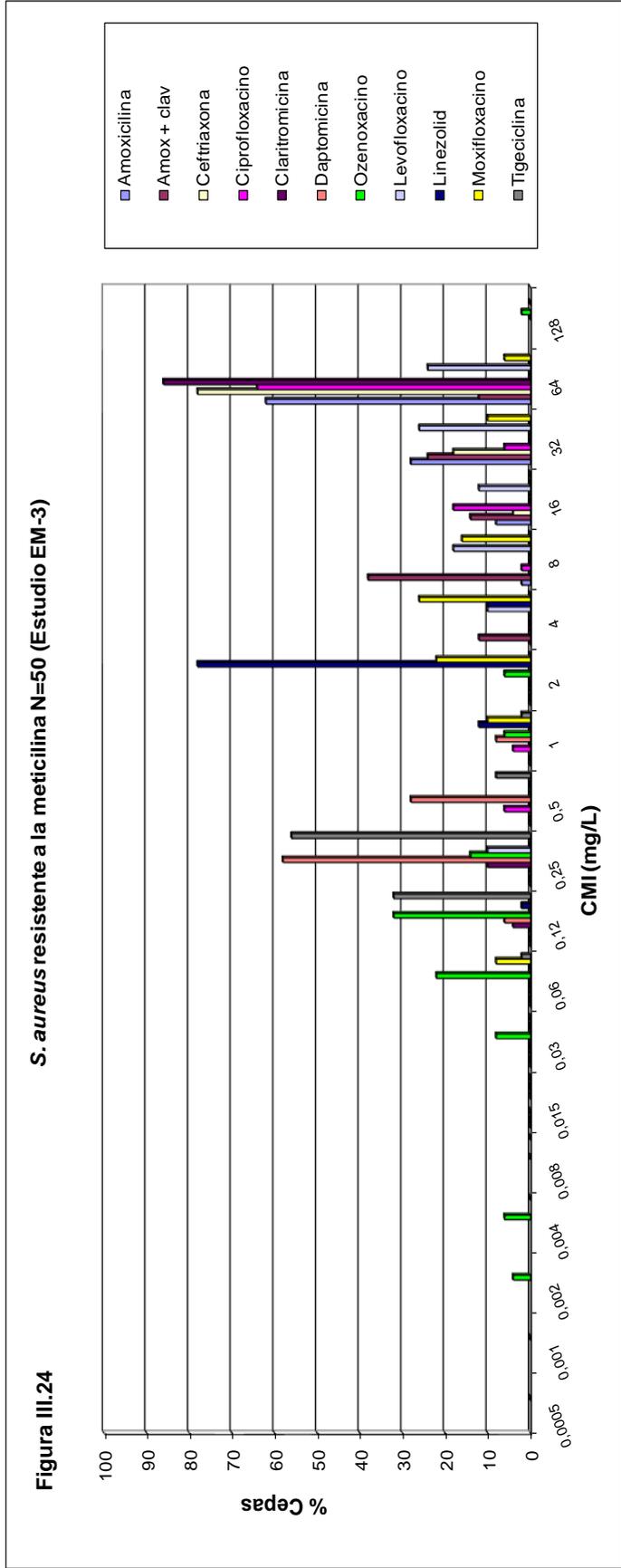


En la tabla III.15 se puede analizar la distribución de cepas con los diferentes valores de CMI para los antibióticos evaluados. Se destaca ozenoxacino por ser el producto con el mayor número de cepas con CMI bajas, incluso inferiores al mínimo valor testado.

En las figuras III.21 y III.22, con dos representaciones gráficas distintas, se puede observar que las diferencias en potencia y actividad de ozenoxacino. Un 8% de las cepas han sido resistentes a ciprofloxacino, mientras que los valores máximos para ozenoxacino han oscilado entre 0,125-0,5 mg/L para el 6% de las cepas, el 94% restante ha estado por debajo de 0,008 mg/L. Se observa, en las dos figuras, los compuestos que poseen las CMI más elevadas frente a algunas cepas, ya que aparecen en la parte derecha de las gráficas.

Antibióticos	Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina (MRSA).																		
	Porcentaje de cepas con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	8,0	28,0	62,0	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,0	38,0	14,0	24,0	12,0	
Ceftriaxona						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	18,0	78,0	
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	4,0	0,0	0,0	0,0	2,0	18,0	6,0	64,0	
Claritromicina						0,0	0,0	0,0	4,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	86,0	
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	6,0	58,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	4,0	6,0	0,0	0,0	22,0	32,0	14,0	0,0	6,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	10,0	18,0	12,0	26,0	24,0	
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,0	78,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	8,0	2,0	0,0	10,0	22,0	26,0	16,0	0,0	10,0	0,0	6,0	
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	2,0	32,0	56,0	8,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada									
										Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada									





El 40% de las cepas de MRSA han obtenido una CMI para ozenoxacino menor o igual que 0,06 mg/L, mientras que sólo el 2% de las cepas poseen esa CMI o inferior para tigeciclina. En este subgrupo, de los once antibióticos testados, siete de ellos han obtenido CMI₉₀ de 32-≥64 mg/L, entre ellos, las tres fluoroquinolonas.

En figuras III.20, III.23 y III.24, se puede observar que ozenoxacino ha sido el producto con menores CMI en MRSA. Se observa, tanto en la tabla III.16 como en la figura III.24 que ozenoxacino ha presentado un único valor superior a 2 mg/L frente a una cepa, que se analiza, en detalle, en la tabla III.18. Ozenoxacino se ha testado a un rango de concentraciones mayor que los otros antibióticos y, por tanto, este valor de 128 es un máximo valor artefactual, en comparación a los ≥64 mg/L de los siete otros antibióticos.

Tabla III.17. Estudio EM-3 / *Staphylococcus* spp. Resistentes a meticilina y sensibles a ciprofloxacino

Cepas	Antibióticos CMI (mg/L)										
	CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCLV	OZN	TIG	LNZ	DAP	CLA
<i>S. aureus</i> ID2	0,5	0,25	0,12	≥64	32	8	0,004	0,25	2	1	≥64
<i>S. aureus</i> ID14	1	0,25	0,06	≥64	≥64	8	0,004	0,25	2	0,5	0,25
<i>S. aureus</i> ID23	0,5	0,25	0,06	≥64	≥64	8	0,004	0,12	1	0,12	0,12
<i>S. aureus</i> ID24	0,5	0,25	0,06	≥64	≥64	8	0,002	0,12	2	0,25	0,25
<i>S. aureus</i> ID52	1	0,25	0,06	≥64	≥64	8	0,002	0,25	4	0,25	0,25

En la tabla III.17 se observa que, para el 10% de las cepas de MRSA sensibles a ciprofloxacino, ozenoxacino ha sido el producto más activo y se ha comportado como en el grupo anterior de MSSA sensibles a ciprofloxacino. En la tabla III.17, se observa que las cepas que las cepas han obtenido unas CMI muy bajas para ozenoxacino (0,002-0,004 mg/L), entre diez y diez mil veces inferiores a las del resto de antibióticos.

Tabla III.18. Resultados de actividad frente a la cepa X260

Organismo	Resistencia	OZN	CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCLV	TIG	LNZ	DAP	CLA
<i>S. aureus</i> X260	MRSA	≥128	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	0,12	1	0,5	≥64

En la tabla III.18 se presentan los resultados de la cepa multiresistente que ha presentado un valor de CMI para ozenoxacino ≥ 128 mg/L, y se observa que, además, ha sido resistente a fluoroquinolonas y a otros antibióticos. Esta cepa posee valores de CMI mayores que las concentraciones más altas testadas para todos los antibióticos, excepto para linezolid, tigeciclina o daptomicina (tabla III.18).

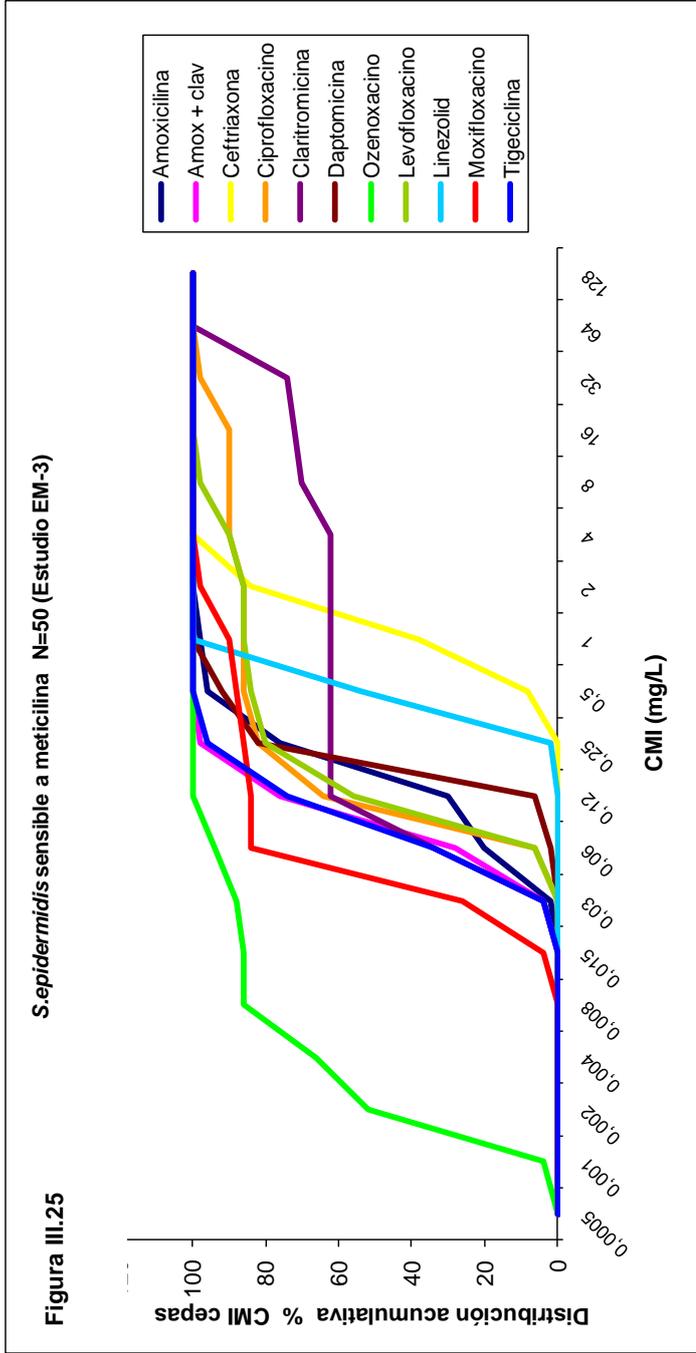
Página en blanco

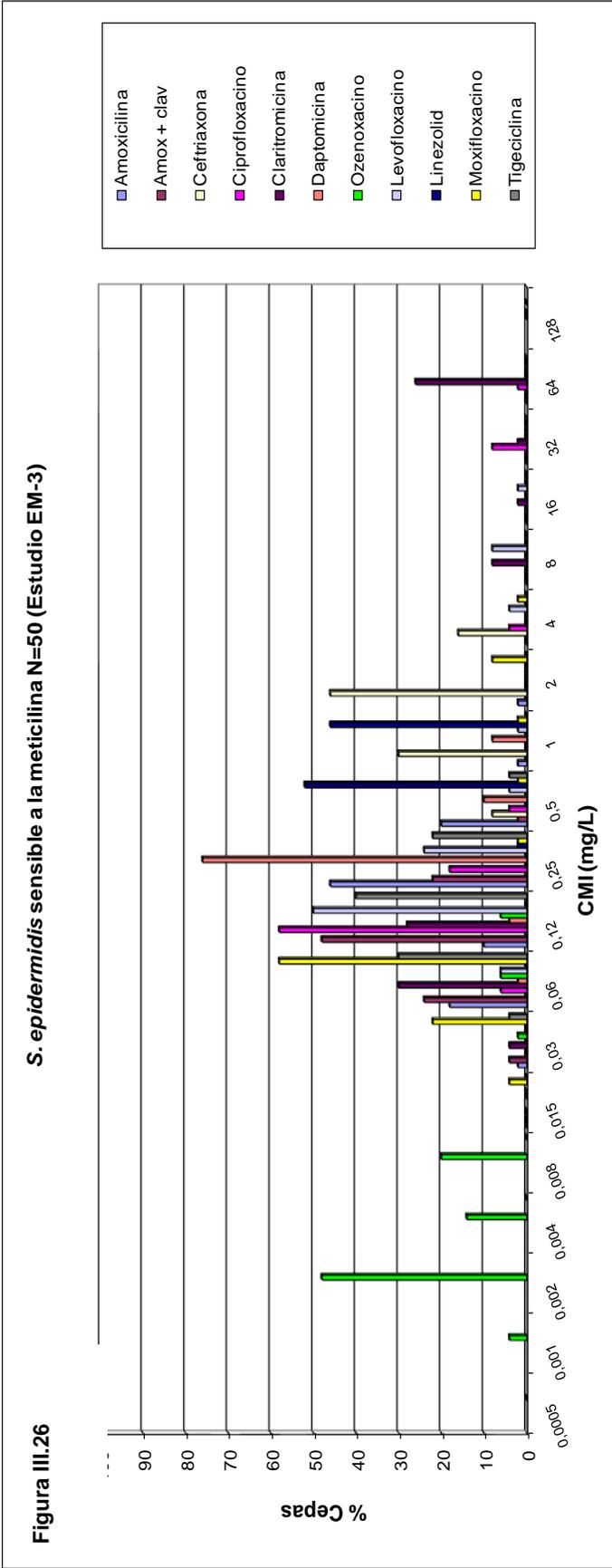
Antibióticos	Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 <i>Staphylococcus epidermidis</i> sensibles a metilina (MSSE).																			
	Porcentaje de cepas con CMI (mg/L)																			
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Amoxicilina						0,0	2,0	18,0	10,0	46,0	20,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						0,0	4,0	24,0	48,0	22,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	30,0	46,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	6,0	58,0	18,0	4,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	8,0	2,0	0,0	0,0
Claritromicina							4,0	30,0	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	2,0	2,0	26,0	0,0	0,0
Daptomicina						0,0	0,0	2,0	4,0	76,0	10,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	4,0	48,0	14,0	20,0	0,0	2,0	6,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	6,0	50,0	24,0	4,0	2,0	0,0	4,0	8,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	52,0	46,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						4,0	22,0	58,0	0,0	2,0	2,0	2,0	8,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	4,0	30,0	40,0	22,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

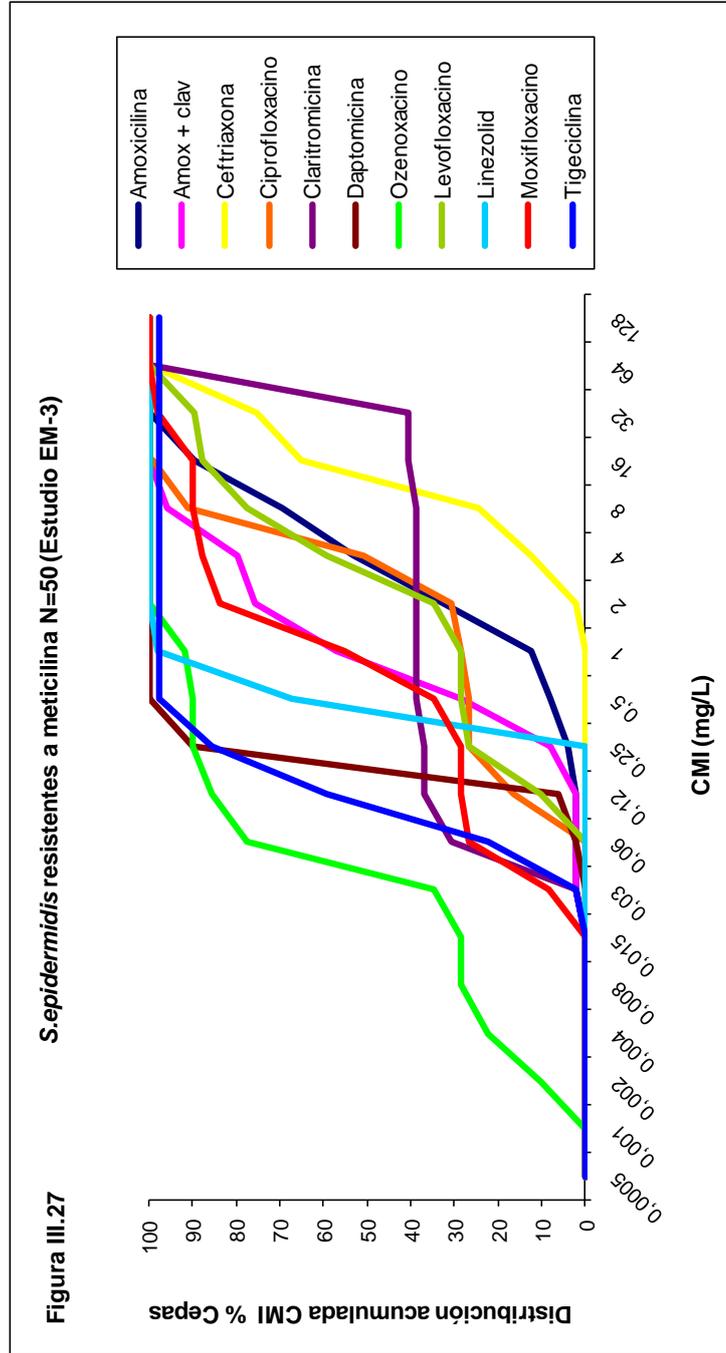
Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada

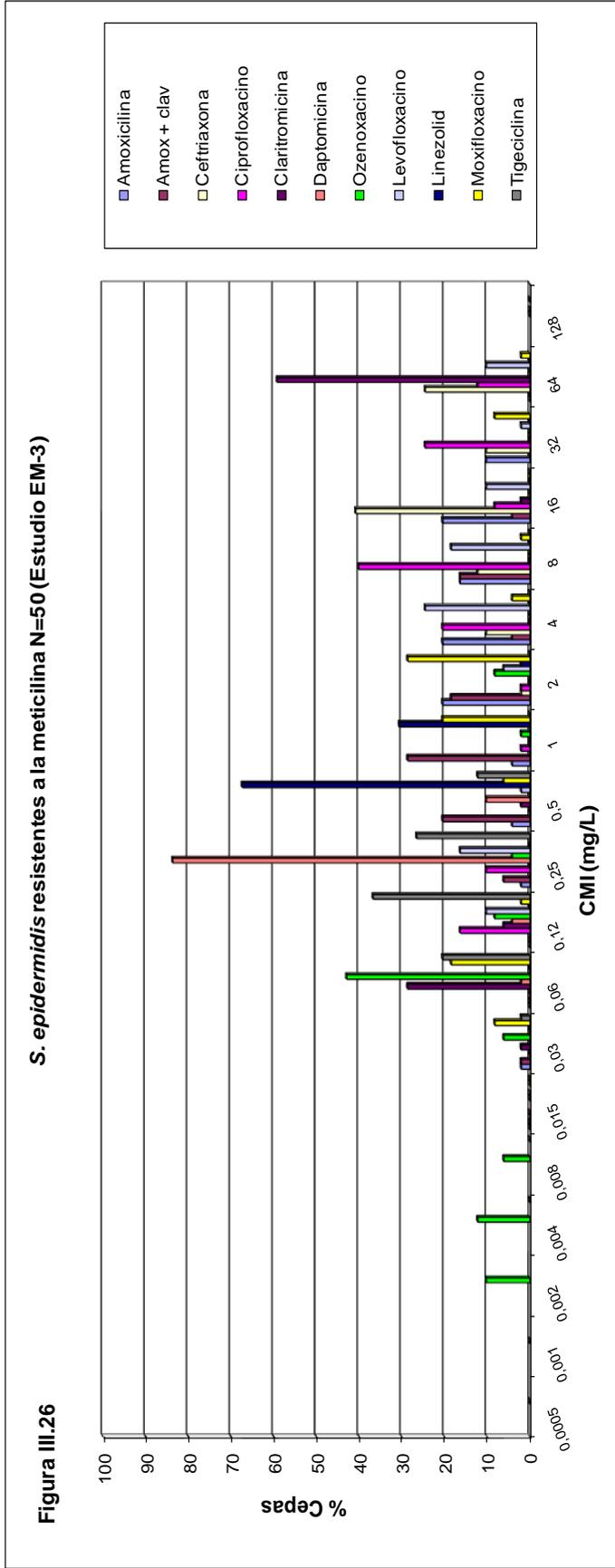




En la tabla III.19 y las figuras III.25 y III.26, se observa como ozenoxacino es el producto con menores CMI; se observan las barras para ozenoxacino a la izquierda de la figura, claramente separadas de las del segundo compuesto más activo, que es moxifloxacino. Un 86% de las cepas han obtenido una CMI para ozenoxacino, muy por debajo de las del resto de antibióticos. Los compuestos con menor actividad han sido claritromicina seguido de ciprofloxacino, levofloxacino y ceftriaxona, con cepas resistentes.

Antibióticos	Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 49 <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes a meticilina (MRSE)																				
	Porcentaje de cepas con CMI (mg/L)																				
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128		
Amoxicilina						0,0	2,0	0,0	0,0	2,0	4,1	4,1	20,4	20,4	16,3	20,4	10,2	0,0			
Amox + clav						0,0	2,0	0,0	0,0	6,1	20,4	28,6	18,4	4,1	16,3	4,1	0,0	0,0			
Ceftriaxona						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	10,2	12,2	40,8	10,2	24,5			
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	16,3	10,2	0,0	2,0	2,0	20,4	4,1	8,2	24,5	12,2			
Claritromicina							2,0	28,6	6,1	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	59,2			
Daptomicina						0,0	2,0	4,1	83,7	10,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Ozenoxacino	0,0	0,0	10,2	12,2	6,1	0,0	6,1	42,9	8,2	4,1	0,0	2,0	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	10,2	16,3	2,0	0,0	6,1	24,5	18,4	10,2	2,0	10,2			
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	67,4	30,6	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Moxifloxacino						0,0	8,2	18,4	2,0	0,0	6,1	20,4	28,6	4,1	2,0	0,0	8,2	2,0			
Tigeciclina				0,0	0,0	2,0	2,0	20,4	36,7	26,5	12,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
Concentraciones no testadas													Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada							Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada	





En la tabla III.20 se observa que el 29% de las cepas de MRSE han sido sensibles a ciprofloxacino, y han presentado unas CMI muy bajas para ozenoxacino (entre 0,002-0,008 mg/L) respecto a las del resto de compuestos, como ocurre con todos los subgrupos sensibles a fluoroquinolonas, independientemente de si son sensibles o resistentes a metilicina. Claritromicina ha sido el producto menos activo.

La mayoría de las cepas de MRSE testadas (71%) han sido, también, resistentes a ciprofloxacino, y en ellas las CMI de ozenoxacino han sido comparables a las de tigeciclina, daptomicina y linezolid, únicos compuestos activos, ya que el resto han presentado una CMI₉₀ entre 8 y ≥64 mg/L.

En la tabla III.21 se presentan todos los resultados frente a las 243 cepas de estreptococos testadas en este estudio. Las diferentes especies se han agrupado en *Streptococcus* del grupo A (*S. pyogenes*), *Streptococcus* del grupo B (*S. agalactiae*), *Streptococcus* del grupo C, *Streptococcus* del grupo G, que se considerarían todos ellos beta-hemolíticos, y además, las especies de *S. constellatus*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis*, y *S. pneumoniae*.

Organismos (n)	Estudio EM-3 / Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus</i> spp. de ozenoxacino y comparativos										
	CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCLV	OZN	TIG	LNZ	DAP	CLA
<i>S. pyogenes</i> grupo A (50)	CMI ₉₀	2	0,25	0,03	0,03	0,03	0,03	0,06	1	0,06	0,55
	Rango	0,25-2	0,12-0,5	≤0,015-0,12	≤0,015-0,12	0,03-0,25	0,008-0,06	0,015-0,12	0,5-2	≤0,03-0,12	≤0,03-64
Strept grupo B <i>S. agalactiae</i> (20)	CMI ₉₀	1	0,25	0,12	0,12	0,12	0,016	0,06	1	1	0,052
	Rango	0,5-1	0,12-0,5	0,03-0,12	0,03-0,25	0,008-0,03	0,03-0,06	1-2	0,12-1	≤0,03-4	
Strept grupo C (20)	CMI ₉₀	1	0,25	0,03	0,03	0,03	0,03	0,25	2	0,25	2,6
	Rango	0,5-1	0,12-0,25	≤0,015-0,25	0,03-0,12	≤0,015-0,03	0,008-0,25	0,03-0,25	0,5-2	≤0,03-0,5	≤0,03-32
Strept grupo G (20)	CMI ₉₀	1	0,25	0,06	0,06	0,03	0,03	0,25	2	0,25	2
	Rango	0,25-8	0,06-2	≤0,015-0,12	0,03-0,12	≤0,015-0,03	0,008-0,25	0,03-0,25	1-2	≤0,03-0,5	≤0,03-≥64
<i>Streptococcus</i> <i>constellatus</i> (9)	CMI ₉₀	1	0,25	0,25	0,5	0,5	0,03	0,06	2	0,5	≥64
	Rango	0,5-1	0,03-0,25	0,12-0,25	0,06-0,5	0,06-0,25	0,015-0,03	0,015-0,06	0,06-2	0,12-0,5	≤0,03-≥64
<i>Streptococcus</i> <i>bovis</i> (10)	CMI ₉₀	2	0,25	0,12	0,25	0,12	0,06	0,06	1	0,12	≥64
	Rango	0,5-≥64	0,06-8	≤0,015-0,12	0,03-0,25	≤0,015-0,12	0,008-0,5	0,015-0,06	0,5-1	≤0,03-0,12	≤0,03-≥64
<i>Streptococcus</i> <i>mitis</i> (10)	CMI ₉₀	8	0,25	8	0,5	8	0,06	0,12	1	1	≥64
	Rango	0,5-≥64	0,12-4	0,03-32	0,03-1	0,03-16	0,015-0,5	0,015-0,25	0,5-1	0,12-1	≤0,03-≥64
<i>Streptococcus</i> <i>sanguis</i> (10)	CMI ₉₀	4	0,25	0,5	0,25	0,5	0,03	0,06	1	0,5	0,5
	Rango	0,5-8	0,12-4	≤0,015-0,5	0,03-0,25	≤0,015-0,5	0,015-0,06	0,015-0,06	0,5-1	0,12-1	≤0,03-2
<i>Streptococcus</i> <i>oralis</i> (10)	CMI ₉₀	4	0,25	0,25	0,5	0,5	0,06	0,06	1	2	0,25
	Rango	0,5-4	0,06-1	0,03-1	0,03-0,5	0,03-1	0,015-0,06	0,015-0,12	0,5-1	0,25-2	≤0,03-1
<i>S. pneumoniae</i> (64)	CMI ₉₀	2	0,25	8	2	8	0,03	0,03	1	0,5	64
	Rango	0,5-2	0,06-0,25	≤0,015-16	≤0,015-4	≤0,015-8	0,015-0,06	0,015-0,06	0,25-2	≤0,03-0,25	≤0,03-≥64
Sensible a penicilina (20)	CMI ₉₀	2	0,25	0,03	0,06	0,03	0,03	0,03	1	0,5	64
	Rango	0,5-2	0,06-0,25	≤0,015-0,06	≤0,015-0,12	≤0,015-0,03	0,015-0,06	0,015-0,3	0,5-1	≤0,03-0,5	≤0,03-≥64
Intermedia a penicilina (24)	CMI ₉₀	2	0,21	2	1	2	0,03	0,03	1	0,5	64
	Rango	0,5-2	0,06-0,25	0,03-4	0,06-4	0,03-4	0,015-0,03	0,015-0,06	0,25-1	≤0,03-0,5	≤0,03-≥64
Resistente a penicilina (20)	CMI ₉₀	1,1	0,25	8,8	2	8	0,03	0,03	1	0,125	32
	Rango	0,5-2	0,12-0,25	0,03-16	0,03-4	0,03-8	0,015-0,03	0,015-0,03	0,5-2	≤0,03-0,25	≤0,03-≥64

En resumen, se observa que frente a todas las cepas de las distintas especies de *Streptococcus*, ozenoxacino ha presentado una muy buena actividad, habiendo sido el producto más potente, en algunos casos, junto a tigeciclina. Las CMI₉₀ para ozenoxacino han oscilado entre 0,03 y 0,06 mg/L aunque el rango inferior ha llegado hasta valores de 0,008-0,015 mg/L y no ha superado 0,25 mg/L, también en todos los subgrupos. La única quinolona que tiene un punto de corte definido para estreptococos es moxifloxacino y sólo se han detectado algunas cepas con CMI superiores a 2 mg/L en *S. bovis*, *S. mitis* y *S. sanguis*, quienes también han presentado CMI altas para ciprofloxacino y levofloxacino. En algunos subgrupos o especies de estreptococos se ha observado que, para claritromicina, existe una subpoblación de cepas frente a las que posee muy buena actividad (por debajo del límite testado) y, otra residual, resistente, por encima de la máxima concentración evaluada (64 mg/L).

En la tabla III.21, se observa que, todos los productos han presentado, en general, actividad frente a las cepas estudiadas de *S. pyogenes* (Streptococci del grupo A). Ozenoxacino ha sido el producto con mayor actividad (CMI₉₀ 0,03 mg/L y rango 0,008-0,06 mg/L), aunque similar al grupo de productos formados por amoxicilina, sola o con ác.clavulánico, ceftriaxona, tigeciclina y daptomicina. Moxifloxacino, claritromicina, linezolid, ciprofloxacino y levofloxacino han obtenido algo menos de actividad, ya que se han detectado algunas cepas con sensibilidad disminuida a claritromicina, ciprofloxacino y levofloxacino.

En la tabla resumen III.21, se observa que frente al subgrupo formado por los Streptococci del grupo B, con 20 cepas de *S. agalactiae*, el producto más activo ha sido, también, ozenoxacino (CMI₉₀ 0,016 mg/L y rango 0,008-0,03 mg/L), seguido de tigeciclina, amoxicilina (sola o con ác.clavulánico), ceftriaxona y moxifloxacino, (CMI₉₀ entre 0,06 y 0,25 mg/L y rangos de hasta 0,5 mg/L, en conjunto), a continuación, daptomicina, levofloxacino, ciprofloxacino y linezolid (CMI₉₀ de 1 mg/L y rangos de hasta 2 mg/L).

En la tabla resumen III.21 se observa que, en general, todos los productos han presentado actividad frente a las cepas estudiadas de Streptococci del grupo C, excepto claritromicina para algunas cepas. Ozenoxacino, amoxicilina (sola o con ác. clavulánico) y ceftriaxona han sido los productos con mayor actividad. Ozenoxacino (CMI₉₀ 0,03 mg/L y rango 0,008-0,25 mg/L), a continuación tigeciclina, daptomicina y moxifloxacino (CMI₉₀ 0,25 mg/L), y ciprofloxacino, levofloxacino, linezolid y claritromicina (CMI₉₀ entre 1-2,6 mg/L).

Ozenoxacino, amoxicilina (con y sin ác.clavulánico) y ceftriaxona han sido los compuestos más activos frente a las cepas de *Streptococcus* del grupo G. Las CMI₉₀ para estos compuestos han estado entre 0,03 y 0,06 mg/L y los rangos entre 0,008 y 0,25 mg/L. Claritromicina ha presentado, en el 70% de las cepas, unas CMI por debajo de 0,03 mg/L y luego, en un 20% CMI entre 0,5-2 mg/L y otro 5% >64 mg/L.

Ozenoxacino y tigeciclina son los productos más activos frente a todas las cepas de *S. pneumoniae*, y tal y como se observa en la tabla III.21, no se han observado diferencias entre las cepas que poseen distintos grados de sensibilidad a la penicilina. Se observa que a estos dos productos, ozenoxacino y tigeciclina (CMI₉₀ 0,03 mg/L y rango 0,015-0,03 mg/L), le han seguido moxifloxacino y daptomicina (CMI₉₀ 0,25 y 0,5 mg/L), y, linezolid, ceftriaxona y ciprofloxacino (CMI₉₀ 1, 1 y 2 mg/L). Amoxicilina (con y sin ác.clavulánico) ha presentado una CMI₉₀ de 8 mg/L y un rango ≤0,015-16 mg/L para los 64 cepas en total, pero al analizar, separadamente, el subgrupo sensible a penicilina han mostrado actividad (CMI₉₀ 0,03 mg/L) y un rango menos amplio (≤0,015-0,03 mg/L). Ozenoxacino ha obtenido mayor actividad, respecto a ciprofloxacino (sesenta y cuatro veces), levofloxacino (treinta y dos veces) y moxifloxacino (ocho veces mayor).

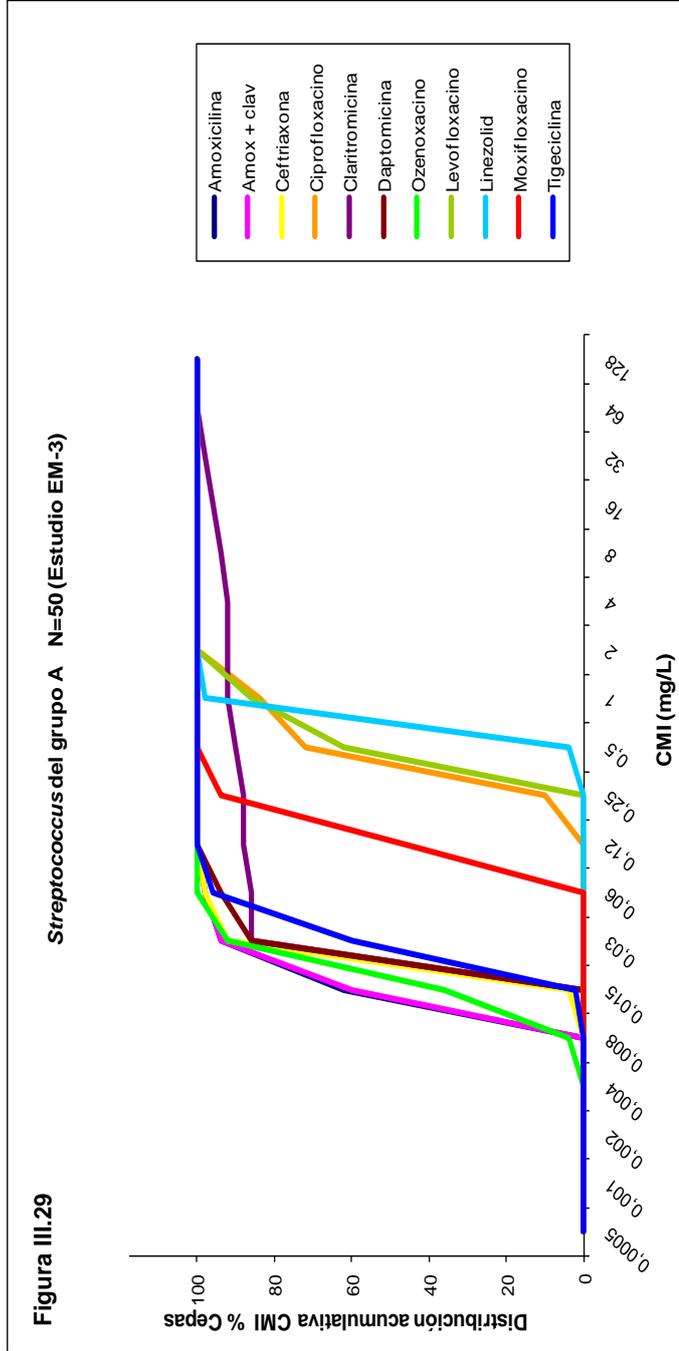
Tabla III.22. Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 Streptococci del grupo A

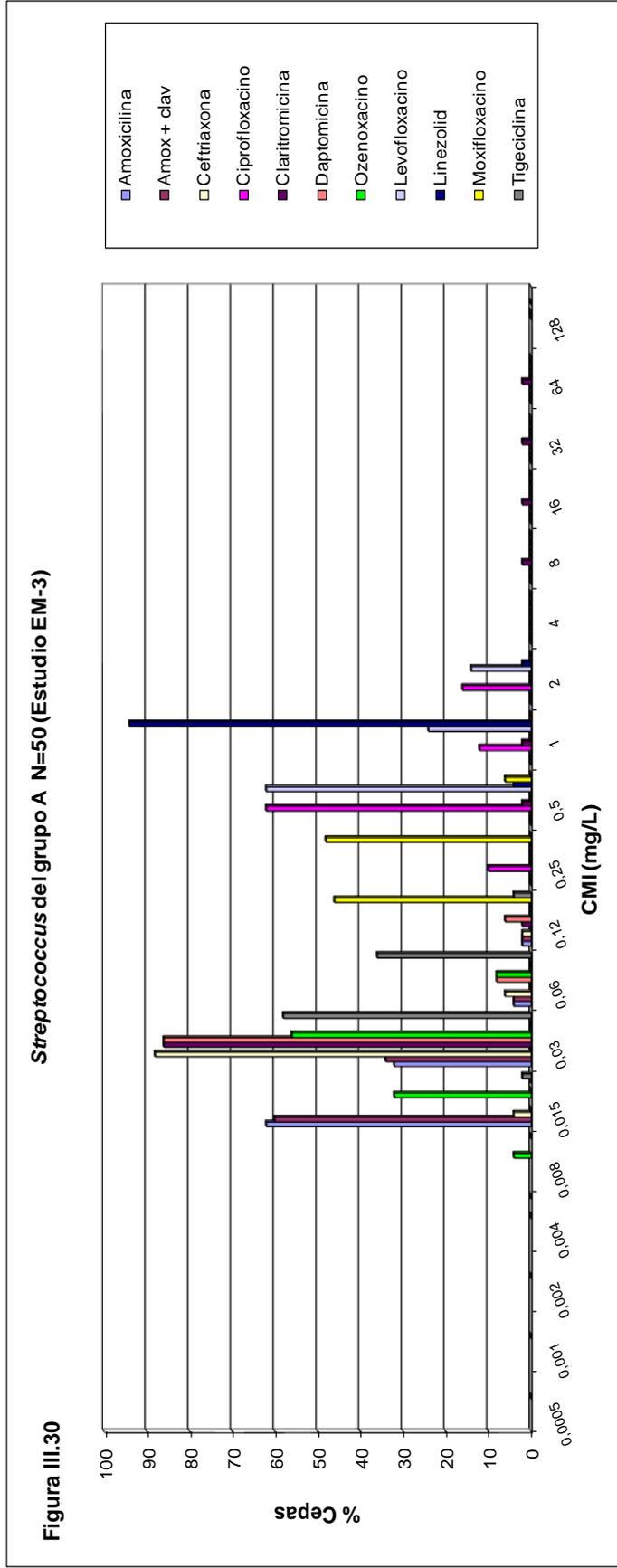
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																			
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Amoxicilina						62,0	32,0	4,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						60,0	34,0	4,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						4,0	88,0	6,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	62,0	12,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina							86,0	0,0	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
Daptomicina							86,0	8,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	32,0	56,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	62,0	24,0	14,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	94,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	46,0	48,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	2,0	58,0	36,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada



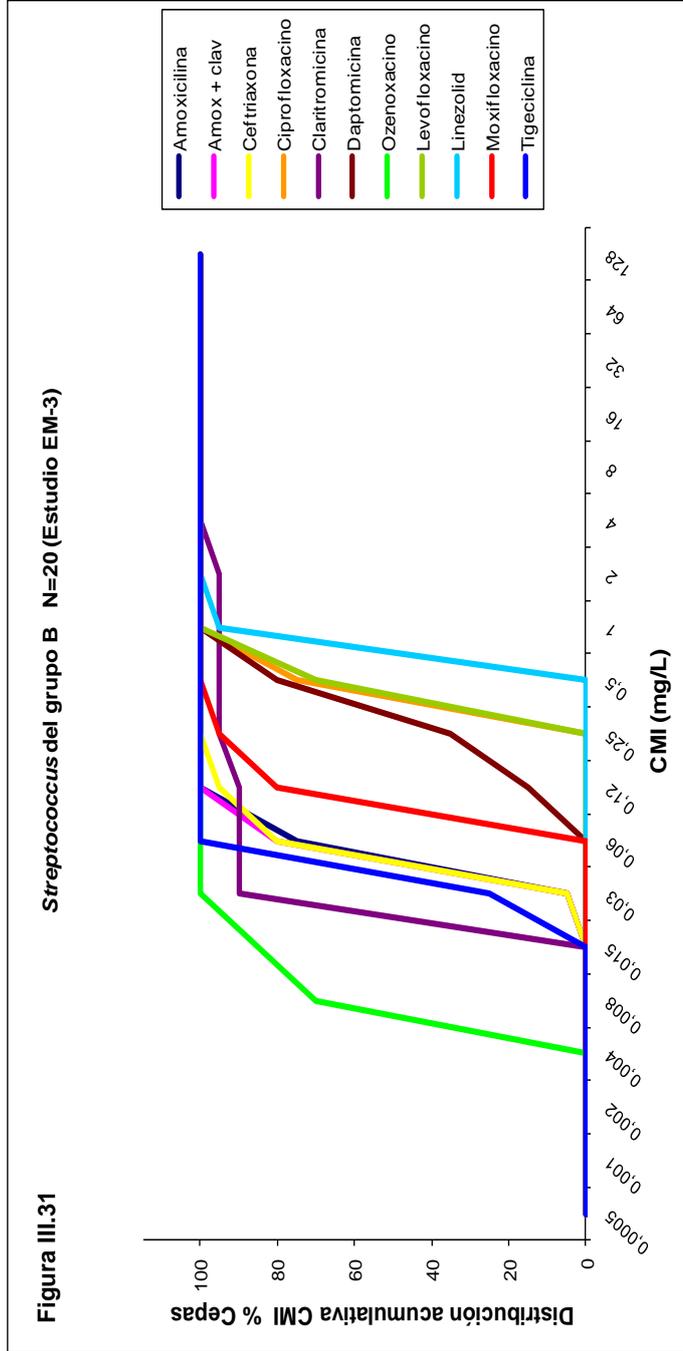


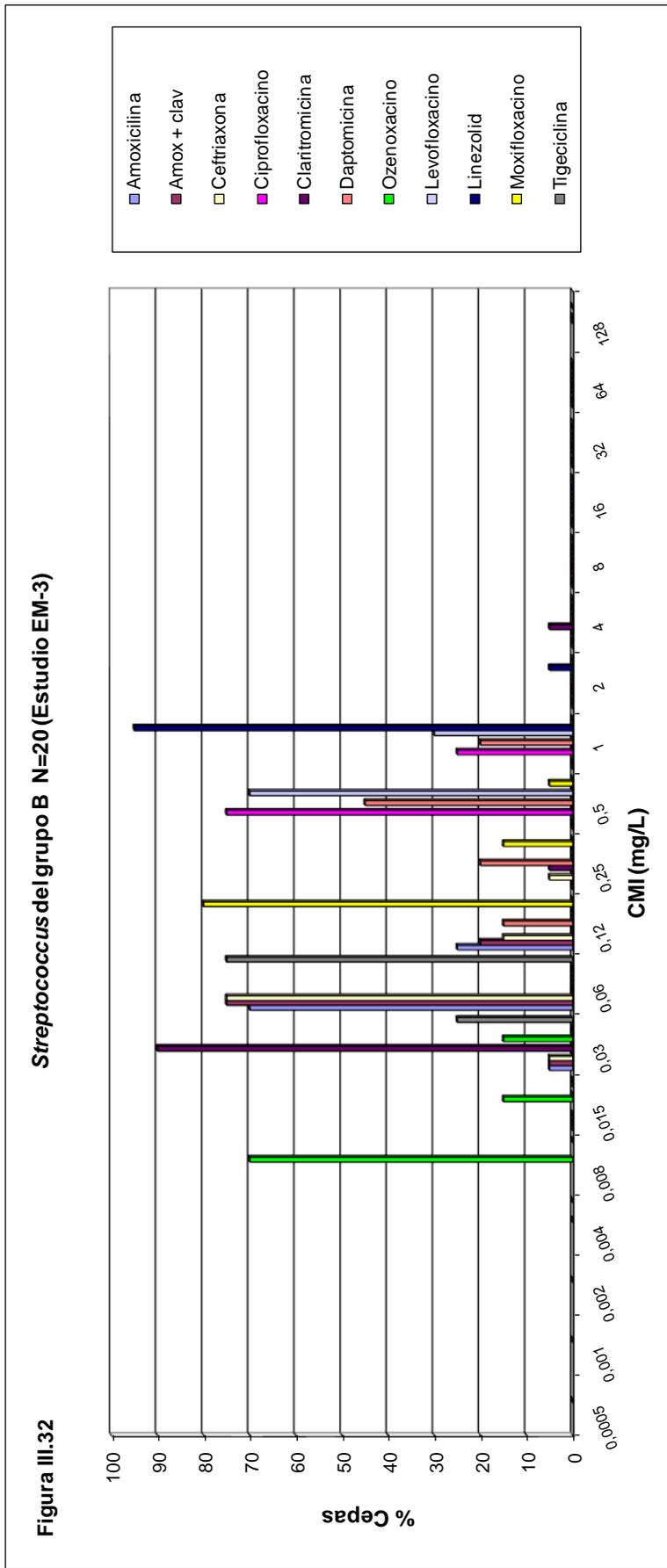
En la tabla III.22 y figuras III.29 y III.30 se observa la actividad de ozenoxacino que, en esta ocasión, comparte el mejor rango de actividades con amoxicilina, ceftriaxona, tigeciclina y daptomicina.

En la tabla III.22 se observa que no han habido cepas con CMI por encima de 2 mg/L para ninguna de las quinolonas, a diferencia de lo había ocurrido frente a los estafilococos, y que los valores más altos se han obtenido con claritromicina, a pesar de que un 86% de las cepas han presentado CMI, para este producto, por debajo de 0,03 mg/L (mínima concentración testada), igual que ha ocurrido con daptomicina. Un 60% de las cepas han mostrado una CMI para amoxicilina (sola o con ác. clavulánico) por debajo de 0,015 mg/L (mínima concentración testada), aunque esto no ha afectado a la determinación de la CMI₉₀ para estos productos.

Frente a *S. pyogenes* ozenoxacino ha sido sesenta y cuatro veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, ocho veces más activo que moxifloxacino, treinta y dos veces más que linezolid y dos más que tigeciclina. Datos individuales, no mostrados, demuestran que ozenoxacino ha sido destacadamente muy activo, también, frente a cepas con sensibilidad disminuida a otros antibióticos.

Tabla III.23 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 Streptococci del grupo B.																				
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																			
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Amoxicilina						0,0	5,0	70,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						0,0	5,0	75,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	5,0	75,0	15,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina																				
Daptomicina																				
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	15,0	0,0	0,0	15,0	20,0	45,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	95,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	80,0	15,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina						0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada					Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada					





En la tabla III.23 y figura III.31 se puede observar que ozenoxacino ha sido el producto con mayor actividad, en la tabla III.32 con el número de cepas por CMI detalladas, se observa que otros compuestos como claritromicina y tigeciclina son muy activos, también, frente a algunas cepas.

El comportamiento de claritromicina (tabla III.23 y figura III.32) se ha desmarcado de la del resto de compuestos, porque ha sido marcadamente activo con una CMI₉₀ de 0,05 mg/L, con un 90% de las cepas con una CMI por debajo de su límite mínimo testado, pero con un rango que ha llegado hasta un máximo de 4 mg/L.

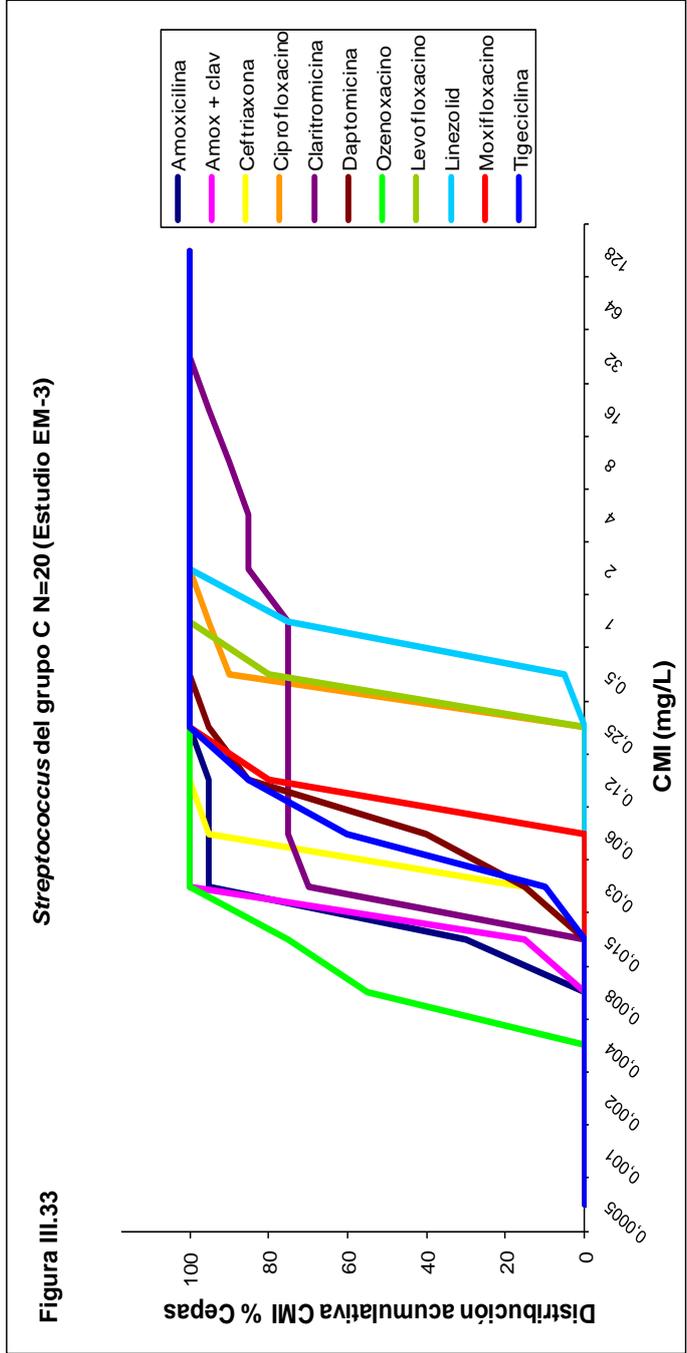
Dentro de la clase de las quinolonas, ozenoxacino ha sido treinta y dos veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y, ocho más que moxifloxacino.

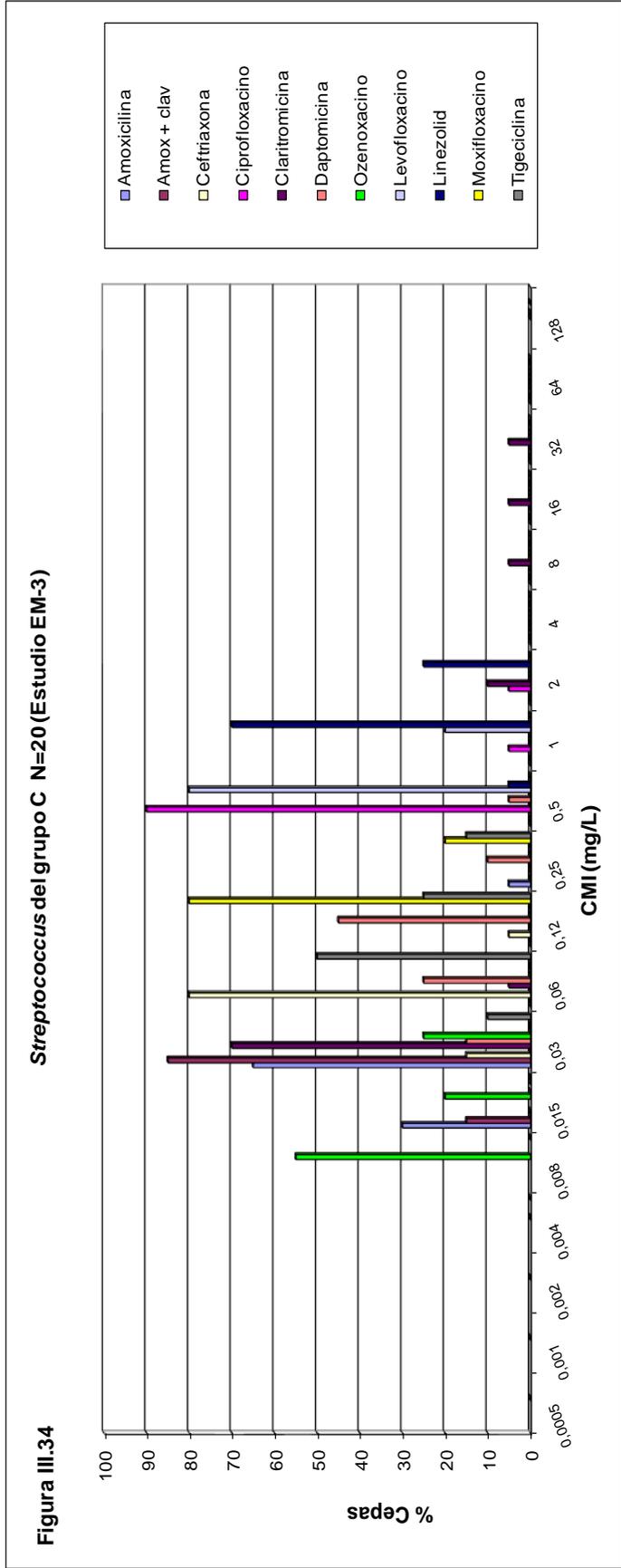
Tabla III.24 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 Streptococci del grupo C.																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						30,0	65,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						15,0	85,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	15,0	80,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	90,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina								70,0	5,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0
Daptomicina								15,0	25,0	45,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	55,0	20,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	70,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	10,0	50,0	25,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada



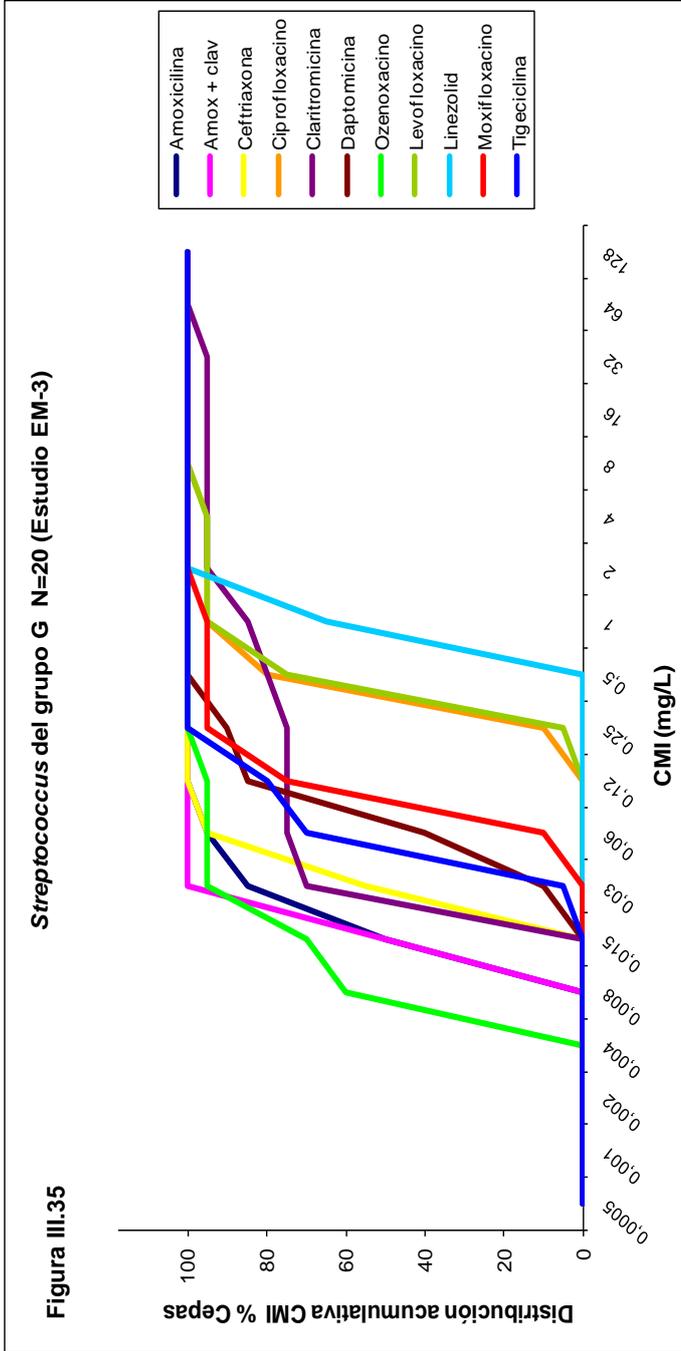


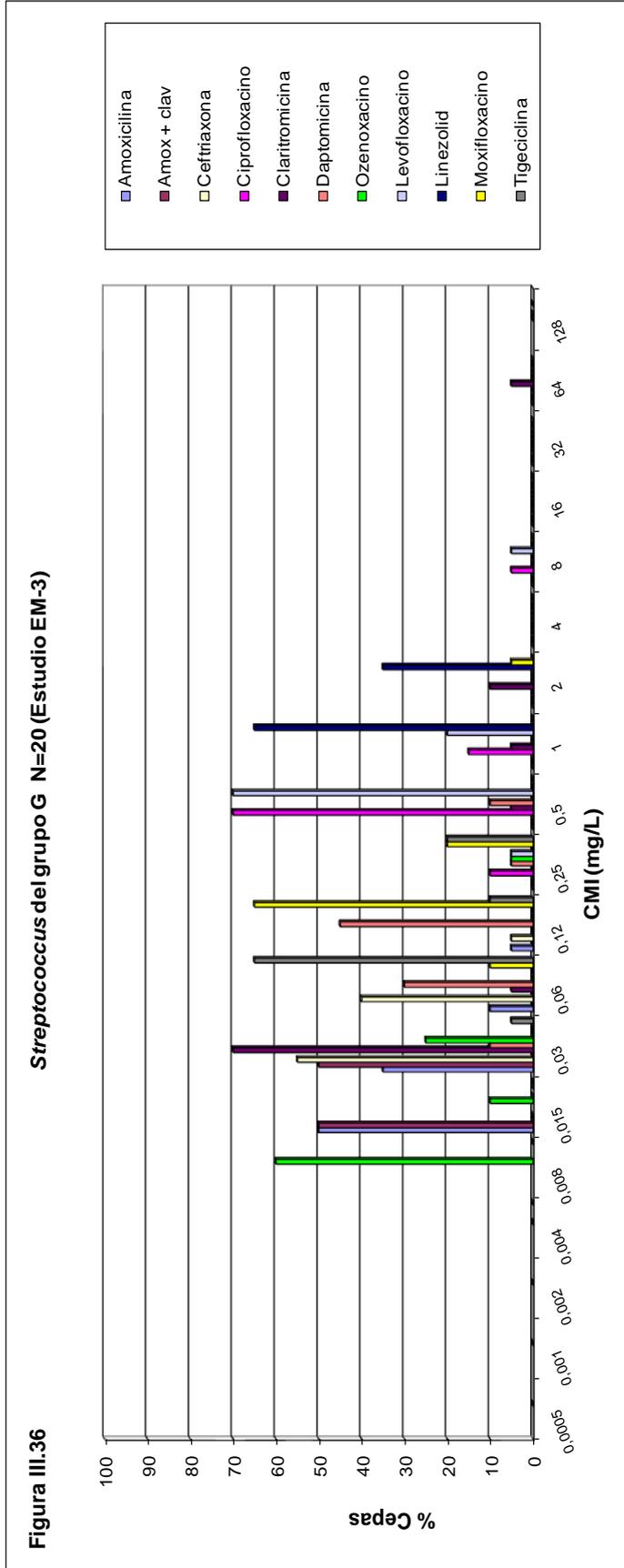
En la tabla III.24 y figura III.333 y III.34 se observa la potente actividad de ozenoxacino, que se destaca ligeramente con las menores CMI frente a algunas cepas, y con todos los valores por debajo de 0,06 mg/L.

Dentro de la familia de las quinolonas, ozenoxacino ha sido treinta y dos veces más activo que levofloxacino, dieciséis que ciprofloxacino y ocho que moxifloxacino.

Con claritromicina se ha observado, de nuevo, dos subpoblaciones de cepas frente a las que presenta una actividad muy distinta: el 70% de las cepas han obtenido una CMI por debajo de 0,03 mg/L y un 15% entre 8 y 32 mg/L. Ozenoxacino ha sido activo, también, frente a las cepas no sensibles a claritromicina.

Tabla III.25. Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 Streptococci del grupo G																									
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																								
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128						
Amoxicilina						50,0	35,0	10,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Amox + clav						50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Ceftriaxona						0,0	55,0	40,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	70,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Claritromicina							70,0	5,0	0,0	5,0	10,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0					
Daptomicina							10,0	30,0	45,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	10,0	25,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	65,0	35,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Moxifloxacino						0,0	0,0	10,0	65,0	20,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	5,0	65,0	10,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
Concentraciones no testadas																Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada					Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada				

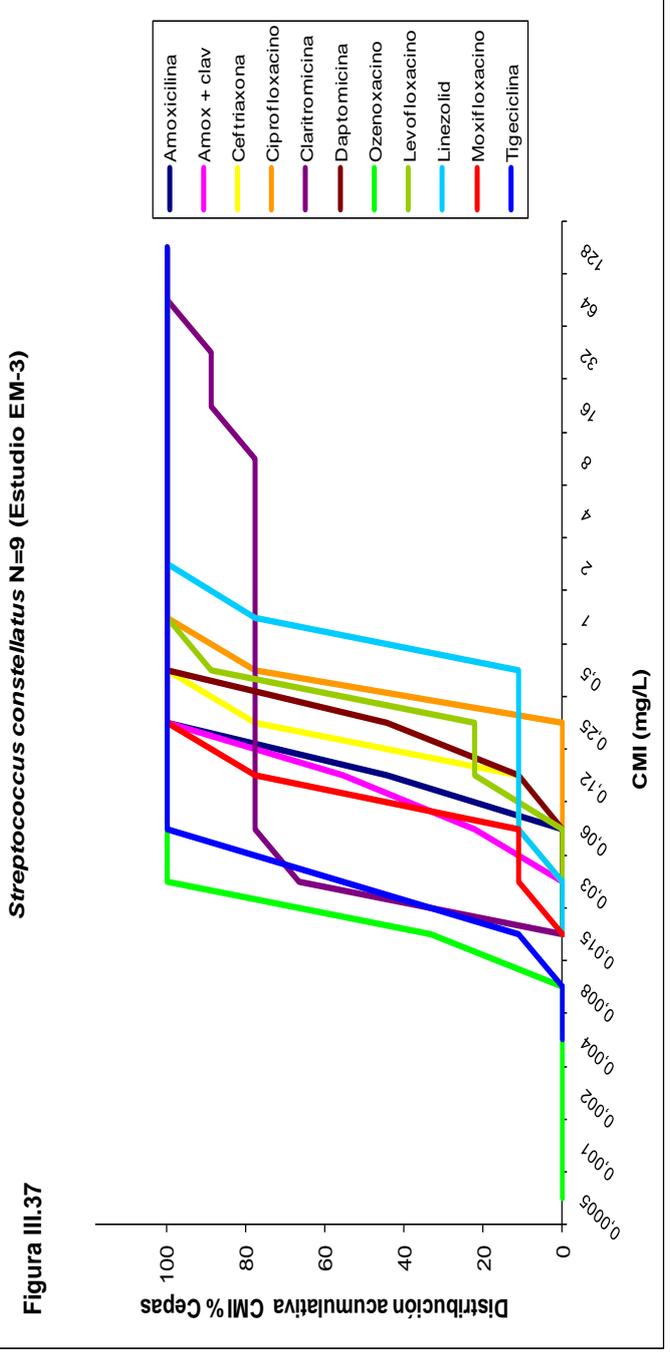


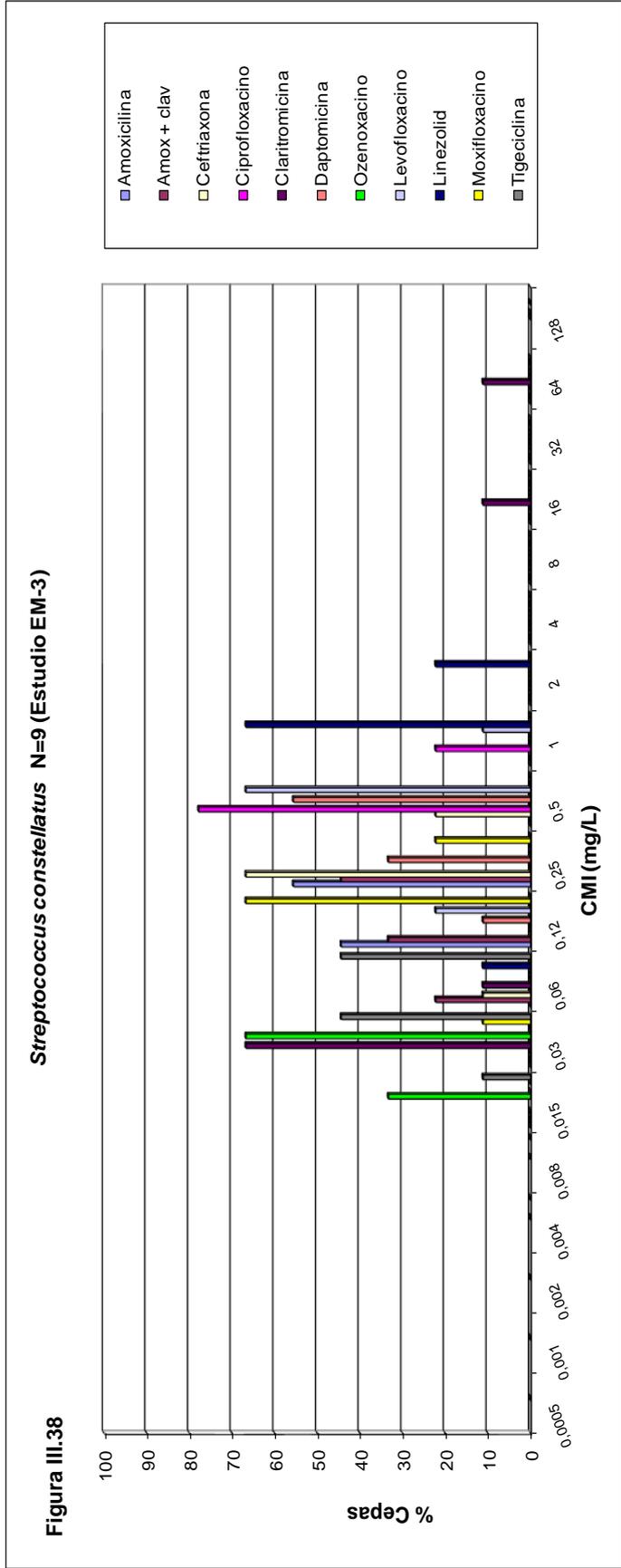


En la tabla III.25 y figuras III.35 y III.36 se observa que ozenoxacino es el producto más activo junto a amoxicilina (con y sin ácido clavulánico) y ceftriaxona, ya que poseen CMI por inferiores a la mínima concentración testada. En todos los casos las cepas han presentado valores máximos inferiores a 0,06 mg/L para ozenoxacino y a 0,25 mg para amoxicilina. Linezolid y ciprofloxacino son dos productos frente a los que algunas cepas dan valores de 1-2 mg/L, mientras que claritromicina ha presentado, en el 70% de las cepas, unas CMI por debajo de 0,03 mg/L y luego, en un 20% CMI entre 0,5-2 mg/L y otro 5% >64 mg/L.

Ozenoxacino ha sido treinta y dos veces más activo que ciprofloxacino, levofloxacino y ocho que moxifloxacino, aunque se han identificado algunas cepas con CMI elevadas a ciprofloxacino, levofloxacino y claritromicina.

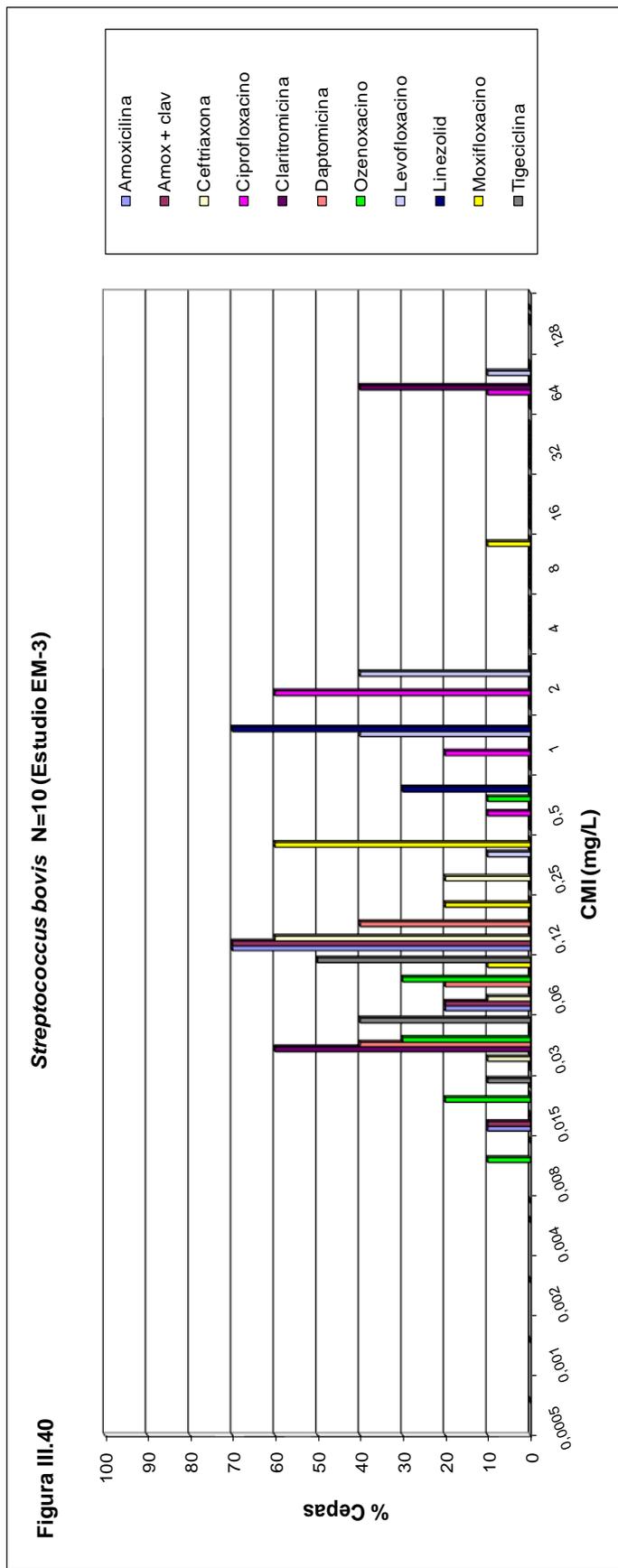
Tabla III.26. Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 9 <i>Streptococcus constellatus</i>																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	44,4	55,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						0,0	0,0	22,2	33,3	44,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	0,0	11,1	0,0	66,7	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	77,8	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina								66,7	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	11,1
Daptomicina						33,3	66,7	0,0	0,0	0,0	33,3	55,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,2	0,0	66,7	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0	66,7	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	11,1	0,0	66,7	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	11,1	44,4	44,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina						0,0	0,0	0,0	44,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentraciones no testadas																			
Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada																			
Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada																			





Ozenoxacino es el compuesto que ha presentado unas CMI más bajas para *Streptococcus constellatus*, seguido de tigeciclina (CMI₉₀ de 0,03 y 0,06 mg/L respectivamente). La actividad de claritromicina se ha separado en dos subgrupos de cepas, de nuevo, unas frente a las que ha sido muy activa, con CMI entre <0,03 mg/L y otras, en cambio, con CMI de entre 16 y ≥64 mg/L. La CMI₉₀ para claritromicina ha sido de ≥64 mg/L, a mucha distancia del resto de antibióticos que poseen unas CMI₉₀ entre 0,25 y 1 mg/L, excepto para linezolid que es de 2 mg/L.

Ozenoxacino ha sido treinta y dos veces más activo que ciprofloxacino o levofloxacino y ocho veces mejor que moxifloxacino.



Tal y como se observa en las tablas III.21 y III.27, y figuras III.39 y III.40, los productos más activos han sido ozenoxacino, tigeciclina, amoxicilina (sola o con ácido clavulánico) y daptomicina (con CMI₉₀ entre 0,06 y 0,12 mg/L). Ceftriaxona, las tres fluoroquinolonas y linezolid han sido los compuestos que les siguen en actividad (CMI₉₀ entre 0,25 y 2 mg/L), aunque se han encontrado cepas resistentes a ciprofloxacino, moxifloxacino y levofloxacino, al igual que cepas con CMI de 64 mg/L a claritromicina, que ha presentado, de nuevo, dos subgrupos de cepas con actividades extremas de $\leq 0,03$ y ≥ 64 .

Dentro de la familia de las quinolonas, ozenoxacino ha demostrado ser más activo que ciprofloxacino y levofloxacino (treinta y dos veces), y ligeramente superior a moxifloxacino (cuatro veces).

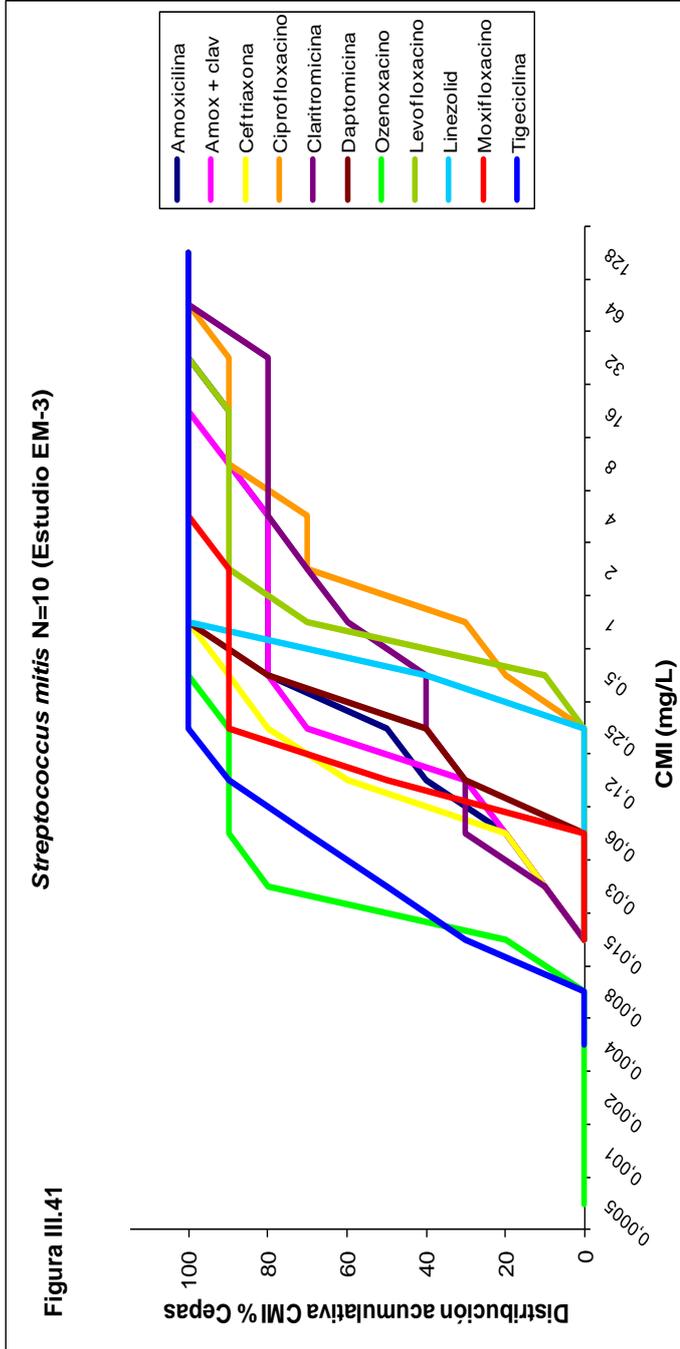
Tabla III.28. Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 10 *Streptococcus mitis*

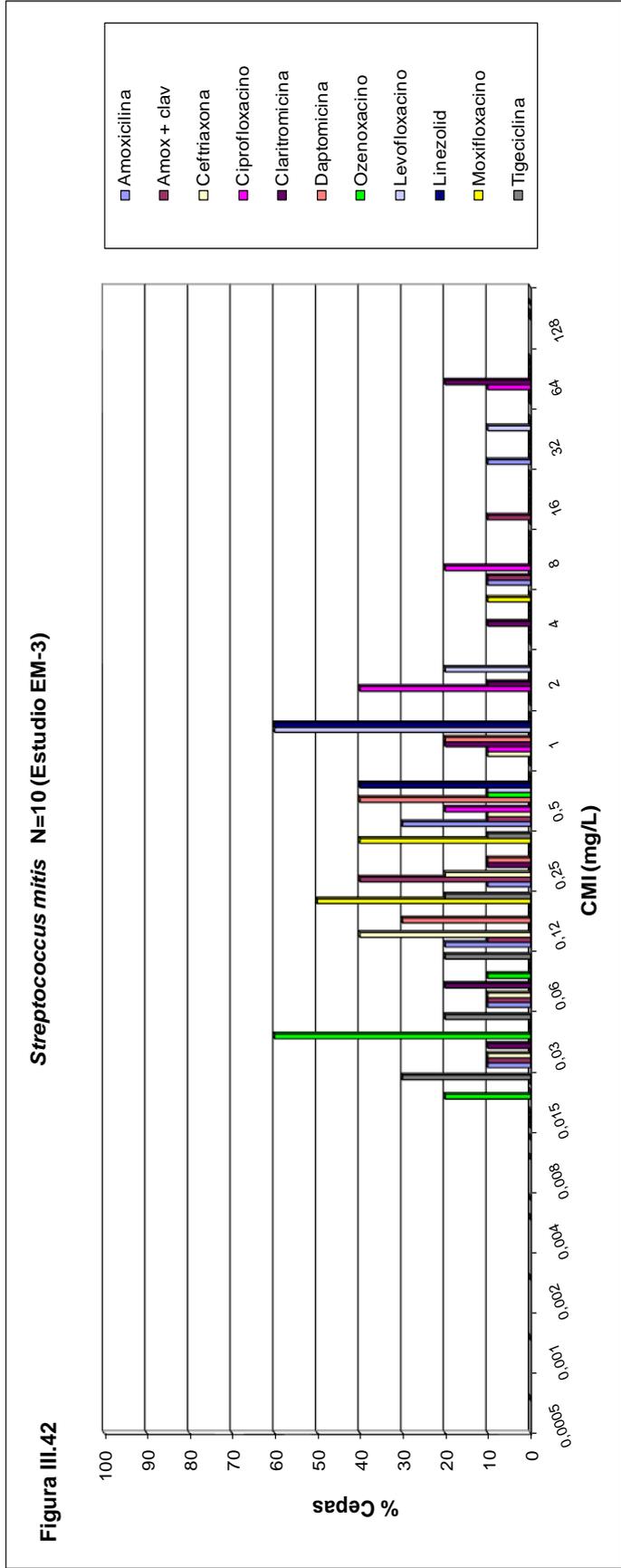
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	10,0	10,0	20,0	10,0	30,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Amox + clav						0,0	10,0	10,0	10,0	40,0	10,0	0,0	0,0	0,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	10,0	10,0	40,0	20,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	10,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	10,0
Clarithromicina							10,0	20,0	0,0	10,0	0,0	20,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0
Daptomicina							0,0	0,0	30,0	10,0	10,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	60,0	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	60,0	20,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	50,0	40,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	30,0	20,0	20,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

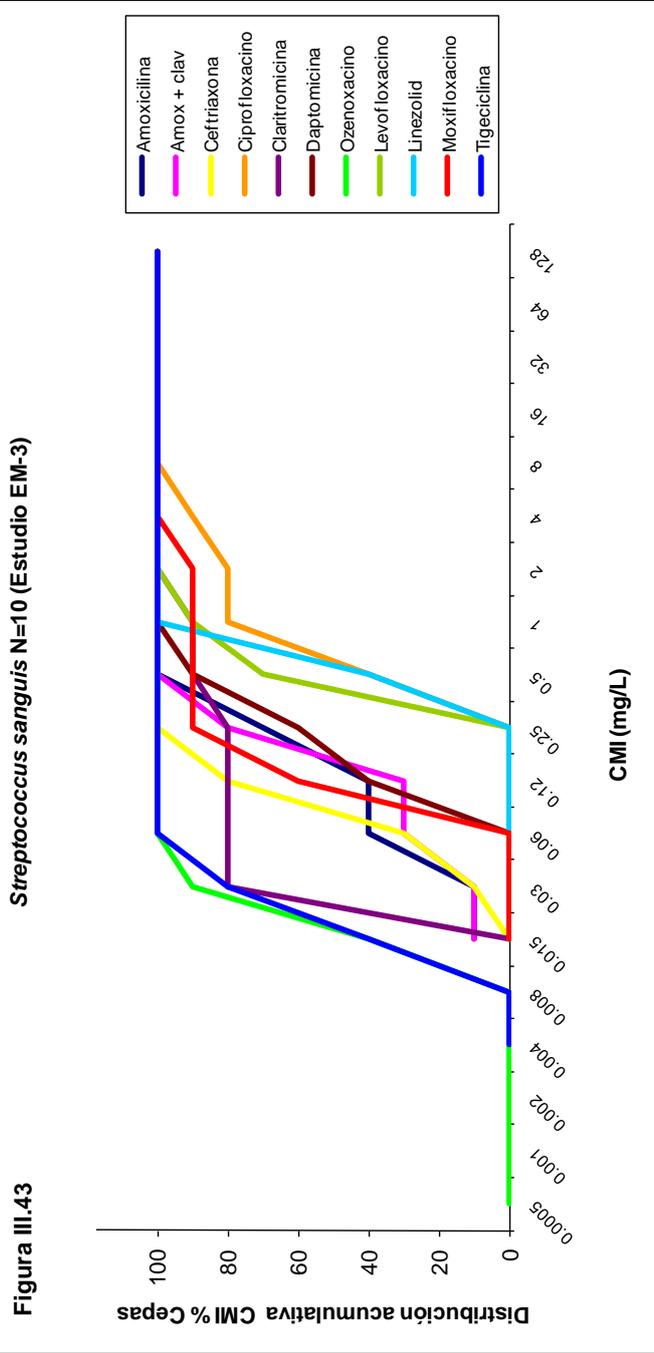
Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada

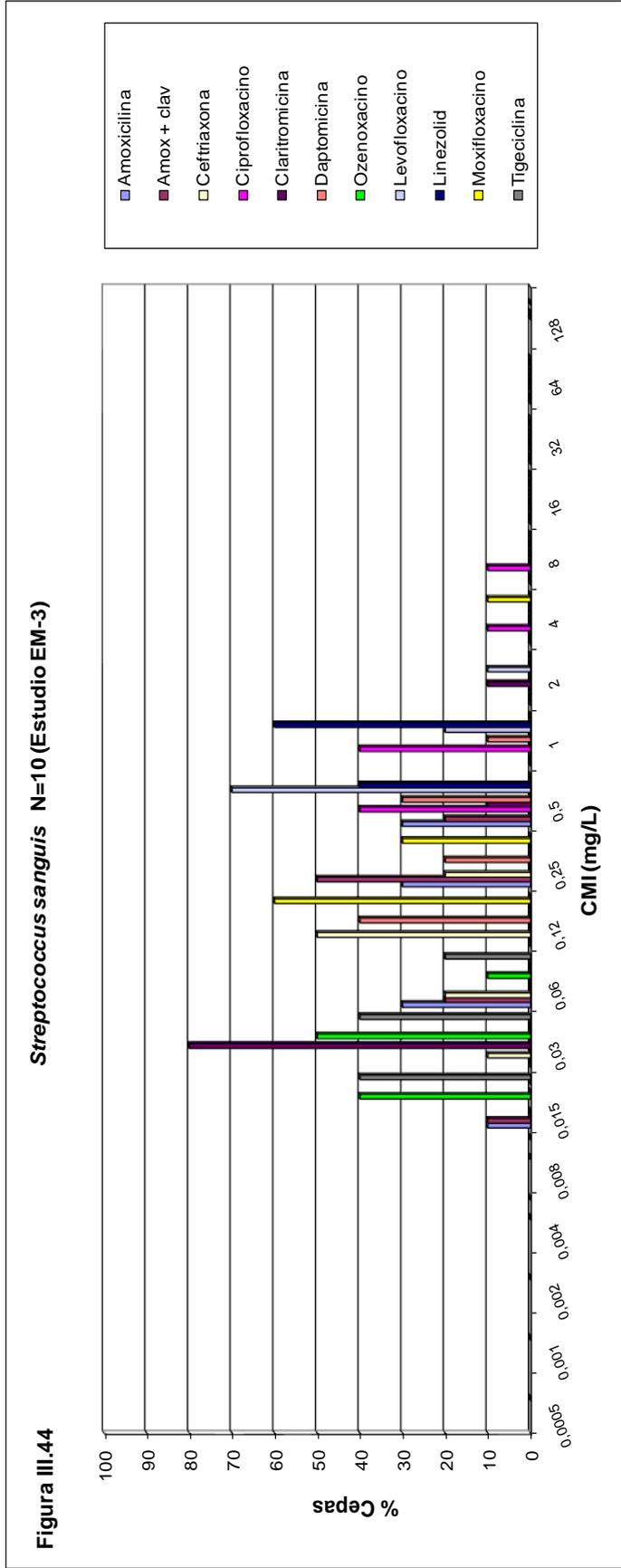




Tal y como se observa en las tablas III.21 y III.28, y figuras III.41 y III.42, frente a *Streptococcus mitis*, ozenoxacino y tigeciclina han sido los compuestos más activos (CMI₉₀ y rangos de 0,06 y 0,015-0,5 y, 0,125 y 0,015-0,25 mg/L, respectivamente). Ceftriaxona, moxifloxacino, daptomicina y linezolid les han seguido en actividad (CMI₉₀ entre 0,5 y 8 mg/L). Se observa que, ha aparecido un número más elevado de cepas con CMI por encima de 2 mg/L a moxifloxacino, levofloxacino, ciprofloxacino y a amoxicilina (sola o con ác.clavulánico), además de las de CMI a claritromicina ≥ 64 mg/L. Ozenoxacino ha sido más de cien veces más activo que ciprofloxacino, treinta y dos veces que levofloxacino y cuatro veces que moxifloxacino.

Tabla III.29. Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 10 <i>Streptococcus sanguis</i> .		Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
		0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina																				
Amox + clav						10,0	0,0	30,0	0,0	30,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						10,0	0,0	20,0	0,0	50,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	10,0	20,0	50,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Clarithromicina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	50,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentraciones no testadas																				
Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada										Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada										





Tal y como se observa en las tablas III.21 y III.29, y figuras III.43 y III.44, frente a las cepas de *Streptococcus sanguis* estudiadas, ozenoxacino y tigeciclina han sido los productos más activos (CMI₉₀ de 0,03 y 0,06 mg/L y rangos de 0,015-0,06 mg/L). Ceftriaxona, daptomicina, moxifloxacino, amoxicilina (con y sin ac.clavulánico) y claritromicina han mostrado buena actividad (CMI₉₀ entre 0,25 y 0,5 mg/L). Levofloxacino y linezolid han obtenido una CMI de 1 mg/L y rangos de 0,5-1 y 0,5-2 mg/L y, finalmente, ciprofloxacino (CMI₉₀ de 4 mg/L y rango de 0,5-8 mg/L).

Frente a *S. sanguis*, claritromicina con una CMI₉₀ de 0,5 mg/L y máximas CMI de 2 mg/L se ha desmarcado de los resultados obtenidos con el resto de especies y grupos de estreptococos, no se han detectado cepas con CMI ≥64 mg/L.

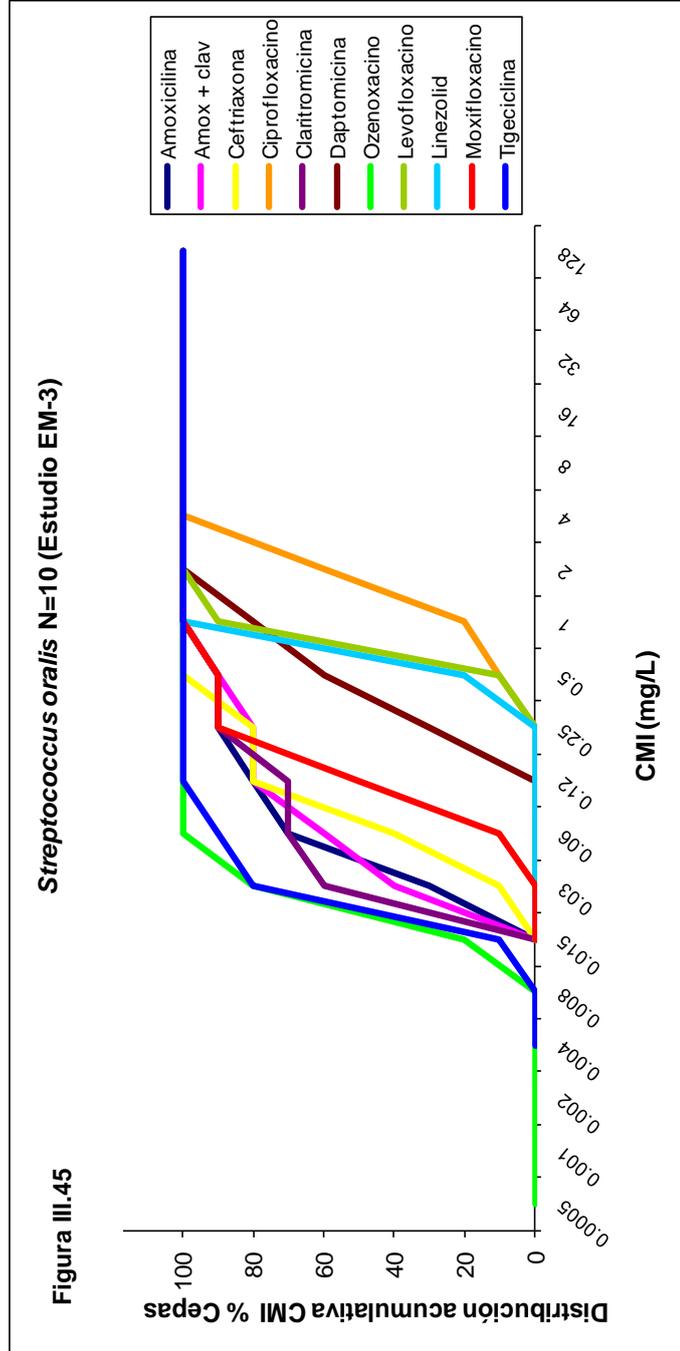
De nuevo, ozenoxacino ha sido, unas cien veces más activo que ciprofloxacino, treinta y dos que levofloxacino, y unas ocho veces mejor que moxifloxacino.

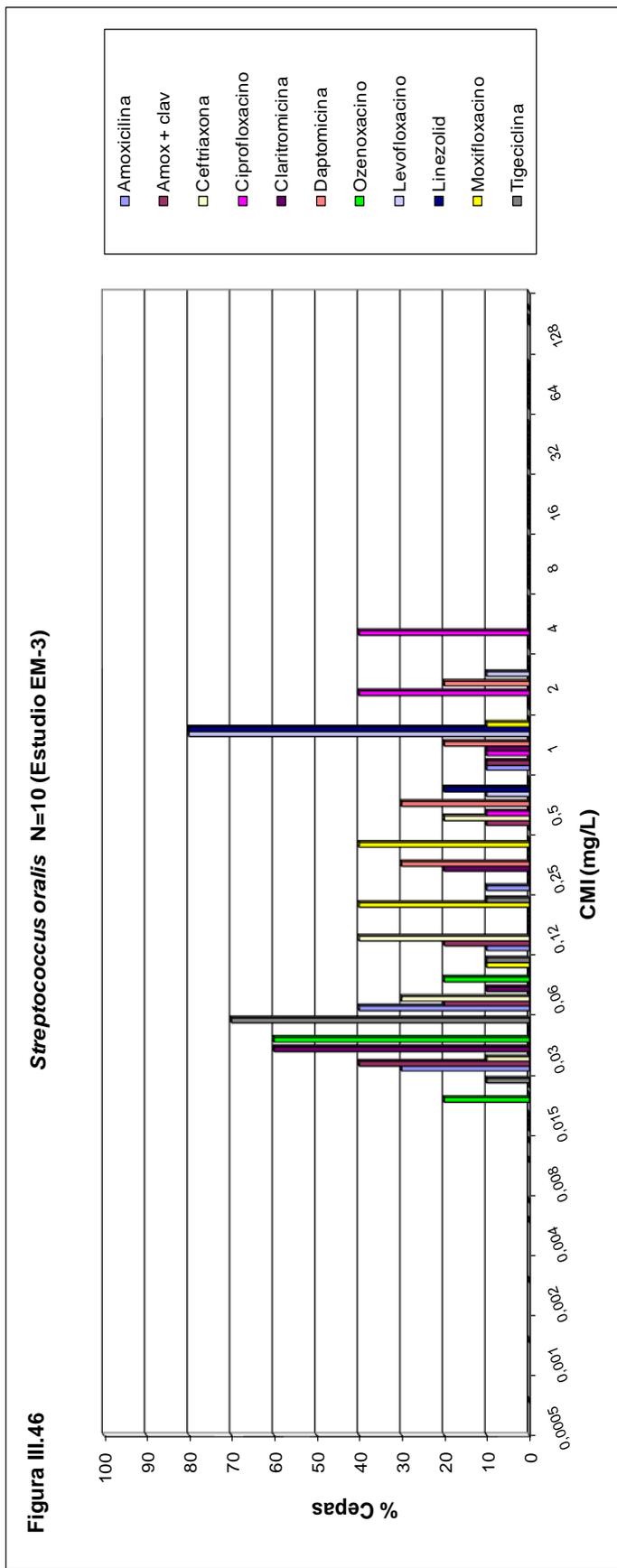
Antibióticos	Distribución de las de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 10 <i>Streptococcus oralis</i>																		
	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	30,0	40,0	10,0	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						0,0	40,0	20,0	20,0	0,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	10,0	30,0	40,0	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	10,0	40,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina						60,0	10,0	10,0	0,0	20,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	20,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	60,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	80,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	10,0	40,0	40,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina						0,0	0,0	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada





Tal y como se observa en las tablas III.21 y III.30, y figuras III.45 y III.46, frente a *Streptococcus oralis* se ha obtenido una distribución de las CMI prácticamente igual a *S. sanguis*. Los compuestos más activos han sido ozenoxacino y tigeciclina (CMI₉₀ de 0,06 mg/L y rangos de 0,015-0,06 y 0,015-0,125 mg/L), seguidos de moxifloxacino, amoxicilina y claritromicina (CMI₉₀ de 0,25 mg/L y rangos entre 0,03-1 mg/L), de ceftriaxona y amoxicilina con clavulánico, linezolid, levofloxacino y daptomicina (CMI₉₀ de 0,5, 0,5, 1, 1 y 2, respectivamente), y por último, de ciprofloxacino, con un 40% de las cepas con una CMI de 4 mg/L.

Ozenoxacino ha sido, también, más potente que las tres fluoroquinolonas, sesenta y cuatro veces más potente que ciprofloxacino, dieciséis veces más potente que levofloxacino y cuatro veces más potente que moxifloxacino.

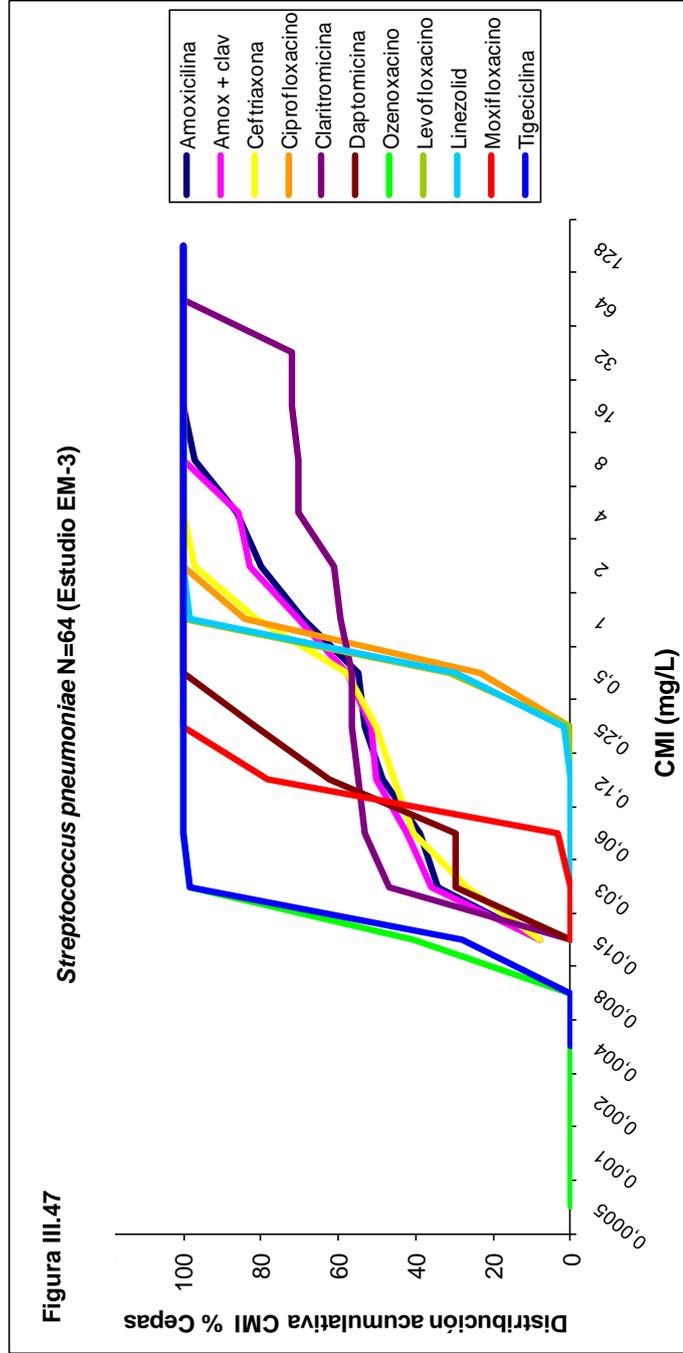
Tabla III.31. Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 64 *Streptococcus pneumoniae*

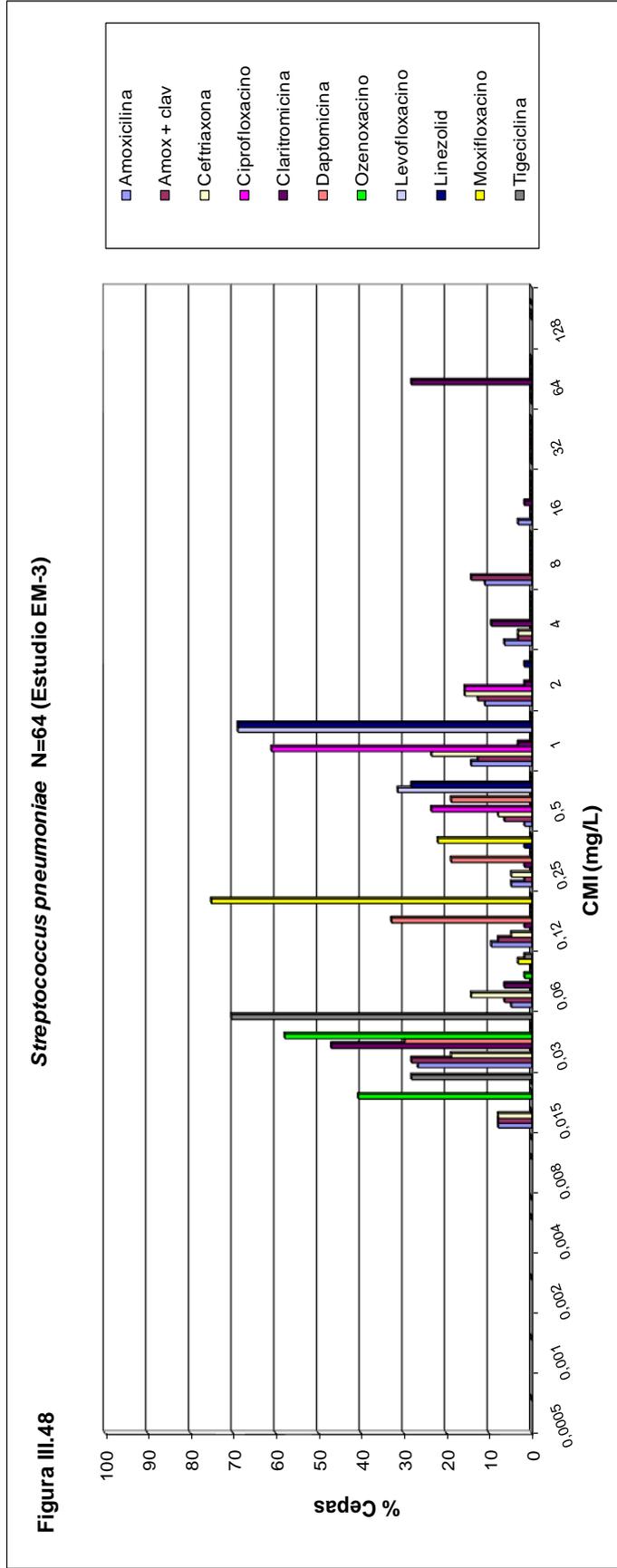
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						7,8	26,6	4,7	9,4	4,7	1,6	14,1	10,9	6,3	10,9	3,1	0,0	0,0	
Amox + clav						7,8	28,1	6,3	7,8	1,6	6,3	12,5	12,5	3,1	14,1	0,0	0,0	0,0	
Ceftriaxona						7,8	18,8	14,1	4,7	4,7	7,8	23,4	15,6	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23,4	60,9	15,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Claritromicina							46,9	6,3	1,6	1,6	0,0	3,1	1,6	9,4	0,0	1,6	0,0	28,1	
Daptomicina							29,7	0,0	32,8	18,8	18,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,6	57,8	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	31,3	68,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	28,1	68,8	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Moxifloxacino						0,0	0,0	3,1	75,0	21,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Tigeciclina				0,0	0,0	28,1	70,3	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada





Ozenoxacino y tigeciclina son los productos más activos frente a todas las cepas de *S. pneumoniae*. En la tabla III.31 y en la figura III.47 se observan que presentan unos resultados muy similares, también en distribución, como se confirma en la figura III.48). El resto de productos presentan, dentro de un rango muy correcto de CMI, un comportamiento más errático, ya que les cuesta conseguir una buena actividad en el 90% de las cepas. Moxifloxacino y daptomicina presentan buena actividad, y, moderada, linezolid, ceftriaxona y ciprofloxacino. Amoxicilina se ve afectada por la presencia de cepas resistentes a penicilina, y, por otro lado, claritromicina ha sido activa sólo frente algunas cepas (rango $\leq 0,03-264$) y sus valores de CMI_{90} han sido altos ≥ 64 mg/L). Ozenoxacino ha obtenido mayor actividad, respecto a ciprofloxacino (sesenta y cuatro veces), levofloxacino (treinta y dos veces) y moxifloxacino (ocho veces mayor).

En las tabla III.32 se presentan las CMI₉₀ y el rango para ozenoxacino y los diez antibióticos comparativos frente a bacterias Gram-negativas como *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*, y frente a *P. aeruginosa*.

Organismos (n)		Estudio EM-3 / <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella spp.</i> y <i>Shigella spp.</i>											
		CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCV	OZN	TIG	LNZ	DAP	CLA	
<i>E. coli</i> (50)	CMI ₉₀	32	16	32	≥64	0,12	16	≥128	0,25	≥128	≥128	≥64	
	Rango	≤0,015-≥64	≤0,015-≥64	0,03-≥64	4-≥64	≤0,015-≥64	2-≥64	0,008-≥128	0,06-0,5	16-≥128	≥128	16-≥64	
quinol-S (35)	CMI ₉₀	0,024	0,048	0,12	64	0,12	16	0,12	0,25	≥128	≥128	64	
	Rango	≤0,015-0,25	≤0,015-0,25	0,03-1	4-≥64	≤0,015-≥64	2-≥64	0,008-0,5	0,06-0,5	64-≥128	≥128	16-≥64	
quinol-R (15)	CMI ₉₀	64	51	64	64	1,3	25,6	≥128	0,5	≥128	≥128	≥64	
	Rango	2-≥64	2-≥64	2-≥64	8-≥64	0,06-≥64	4-32	1-≥128	0,06-0,5	16-≥128	≥128	32-≥64	
<i>P. aeruginosa</i> (50)	CMI ₉₀	16	32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥128	≥16	≥128	≥128	≥64	
	Rango	0,06-≥64	0,25-≥64	1-≥64	≥64	8-≥64	≥64	0,5-≥128	≥128	≥128	≥128	≥64	
cipro S (36)	CMI ₉₀	0,5	2	4	64	64	64	8	≥128	128	128	64	
	Rango	0,06-1	0,5-4	1-4	≥64	16-≥64	≥64	0,5-8	0,5-≥16	≥128	≥128	≥64	
cipro no S (14)	CMI ₉₀	32	64	64	64	64	64	128	16	128	128	64	
	Rango	2-≥64	8-≥64	8-≥64	≥64	8-≥64	≥64	16-≥128	8-≥16	≥128	≥128	≥64	
<i>Salmonella spp</i> (20)	CMI ₉₀	0,015	0,066	0,12	64	0,133	8,8	0,12	2	≥128	128	64	
	Rango	≤0,015	≤0,015-0,12	≤0,015-0,12	1-≥64	≤0,015-1	1-32	0,03-0,25	0,12-4	4-≥128	≥128	16-≥64	
<i>Shigella spp</i> (20)	CMI ₉₀	0,015	0,015	0,03	≥64	0,06	16	0,03	2	128	≥128	≥64	
	Rango	≤0,015	≤0,015	≤0,015-0,03	1-≥64	0,03-1	1-32	0,008-0,03	0,12-2	≥128	≥128	16-≥64	

Ozenoxacino ha presentado una buena actividad frente a bacterias Gram-negativas, aunque significativamente menor que la que ha obtenido frente a Gram-positivos, como los estafilococos, con unas CMI extremadamente bajas.

Las cuatro quinolonas, y especialmente ciprofloxacino, ha mostrado una buena actividad frente a las enterobacterias *Salmonella* spp, *Shigella* spp y *E. coli*, sensibles a ciprofloxacino, y, frente a *P. aeruginosa*, también sensibles a ciprofloxacino. Entre el resto de antibióticos, sólo ceftriaxona y tigeciclina han presentado actividad frente a estas cepas.

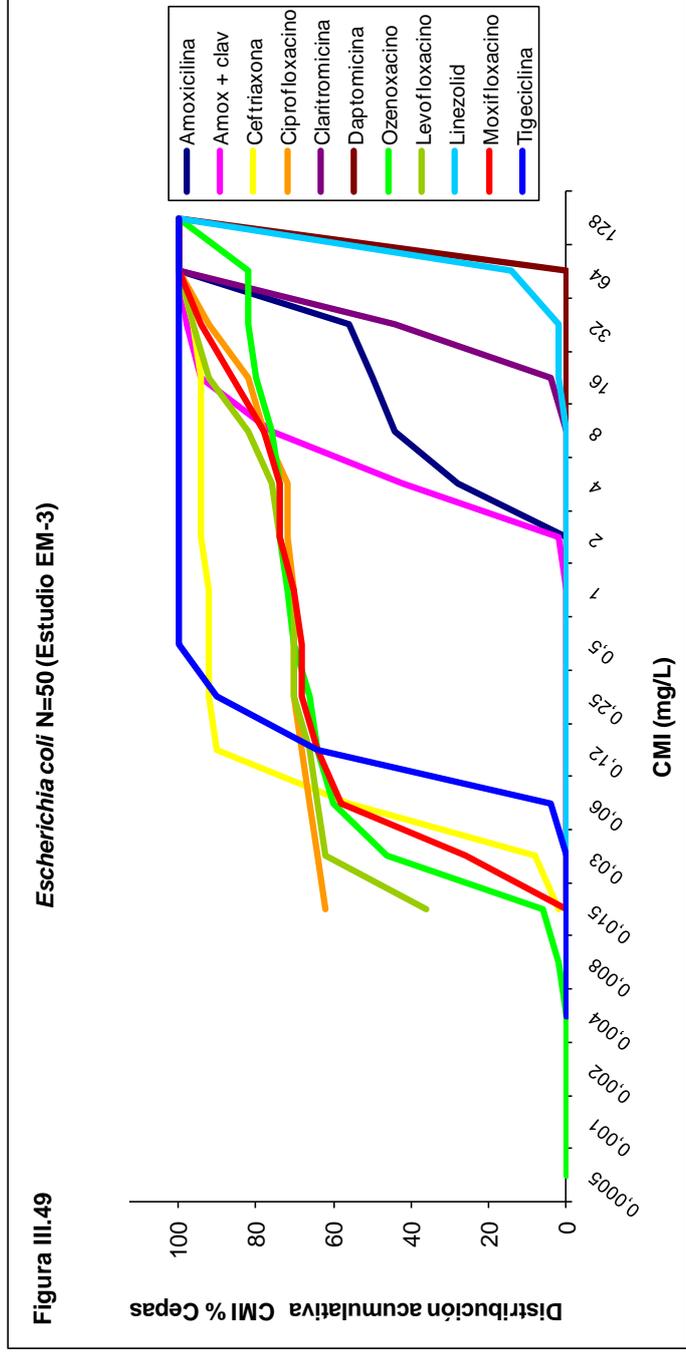
Las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* se han subdividido en sensibles y resistentes a ciprofloxacino; en ellas se puede observar que todas las quinolonas, incluido ozenoxacino, han perdido totalmente su actividad frente a cepas resistentes a ciprofloxacino. Del resto de antibióticos comparativos, sólo tigeciclina mantiene una buena actividad frente a las cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino, pero no frente a *P. aeruginosa* resistentes a ciprofloxacino.

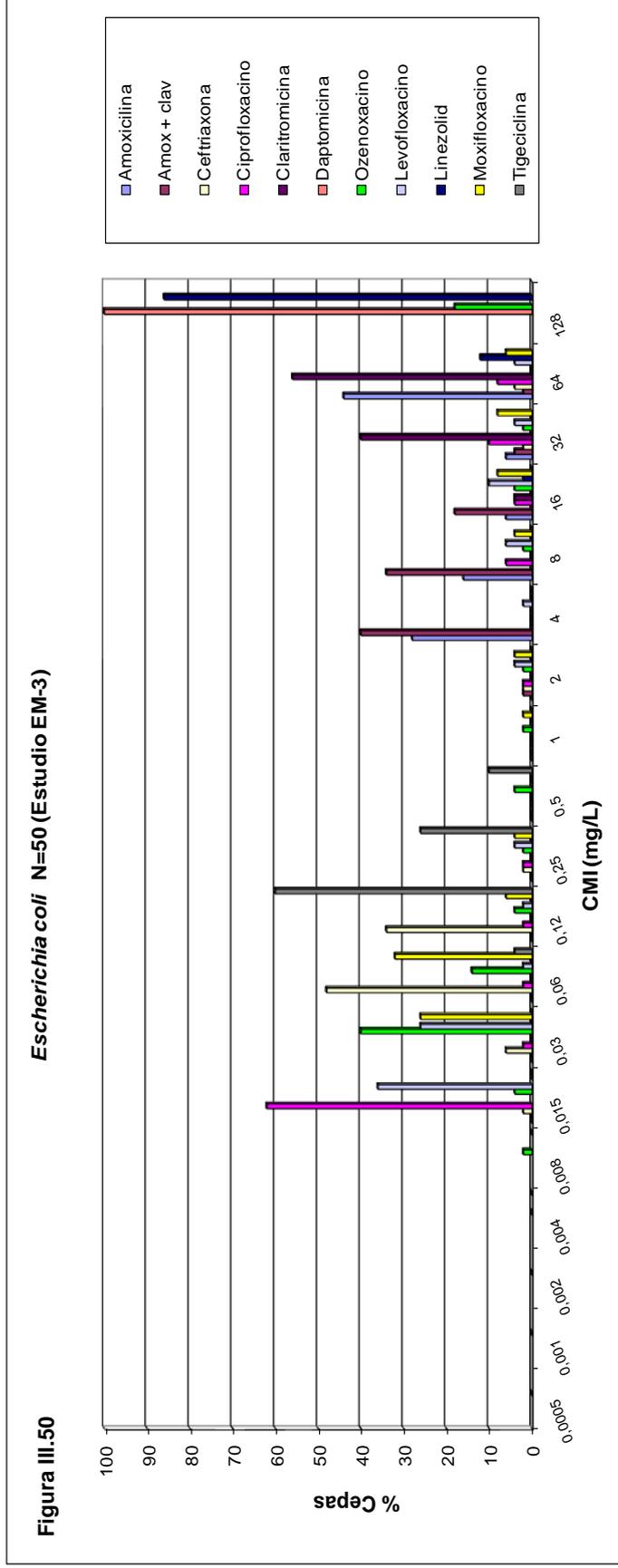
En la tabla III.32, se observa que, frente al 30% de cepas de *E. coli* que son resistentes a ciprofloxacino sólo mantienen su actividad tigeciclina (CMI₉₀ 0,5 mg/L, rango 0,06-0,5 mg/L) y ceftriaxona, excepto para una de ellas que también es resistente a ceftriaxona (CMI₉₀ 1,3 mg/L, rango 0,06-≥64 mg/L). En las cepas sensibles a ciprofloxacino (72%), éste mismo antibiótico ha sido el producto más activo, seguido de levofloxacino, moxifloxacino y ozenoxacino (CMI₉₀ de 0,5, 2, 4 y 8 mg/L, respectivamente). Tigeciclina y ceftriaxona han presentado, unas CMI una o dos diluciones por debajo de sus máximos testados (CMI₉₀ de 16 y 64 mg/L), lo que indica una falta de actividad clara. Ninguno de los productos testados ha demostrado actividad frente a las cepas de *P. aeruginosa* no sensibles a ciprofloxacino (28%) (CMI igual o superior a 2 mg/L).

Las cepas de *Salmonella* spp testadas han sido todas extremadamente sensibles a ciprofloxacino (el 100% con las CMI por debajo del límite de concentración evaluado de 0,015 mg/L), y, también han presentado muy buena actividad levofloxacino, moxifloxacino, ozenoxacino y ceftriaxona (CMI₉₀ de 0,06, 0,12, 0,12 y 0,13 mg/L, respectivamente). Tigeciclina y amoxicilina con ác.clavulánico (CMI₉₀ de 2 y 8,8 mg/L, y rangos de 0,12-4 y 1-32 mg/L) han sido moderadamente activos, y cinco cepas han presentado resistencia a amoxicilina sola (CMI₉₀ de 64 mg/L, y rango de 1-≥64 mg/L) y linezolid, daptomicina y claritromicina han sido inactivos.

Las cepas de *Shigella* spp evaluadas ha sido todas extremadamente sensibles a ciprofloxacino y levofloxacino (el 100% con las CMI por debajo del límite de concentración evaluado de 0,015 mg/L), y también han presentado excelente actividad ozenoxacino y moxifloxacino (CMI₉₀ de 0,03 mg/L y rangos de 0,008-0,03 y ≤0,015-0,03 mg/L, respectivamente).

Tabla III.33 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 <i>Escherichia coli</i>																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,0	16,0	6,0	6,0	44,0	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	40,0	34,0	18,0	4,0	2,0	
Ceftriaxona						2,0	6,0	48,0	34,0	2,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	4,0	
Ciprofloxacino						62,0	2,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	6,0	4,0	10,0	8,0	
Claritromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	40,0	56,0	
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	4,0	40,0	14,0	4,0	2,0	4,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	2,0	0,0	18,0
Levofloxacino						36,0	26,0	2,0	2,0	4,0	0,0	0,0	4,0	2,0	6,0	10,0	4,0	4,0	
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	12,0	86,0
Moxifloxacino						0,0	26,0	32,0	6,0	4,0	0,0	2,0	4,0	0,0	4,0	8,0	8,0	6,0	
Tigeciclina						0,0	0,0	0,0	60,0	26,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada					Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada				





Tal y como se observa, con los datos globales para *E. coli*, en la tabla III.33 y en la figura III.49, ceftriaxona y tigeciclina han sido los compuestos más activos, mientras que ozenoxacino ha sido menos activo también que ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, pero más activo que amoxicilina, augmentine, linezolid, daptomicina y claritromicina.

El perfil de la distribución de las actividades que se observa en la figura III.49 es muy significativo de la diferente susceptibilidad de este grupo de microorganismos a los antibióticos. Los valores de CMI que inactivan el crecimiento del 90-100% de las cepas se desplazan hacia la derecha, hacia valores superiores, hasta compuestos que, como se ha mencionado, son completamente inactivos. La presencia de cepas resistentes a los antibióticos modifica los valores medios de actividad. En la tabla III.33 y en la gráfica III.50 se puede observar, la existencia de cepas sensibles a algunos productos y otras resistentes a todos los antibióticos testados. Linezolid, daptomicina y claritromicina no son activos frente a bacterias Gram-negativas.

Se observa que las quinolonas poseen una buena actividad frente a algunas cepas (CMI₉₀ entre 0,024 y 0,12 mg/L), que pierden de manera conjunta en las cepas resistentes a todas ellas.

Tabla III.34 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 *Pseudomonas aeruginosa*

Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	
Ceftriaxona						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	20,0	24,0	54,0	
Ciprofloxacino						0,0	0,0	10,0	22,0	24,0	16,0	6,0	4,0	2,0	2,0	6,0	6,0	2,0	
Claritromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	16,0	28,0	18,0	12,0	2,0	6,0	2,0	12,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	28,0	18,0	22,0	2,0	8,0	0,0	10,0	4,0	
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,0	36,0	28,0	2,0	6,0	0,0	14,0	
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	2,0	4,0	46,0	46,0	0,0		

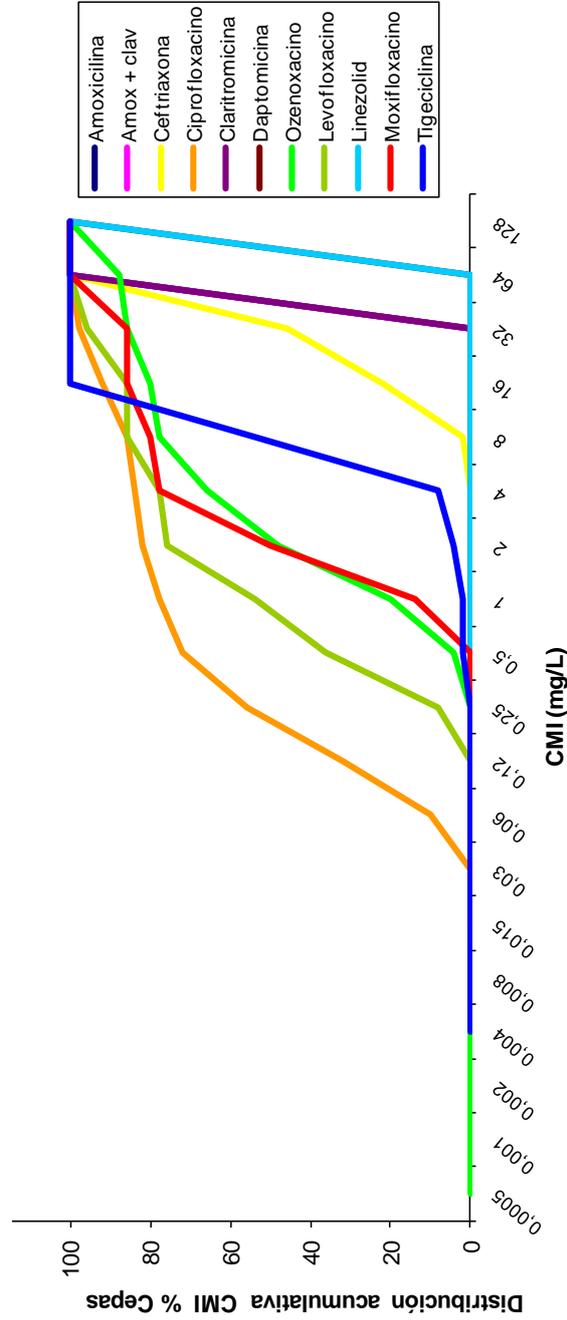
Concentraciones no testadas

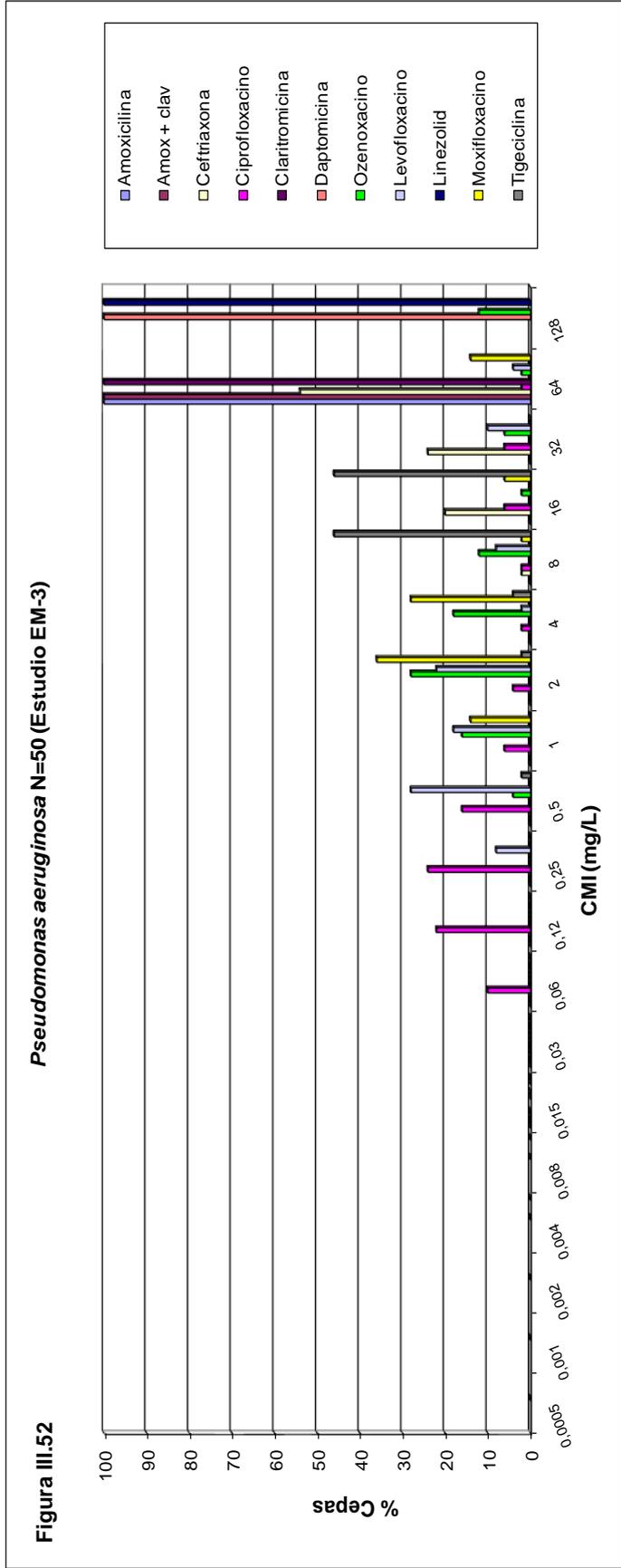
Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada

Figura III.51

Pseudomonas aeruginosa N=50 (Estudio EM-3)





Tal y como se observa en la tabla III.34 y en las figuras III.51 y III.52, sólo algunos compuestos mantienen una cierta actividad frente a las cepas de *P. aeruginosa* analizadas. De nuevo, los valores de CMI se desplazan hacia la derecha de la figura, y muchos compuestos no consiguen ser activos frente al 100% de las cepas, ya que sus CMI serían superiores a la máxima concentración testada (tabla III.34). Amoxicilina (sola o con ác.clavulánico), claritromicina, linezolid y daptomicina han sido completamente inactivos (máximas CMI testadas 64-128 mg/L).

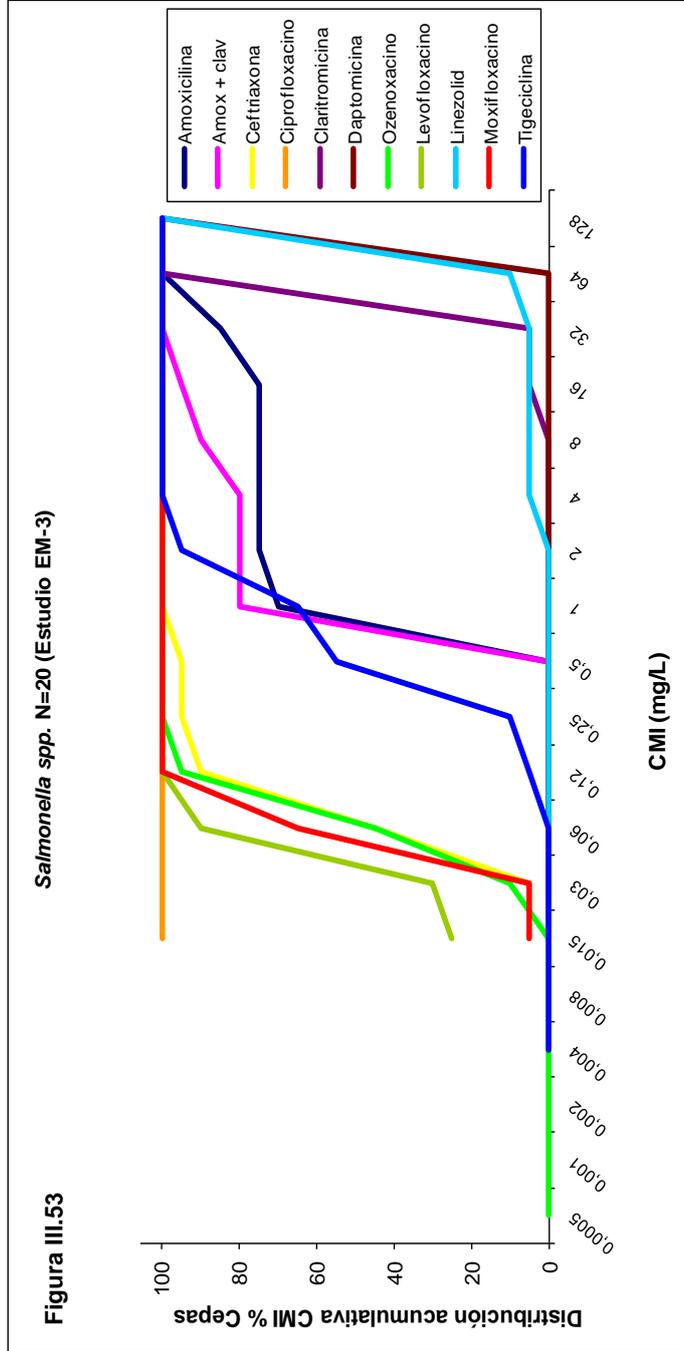
El análisis global de las cepas permite ver que ciprofloxacino ha sido el producto con mayor actividad, seguido de levofloxacino, moxifloxacino y ozenoxacino, en algunas cepas.

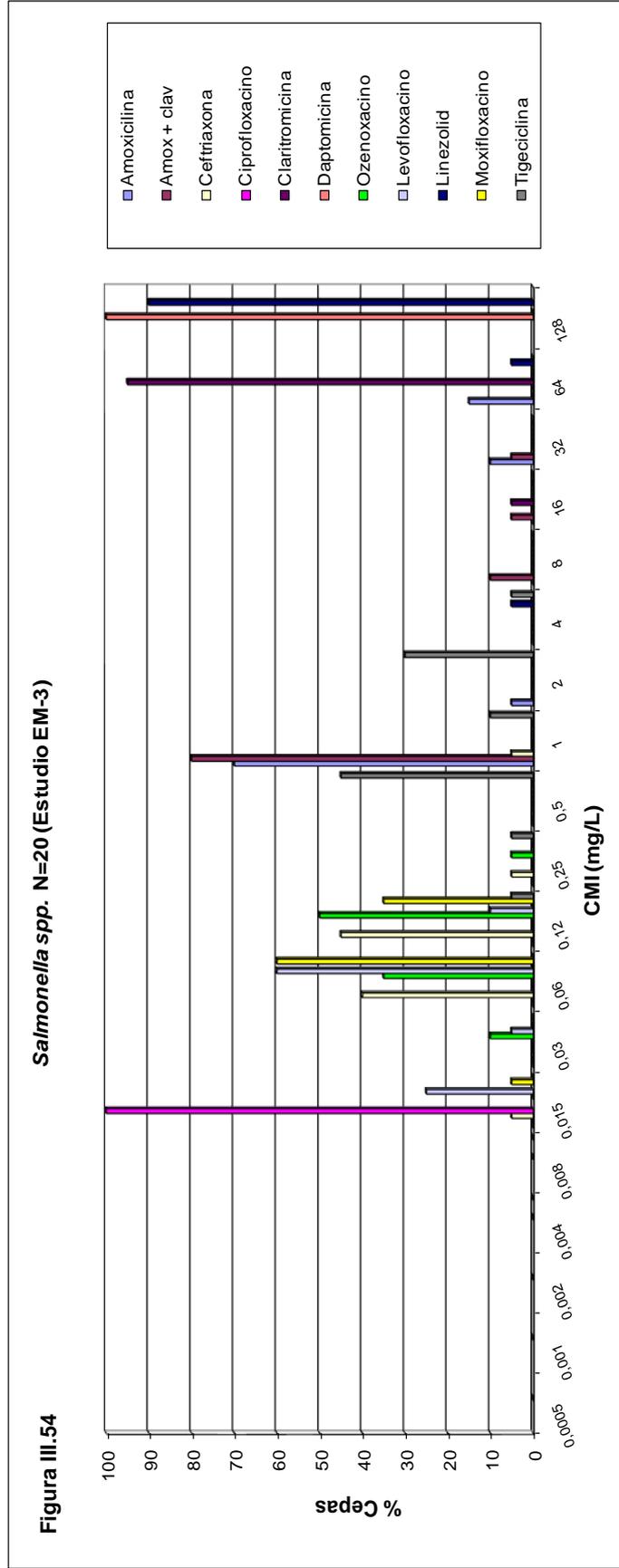
Tabla III.35. Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 <i>Salmonella</i> spp.																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	70,0	5,0	0,0	0,0	0,0	10,0	15,0	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	0,0	10,0	5,0	5,0	0,0	
Ceftriaxona						5,0	0,0	40,0	45,0	5,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ciprofloxacino						100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Clarithromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	95,0	
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	35,0	50,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Levofloxacino						25,0	5,0	60,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	90,0
Moxifloxacino						5,0	0,0	60,0	35,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina						0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	45,0	10,0	30,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

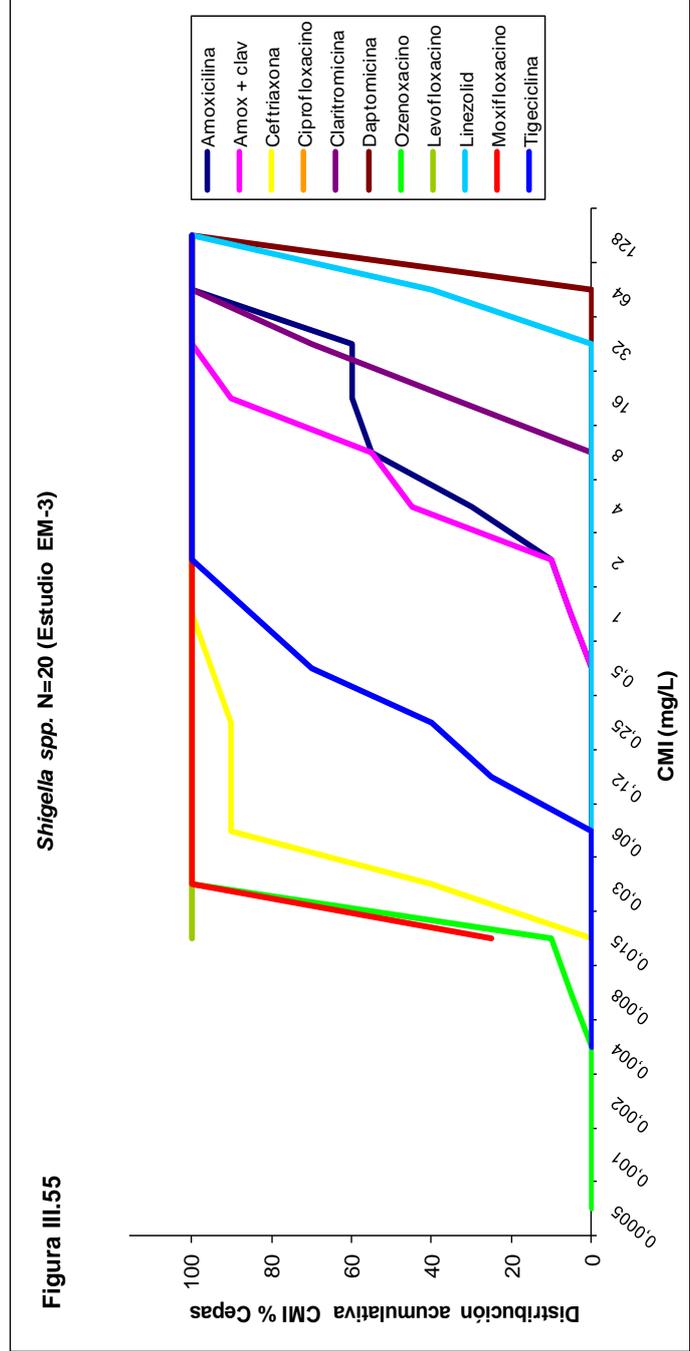
Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada

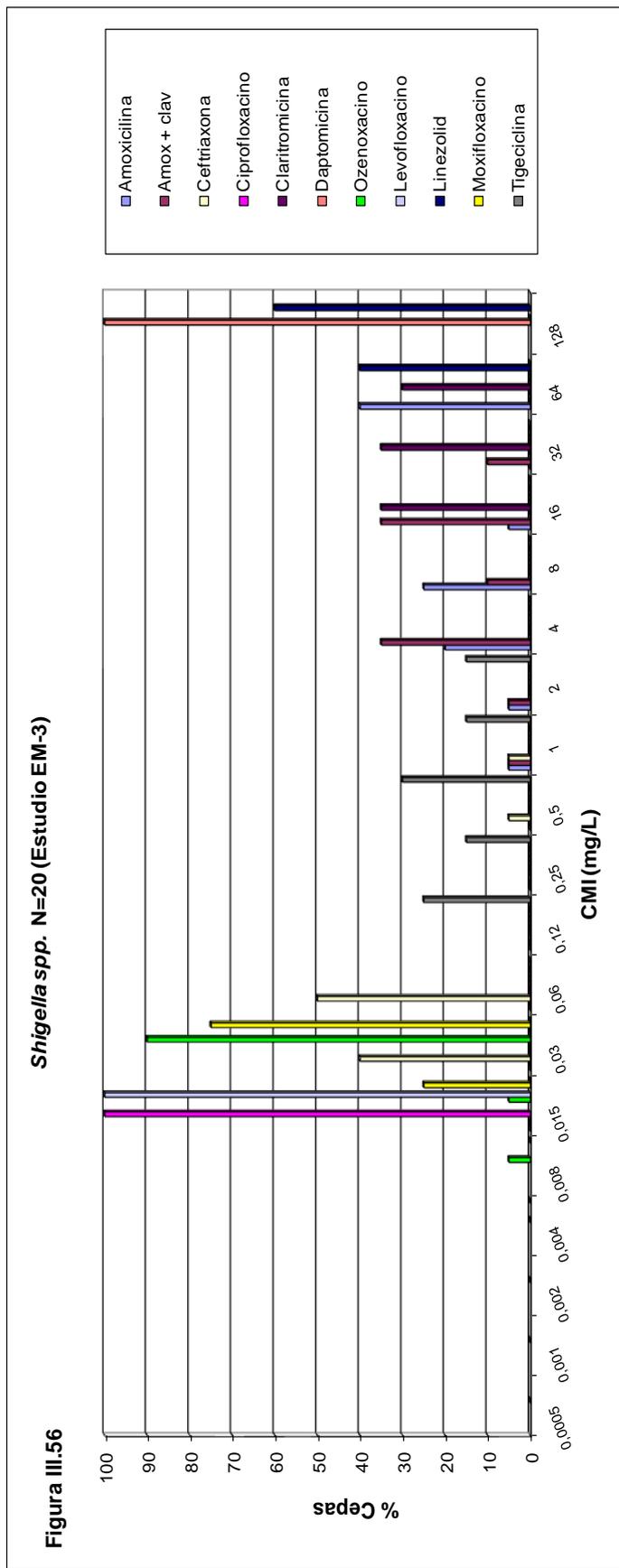




Tal y como se observa en las tablas III.32, III.35 y en las figuras III.53 y III.54, las cepas de *Salmonella* spp. testadas han sido todas extremadamente sensibles a ciprofloxacino (el 100% con las CMI por debajo del límite de concentración evaluado de 0,015 mg/L), y, también han presentado muy buena actividad levofloxacino, moxifloxacino, ozenoxacino y ceftriaxona. Tigeciclina y amoxicilina con ácido clavulánico han sido moderadamente activos, y cinco cepas han presentado resistencia a amoxicilina sola. No se ha podido determinar la CMI de los compuestos inactivos frente a Gram-negativos, como linezolid, daptomicina y claritromicina, en la mayoría de las cepas.

Tabla III.36. Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 <i>Shigella</i> spp.																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	20,0	25,0	5,0	0,0	40,0	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	35,0	10,0	35,0	10,0	0,0	
Ceftriaxona						0,0	40,0	50,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ciprofloxacino						100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Claritromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,0	35,0	30,0	
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	90,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Linezolid							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	
Moxifloxacino						25,0	75,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	15,0	30,0	15,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada							Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada		





Las cuatro quinolonas evaluadas han sido extremadamente potentes frente a todas las cepas de *Shigella* spp que se han testado. El 100% de ellas han presentado CMI por debajo del límite de concentración evaluado para ciprofloxacino y levofloxacino de 0,015 mg/L (tabla III.36). De manera similar, han presentado excelente actividad ozenoxacino y moxifloxacino, tal y como se observa en las tablas III.32 y III.36, y en las figuras III.55 y III.56.

En las dos figuras se observa claramente que las cuatro quinolonas quedan a la izquierda de la gráfica, en la zona de menores CMI, seguidas de ceftriaxona y tigeciclina que han presentado una actividad moderada, mientras que amoxicilina con y sin ác.clavulánico ha obtenido CMI₉₀ altas (de 16 y 64 mg/L) y linezolid, daptomicina y claritromicina tampoco han resultado activos.

En la tabla III.37 se presentan las CMI₉₀ y el rango para ozenoxacino y los diez antibióticos comparativos frente a diversas especies de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

Tabla III.37.		Estudio EM-3 / <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> y <i>Neisseria spp.</i>									
Organismos (n)	Antibióticos CMI ₉₀ y Rango (mg/L)										
	CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCLV	OZN	TIG	LNZ	DAP	CLA
<i>H. influenzae</i> (70)	CMI ₉₀	0,015	0,06	64	0,015	1	0,015	0,5	16	128	8
	Rango	≤0,015-0,5	≤0,015-1	0,12-≥64	≤0,015-0,25	0,25-4	0,002-0,25	0,12-1	8-32	≥128	2-16
No tipables (20)	CMI ₉₀	0,015	0,015	5,2	0,015	1	0,008	1	16	128	8
	Rango	≤0,015	≤0,015-0,03	0,25-16	≤0,015	0,25-4	0,002-0,008	0,25-1	8-16	≥128	4-8
β-lactamasa negativos (24)	CMI ₉₀	0,015	0,03	2	0,015	0,8	0,015	0,25	16	128	8
	Rango	≤0,015	≤0,015-0,06	0,25-2	≤0,015-0,06	0,25-4	0,002-0,03	0,12-0,5	8-32	≥128	4-16
β-lactamasa positivos (25)	CMI ₉₀	0,015	0,06	64	0,015	2	0,015	0,5	32	128	8
	Rango	≤0,015	≤0,015-0,125	8-≥64	≤0,015-0,25	0,5-4	0,004-0,015	0,12-0,5	8-32	≥128	2-16
<i>M. catarrhalis</i> (50)	CMI ₉₀	0,03	0,06	8	1	0,25	0,008	0,06	4	16	0,06
	Rango	≤0,015-0,06	0,03-0,12	≤0,015-16	≤0,015-2	≤0,015-0,25	≤0,0005-0,015	0,03-0,25	4-8	2-≥128	≤0,03-0,12
β-lactamasa negativos(25)	CMI ₉₀	0,03	0,06	0,06	0,12	0,06	0,008	0,06	4	20,8	0,078
	Rango	≤0,015-0,06	0,06	≤0,015-0,12	≤0,015-0,25	≤0,015-0,12	≤0,0005-0,008	0,03-0,12	4	4-32	≤0,03-0,12
β-lactamasa positivos(25)	CMI ₉₀	0,048	0,06	16	1,6	0,25	0,008	0,06	6,4	16	0,06
	Rango	≤0,015-0,06	0,03-0,12	2-16	0,03-2	0,03-0,25	0,002-0,015	0,03-0,25	4-8	8-≥128	≤0,03-0,12
<i>N. gonorrhoeae</i> (20)	CMI ₉₀	0,03	0,06	16	0,03	1	0,008	0,5	1	128	2
	Rango	≤0,03-16	≤0,03-4	≤0,03-≥64	≤0,03	0,06-2	≤0,0005-0,12	≤0,03-1	0,25-8	64-≥128	≤0,03-8
β-lactamasa negativos (13)	CMI ₉₀	0,03	0,054	0,5	0,03	0,5	0,008	0,45	3,4	128	1,8
	Rango	≤0,03	≤0,03-0,06	0,06-0,5	≤0,03	0,25-2	≤0,0005-0,03	≤0,03-1	0,5-8	≥128	≤0,03-8
β-lactamasa positivos (7)	Media geom	6,48	1,63	35,2	0,03	1,4	0,054	0,5	1	128	3,5
	Rango	≤0,03-16	≤0,03-4	0,25-≥64	≤0,03	0,25-2	≤0,0005-0,12	0,12-0,5	0,5-1	≥128	0,06-8
<i>N. meningitidis</i> (20)	CMI ₉₀	0,03	0,03	0,12	0,015	0,12	0,002	0,12	8	128	0,25
	Rango	≤0,015-0,06	≤0,015-0,03	≤0,015-0,25	≤0,015-0,06	≤0,015-0,25	≤0,0005-0,008	0,008-0,25	4-8	8-≥128	≤0,03-1

La actividad obtenida por ozenoxacino ha sido excelente, en todos los casos, del mismo nivel que la de las otras quinolonas y ceftriaxona para *H.influenzae*, y como mínimo, entre uno y dos órdenes de magnitud más potente que las quinolonas y tigeciclina frente a *M.catarrhalis* y las dos especies del género *Neisseria* evaluadas.

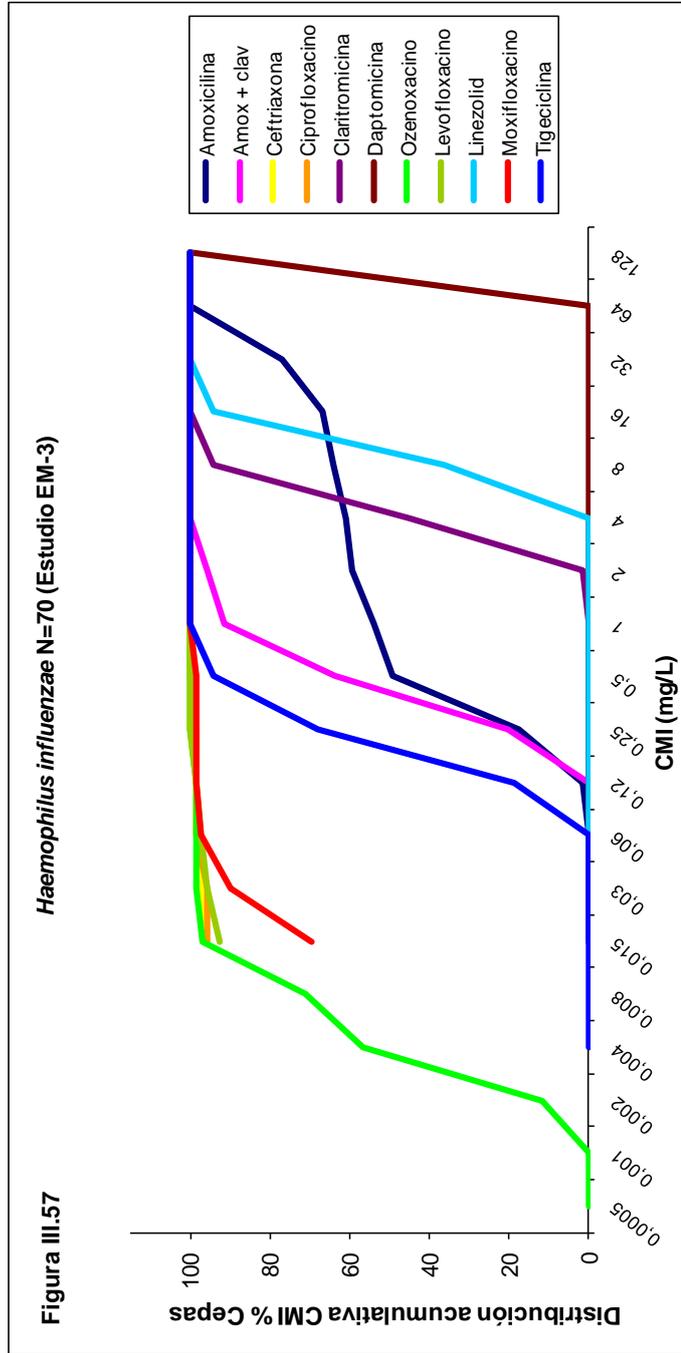
Las 70 cepas de *H.influenzae* se han subdividido en: 20 *H.influenzae* no tipables, 24 *H.influenzae* beta-lactamasa negativas y 21 *H.influenzae* beta-lactamasa positivas. Como se observa en la tabla III.37, con los resultados detallados por subgrupos, sólo amoxicilina ha perdido, lógicamente, actividad en las cepas beta-lactamasas positivas, el resto de compuestos han mantenido las mismas CMI en los tres tipos de cepas. Ozenoxacino ha sido el producto más activo, junto a levofloxacin, ceftriaxona, ciprofloxacino y moxifloxacino (CMI₉₀. 0,015 mg/L). Las CMI de ozenoxacino han sido tan bajas como 0,002 mg/L, con una CMI₉₀ de sólo 0,015 mg/L y un rango de 0,008-0,015 mg/L, Amoxicilina con ác.clavulánico, ha demostrado moderada actividad (CMI₉₀ 1 mg/L) mientras que amoxicilina sola, claritromicina, linezolid y daptomicina no han presentado actividad frente a estas cepas (CMI₉₀ entre 16-128 mg/L).

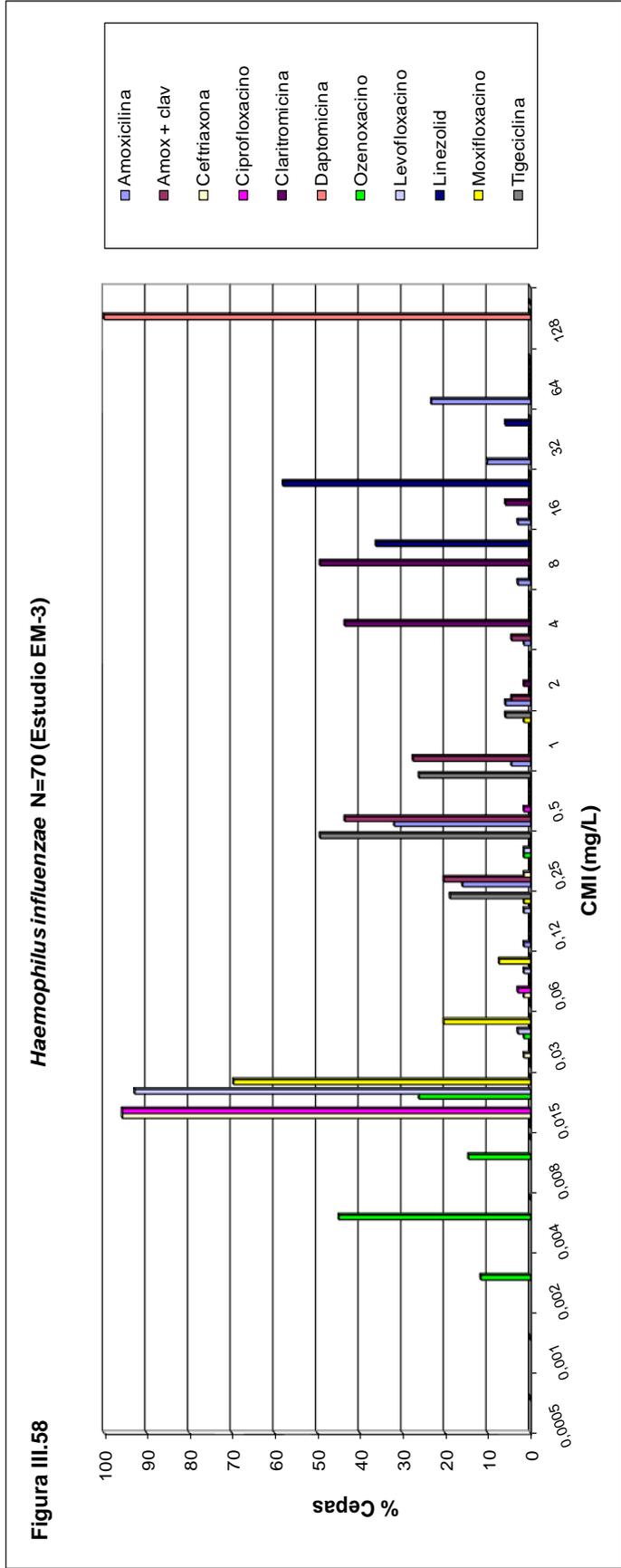
Frente a las cepas de *Moraxella catarrhalis*, ozenoxacino ha sido el antibiótico con mayor actividad (CMI₉₀ 0,008 mg/L y rango \leq 0,0005-0,015), separado de ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, tigeciclina y claritromicina (CMI₉₀ entre 0,03 y 0,06 mg/L y rangos entre \leq 0,015 y 0,25 mg/L), que le siguen a continuación. Amoxicilina con ác.clavulánico y ceftriaxona ha obtenido unas CMI₉₀ intermedias (0,25 y 1 mg/L), mientras que los productos con menor actividad han sido linezolid, amoxicilina y daptomicina (CMI₉₀ de 4, 8 y 16 mg/L). Al dividir las cepas entre beta-lactamasa negativas (18) y positivas (25), se observa que la actividad de ozenoxacino y de la mayoría de compuestos no se ha visto afectada. En las cepas beta-lactamasa positivas amoxicilina ha perdido actividad, como era de esperar, ha pasado de CMI₉₀ 0,06 a 16 mg/L y se han mantenido con buena actividad amoxicilina con clavulánico, aunque ha doblado su CMI₉₀ (de 0,06 a 0,25 mg/L), y ceftriaxona, que ha perdido un orden de magnitud (CMI₉₀ de 0,12 a 1,6 mg/L).

Frente a *Neisseria gonorrhoeae*, ozenoxacino ha sido el producto con mayor actividad (CMI₉₀ 0,008 mg/L y rango \leq 0,0005-0,12 mg/L), aunque para ceftriaxona, ciprofloxacino y levofloxacino, entre el 95-100% de las cepas, han indicado valores por debajo del límite inferior evaluado, por lo que, especialmente para las cepas beta-lactamasa negativas, no se ha podido definir una CMI₉₀ exacta, y está su actividad Infra-estimada. Ozenoxacino ha sido ocho veces mejor que moxifloxacino para las beta-lactamasa positivas. Menor actividad han presentado linezolid, amoxicilina con ác.clavulánico y claritromicina, seguidos de amoxicilina sola (CMI₉₀ 16 mg/L), y finalmente, daptomicina, que no ha presentado actividad frente a *N. gonorrhoeae*. Frente a las siete cepas de *N.gonorrhoeae* beta-lactamasa positivas, aparte de haber perdido amoxicilina sin ác.clavulánico su actividad, ha empeorado significativamente la de ciprofloxacino y levofloxacino (CMI₉₀ de \leq 0,03 a 6,48 mg/L).

Frente a las cepas de *N. meningitidis*, ozenoxacino ha sido el compuesto más potente, con las CMI más bajas (CMI₉₀ 0,002 mg/L y rango \leq 0,0005-0,008 mg/L) aunque los compuestos que le siguen, ceftriaxona y las tres fluoroquinolonas (CMI₉₀ entre 0,015 y 0,03 mg/L y rangos \leq 0,015-0,06 mg/L), han sido Infra-valoradas ya que no se ha podido determinar la CMI de muchas cepas por estar debajo del límite inferior. Se consideran aproximadamente equivalentes en un rango de actividad excelente frente a este microorganismo. Con una actividad intermedia les siguen tigeciclina, amoxicilina (con y sin ác.clavulánico) y claritromicina (CMI₉₀ de 0,12 mg/L y 0,25 mg/L claritromicina y, rangos entre 0,015 y 1 mg/L), y finalmente, sin actividad, linezolid y daptomicina (CMI₉₀ de 8 y 128 mg/L).

Tabla III.38 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 70 <i>Haemophilus influenzae</i> .																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	0,0	1,5	15,9	31,9	4,4	5,8	1,5	2,9	2,9	10,1	23,2	
Amox + clav						0,0	0,0	0,0	0,0	20,3	43,5	27,5	4,4	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						95,7	1,5	1,5	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						95,7	0,0	2,9	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Clarithromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	43,5	49,3	5,8	0,0	0,0	0,0
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ozenoxacino	0,0	11,6	44,9	14,5	26,1	26,1	1,5	0,0	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						92,8	2,9	1,5	1,5	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						69,6	20,3	7,3	1,5	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	36,2	58,0	5,8	0,0	0,0
Moxifloxacino							0,0	0,0	0,0	18,8	49,3	26,1	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,8	49,3	26,1	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada							Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada		

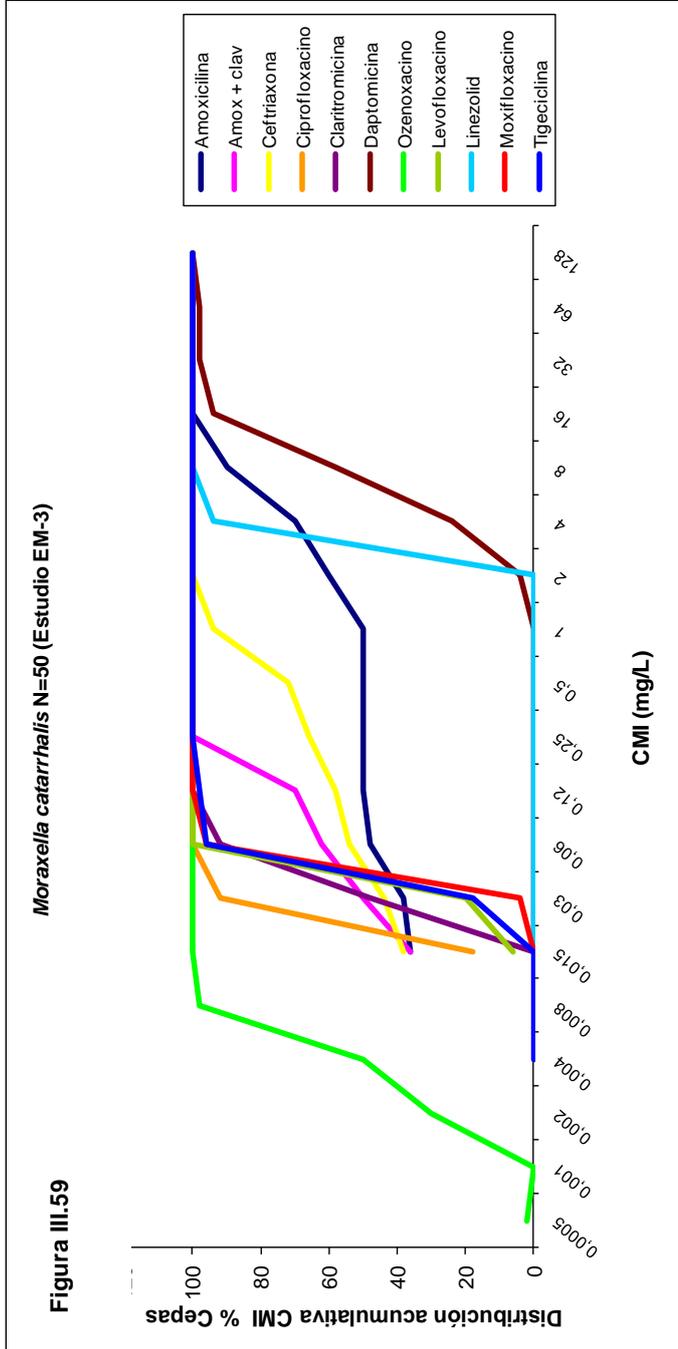


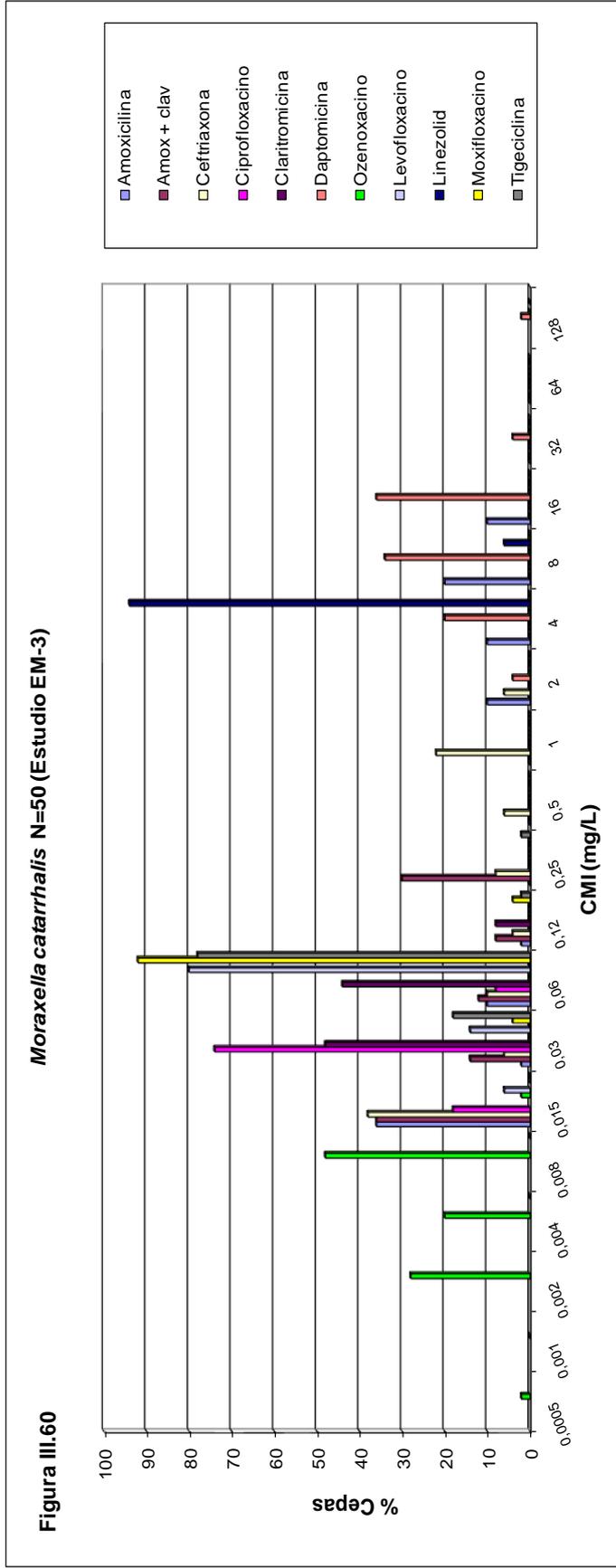


Tal y como se observa en las tablas III.38 y en las figuras III.57 y III.58, frente a las 70 cepas de *H. influenzae* testadas, ozenoxacino ha sido el producto más activo, junto a levofloxacino, ceftriaxona, ciprofloxacino y moxifloxacino, con CMI por debajo de su mínima concentración testada (tabla III.57).

En las figuras se separan claramente estos cuatro compuestos más activos, amoxicilina, con moderada actividad (sólo frente a las cepas no beta-lactamasa positivas) y el resto de compuestos con bastante menor actividad.

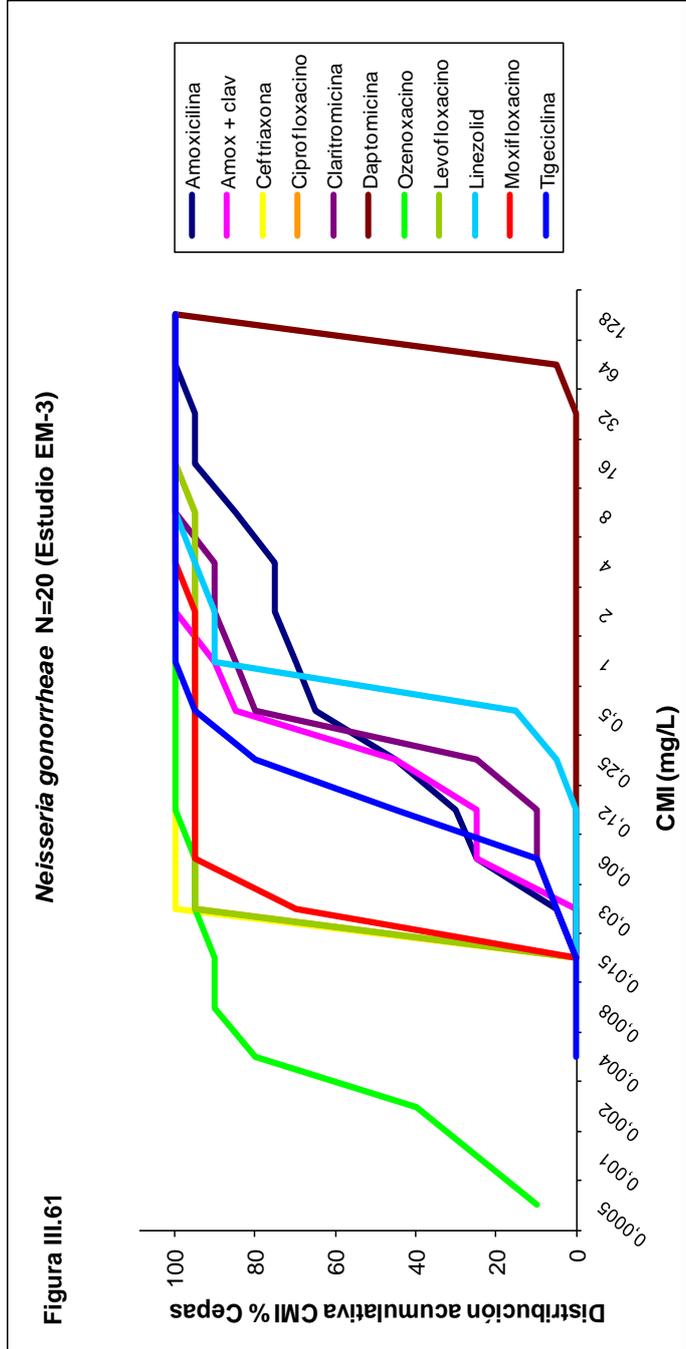
Antibióticos	Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 50 <i>Moraxella catarrhalis</i> .																		
	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicillin						36,0	2,0	10,0	2,0	0,0	0,0	0,0	10,0	10,0	20,0	10,0	0,0	0,0	
Amox + clav						36,0	14,0	12,0	8,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ceftriaxone						38,0	6,0	10,0	4,0	8,0	6,0	22,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ciprofloxacina						18,0	74,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Clarithromycin							48,0	44,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	20,0	34,0	36,0	4,0	0,0	2,0
Ozenoxacino	2,0	0,0	28,0	20,0	48,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacina						6,0	14,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Linezolid							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	94,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacina						0,0	4,0	92,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	0,0	18,0	78,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Concentraciones no testadas					Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada					Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada								

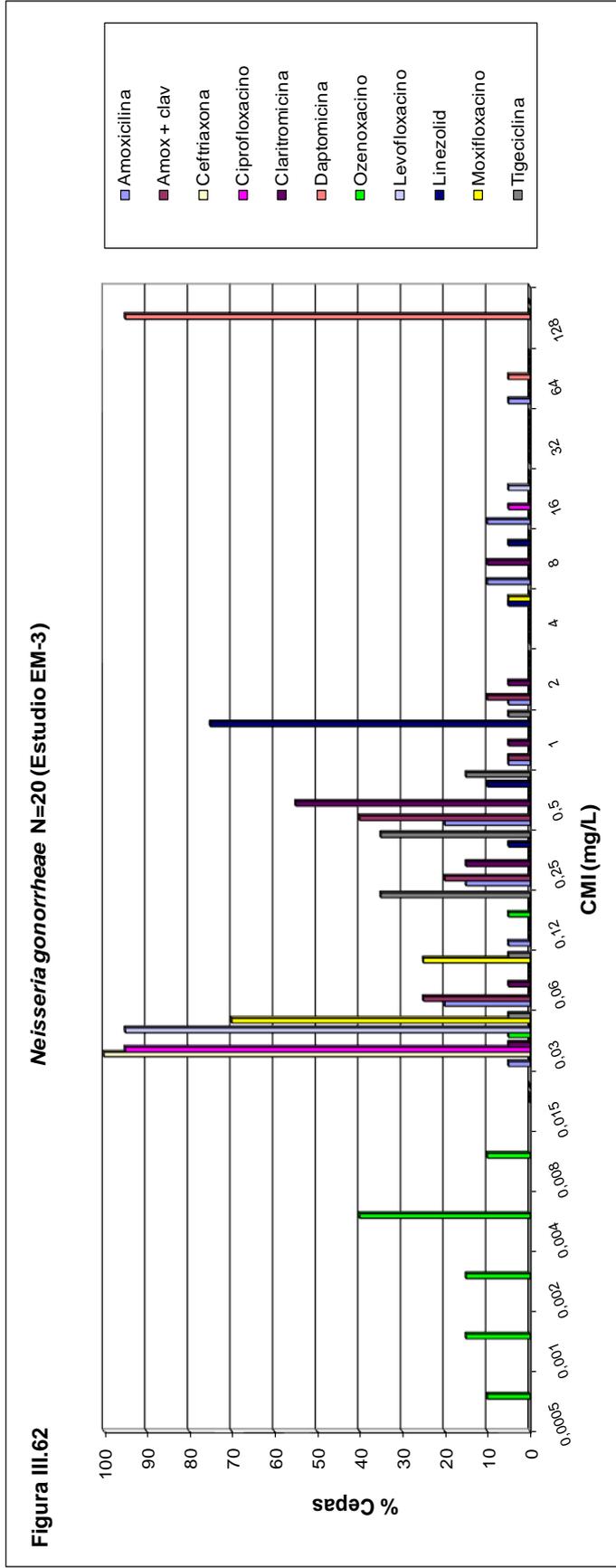




Frente a las cepas de *Moraxella catarrhalis*, como se observa en las tablas III.37 y III.39 y figuras II.59 y III.60 se observa que ozenoxacino ha sido el antibiótico con mayor actividad, seguido de ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, tigeciclina y claritromicina, frente a los cuales no se ha podido determinar la CMI para algunas cepas, ya que eran inferiores a la mínima concentración testada. Los productos con menor actividad han sido linezolid, amoxicilina y daptomicina.

Tabla III.40 Distribución de los datos de CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina							5,0	20,0	5,0	15,0	20,0	5,0	5,0	0,0	10,0	10,0	0,0	5,0	
Amox + clav							0,0	25,0	0,0	20,0	40,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ceftriaxona							100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ciprofloxacino							95,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	
Claritromicina							5,0	5,0	0,0	15,0	55,0	5,0	5,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Ozenoxacino	10,0	15,0	40,0	10,0	10,0	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	95,0
Levofloxacino							95,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	10,0	75,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino							70,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina							5,0	5,0	35,0	35,0	15,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada							Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada		



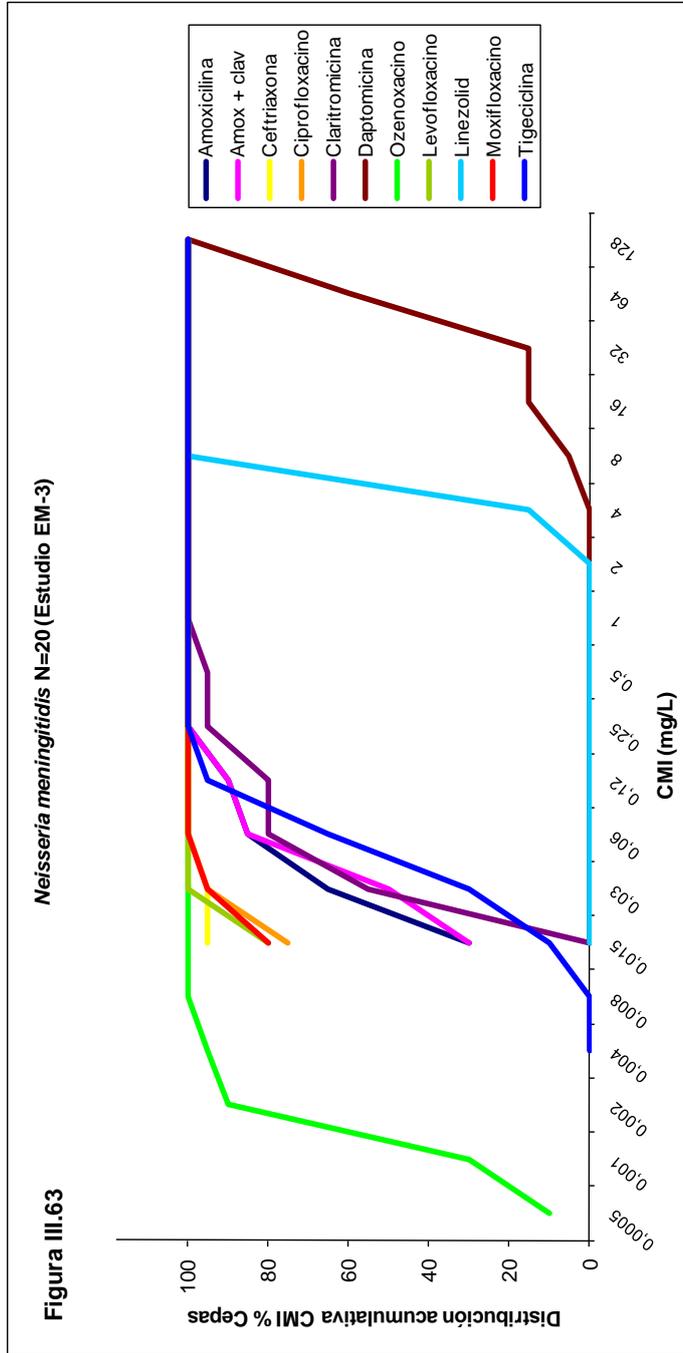


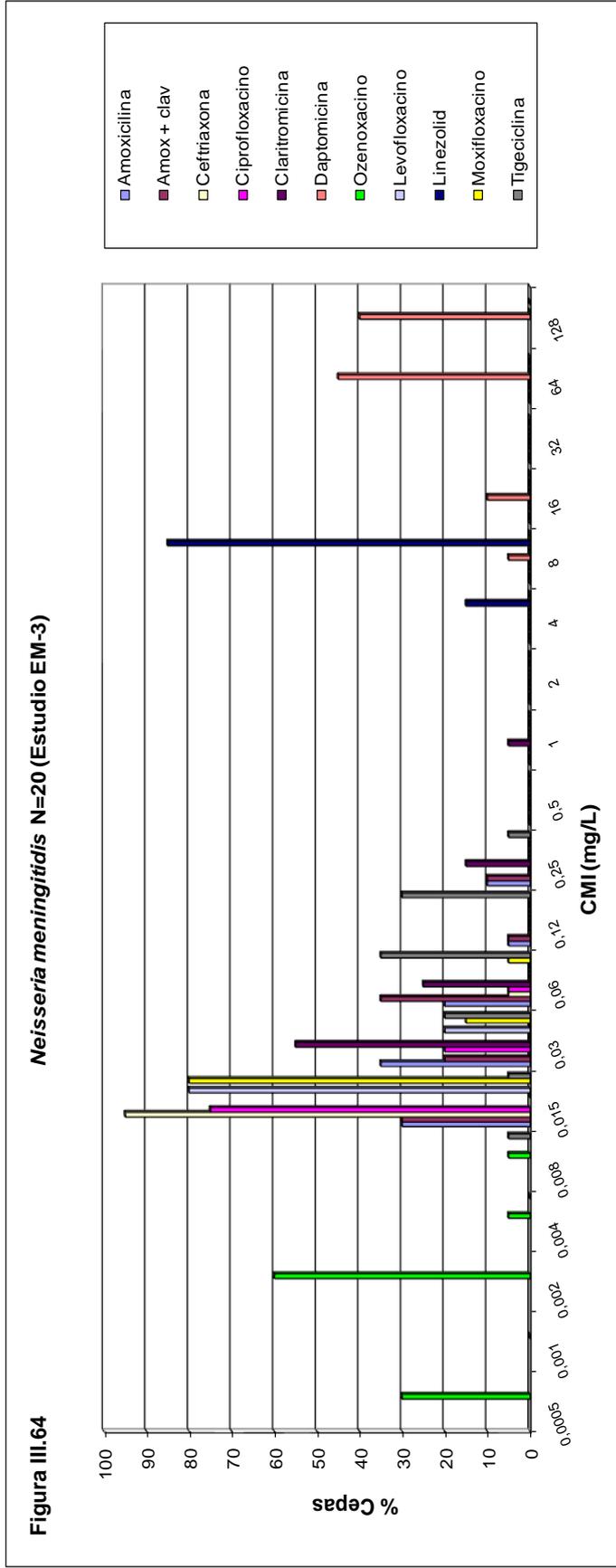
Frente a *Neisseria gonorrhoeae*, ozenoxacino ha sido el producto con mayor actividad, como se puede observar en las tablas III.37, III.40 y en las figuras III.61 y III.62, aunque para ceftriaxona, ciprofloxacino y levofloxacino, entre el 95-100% de las cepas, han indicado valores por debajo del límite inferior evaluado.

Los productos con menor actividad han sido linezolid, amoxicilina con ácido clavulánico y claritromicina, seguidos de amoxicilina sola (CMI₉₀ 16 mg/L), y finalmente, daptomicina.

Las dos cepas que se observan en la figura III.62 con CMI de 0,03 y 0,12 mg/L para ozenoxacino corresponden a la única cepa resistente a ciprofloxacino detectada (CMI de 16 mg/L, *breakpoint*/punto de corte superior a 0,5 mg/L), para la que las CMI de ozenoxacino, moxifloxacino y levofloxacino han sido de 0,12, 4 y 16 mg/L, respectivamente, y también, a una cepa para las que la CMI de linezolid y de claritromicina ha sido de 8 mg/L, y las de ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino de ≤0,03, ≤0,03 y 0,06 mg/L, respectivamente. Recordar que 0,03 mg/L es la mínima concentración que se ha evaluado para la mayoría de antibióticos.

Tabla III.41		Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 <i>Neisseria meningitidis</i>																	
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						30,0	35,0	20,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						30,0	20,0	35,0	5,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						95,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino						75,0	20,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina							55,0	25,0	0,0	15,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	45,0	40,0
Daptomicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	30,0	0,0	60,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	85,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						80,0	15,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	5,0	5,0	20,0	35,0	30,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada					Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada				





Frente a las cepas de *N. meningitidis*, ozenoxacino ha sido el compuesto más potente, tal y como se observa en las tablas III.37, III.41 y en las figuras III.63 y III.64; muy similar a ceftriaxona y las tres fluoroquinolonas, frente a las que no se ha podido determinar exactamente su actividad por debajo de 0,015 mg/L (tabla III.41). Tigeciclina, amoxicilina (con y sin ácido clavulánico) y claritromicina presentan valores superiores y, finalmente, sin actividad, linezolid y daptomicina (CMI₉₀ de 8 y 128 mg/L).

En la tabla III.42 se presentan las CMI₉₀ y el rango para ozenoxacino y los diez antibióticos comparativos frente los aerobios, Gram-positivos, *Listeria monocytogenes*, Gram-negativos, *Helicobacter pylori*, y los anaerobios, Gram-negativos, *Bacteroides fragilis*, y Gram-positivos como *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*.

Organismos (n)	Antibióticos CMI ₉₀ y Rango (mg/L)											
	CIP	LEV	MOX	AMOX	CEF	AMOCV	OZN	TIG	LNZ	DAP	CLA	
<i>L.monocytogenes</i> (20)	CMI ₉₀	1	0,5	0,5	≥64	0,5	0,06	0,125	2	2	0,125	
	Rango	0,5-2	0,25-2	0,12-1	0,06-0,5	0,06-0,5	0,008-0,125	0,015-0,12	1-8	0,015-≥128	≤0,03-4	
<i>H. pylori</i> (5)	Med geom	1	0,5	0,03	0,12	0,03	0,008	0,12	8	128	32	
	Rango	0,12-1	0,25-1	0,12-0,5	0,12-0,25	≤0,03	0,002-0,008	≤0,03-0,12	8	>128	≤0,03-32	
<i>B. fragilis</i> (20)	CMI ₉₀	16	4	64	64	16	0,12	1	4	128	2	
	Rango	2-32	0,25-32	0,12-8	2->64	0,12-16	0,015-1	0,25-8	2-4	>128	0,25-8	
<i>Cl. perfringens</i> (10)	CMI ₉₀	0,5	0,25	0,5	2	0,12	0,015	0,5	2	2	1	
	Rango	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	<0,03-2	<0,03-0,12	0,015-0,12	0,06-0,5	1-4	0,125-2	0,25-1	
<i>Cl. difficile</i> (10)	CMI ₉₀	64	64	32	64	2	2	0,06	2	2	64	
	Rango	16->64	4->64	2-32	0,5-2	32->64	1-2	<0,03-0,06	2	0,125-2	1->64	

De manera global, se observa que ozenoxacino ha presentado muy buena actividad frente a *H. pylori*, *L.monocytogenes* y *B. fragilis*. Por otro lado, ozenoxacino ha mostrado una excelente actividad frente a *C. perfringens*, mientras que ésta ha disminuido frente a las cepas testadas de *C.difficile* que han sido, a su vez, resistentes a las quinolonas y al resto de antibióticos, excepto a tigeciclina. Respecto al resto de compuestos, linezolid, daptomicina y claritromicina no han presentado actividad frente a las especies Gram-negativas y, han habido muchas cepas resistentes a amoxicilina (sola o con ác.clavulánico) y a ceftriaxona.

Los productos más activos frente a *L.monocytogenes* son ozenoxacino y tigeciclina, con CMI₉₀ de 0,06 y 0,125 mg/L, respectivamente, con unos rangos muy estrechos de actividad, seguidos de claritromicina con CMI₉₀ similar y rango mayor ($\leq 0,03$ -4mg/L). El resto de productos han presentado unas CMI₉₀ entre 0,5-2 mg/L, excepto ceftriaxona, el antibiótico con menor actividad, con una CMI₉₀ de ≥ 64 mg/L. Ozenoxacino ha sido dieciséis veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y ocho veces más activo que moxifloxacino.

Ozenoxacino ha sido el producto más activo frente a las 5 cepas de *H. pylori* testadas (rango 0,002-0,008 mg/L). Para amoxicilina, con y sin ác.clavulánico, todos los valores eran inferiores al límite mínimo testado (rango $\leq 0,03$ mg/L), y los productos que les siguen son tigeciclina y ceftriaxona (rangos $\leq 0,03$ -0,12 y 0,12-0,25 mg/L), moxifloxacino, ciprofloxacino y levofloxacino (rangos 0,12-0,5, 0,12-1 y 0,12-1 mg/L; respectivamente) y, finalmente, linezolid y daptomicina (rango 8 y ≥ 128 mg/L). Claritromicina ha presentado una muy buena actividad, igual que amoxicilina, frente a 4 de las cepas (rango $\leq 0,03$ mg/L), aunque se ha detectado una cepa que presenta resistencia a claritromicina (CMI 32 mg/L). Ozenoxacino ha demostrado mayor actividad que el resto de fluoroquinolonas (cien veces mayor actividad que ciprofloxacino y levofloxacino, y sesenta y cuatro veces mejor que moxifloxacino), hecho que no había ocurrido en las otras especies.

Ozenoxacino ha presentado una actividad significativamente mayor que el resto de compuestos frente a *B. fragilis*, con las CMI más bajas (CMI₉₀ 0,12 mg/L y rango 0,015-1 mg/L). Los compuestos que le siguen han obtenido CMI diez veces más altas: tigeciclina, moxifloxacino y claritromicina (CMI₉₀ 1, 2 y 2 mg/L y rangos de 0,12 a 8 mg/L). La CMI₉₀ para levofloxacino y linezolid ha sido de 4mg/L, y la del resto de antibióticos con valores de 16 mg/L, ciprofloxacino y amoxicilina con ác.clavulánico, de 64 mg/L, amoxicilina y ceftriaxona, y daptomicina con 128 mg/L daptomicina no han resultado ser activos frente a estas cepas. La diferencia entre las quinolonas ha sido a favor de ozenoxacino, a pesar de ser bacterias gram-negativas, siendo unas cien veces mejor que ciprofloxacino y levofloxacino, y dieciséis que moxifloxacino.

Frente a las cepas testadas de *C.difficile*, tigeciclina es el compuesto que ha presentado mejor actividad (CMI₉₀ 0,06 mg/L y rango $\leq 0,03$ -0,06 mg/L). Con menor actividad le han seguido daptomicina, ozenoxacino, amoxicilina sola y con ác.clavulánico y linezolid (CMI₉₀ 2 mg/L y rangos entre $\leq 0,03$ -4 mg/L). No han presentado actividad, con unas CMI₉₀ muy elevadas, ceftriaxona, ciprofloxacino, levofloxacino y claritromicina (64 mg/L) y moxifloxacino (32 mg/L). Ozenoxacino ha demostrado poseer una relevante mejor actividad que el resto de fluoroquinolonas, con, al menos, treinta y dos veces menor CMI que levofloxacino y ciprofloxacino, y dieciséis veces menos que la de moxifloxacino, frente a estas cepas.

Las cepas de *C. perfringens* son todas más sensibles a los antibióticos testados. Ozenoxacino es el antibiótico con mayor actividad (CMI₉₀ 0,015 mg/L, rango 0,015-0,12 mg/L), seguido de amoxicilina sola y con ác.clavulánico (CMI₉₀ 0,06 y 0,012 mg/L, rango $\leq 0,03$ -0,12 mg/L), de levofloxacino, tigeciclina, moxifloxacino y ciprofloxacino (CMI₉₀ de 0,25 y 0,5 mg/L, rangos entre 0,06-0,5 mg/L), de claritromicina, ceftriaxona, daptomicina y linezolid (CMI₉₀ de 2 mg/L y rangos entre $\leq 0,03$ -4 mg/L). Ozenoxacino posee una actividad dieciséis veces mejor que la de levofloxacino.

Antibióticos	Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 <i>Listeria monocytogenes</i>																		
	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina						0,0	0,0	5,0	10,0	65,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav						0,0	0,0	5,0	15,0	55,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	40,0	15,0	5,0	5,0	10,0	15,0	0,0
Ciprofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	40,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Clarithromicina							10,0	45,0	40,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Daptomicina						5,0	0,0	0,0	5,0	5,0	35,0	15,0	30,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	20,0	60,0	10,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	20,0	70,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0	50,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	5,0	55,0	35,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina				0,0	0,0	5,0	10,0	40,0	45,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

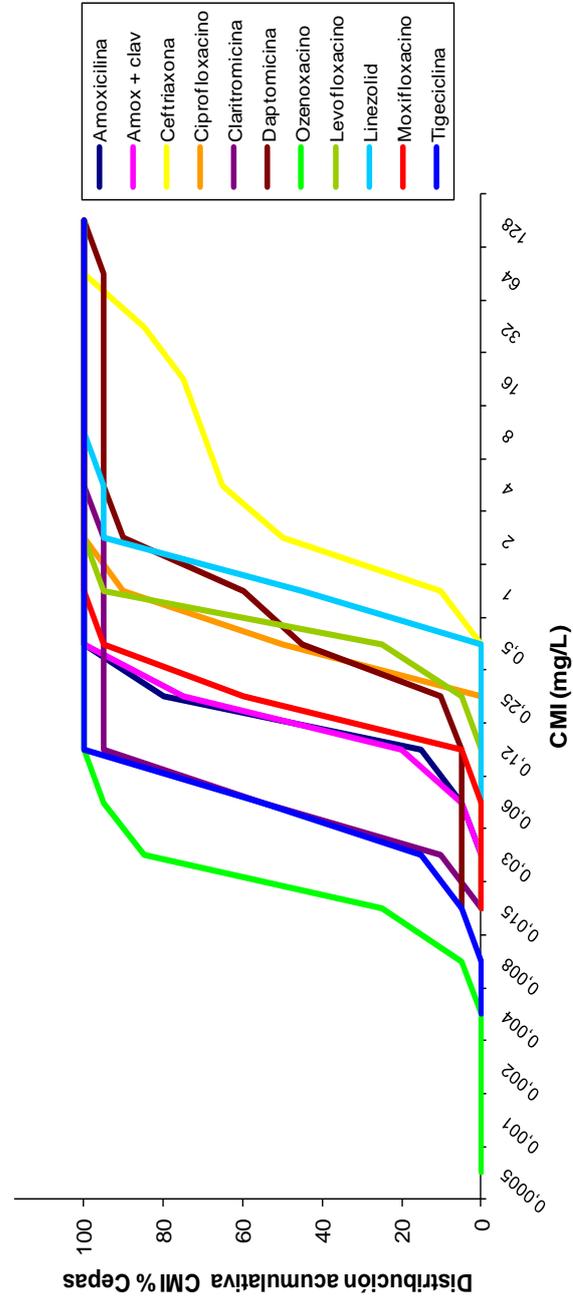
Concentraciones no testadas

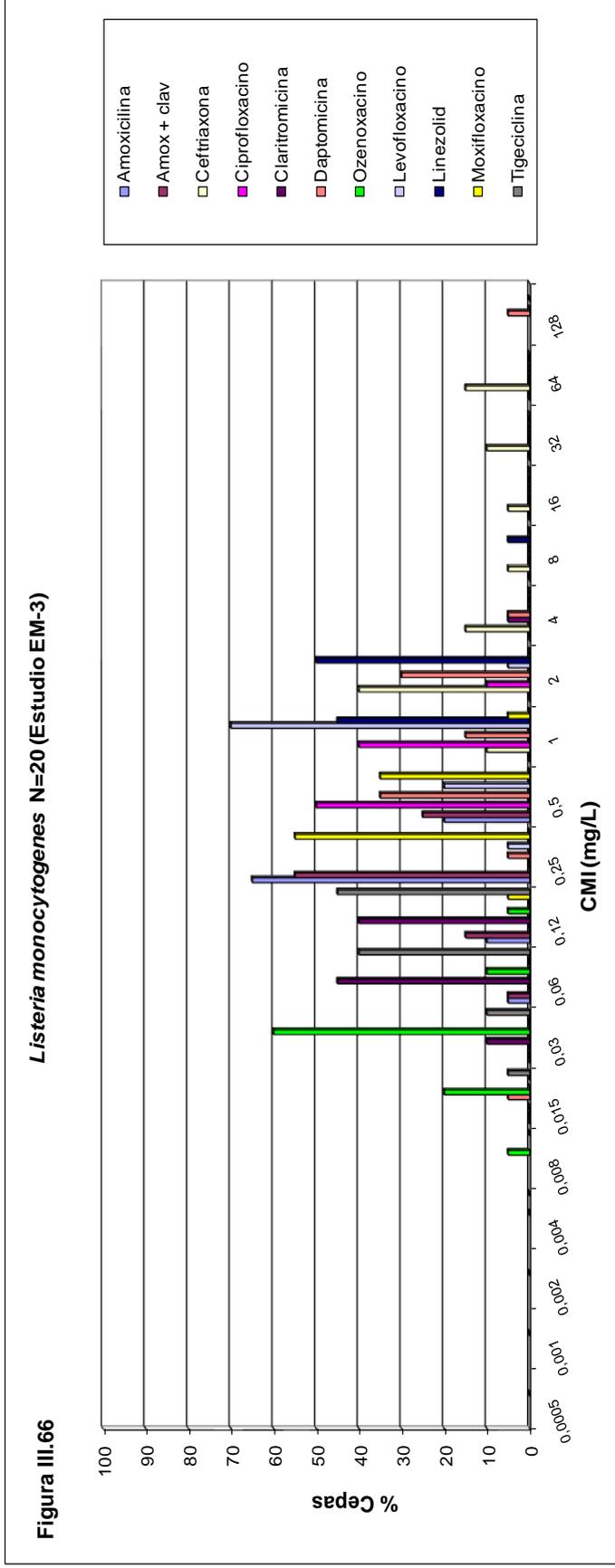
Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada

Figura III.65

Listeria monocytogenes N=20 (Estudio EM-3)





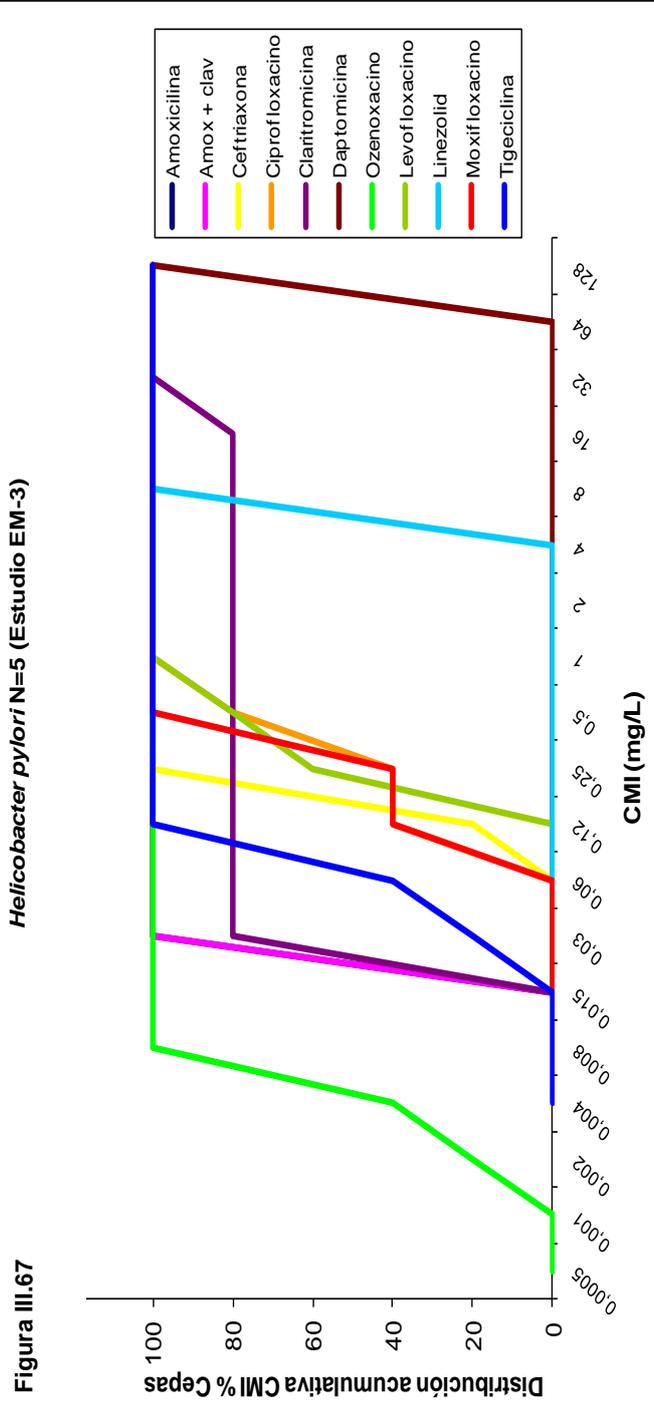
Tal y como se observa en las tablas III.42 y III.43, y figuras III.65 y III.66, ozenoxacino seguido de tigeciclina, son los productos más activos, seguidos de claritromicina, con una CMI₉₀ similar, pero con un rango mayor ($\leq 0,03-4\text{mg/L}$). El resto de productos han presentado actividad intermedia, excepto ceftriaxona frente a la que muchas cepas poseen CMI elevadas. Un 5% de las cepas han presentado valores elevados para claritromicina, linezolid y daptomicina.

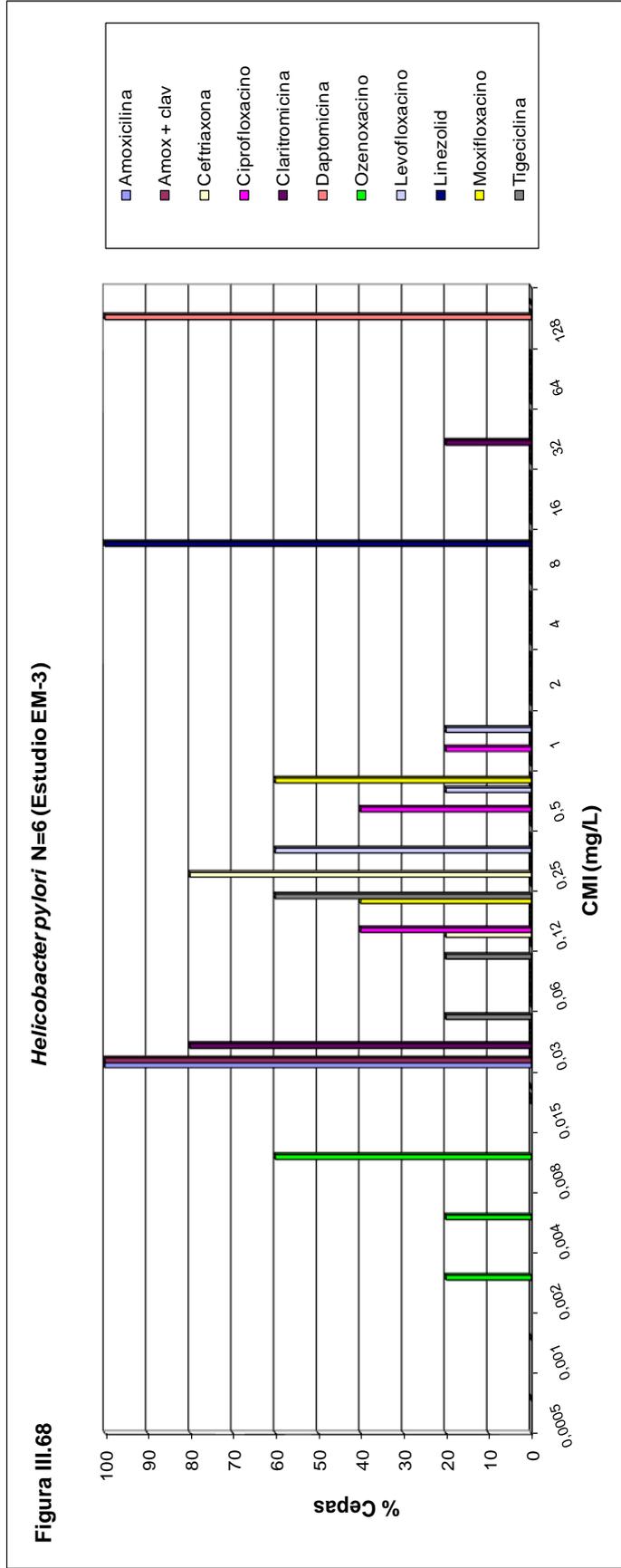
Antibióticos	Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 5 <i>Helicobacter pylori</i> .																		
	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina							100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav							100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona							0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino							0,0	0,0	40,0	0,0	40,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Claritromicina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	20,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino							0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino							0,0	0,0	40,0	0,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina							20,0	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada





Ozenoxacino ha sido el producto que ha presentado mejor actividad frente a las 5 cepas de *H. pylori* testadas, tal y como se observa en las tablas III.42, III.44 y en las figuras III.67 y III.68, aunque amoxicilina, con y sin ácido clavulánico, están infravalorados, ya que no se ha podido determinar el valor exacto de CMI₉₀, por ser inferiores al límite mínimo testado de 0,03 mg/L (tabla III.44). El resto de productos presentan una moderada actividad excepto linezolid y daptomicina (rango 8 y ≥ 128 mg/L). Claritromicina ha presentado una muy buena actividad, igual que amoxicilina, frente a 4 de las cepas (rango $\leq 0,03$ mg/L), aunque se ha detectado una cepa que presenta resistencia a claritromicina (CMI 32 mg/L).

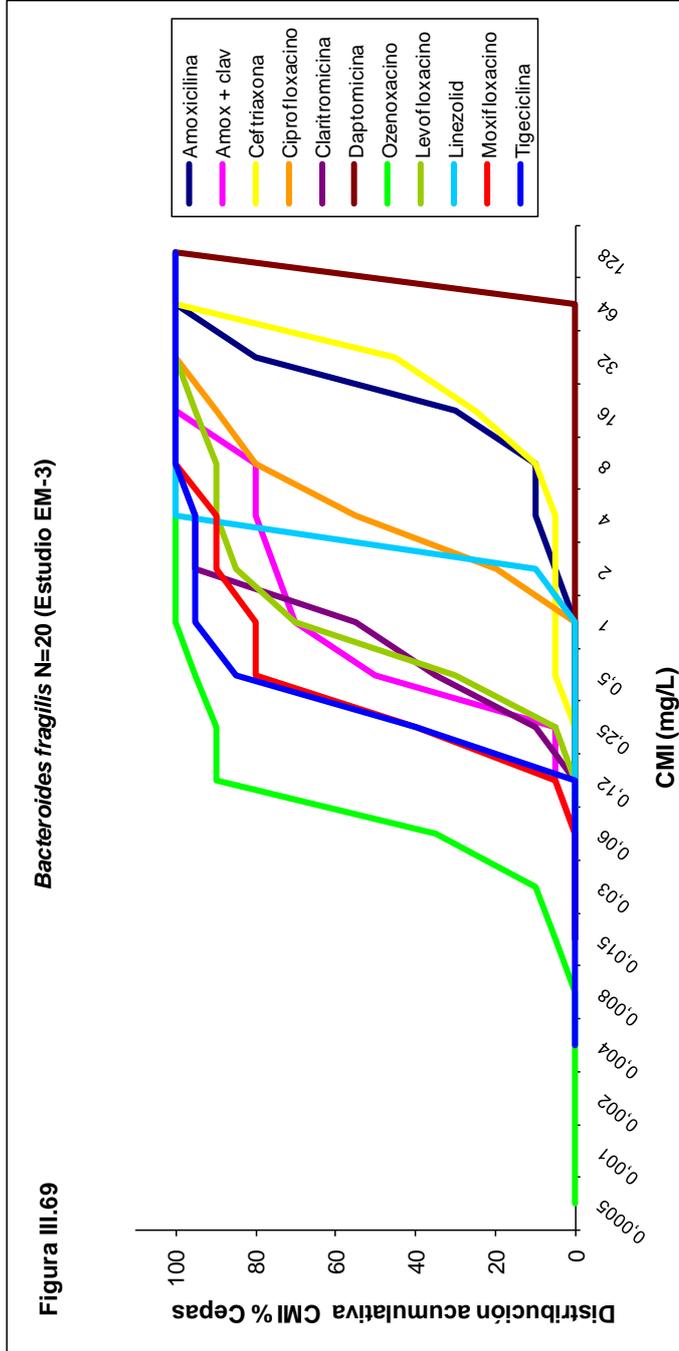
Ozenoxacino se desmarca, considerablemente, con mejor actividad que el resto de quinolonas (figura III.67).

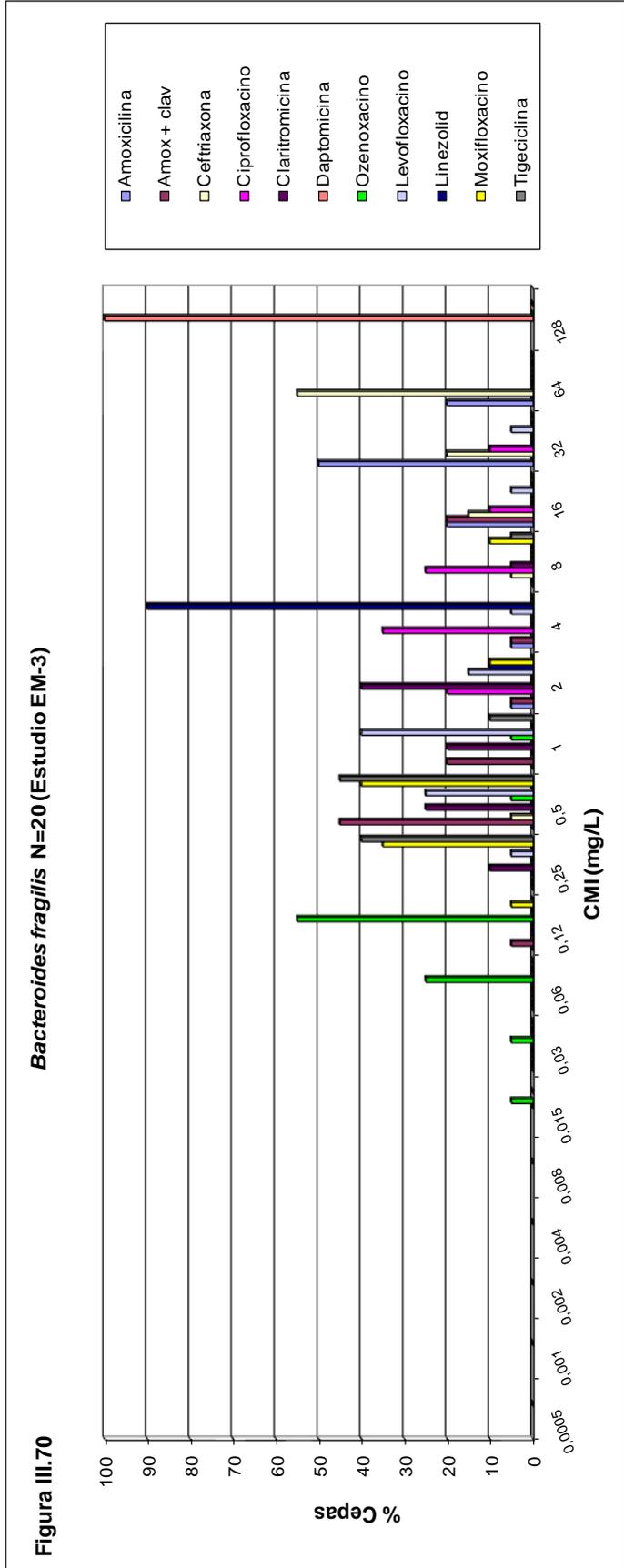
Tabla III.45. Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 20 <i>Bacteroides fragilis</i>																			
Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																		
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amoxicilina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	20,0	50,0	20,0	
Amox + clav							0,0	0,0	5,0	0,0	45,0	20,0	5,0	5,0	0,0	20,0	0,0	0,0	
Ceftriaxona							0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	15,0	20,0	55,0	
Ciprofloxacino							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	35,0	25,0	10,0	10,0	0,0	
Claritromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Daptomicina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	25,0	55,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ozenoxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	25,0	40,0	15,0	5,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	5,0	35,0	40,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tigeciclina						0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	45,0	10,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Concentraciones no testadas

Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada





Los resultados muestran que ozenoxacino ha presentado una actividad significativamente mayor que el resto de compuestos frente a *B. fragilis*, tal y como se observa en las tablas III.42, III.45 y en las figuras III.69 y III.70. Tigeciclina, moxifloxacino y claritromicina son los compuestos que le siguen pero consiguen inhibir el crecimiento de todas las cepas a concentraciones moderadamente elevadas. En la figura III.69 se observa como se desmarca la actividad de ozenoxacino de la del resto de quinolonas, y en la III.70 la cantidad de cepas con CMI elevadas para los distintos antibióticos.

Tabla III.46 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 10 *Clostridium difficile*

Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																			
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Amoxicilina							0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	60,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amox + clav							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftriaxona							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0
Ciprofloxacino							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	90,0	0,0	0,0
Claritromicina							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	10,0	40,0	20,0	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Levofloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Linezolid						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moxifloxacino						0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	20,0	70,0	0,0	0,0
Tigeciclina						80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

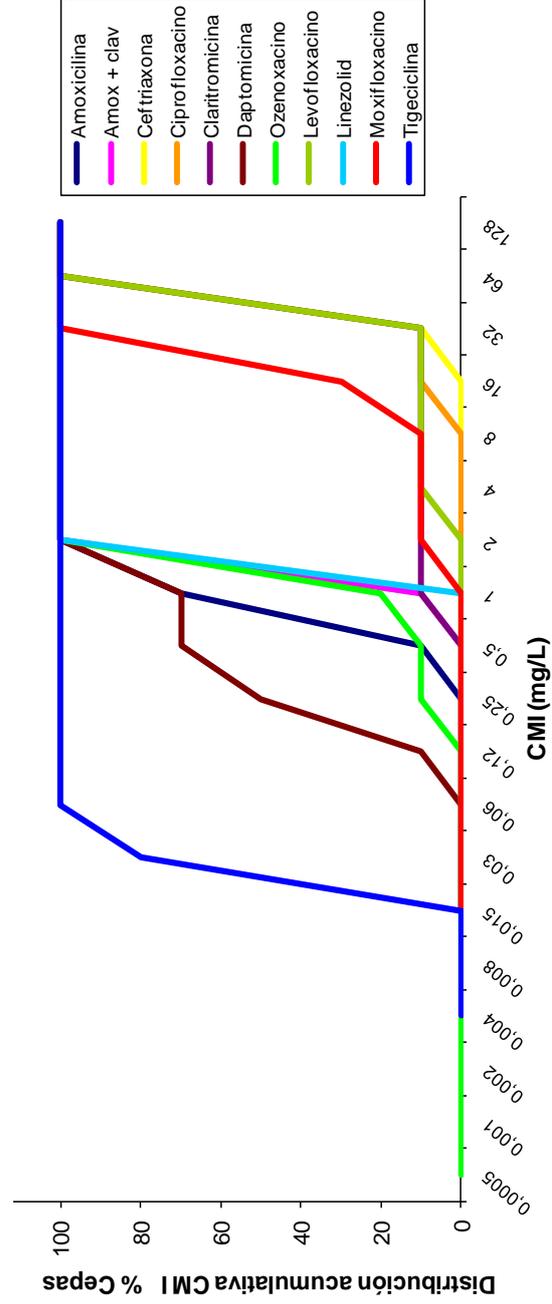
Concentraciones no testadas

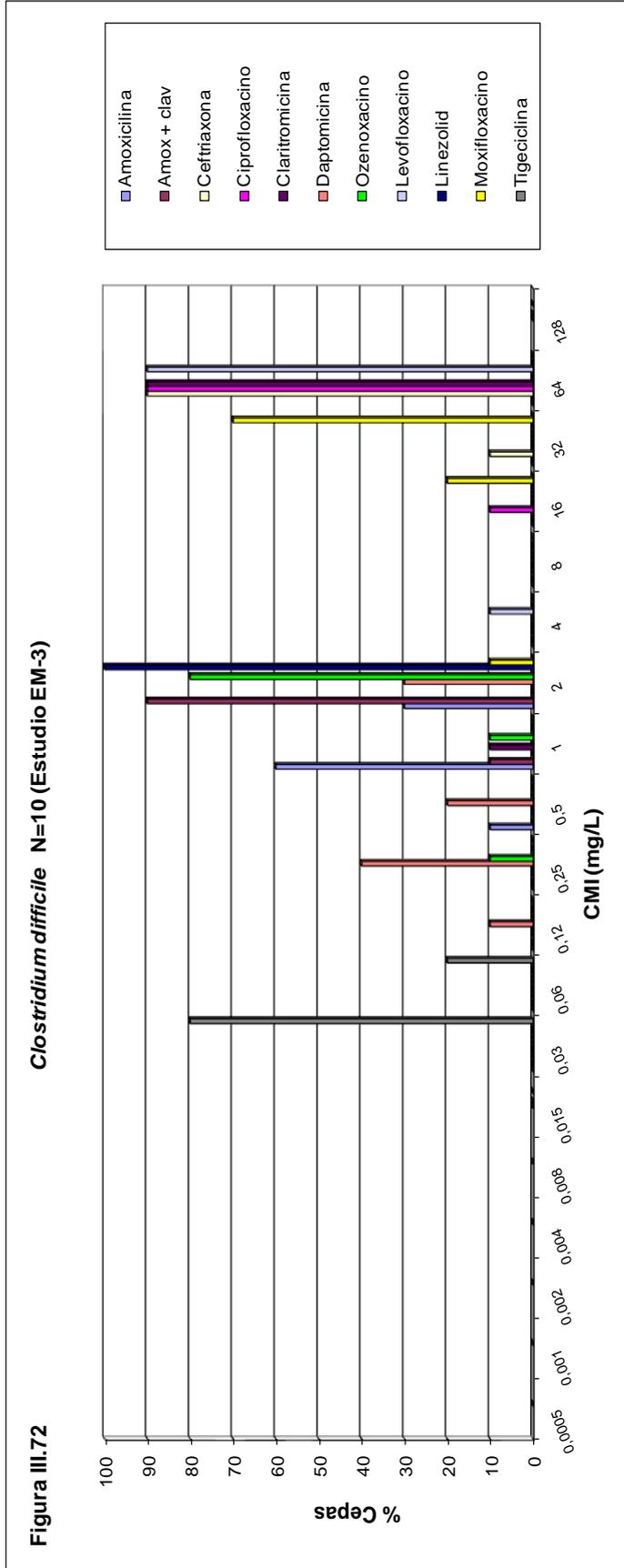
Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada

Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada

Figura III.71

Clostridium difficile N=10 (Estudio EM-3)

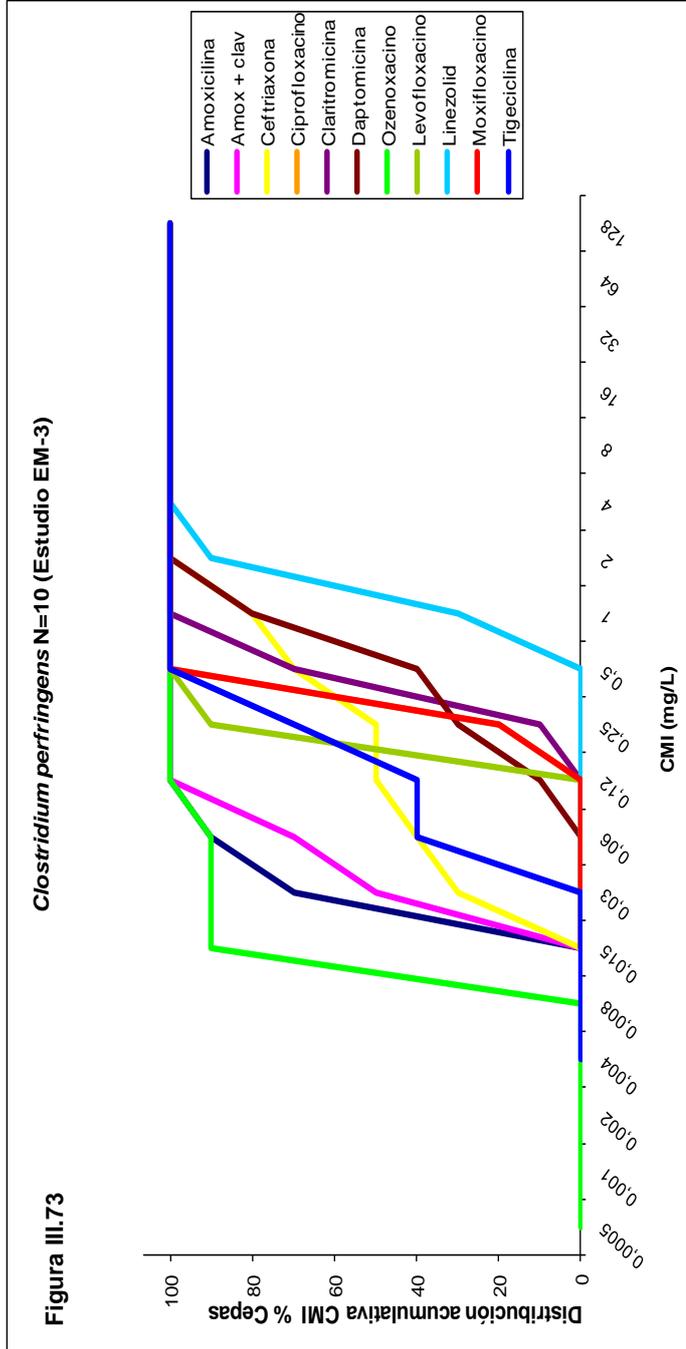


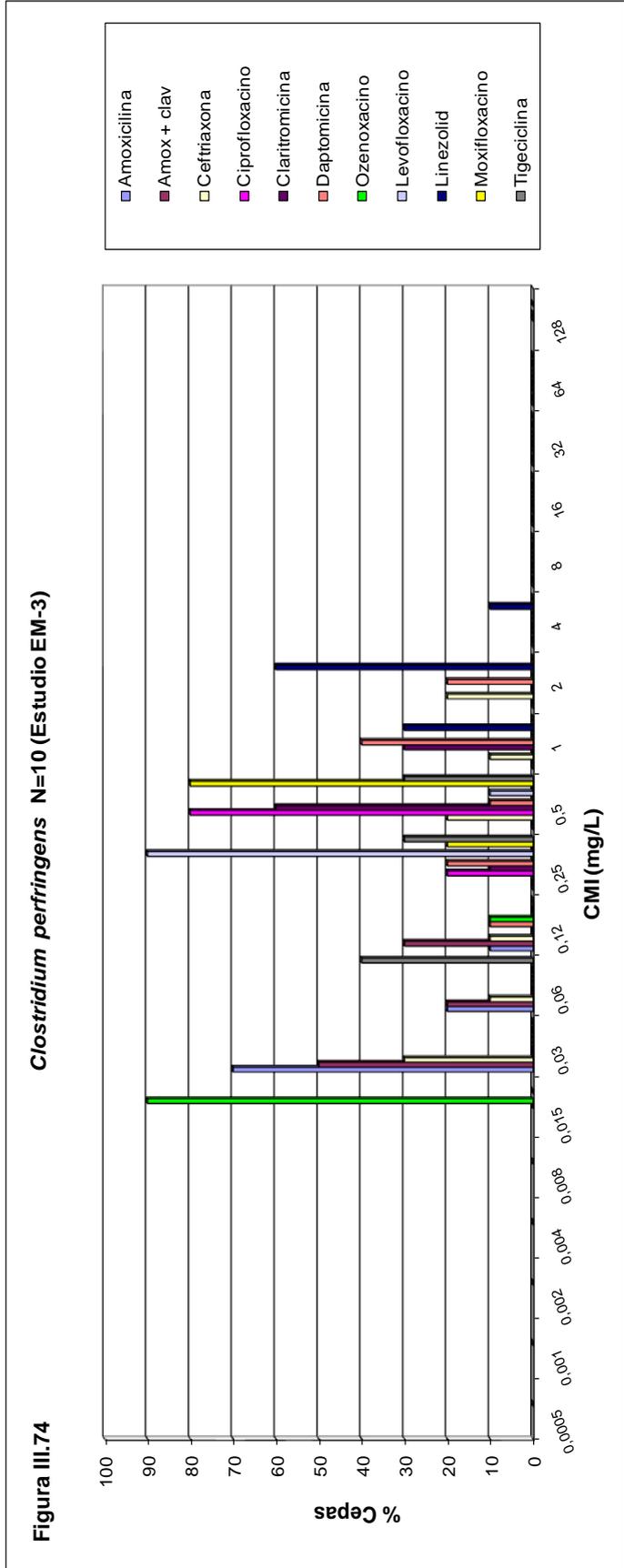


Frente a las cepas testadas de *C. difficile*, tigeciclina se desmarca con una excelente actividad, muy separada de la del resto de compuestos, como se observa en la tabla III.46, el 80% de las cepas presentan CMI inferiores a la mínima concentración testada. A distancia le siguen daptomicina, ozenoxacino, amoxicilina sola y con ácido clavulánico y linezolid, como se observa en las figuras III.71 y III.72. No han presentado actividad ceftriaxona, ciprofloxacino, levofloxacino y claritromicina y moxifloxacino, con CMI por encima de las máximas concentraciones testadas (tabla III.46). Ozenoxacino ha demostrado poseer mejor actividad que el resto de fluoroquinolonas, con, al menos, treinta y dos veces menor CMI₉₀ que levofloxacino y ciprofloxacino, y dieciséis menor que la de moxifloxacino, frente a estas cepas.

Tabla III.47 Distribución de las CMI para ozenoxacino y comparadores frente a 10 *Clostridium perfringens*.

Antibióticos	Porcentaje de aislados con CMI (mg/L)																												
	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128										
Amoxicilina							70,0	20,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Amox + clav							50,0	20,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Ceftriaxona							30,0	10,0	10,0	0,0	20,0	10,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Ciprofloxacino							0,0	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Claritromicina							0,0	0,0	0,0	10,0	60,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Daptomicina						0,0	0,0	0,0	10,0	20,0	10,0	40,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Ozenoxacino	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	90,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Levofloxacino							0,0	0,0	0,0	90,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Linezolid							0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	60,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Moxifloxacino							0,0	0,0	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Tigeciclina							0,0	40,0	0,0	30,0	30,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0										
Concentraciones no testadas										Incluye cepas con CMI ≤ concentración mostrada										Incluye cepas con CMI ≥ concentración mostrada									





Tal y como se observa en las tabla III.47 y en las figuras III.73 y III.74, las cepas de *C. perfringens* poseen un perfil de susceptibilidad diferente al de las cepas de *C. difficile* anteriormente descritas. Son todas más sensibles a los antibióticos testados, la máxima CMI detectada ha sido de 4 mg/L, y ha sido para linezolid, y de 2mg/L, para ceftriaxona, linezolid y daptomicina.

Ozenoxacino presenta una excelente actividad, mayor que la del resto de compuestos (figura III.73), aunque amoxicilina sola y con ácido clavulánico poseen más del 50% de las cepas con CMI infra-valoradas, inferiores a 0,03 mg/L. La mayoría de compuestos poseen una buena actividad, como levofloxacino, tigeciclina, moxifloxacino y ciprofloxacino. Ozenoxacino posee una CMI₉₀ dieciséis veces menor que la de levofloxacino.

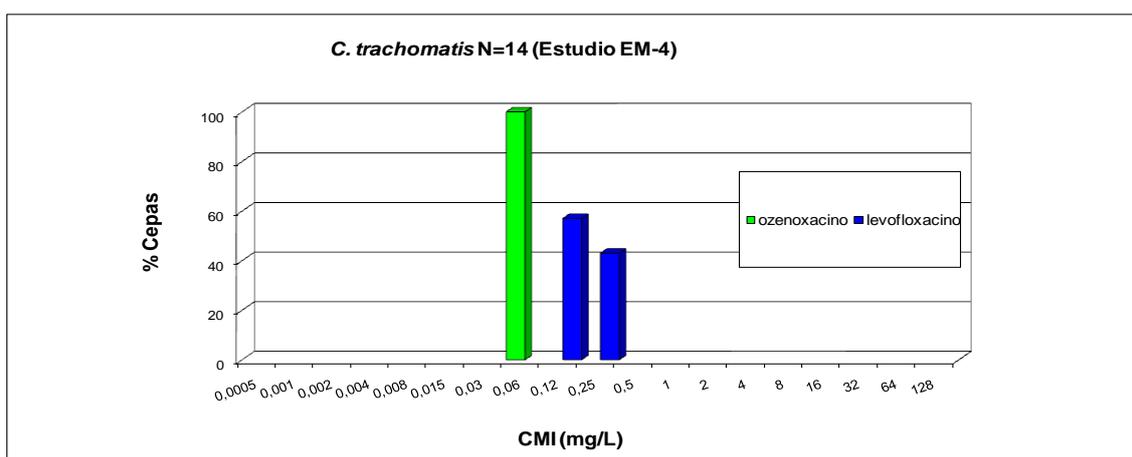
III.2.4. Resultados del Estudio EM-4

Tabla III.48: Resumen de las CMI para ozenoxacino, levofloxacino o rifampicina frente a patógenos atípicos.

Tabla III.48. Actividad de ozenoxacino y comparadores, frente a patógenos atípicos				
Patógenos (N)	Antibióticos	CMI (mg/L)		
		50%	90%	Rango
<i>C. trachomatis</i> (14)	Ozenoxacino	-	≤0,06	≤0,06
	Levofloxacino	-	0,12	0,12 – 0,25
<i>C. pneumoniae</i> (5)	Ozenoxacino	-	0,015	0,015
	Levofloxacino	-	0,5	0,5
<i>M. pneumoniae</i> (20)	Ozenoxacino	0,06	0,06	0,06 – 0,25
	Levofloxacino	0,5	1	0,25 – 4
<i>M. hominis</i> (27)	Ozenoxacino	0,03	0,12	0,03– 0,12
	Levofloxacino	0,25	0,5	0,06 – 2
<i>U. urealyticum</i> (20)	Ozenoxacino	0,06	0,12	0,015 – 0,25
	Levofloxacino	0,5	1	0,5 - 2
<i>M. tuberculosis</i> (12)	Ozenoxacino	-	0,25	0,12 – 0,5
	Rifampicina	-	0,5	0,06 – 2
<i>L. pneumophila</i> (26)	Ozenoxacino	0,001	0,001	≤0,0005 – 0,002
	Levofloxacino	0,008	0,008	0,004 – 0,008

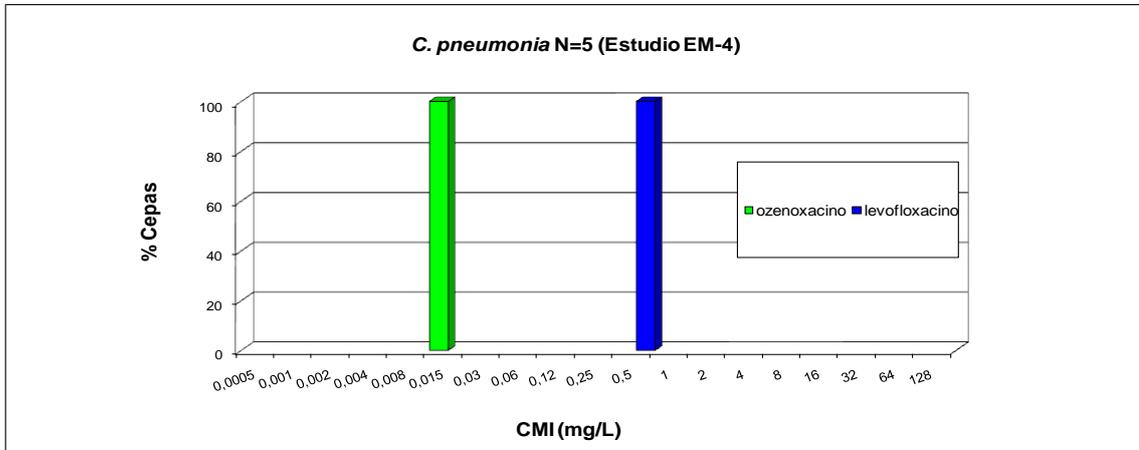
En la tabla III.48, con el resumen de los resultados para los patógenos atípicos, se puede observar que ozenoxacino posee buena actividad frente a todas las cepas de las siete especies estudiadas, siempre en unos rangos muy estrechos y por debajo de 0,25 mg/L. Se ha utilizado como comparativo levofloxacino para *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp, *Ureaplasma* spp. y *Legionella* spp., y rifampicina para *Mycoplasma pneumoniae*. Las CMI de ozenoxacino son siempre más bajas que las de levofloxacino y rifampicina, entre 10 y 100 veces, excepto para *Mycoplasma hominis* y *Mycobacterium tuberculosis*, que son de una y dos diluciones, respectivamente.

Figura III.75: Actividad de ozenoxacino y levofloxacino frente a 14 cepas de *Chlamydia trachomatis*



Ozenoxacino ha sido más activo que levofloxacino frente a todas las cepas, aunque no se han establecido los *end-points* de las CMI de ozenoxacino frente a *C. trachomatis*, porque la mínima concentración evaluada ha sido de 0,06 mg/L y todos los valores de CMI han resultado ser inferiores a este valor.

Figura III.76: Actividad de ozenoxacino y levofloxacino frente a 5 cepas de *Chlamydomphila pneumoniae*.



Al investigar con *C. pneumoniae*, se utilizó un rango inferior de concentraciones con el que se han obtenido unas CMI de 0,015 mg/L frente a las 5 cepas. Este nivel de actividad ha sido 30 veces mejor que el de levofloxacino para las mismas cepas.

Figura III.77: Actividad de ozenoxacino y levofloxacino frente a 20 *Mycoplasma pneumoniae*.

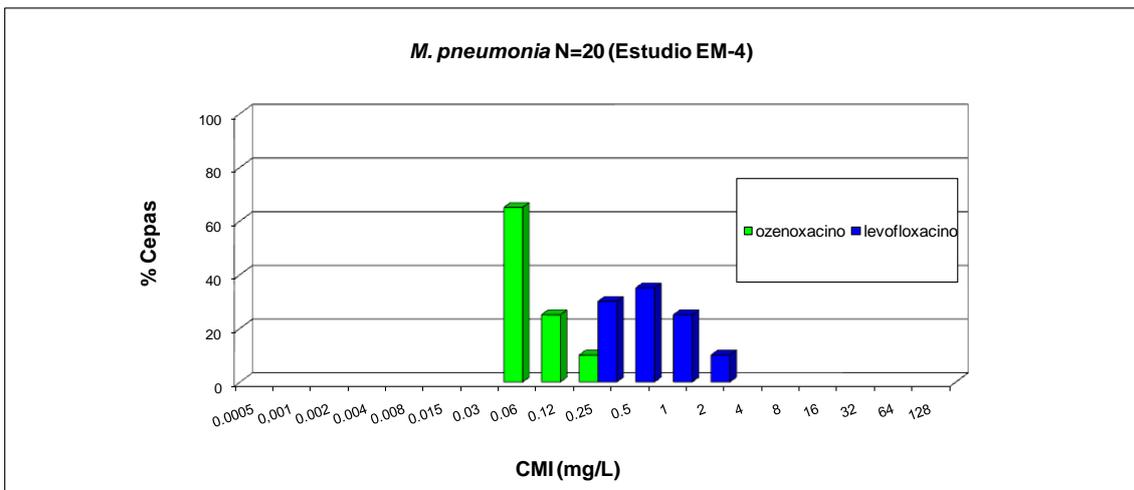
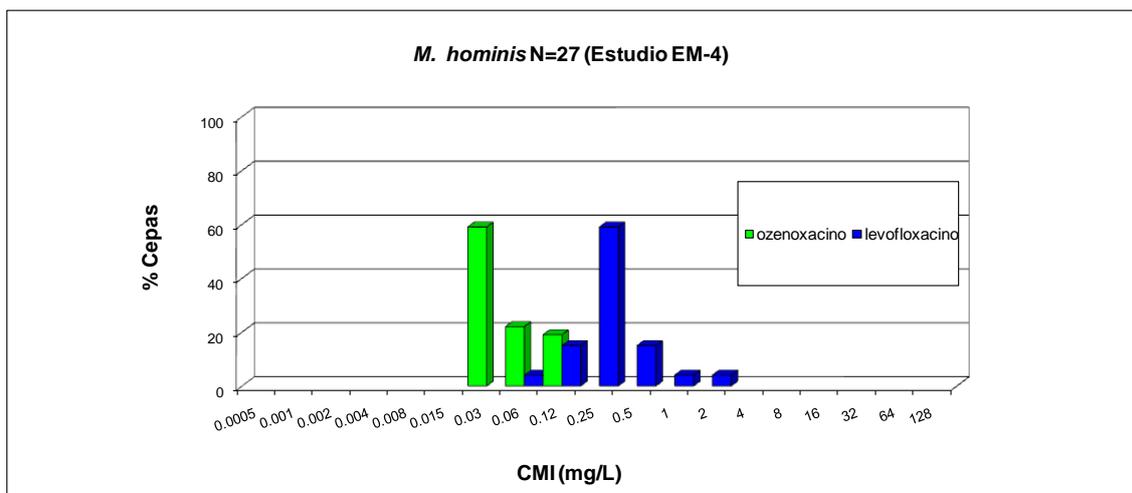
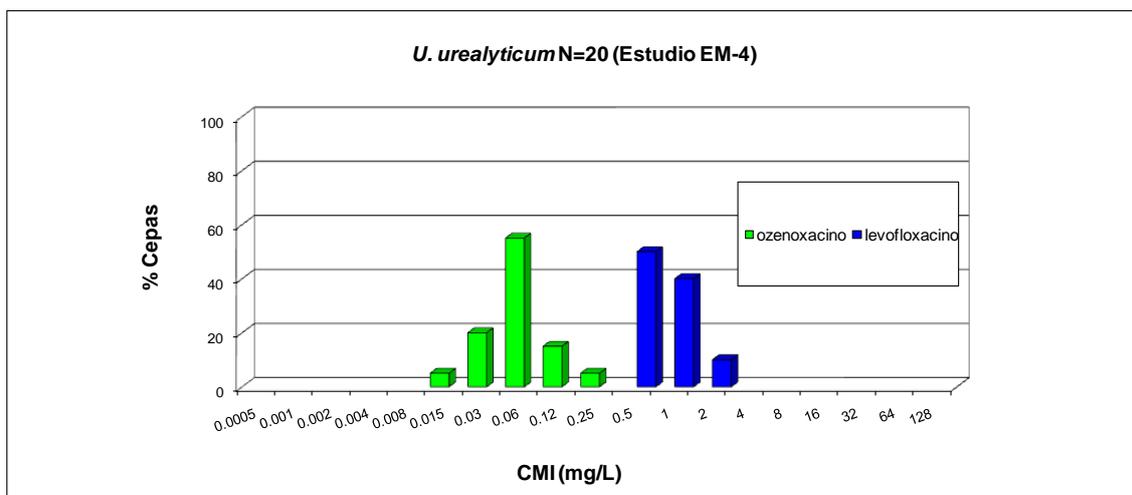


Figura III.78: Actividad de ozenoxacino y levofloxacino frente a 27 *Mycoplasma hominis*.



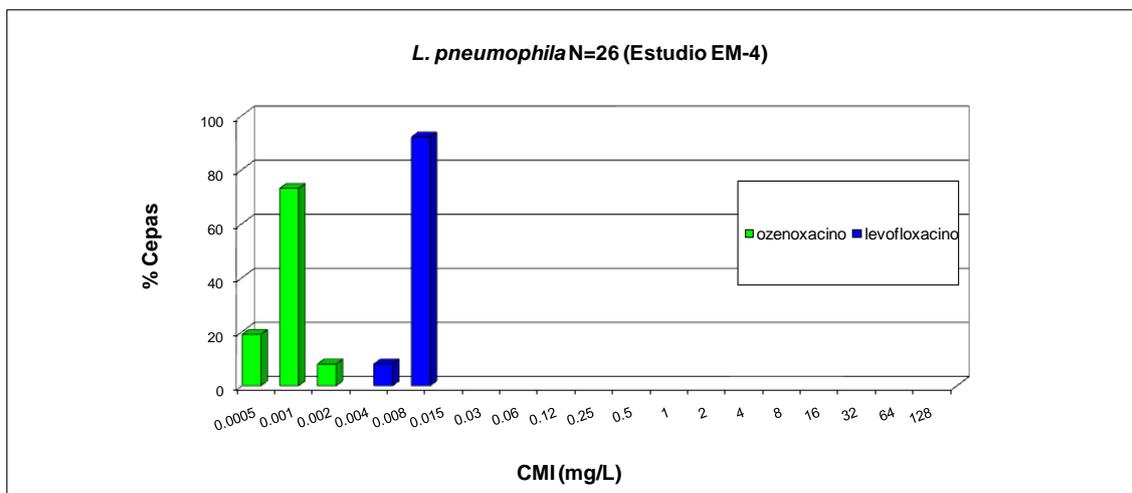
Las cepas de las dos especies de *Mycoplasma spp.* han sido más sensibles a ozenoxacino que a levofloxacino, *M. hominis* con de CMI₉₀ de 0,12 mg/L mientras que para *M. pneumoniae* ha sido de 0,06 mg/L.

Figura III.79: Actividad de ozenoxacino y levofloxacino frente a 20 *Ureaplasma urealyticum*



Ozenoxacino ha sido más potente frente a *U. urealyticum* que levofloxacino (CMI₉₀ de 0,12 y 1 mg/L, respectivamente).

Figura III.80: Actividad de ozenoxacino y levofloxacino frente a 26 *Legionella pneumophila*.



Ambas quinolonas han sido muy activas frente a *L. pneumophila* y, de nuevo, ozenoxacino ha sido más potente con CMI tan bajas como $\leq 0,0005$ mg/L.

Figura III.81: Actividad de ozenoxacino y rifampicina frente a 12 *Mycobacterium tuberculosis*.

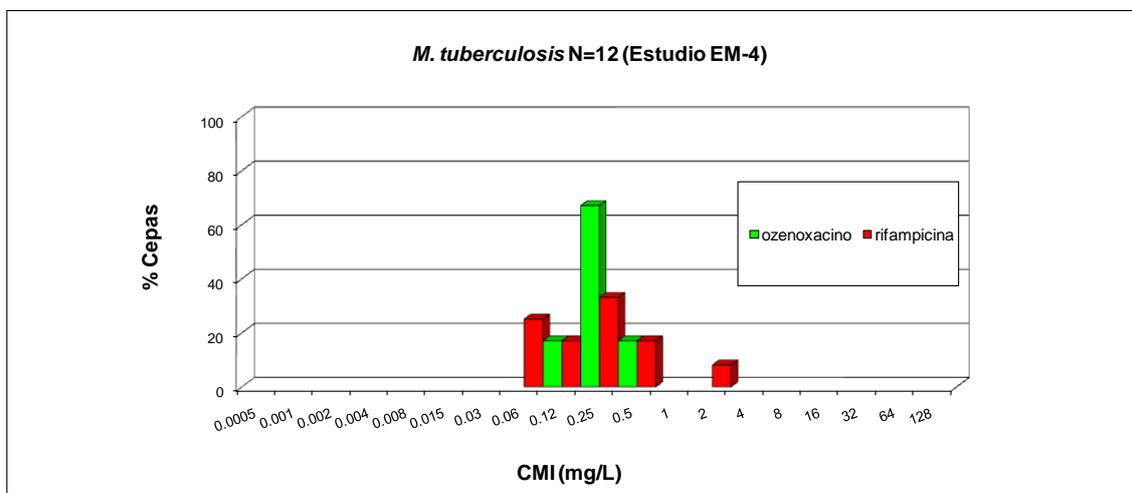


Tabla III.49: Actividad de ozenoxacino y rifampicina frente a 12 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla III.49. Actividad de ozenoxacino y rifampicina frente a cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .		
Cepas (ID)	CMI (mg/L)	
	ozenoxacino	rifampicina
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-1)	0,25	0,12
<i>M. tuberculosis</i> (resistente a rifampicina) (Mt-ID-2)	0,25	2
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-3)	0,25	0,06
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-4)	0,25	0,5
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-5)	0,25	0,25
<i>M. tuberculosis</i> (resistente a isoniazida) (Mt-ID-6)	0,25	0,5
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-7)	0,25	0,25
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-8)	0,25	0,12
<i>M. tuberculosis</i> (resistente a estreptomina y isoniazida) (Mt-ID-9)	0,5	0,25
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-10)	0,5	0,25
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-11)	0,12	0,06
<i>M. tuberculosis</i> (Mt-ID-12)	0,12	0,06

En la tabla III.81 se puede observar que ozenoxacino posee una buena actividad frente a *M. tuberculosis*, y que ésta no se ve afectada en cepas con resistencia a rifampicina, isoniazida o estreptomina.

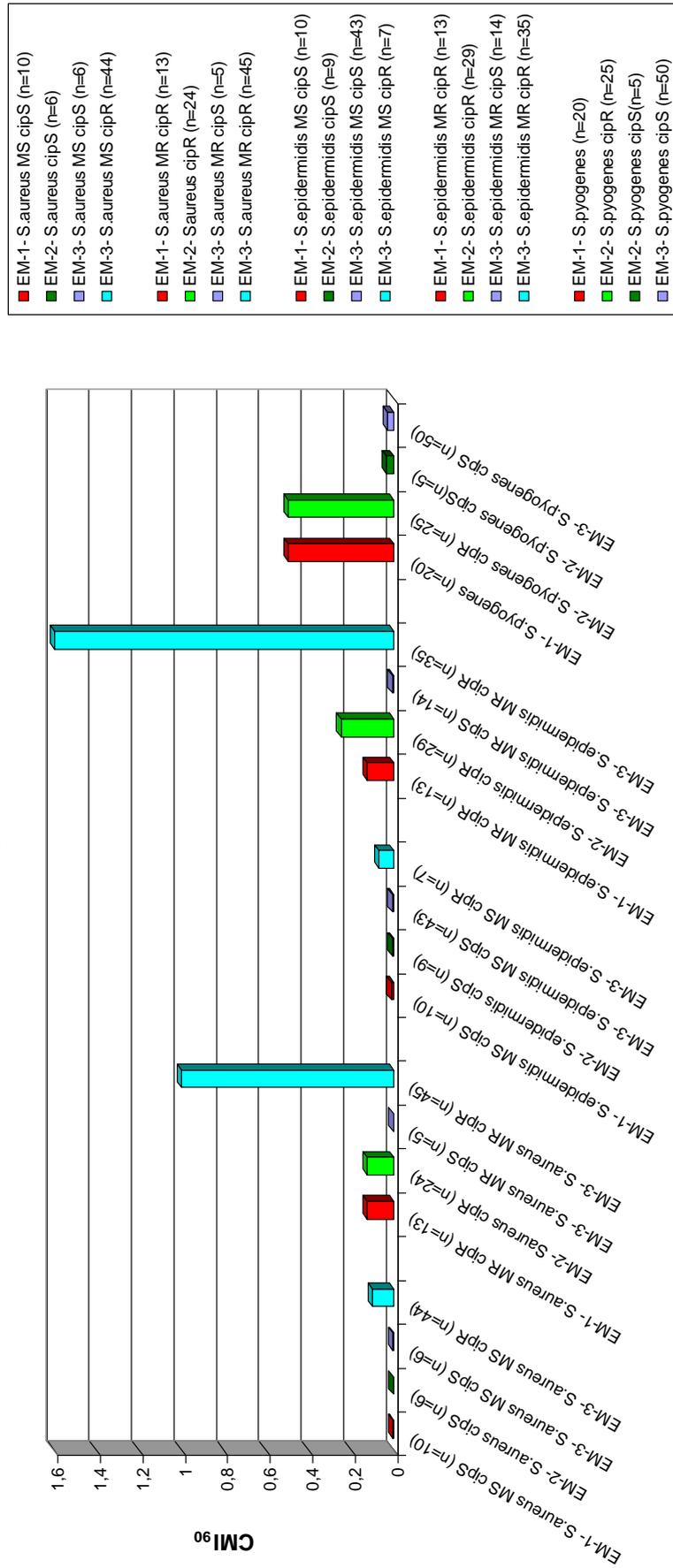
La actividad de ozenoxacino frente a *M. tuberculosis* fue comparable a la de rifampicina, como se observa en la figura III.81 y en la tabla III.49, con los datos individuales.

II.2.5. Resultados comparativos actividad de ozenoxacino entre las cepas de patógenos Gram-positivos de infecciones de piel de los estudios EM-1, EM-2 y EM-3.

Se muestran en la figura III.82, los datos de actividad de ozenoxacino frente a las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes* de los diferentes estudios, aisladas entre 2001 y 2006. Las cepas se subdividen en sensibles o resistentes a metilina, y/o en sensibles y resistentes a ciprofloxacino, en función de la información disponible.

Figura III.82. Actividad de ozenoxacino frente a los patógenos más comunes de SSSIs.

Actividad de ozenoxacino frente a cepas de *S.aureus*, *S.epidermidis* y *S.pyogenes* (cepas aisladas EM-1: 2001-2, EM-2: 2004-5 y EM-3: 2004-6)



Especie por estudio (n), con resistencia a meticilina (MS/MR) y a ciprofloxacina (cipS/cipR)

En la figura III.82, con los datos de los tres primeros estudios, se puede observar, para las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes*, especies patógenas y comensales más comunes en SSSIs, que los valores de CMI₉₀ de ozenoxacino son más altos en aquellas cepas resistentes a ciprofloxacino; aún así, los valores máximos no sobrepasan 1 mg/L, 1,6 mg/L y 0,5 mg/L, respectivamente, para ninguno de los grupos de cepas.

Las cepas sensibles a ciprofloxacino, poseen una CMI₉₀ para ozenoxacino muy baja, independientemente de si son sensibles o resistentes a metilicina. El máximo valor para *S. aureus* y *S. epidermidis* es de 0,008 mg/L y para *S. pyogenes* de 0,036 mg/L.

La CMI₉₀ para ozenoxacino en las cepas resistentes a ciprofloxacino y metilicina es, también, superior a la de las cepas resistentes a ciprofloxacino y sensibles a metilicina. Para las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a metilicina y ciprofloxacino, se puede observar que las cepas del tercer estudio poseen valores superiores (x10-x20) a los de los dos primeros estudios, en el tercer estudio, el número de cepas es ligeramente más elevado, y también las cepas son de aislamientos más recientes.

APARTADO III.3. DISCUSIÓN

III.3. DISCUSIÓN

En este capítulo del presente trabajo se ha realizado la determinación de la actividad antibacteriana de ozenoxacino frente a diferentes especies bacterianas, dividida en cuatro ensayos distintos.

En los dos primeros estudios (EM-1 y EM-2) se evaluó la actividad del producto enfocada a patógenos de SSSIs, con comparativos de uso tópico. En cambio, en el estudio EM-3, se completa la evaluación del perfil antimicrobiano de ozenoxacino, frente a un número más elevado de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas involucradas en distintos tipos de infecciones y frente a diez antibióticos comparativos. Las cepas fueron, mayoritariamente, de origen clínico, y fueron aisladas entre 2001 y 2006. Las especies de Gram-positivos seleccionadas, además de las que ya se habían incluido en los primeros estudios, son estreptococos del grupo C, G y otras especies de estreptococcus (*S. constellatus*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. sanguis* y *S. oralis*, algunas pertenecientes al grupo de estreptococcus viridans), además de *L. monocytogenes* y las anaerobias *Clostridium perfringens* y *C. difficile*. Las especies de Gram-negativos seleccionadas, además de la ya testada *P. aeruginosa*, son *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *H. pylori*, *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae* y, como especie anaeróbica: *Bacteroides fragilis*. De igual manera, se exploraron otros microorganismos considerados atípicos con implicación en infecciones respiratorias o de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Los antibióticos comparativos son, en los dos primeros estudios, fluoroquinolonas y los dos productos tópicos más relevantes del mercado para las SSSIs. Mientras que, en el estudio EM-3 se incorporaron como comparativos antibióticos de uso sistémico (oral y/o endovenoso), pertenecientes a distintas familias: tres fluoroquinolonas, una penicilina y una cefalosporina de tercera generación, un macrólido, una oxazolidinona, un lipopéptido y una gliciliciclina.

La actividad global de ozenoxacino frente a todas las especies bacterianas evaluadas es muy relevante, ya que su máxima CMI para la gran mayoría de las cepas es 0,5-2 mg/L, si exceptuamos a una cepa de MRSA multiresistente, a los *Enterococcus* spp., y, a las bacterias Gram-negativas resistentes a ciprofloxacino.

Los resultados de actividad antimicrobiana que se presentan en este estudio concuerdan con los del estudio publicado para ozenoxacino (Yamakawa, 2002), en el que se analizaban 223 cepas pertenecientes a distintas especies de Gram-positivos y *P. aeruginosa*, en comparación a diversos antibióticos tópicos y otras quinolonas.

III.3.1 Gram-positivos, *Staphylococcus* spp

La incidencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario, ha aumentado en muchos países (Appelbaum, 2007, Bhagwat, 2009). Actualmente se considera más problemático el aumento de la incidencia de MRSA en cepas adquiridas en la comunidad, mientras que hasta ahora, los estudios y esfuerzos se habían concentrado en la erradicación efectiva de las cepas de MRSA en poblaciones que colonizan ambientes hospitalarios, multiresistentes a antibióticos pero menos virulentas (Jensen, 2006, Mulvey, 2009).

Vancomicina se considera el antibiótico de elección para las cepas resistentes a meticilina, pero la identificación de cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (hVISA) o resistentes a vancomicina (VRSA) ha aumentado la preocupación de la comunidad y de las autoridades sanitarias, ya que se han asociado estas cepas con fallos clínicos (Appelbaum, 2007, Howden, 2004). Especialmente en Estados Unidos, la aparición de las cepas hVISA y VRSA, el reducido espectro y la falta de actividad bactericida de vancomicina, junto a problemas de tolerabilidad en algunos pacientes, había puesto de manifiesto las limitadas soluciones terapéuticas y la necesidad de nuevos antibióticos (Bhagwat, 2009). El uso de

fluoroquinolonas, trimethoprim–sulfametoxazol, clindamicina o minociclina ha sido efectivo en los casos en los que se ha requerido una terapia bactericida. Estos productos no son tan efectivos como vancomicina, ya sea porque poseen menor actividad antiestafilocócica o por las cepas resistentes a los mismos que pueden seleccionar durante la terapia. Las quinolonas de última generación, con una mayor actividad antiestafilocócica, tienen su uso limitado para mantener su eficacia en infecciones graves, pero son un buen camino a explorar con el objetivo de identificar compuestos con un potencial frente a las necesidades en este campo (Gemmell, 2006, Shopsin, 2004).

El primer punto a destacar de ozenoxacino frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* es que ha sido el producto más potente frente a cepas MSSA y MSSE, y de los más potentes frente a MRSA y MRSE, en los tres estudios de actividad realizados.

Se desglosa la discusión de la actividad de ozenoxacino frente a MSSA y MRSA, en función de si las cepas son sensibles o no a ciprofloxacino. Se conoce que la resistencia a esta fluoroquinolona, principalmente en cepas de origen hospitalario, se correlaciona con la resistencia a meticilina, o, expresado de otra manera, que las cepas HA-MRSA poseen un fenotipo de multiresistencia que suele incluir resistencia a ciprofloxacino (Goldstein, 2005, Nilius, 2003, Noguchi, 2005, Shopsin, 2004).

Frente a las cepas de MSSA y MSSE que son sensibles a ciprofloxacino (alrededor del 90% en EM-3), ozenoxacino es un antibiótico muy potente, con CMI₉₀ de entre 0,004-0,008 mg/L, destacadamente más activo que el resto de antibióticos evaluados (tópicos y sistémicos), y entre ellos cien veces más activo que ciprofloxacino, levofloxacino y mupirocina, y diez veces más que el ác. fusídico.

Si en lugar de analizar a continuación las cepas sensibles a meticilina (MSSA y MSSE) y resistentes a ciprofloxacino, se pasa a valorar el resto de las cepas igualmente sensibles a ciprofloxacino, aunque sean resistentes a meticilina (MRSA y MRSE), se observa que los resultados son muy similares a los que se acaban de describir.

Frente a las cepas MRSA y MRSE, ambas sensibles a ciprofloxacino (un porcentaje bajo, entre el 10% y un 29% en EM-3), ozenoxacino ha sido el producto más activo, respecto a todos los comparativos utilizados, con CMI₉₀ muy bajas de 0,003 y 0,008 mg/L, entre diez y diez mil veces inferiores a las del resto de antibióticos.

Los valores de CMI para oxenoxacino, en estas cepas, son todas del mismo orden, extremadamente bajos, debido a que las cepas son sensibles a todas las quinolonas, aunque con valores superiores a los de ozenoxacino.

Al analizar los resultados para las cepas MSSA y MSSE, ambas resistentes a ciprofloxacino (una minoría, alrededor del 10% en EM-3), se observa que la actividad de ozenoxacino, es algo inferior a las anteriores, aunque sigue siendo muy buena, con CMI₉₀ de 0,1 y 0,07 mg/L, comparable a las de daptomicina y tigeciclina, y mejor que las del resto de antibióticos incluyendo a las fluoroquinolonas, mupirocina y el ác.fusídico.

Como se esperaba, la proporción de cepas resistentes a ciprofloxacino, de entre las resistentes a meticilina, es muy elevada. El 90-100% de las cepas de MRSA y el 71% de las MRSE han presentado resistencia a ciprofloxacino, y frente a ellas, ozenoxacino mantiene una buena actividad (CMI₉₀ entre 0,125 y 1 mg/mL), similar a la de los antibióticos de uso sistémico más activos (daptomicina y tigeciclina), y a la del ác.fusídico (con excepciones de resistencia a fusídico). De manera excepcional, se ha detectado una cepa MRSA multiresistente, con una CMI para ozenoxacino de ≥ 128 mg/L y sensible sólo a tigeciclina, daptomicina y linezolid. Algunas de las cepas de MRSE han presentado, además de a ciprofloxacino, resistencias al ác.fusídico y sensibilidad disminuida a mupirocina. Es importante destacar que, en todos los casos, ozenoxacino es, mínimo, treinta veces mejor que mupirocina y las fluoroquinolonas evaluadas (ciprofloxacino, moxifloxacino, levofloxacino y nadifloxacino).

Este hecho posiciona muy bien a ozenoxacino, como el producto con menores CMI frente a MRSA y MRSE resistentes a ciprofloxacino, a pesar de haberse detectado resistencia en una

cepa MRSA multiresistente a otros antibióticos. Las cepas MRSA resistentes a fluoroquinolonas son un reconocido problema terapéutico (Jones, 2001), ya que, de los once antibióticos testados en el estudio EM-3, siete de ellos poseen CMI₉₀ superiores a 32 mg/L, y entre ellos las tres fluoroquinolonas, por lo que la actividad mantenida de ozenoxacino en los tres estudios, permite augurar eficacia clínica frente a cepas resistentes a meticilina. Parece claro que, la disminución de su potencia, la dirige la resistencia de las cepas a ciprofloxacino, y no la resistencia a la meticilina, como también está descrito para otras quinolonas (Shopsin, 2006), pero el rango de sensibilidad que mantienen las cepas a ozenoxacino, a pesar de la resistencia a las otras fluoroquinolonas, es una característica diferencial de este producto.

En los estudios EM-2 y EM-3 se habían seleccionado las cepas de MSSA y de MRSA sin haber evaluado previamente su susceptibilidad a ciprofloxacino. Se detectó mayor incidencia de cepas resistentes a ciprofloxacino de entre las MSSA y MRSA aisladas en EM-2 (procedentes de un hospital de Barcelona), que no en las del estudio EM-3 (cepas de colección y clínicas, aisladas en todo el mundo). Se considera especialmente elevado y atípico el 50% de las MSSA que fueron resistentes a ciprofloxacino en EM-2 vs un 8% en EM-3. Más cercano a los porcentajes descritos están los resultados para resistentes a ciprofloxacino en MRSA, se ha detectado un 100% en EM-2 vs. el 90% en EM-3. A pesar de ello, las CMI para ozenoxacino fueron muy bajas (MSSA rango 0,002-0,016 mg/L, MRSA rango 0,004-0,25 mg/L), y, superiores en el estudio EM-3, y no, en el EM-2, como se podía haber esperado por su mayor porcentaje de resistencia a ciprofloxacino (Schmitz, 1999).

La elevada actividad detectada para ozenoxacino hay que interpretarla, también, en la clave de potencia frente a cepas resistentes a otros antibióticos. En el ensayo EM-2, en el que se utilizaban comparativos tópicos, se ha detectado que un 63% de las cepas de *S. aureus*, son resistentes a alguno de los antibióticos: ciprofloxacino, moxifloxacino, ác.fusídico o mupirocina.

El hecho que ozenoxacino haya sido el producto más activo en *S.epidermidis*, en todos los casos, manteniéndose las CMI entre 0,004 y 1 mg/L para las cepas resistentes a ciprofloxacino y/o a otros antibióticos, es importante para el tratamiento de infecciones con posibles cepas no sensibles. Las cepas con CMI elevadas para el ác.fusídico y la mupirocina pueden estar comprometiendo la actividad de los productos en el lugar de la infección a pesar de ser productos de aplicación tópica. Por otro lado, unas CMI máximas para ozenoxacino de 0,25-1 mg/L, en las cepas MRSA multiresistentes, no parecen indicar problemas de actividad ya que, los presumibles niveles de producto en el lugar de la infección, deben poder estar por encima de este valor.

Es considerable la resistencia al ác.fusídico que presentaron las cepas de *S. aureus*, en un 30% los MSSA y en un 18% los MRSA. El 47% de las cepas de *S. aureus* presentaron sensibilidad disminuida a mupirocina, lo fueron un 66% de las cepas de MRSA resistentes a ciprofloxacino, mientras que no lo fueron ninguna de las cepas con sensibilidad a ciprofloxacino o a meticilina; esto coincide con lo descrito en la bibliografía (Boucher, 2008). Todas las cepas que presentaron sensibilidad disminuida a mupirocina fueron resistentes a, al menos, otro antibiótico, esto no ocurre ni para el ác.fusídico ni para ciprofloxacino. En la bibliografía se describe la relación entre la resistencia a meticilina, rifampicina mupirocina en *S. aureus* (Schmitz, 1998 y 2000), debida a la transferencia conjugativa de plásmidos portadores de la resistencia a mupirocina, en cepas de MRSA (Pawa, 2000), que podría explicar estos datos.

III.3.2 Gram-positivos, *Streptococcus* spp (y *Enterococcus* spp)

Las infecciones por estreptococos son muy frecuentes, ya que son microorganismos de amplia distribución, mayoritariamente anaerobios facultativos y con requerimientos especiales. Entre las infecciones que suelen causar están amigdalitis aguda, otitis media, sinusitis, neumonía, meningitis, infección del tracto urinario, infección abdominal o infecciones de piel y tejidos asociados.

Frente a estreptococcus de los diferentes subgrupos, ozenoxacino presenta una muy buena actividad, siendo siempre el producto más potente, en algunos casos junto a tigeciclina. Las

CMI₉₀ para ozenoxacino son muy bajas con un rango inferior de hasta 0,008 mg/L e inferior a 0,25mg/L. A pesar de su excelente actividad frente a estreptococos, ozenoxacino es ligeramente menos potente que frente a estafilococos, aunque, es más homogénea la respuesta de todas las cepas al producto.

En general, todos los productos analizados presentan actividad frente a las cepas estudiadas de *S. pyogenes*, especie muy relevante en las SSSIs. Ozenoxacino presenta una buena actividad frente a las cepas testadas de *S. pyogenes*, con unas CMI entre 0,03-0,5 mg/L ó entre 0,008-0,06 mg/L, en función de la susceptibilidad de las mismas a ciprofloxacino. Esta actividad es similar a la de otros antibióticos sistémicos como amoxicilina, ceftriaxona, tigeciclina y daptomicina, y es más activo que mupirocina, ác.fusídico y que el resto de antibióticos incluyendo a las quinolonas. Ozenoxacino fue sesenta y cuatro veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y ocho más que moxifloxacino. La actividad de ozenoxacino se mantiene en cepas de *S. pyogenes* que presentan resistencia o disminución de susceptibilidad al ác. fusídico, mupirocina, claritromicina u a otras quinolonas, propiedad muy interesante para su utilización frente a cepas multiresistentes.

En el estudio EM-2, se ha detectado que un 100% de las cepas de *S. pyogenes* son resistentes a alguno de los mencionados antibióticos. Todas las cepas son resistentes al ác.fusídico, el 83% lo son a ciprofloxacino y un 23% son no sensibles a mupirocina además de resistentes a ciprofloxacino y al ác.fusídico. Es decir, todas las cepas que presentaron sensibilidad disminuida a mupirocina fueron resistentes a, al menos, otro antibiótico, esto no ocurre ni para el ác.fusídico ni para ciprofloxacino, y es, posiblemente, debido a la transformación conjugativa con plásmidos de resistencia, entre Gram-positivos (Pawa, 2000, Schmitz, 1999). Ozenoxacino, frente a estas cepas, mantiene una buena actividad, aunque son, de nuevo, valores ligeramente más elevados que los que presentaba frente a *Staphylococcus* spp.

En el estudio EM-3, en cambio, (tabla III.22) se observa, que no hay cepas con CMI por encima de 2 mg/L para ninguna de las quinolonas, a diferencia de lo que ocurría en los estafilococos.

Frente a *S. agalactiae*, estreptococcus beta-hemolítico del grupo B, y relevante en infecciones en neonatos y mujeres embarazadas, ozenoxacino demostró una potente actividad, con unas CMI muy bajas (entre 0,008 y 0,25 mg/L), considerablemente mejor que la del resto de antibióticos e incluyendo a cepas resistentes a ciprofloxacino. Dentro de la clase de las quinolonas, ozenoxacino es treinta y dos veces más activo que ciprofloxacino o levofloxacino y ocho más que moxifloxacino, y en comparación a mupirocina, ésta posee un rango de actividad entre 5 y 2 mg/L, mientras que el ác.fusídico posee un rango amplio de CMI, entre 0,5-64 mg/L, De todos los antibióticos testados, tanto de uso tópico como sistémico, ozenoxacino es el producto que presenta mayor actividad.

Todos los productos presentan actividad frente a las cepas estudiadas de *Streptococci* del grupo C. Ozenoxacino, amoxicilina (sola o con ác. clavulánico) y ceftriaxona son los productos con mayor actividad (ozenoxacino CMI₉₀ 0,03 mg/L), y, dentro de la familia de las quinolonas, ozenoxacino es treinta y dos veces más activo que levofloxacino, dieciséis que ciprofloxacino y ocho que moxifloxacino. Ocurre lo mismo, con ozenoxacino, frente a las cepas de estreptococcus del grupo G, y frente a las de las especies *S. constellatus*, *S. bovis*, *S. mitis*, *S. sanguis* y *S. oralis*, evaluadas.

Se identificaron algunas cepas con CMI elevadas a ciprofloxacino, levofloxacino y, también a claritromicina, entre las del grupo G, además de las cepas resistentes a claritromicina, en cada uno de los subgrupos, y ozenoxacino presenta una buena actividad frente a todas ellas.

Respecto a *S. pneumoniae*, especie patógena capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos, como neumonía, endocarditis, meningitis, etc., ozenoxacino posee una buena actividad frente a las cepas tanto sensibles como resistentes a penicilina. Su actividad es sólo comparable a la de tigeciclina, y superior a la del resto de productos analizados, incluyendo a las otras quinolonas. Los rangos de actividad observados para ozenoxacino son inferiores a 0,5 mg/L, en un estudio, y a 0,03 mg/L, en otro, y se mantienen independientemente de la resistencia detectada a otros antibióticos. Ozenoxacino es treinta y dos, y sesenta y cuatro veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, respectivamente, y

ocho más que moxifloxacino. El hecho de poseer una buena actividad frente a este patógeno implicado en infecciones respiratorias, además de al resto de Gram-positivos, le aporta ventajas respecto a las fluoroquinolonas de las anteriores generaciones, y a los antibióticos comparativos en este estudio (Jones, 2003, Morrissey, 1999, Pankuch, 2001).

Por otro lado, las infecciones asociadas a *Enterococcus* suelen ser endocarditis, infecciones urinarias y colonización o sobreinfección de enfermos que reciben tratamiento antibiótico. Sólo en uno de los estudios, se evaluó la actividad de ozenoxacino frente a cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, bacterias Gram-positivas sobre las que se podía esperar o desear una buena actividad del compuesto. Los resultados mostraron para ozenoxacino una baja actividad (CMI de 2-4 mg/L para *E. faecium*), aunque superior, tanto a ciprofloxacino y moxifloxacino, como a mupirocina y al ác. fusídico. De las 24 cepas aisladas, 22 de ellas son resistentes a ciprofloxacino. Las quinolonas poseen menor actividad frente a enterococos, que frente al resto de bacterias Gram-positivas (Jones, 2008, Tanaka, 2002, Tankovic, 1996). Como una posible causa se describe la presencia del gen *qnr* como responsable de la resistencia intrínseca a las quinolonas en *Enterococcus*, spp. (Arsène, 2007), y, los resultados de este estudio apuntan que ha mantenido su inhibición, también, frente a ozenoxacino. Este gen (plasmídico en Enterobacterias), que se descubrió inicialmente en Gram-negativos, codifica para una familia de proteínas que protegen a la ADN girasa de la inhibición por las quinolonas. En el genoma de *Enterococcus faecalis* se ha identificado una secuencia con un 25% de homología al gen que codifica para Qnr (Arsène, 2007, Paulsen, 2003), y por eso se postula como una explicación a esta menor actividad.

III.3.3 Gram-positivos, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. y *Listeria monocytogenes*.

Ozenoxacino presenta actividad, también, frente a otras bacterias Gram-positivas como *Propionibacterium acnes*, y frente a diferentes especies del género *Corynebacterium* spp y a *Listeria monocytogenes*. Son bacilos Gram-positivos, no esporulados, que acostumbran a causar infecciones de la piel y estructuras relacionadas o infecciones en pacientes inmunosuprimidos.

Ozenoxacino presenta una excelente actividad, mejor que el ác.fusídico y las fluoroquinolonas, frente a las cepas de *P. acnes* testadas, que eran todas no sensibles a mupirocina. Esta actividad puede ser relevante en el tratamiento de infecciones de SSSIs, no tanto por el hecho que puedan incluir acné, cuyo agente causal es *P.acnes*, sino por la cada vez más relevante presencia de este microorganismo en infecciones secundarias de heridas, traumatismos, prótesis o cirugías, o en infecciones oculares (Perry, 2006). También se postula que, gracias a la habilidad que posee de crecimiento lento intracelular o sobre otras superficies (*medical devices*) le está haciendo aparecer como un agente causal con un rol, aún por acabar de definir, incluso en condiciones tan poco ligadas normalmente con las infecciones, como el cáncer de próstata (Lambert, 2011, Perry 2006).

Ozenoxacino posee una buena actividad frente a las cepas de *Corynebacterium* testadas, con CMI entre 0,001-0,12 mg/L o entre 0,03-4 mg/L, en función de su susceptibilidad o no a ciprofloxacino. De los dos antibióticos de uso tópico testados, sólo el ác.fusídico presenta cierta actividad. No hay puntos de corte de resistencia definidos para *Corynebacterium* spp., pero se puede observar que el ác.fusídico mantiene dos subpoblaciones, una frente a la que posee una muy buena actividad, y, otra aparentemente residual (16%), frente a la que es inactivo. El hecho que ozenoxacino posea actividad frente a las distintas especies patógenas implicadas en SSSIs es positivo, refleja el excelente espectro del producto, y puede ser muy útil como tratamiento empírico, ya que no se suele identificar el agente causal de una uSSSI, por la baja gravedad de la infección, y por la dificultad de diferenciarlo de la flora comensal de la piel (Gemmell, 2006).

A pesar que la incidencia de infecciones, normalmente de origen alimentario, causadas por este patógeno intracelular es baja, la tasa de mortalidad por *L. monocytogenes* puede llegar a ser elevada en poblaciones inmunosuprimidas, mujeres embarazadas o ancianos, con

manifestaciones graves como septicemias, meningitis, abortos o muertes neonatales, o moderadas como gastroenteritis (Farber, 1991, Ramaswamy, 2007).

Ozenoxacino presenta muy buena actividad frente a *L. monocytogenes* (CMI₉₀ 0,06 mg/L) junto a tigeciclina, ambos antibióticos poseen unos rangos muy estrechos de actividad por debajo de 0,125 mg/L, y, son siempre más potentes que el resto de compuestos. Se detectan algunas cepas frente a las que no presentan actividad claritromicina, linezolid ni daptomicina. Respecto a las otras quinolonas, ozenoxacino fue dieciséis veces más activo que ciprofloxacino y levofloxacino, y ocho veces más activo que moxifloxacino, y compara también, muy positivamente, frente a los datos publicados (Seral, 2005).

III.3.4. Gram-negativos, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

Como se ha mencionado en la introducción, la resistencia a quinolonas es frecuente en bacterias Gram-negativas; un 73% de las cepas de *P. aeruginosa* testadas en el estudio EM-2 y un 28% de las testadas en EM-3 son resistentes a ciprofloxacino (2-1024 mg/L), y ninguno de los antibióticos testados fue activo frente a estas cepas. Por tanto, en el caso de que el responsable de una infección sean cepas no sensibles a ciprofloxacino, aparece un problema de falta de un antibiótico eficaz que pueda eliminar dicha infección (Boucher, 2009).

Frente a las cepas de *P. aeruginosa* sensibles a ciprofloxacino, ozenoxacino presentó una actividad ligeramente inferior a la del mejor producto, que fue ciprofloxacino, y similar a la de levofloxacino y moxifloxacino, con diferencias siempre menores a un orden de magnitud. Respecto al resto de antibióticos no quinolonas, sólo tigeciclina presentaba actividad frente a algunas cepas, hecho que confirma la dificultad de tratar infecciones causadas por este patógeno, que combina resistencia intrínseca a muchos fármacos con resistencias adquiridas (Lambert, 2002, Obritsch, 2005).

Se ha observado que ozenoxacino posee poca actividad frente a las cepas de *A. baumannii* resistentes a ciprofloxacino, que se evaluaron en el segundo estudio, estas cepas no procedían de infecciones de piel, pero se incluyeron para valorar la actividad de ozenoxacino frente a las mismas. Su rango de CMI es de 0,06 a 32 mg/L, es la quinolona que posee mayor actividad, aunque sólo frente a una cepa posee una CMI inferior a 2 mg/L.

Estas dos especies de bacterias gram-negativas no fermentadoras son uno de los problemas importantes tanto de resistencia intrínseca como adquirida a los antibióticos disponibles, y ocupan una posición destacada como dianas o nichos de actividad para los nuevos antibióticos (Boucher, 2009), la actividad de ozenoxacino no es destacable frente a las resistentes a ciprofloxacino, pero sí que puede ser útil, en caso de sensibilidad y de presencia, por ejemplo, en infecciones mixtas de SSSIs (Brook, 2002, Janniger, 2005).

III.3.5. Gram-negativos, Enterobacterias

Frente a las enterobacterias testadas (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *E. cloacae* y *K. pneumoniae*), ozenoxacino presenta una buena actividad cuando las cepas son sensibles a ciprofloxacino (CMI₉₀ alrededor de 0,1-0,5 mg/L), siendo generalmente ciprofloxacino la quinolona más potente. Cuando las cepas presentan resistencia a ciprofloxacino, todas las quinolonas, incluido ozenoxacino, pierden su actividad, y, sólo tigeciclina y ceftriaxona mantienen actividad en los estudios realizados. La actividad de ozenoxacino frente a cepas resistentes a ciprofloxacino, es diez veces menor en el caso de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, y, más de cien veces menor en *E. coli*.

Respecto a la actividad comparativa entre quinolonas, las diferencias no son muy grandes y dependen de las especies. En las cepas sensibles a ciprofloxacino, las diferencias son siempre inferiores a un orden de magnitud.

Tal y como se observa en los dos primeros estudios, tanto el ác.fusídico como la mupirocina muestran muy poca o nula actividad frente a bacterias Gram-negativas: La actividad o amplio

espectro de ozenoxacino, aunque sea parcial y menor que en Gram-positivos, puede favorecer al producto frente a infecciones mixtas o causadas por Gram-negativos, respecto al uso de mupirocina o ác.fusídico (Brook, 2002, Gemmell, 2006).

La resistencia a quinolonas es frecuente en enterobacterias (Hooper, 2001, Neuhauser, 2003); se ha detectado entre un 30-69% de las cepas de *E. coli* resistentes a ciprofloxacino, un 27% de las de *K. pneumoniae* y un 17% de las de *E. cloacae*.

Del estudio EM-3 se destaca que todas las cepas de *Salmonella* spp y *Shigella* spp evaluadas fueron extremadamente sensibles a ciprofloxacino, el 100% de ellas con una CMI por debajo del límite de concentración evaluado (0,015 mg/L), y, también presentaron excelente actividad ozenoxacino, levofloxacino y moxifloxacino (CMI₉₀ de 0,03 mg/L), seguidos de ceftriaxona y tigeciclina (CMI₉₀ de 0,06 y 2 mg/L), mientras que el resto fueron inactivos. En ambas especies está descrita una mayor resistencia al ác. nalidíxico que a las fluoroquinolonas (Martin, 2006, Streit, 2006).

III.3.6. Otras especies: *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *H. pylori*.

Ozenoxacino presenta muy buena actividad frente a las bacterias Gram-negativas agrupadas como *fastidious*, por sus especiales requerimientos de crecimiento y analizadas en este apartado, y superior al resto de compuestos. Especialmente relevante es su actividad frente a patógenos que están implicados en infecciones respiratorias, junto a *S. pneumoniae*, ya discutido anteriormente (Jones, 2002 y 2003).

Ozenoxacino ha sido el compuesto más activo (CMI₉₀ de 0,015 mg/L) de los testados frente a *H. influenzae*, con una actividad similar a la de las fluoroquinolonas y a ceftriaxona, frente a cepas que son tanto beta-lactamasa-positivas, –negativas como no-tipables. Lo mismo le ha ocurrido, a ozenoxacino, frente a *M.catarrhalis* (CMI₉₀ 0,008 mg/L), mejor que las fluoroquinolonas, tigeciclina y claritromicina, con CMI₉₀ un orden de magnitud superiores.

Frente a *Neisseria gonorrhoeae*, tanto beta-lactamasa positivas como negativas, y *N. meningitidis*, ozenoxacino es el producto con mayor actividad (CMI₉₀ 0,008 mg/L y 0,002 mg/L, respectivamente), aunque ceftriaxona, ciprofloxacino y levofloxacino son también antibióticos extremadamente activos. Con el aumento descrito de infecciones o ETS causadas por *N. gonorrhoeae* resistentes a ciprofloxacino (Tapsal, 2001), el disponer de un antibiótico como ozenoxacino, que mantenga una actividad tan potente sería un valor añadido para no tener que utilizar antibióticos de uso parenteral, aunque en la colección de 20 cepas utilizadas en este estudio, sólo un 5% fueron resistentes a ciprofloxacino y levofloxacino, mientras que el valor máximo alcanzado para ozenoxacino fue de 0,125 mg/L. Todas las cepas de *N. meningitidis* fueron, en cambio, sensibles a las quinolonas. Las responsables de estas diferencias de actividad, respecto a Enterobacterias, podría la distinta familia de porinas del género *Neisseria* (por, PorA y PorB) (Derrick, 1999).

Otra posible explicación a la mayor eficacia de las quinolonas en estas bacterias, podrían ser que los sistemas de transporte que posean sean menos susceptibles de expulsar estos compuestos al exterior celular. Están descritas menos bombas de flujo para ellas que para las Enterobacterias, por lo que, por lo menos, existe un mayor desconocimiento. En *H. influenzae* está identificado una sola, perteneciente a la familia MATE, capaz de expulsar quinolonas, mientras que, para *M. catarrhalis* y *Neisseria* spp, en principio, las quinolonas son pobres sustratos de los, entre uno y los dos tipos de bombas descritos (Long, 2008, Rouquette-Loughlin, 2003, Serra, 2009, Vila, 2011), aunque se posee información sobre una bomba de flujo, capaz de expulsar tetraciclinas, inhibible por reserpina, hecho que no es corriente en Gram-negativos (Ruiz, 2005). En cambio, en las Enterobacterias y en Gram-negativos no fermentadores están descritas entre 2 y 6 bombas de flujo que expulsan quinolonas al exterior, posible causa de sus mayores CMI, o de que acumulen resistencias cromosómicas más fácilmente (Fábrega, 2009, Vila, 2011). Para *Neisseria gonorrhoeae*, especialmente están descritas numerosas proteínas de la superfamilia DMT, que son transportadores secundarios (Long, 2008), aunque esto no explicaría su mayor susceptibilidad a quinolonas. En resumen,

posibles diferencias entre las porinas y las bombas de flujo podrían explicar la mejor actividad de ozenoxacino, respecto a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino (Fábrega, 2009).

Estos subgrupos de bacterias patógenas forman parte de los posibles agentes causales de infecciones respiratorias y enfermedades infecciosas del tracto genital, junto a otras especies patógenas estudiadas en este trabajo. Cuantas más especies sean sensibles a ozenoxacino, menor será la necesidad de una identificación previa al tratamiento de los microorganismos, en caso que sea recomendable esta práctica, especialmente para infecciones graves o pacientes asociados a co-morbilidades.

Y finalmente, ozenoxacino es el producto que presenta mejor actividad frente a las 5 cepas de *H. pylori* testadas (rango 0,002-0,008 mg/L), junto a amoxicilina, con y sin ác.clavulánico. Ozenoxacino presenta una considerable mayor actividad que el resto de fluoroquinolonas (cien veces mayor actividad que ciprofloxacino y levofloxacino, y sesenta y cuatro veces mejor que moxifloxacino), hecho que no había ocurrido en las otras especies. Esta destacada actividad podría permitir la exploración de su uso en el triple tratamiento antibiótico que se utiliza para la erradicación de *H. pylori* en pacientes, sobretodo debido al aumento de resistencia a los tratamientos habituales con metronidazol y claritromicina (Bogaerts, 2006).

III.3.7 Bacterias anaerobias: *B. fragilis*, *C. difficile* y *C. perfringens*.

Ozenoxacino presenta una muy buena actividad frente a las tres especies de bacterias anaerobias evaluadas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, esto confirma a esta molécula como miembro de la cuarta generación de quinolonas (Fung-Tomc, 2000, Hecht, 2003), y la posiciona bien frente a los antibióticos comparativos que poseen menor actividad frente a estos patógenos, incluidas las fluoroquinolonas.

Los resultados obtenidos muestran que ozenoxacino posee una actividad significativamente mayor que el resto de compuestos frente a *B. fragilis* (CMI₉₀ 0,12 mg/L), los compuestos que le siguen directamente poseen CMI diez veces más altas (tigeciclina, moxifloxacino y claritromicina) y seguidos de levofloxacino y linezolid, mientras que el resto de antibióticos son inactivos (Christiansen, 2004). La diferencia entre las quinolonas es a favor de ozenoxacino, a pesar de ser bacterias Gram-negativas, siendo unas cien veces mejor que ciprofloxacino y levofloxacino, y dieciséis que moxifloxacino, esto posiciona al producto como una posible opción para el tratamiento de infecciones por *B. fragilis* (Haas, 2009).

Sería interesante valorar si este grupo de bacterias presentan, respecto a las enterobacterias y a las Gram-negativas no fermentadoras, diferencias en la acumulación entre ozenoxacino y las fluoroquinolonas, tal y como se ha planteado anteriormente. Posibles diferencias entre porinas y bombas de flujo podrían explicar la mejor actividad de ozenoxacino, respecto a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino. De entrada, todas estas especies presentan un número menor de bombas de flujo descritas (una por especie), capaces de expulsar quinolonas del interior celular, mientras que, como se ha comentado anteriormente, para los otros dos subgrupos de Gram-negativos son entre 2 y 4 (Vila, 2011), y/o falta información al respecto.

Por otro lado, ozenoxacino presenta una moderada actividad frente a las cepas de *C. difficile* testadas, menor que la de tigeciclina (CMI₉₀ de 2 mg/L vs 0,06 mg/L), aunque significativamente mejor que la del resto de antibióticos, incluidas las otras quinolonas. El tratamiento de la infección aguda por *C. difficile* no es fácil ya que presenta una elevada tasa de resistencia a antibióticos de distintas familias y de recidivas (Leffler, 2009). El disponer de nuevos fármacos, potentes y si fuera posible de acción rápida, diferentes a metronidazol y vancomicina (primeros usos, y recurrencias) permitiría en casos de re-infección severa disponer de una alternativa a los tratamientos actuales.

Las cepas de *C. perfringens* poseen un perfil de susceptibilidad diferente al de las cepas de *C. difficile* anteriormente descritas, tal y como se observa en la literatura científica (Haas, 2009, Leffler, 2009). Las cepas de *C. perfringens* son todas más sensibles a los antibióticos testados. Ozenoxacino es el antibiótico con mayor actividad frente a *C. perfringens* (CMI₉₀ 0,015 mg/L),

seguido por amoxicilina, y, respecto a las otras quinolonas y a tigeciclina, es un orden de magnitud más potente.

Esta potente actividad de ozenoxacino, incluso comparativa a los otros antibióticos, permitiría explorar su uso en infecciones gastrointestinales, de piel y estructuras asociadas complicadas, con abscesos o infecciones por anaerobios en heridas o infecciones de hueso.

III.3.8 Patógenos atípicos: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *U. urealyticum*, *L. pneumoniae* y *M. tuberculosis*.

Ozenoxacino posee una muy buena actividad frente a todas las cepas de las siete especies estudiadas de patógenos atípicos, siempre en unos rangos muy estrechos y por debajo de 0,25 mg/L. Estas especies están implicadas, básicamente, en infecciones respiratorias e infecciones de transmisión sexual, de moderada a alta incidencia y prevalencia, en distintas poblaciones (Rodríguez, 2001, Salas, 2007, UNICEF WHO 2006). Están frecuentemente asociadas a enfermedad latente (Cacho, 2001, Ferrero, 2000, Waites 2004) y retraso en el tratamiento (Salas, 2007). Estos patógenos pueden originar neumonías, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad y partos prematuros, además de tuberculosis (Cacho, 2001, UNICEF WHO, 2006, Vall, 2004). El hecho que ozenoxacino presente elevada potencia, además de actividad paralela frente a bacterias anaerobias, como se ha mencionado en este capítulo, hace que pueda ser un antibiótico a considerar en este tipo de patologías. Sería interesante estudiar su actividad en tratamientos combinados con antifúngicos, ya que podría ser necesario, en algunos casos complicados (Vall, 2004).

Se destaca que las CMI₉₀ de ozenoxacino son siempre más bajas que las de levofloxacino y rifampicina, entre 10 y 100 veces, excepto para *Mycoplasma hominis* y *Mycobacterium tuberculosis*, que son una y dos diluciones menores, respectivamente. Y una mención especial sería para la actividad de ozenoxacino frente a *L. pneumophila*, ya que presenta una CMI₉₀ de 0,001 mg/L, un orden de magnitud inferior a la de levofloxacino.

Los resultados obtenidos para levofloxacino, frente a las diferentes especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Legionella* spp. coinciden con los reportados en la literatura, con alguna ligera variación en el rango de CMI (García, 2000, Jonas, 2001, Nilius, 2002, Pereyre, 2004).

La actividad de ozenoxacino frente a las cepas de *M. tuberculosis* se encuentra dentro del rango de la descrita para las fluoroquinolonas (Angeby, 2010), también independientemente de la resistencia a rifampicina, isoniazida o estreptomina, estos resultados abren la posibilidad de exploración de este compuesto para el tratamiento combinado de infecciones por cepas MDR ó XDR. Los resultados para rifampicina, como comparativo utilizado, se corresponden con los habituales para las cepas salvajes y para las resistentes a distintos antibióticos (Angeby, 2010, Diratthakit, 2010).

III.3.9. Comparación actividad de ozenoxacino frente a patógenos Gram-positivos en SSSIs en los diferentes estudios: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes*

Los resultados para las distintas especies o grupos de especies bacterianas han sido muy parecidos entre los distintos estudios. Se ha podido observar, en todos ellos, que la característica principal del antibiótico ozenoxacino es su potente actividad frente a bacterias Gram-positivas, y que, el factor que rige las ligeras modificaciones en su actividad es la resistencia a ciprofloxacino (Kirby, 2002). Frente a las cepas resistentes a fluoroquinolonas, ozenoxacino, a pesar de aumentar su CMI en 2-3 órdenes de magnitud, posee unos valores, a priori, suficientes para que los previsible niveles de producto en el lugar de la infección sean superiores a los mismos.

Los resultados de actividad, frente a las cepas del género *Staphylococcus*, obtenidos para los distintos comparativos concuerdan con los de la bibliografía (Jacobs 2004, Lauderdale, 2010, Rittenhouse 2008) con distintos matices, según la familia química de que se trate. Para

linezolid, daptomicina y tigeciclina los resultados coinciden exactamente con los reportados (Fritsche 2004, Fomín 2008, Jones 2008, Vandernes 2003, Verkade 2010), mientras que para amoxicilina, sola o con clavulánico, ceftriaxona y las quinolonas, éstos varían ligeramente, en algunos casos, en función de los perfiles de resistencia de las cepas incluidas en los estudios (Keating 2004, Tanaka, 2002). Los resultados de ozenoxacino frente a los antibióticos de uso tópico, utilizados como comparativos, son siempre muy favorables al producto, incluso frente a cepas multiresistentes (Alba, 2009, Martín-de-Nicolás, 1995, Nenoff, 2004, Oizumi, 2001, Sutherland, 1985, Traczewsky, 2008).

Al comparar los resultados de las especies patógenas más importantes en uSSSIs, *S. aureus*, y *S. pyogenes*, junto al comensal más relevante, *S. epidermidis*, obtenidos en los tres estudios EM-1, EM-2 y EM-3, se observa que ozenoxacino posee una muy buena actividad en todas las cepas, aunque los valores de CMI₉₀ son más altos en aquellas cepas resistentes a ciprofloxacino. El hecho que los valores máximos no sobrepasen 1 mg/L, 0,5 mg/L y 1,6 mg/L, respectivamente, hace suponer que deben poder ser alcanzadas y superadas por las concentraciones del producto en el lugar de la infección.

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de ozenoxacino es extremadamente potente cuando las cepas no poseen resistencia a ciprofloxacino, superior a la de los antibióticos que se utilizan para el tratamiento de SSSIs y otras infecciones por Gram-positivos (Adam, 2009, Alba, 2009, Bhagwat, 2009, Biedenbach, 2010, Christiansen, 2004, García-Agudo, 2011, Goldstein, 2006, Hoellman, 2003, Hurdle, 2004, Jones, 2006, Martín-de-Nicolás, 1995).

La CMI₉₀ para ozenoxacino en las cepas resistentes a ciprofloxacino y meticilina es, también, superior a la de las cepas resistentes a ciprofloxacino y sensibles a meticilina, al igual que ocurre para ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, (Coskun-Ari, 2008, Noguchi 2005), pero se mantiene siempre en un rango de actividad potente, que debería ser posible defender, por debajo del punto de corte de resistencia clínica.

Para las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a meticilina y ciprofloxacino, se puede observar que las cepas del tercer estudio poseen valores superiores (x10-x20) a los de los dos primeros estudios, en el tercer estudio, el número de cepas es ligeramente más elevado, y también las cepas son de aislamientos más recientes, el incremento de las resistencias a quinolonas (Bhagwat, 2009) puede ser una explicación, además del distinto origen de las mismas.

Los resultados presentados muestran que ozenoxacino posee una muy buena actividad frente a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, incluso frente a cepas con un alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas. Además, este compuesto también presenta una muy buena actividad frente a cepas salvajes y resistentes a fluoroquinolonas de *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *P. acnes* y *Corynebacterium* spp., microorganismos involucrados en las infecciones de piel y estructuras relacionadas. La actividad adicional que ozenoxacino presenta frente a bacterias Gram-negativas y anaerobios, que también pueden estar involucradas en infecciones de piel, tanto en solitario como mixtas, contribuye a completar el perfil del producto para enfocar el uso del producto frente a este tipo de patologías (Kirby, 2002, Jones, 2006, Nenoff, 2004, Odou, 2007).

El uso de antibióticos tópicos para la eliminación de la colonización por estafilococos en grupos de alto riesgo, como pacientes en proceso de hemodiálisis o cirugía, puede reducir la incidencia de infecciones posteriores (Shopsin, 2004). Mupirocina, un agente tópico antiestafilocócico que inhibe la síntesis de RNA y de proteínas, ha demostrado, en algunos estudios, que puede eliminar la colonización nasal en portadores y puede reducir la incidencia de infecciones de heridas (Gemmell, 2006). Aunque el desarrollo de resistencias a mupirocina, hasta el momento, ha sido limitado, el uso prolongado de este antibiótico ha sido asociado con la aparición de resistencias (Lowy 1998, Schmitz, 2000), de igual manera ocurre, frente al ácido fusídico al que ozenoxacino supera en actividad y amplitud de espectro (Biedenbach, 2010).

En contraposición a su potente actividad como familia, con el aumento del uso de quinolonas y la subsiguiente emergencia de resistencias (Hernández, 2011, Ho, 2004, Smith, 2004, Teras,

2008, Woodford, 2008), es necesario que el diseño o el uso de una nueva quinolona, intente esquivar los mecanismos actuales de resistencia. En este sentido, durante los últimos años, se ha iniciado el desarrollo de nuevas quinolonas, algunas no fluoradas (Adam, 2009, Shospin, 2004), con una mayor actividad frente a microorganismos específicos y/o con menor capacidad de generación de nuevas resistencias o con mejor perfil de seguridad (Strahilevitz, 2005, Yamakawa, 2002).

III.3.10. Actividad global comparativa a quinolonas

Por otro lado, las fluoroquinolonas también se han convertido en antibióticos importantes para el tratamiento de infecciones sistémicas graves, en pacientes que requieran fármacos potentes, por vía oral o endovenosa (Jonas, 2001, Jones, 2002 y 2003, Keating, 2004, Lauderdale, 2010, Milatovic, 2000, Shospin, 2004). El espectro de actividad de los nuevos antibióticos será muy relevante, ya que se puede enfocar su uso al tratamiento de infecciones específicas por *S. aureus* u otros Gram-positivos, por Gram-negativos específicos, como los de algunas infecciones respiratorias, a infecciones causadas, p.ej., por algunas especies de bacterias anaerobias, o incluso, a algunas infecciones mixtas (Christiansen, 2004, Gemmel, 2006, Shospin, 2004, Yun, 2002). Por este motivo, a pesar del abordaje inicial del desarrollo de este compuesto como producto de uso tópico para el tratamiento de infecciones de piel y estructuras asociadas, se explora su actividad frente a un amplio espectro de patógenos bacterianos que pueda identificar otros usos de interés.

Respecto a la actividad obtenida para nadifloxacino, ésta concuerda con el rango de la publicada (Alba 2009, Nenoff 2004, Vogt, 1992), aunque sólo se dispone de información para *Staphylococcus* spp. y *Propionibacterium* spp. De manera general, se observa que, igual que para ozenoxacino, la actividad de nadifloxacina es dependiente de la resistencia a otras quinolonas debido a mutaciones en sus dianas (Oizumi, 2001), pero manteniendo una CMI₉₀ del orden de 0,03-0,1 mg/L en cepas de *S. aureus* sensibles a ciprofloxacino, y entre 0,1 y 0,4 mg/L para *P. acnes*.

En los resultados de este estudio se observa que, en ninguno de los casos, nadifloxacino presenta mayor actividad que ozenoxacino, con CMI que difieren en 2-3 diluciones.

Los resultados obtenidos para ciprofloxacino y moxifloxacino concuerdan con los de la bibliografía para las diferentes especies (Ednie 2003, Jacobs, 2004, Tanaka, 2002).

Al comparar los resultados de ozenoxacino, frente a *Staphylococcus* y *Streptococcus* spp., con los de ciprofloxacino y moxifloxacino, en los dos subgrupos de cepas sensibles o resistentes a ciprofloxacino, ozenoxacino es siempre más activo que las dos quinolonas (entre uno y dos órdenes de magnitud frente a moxifloxacino, y entre uno y tres frente a ciprofloxacino). Los resultados para las fluoroquinolonas concuerdan con los reportados en la bibliografía (Hecht, 2003, Jones, 2008, Gordon, 2002, Tanaka, 2002). La menor actividad de las fluoroquinolonas frente al género *Enterococcus*, dentro de las bacterias Gram-positivas, está descrita y concuerda con los resultados obtenidos (Jones, 2008, Tanaka, 2002, Tankovic, 1996), de las 24 cepas aisladas, 22 de ellas son resistentes a ciprofloxacino. Por las características de ozenoxacino, y en base a discusiones sobre la utilización de las nuevas quinolonas para el tratamiento de infecciones por MRSA u otros gérmenes susceptibles, la potente actividad de ozenoxacino, su baja resistencia cruzada con las otras quinolonas, y, su inexistente resistencia cruzada con otros antibióticos, la colocaría en un grupo de antibióticos cuyo uso sería adecuado, bajo un seguimiento clínico de eficacia y no generación de resistencias (Shospin, 2004).

De las tres quinolonas testadas, con actividad muy similar, moxifloxacino es ligeramente mejor frente a *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; y frente a *Acinetobacter baumannii*, destacar que ozenoxacino es la quinolona con mejor actividad, con un rango de 0,06-32 mg/L, siendo todas las cepas testadas resistentes a ciprofloxacino. Los resultados para ciprofloxacino y moxifloxacino concuerdan con los descritos en la bibliografía (Gordon, 2002, Higgins, 2010), con ligeras diferencias que se explican por las diferencias en el perfil de resistencias de las cepas testadas en los distintos estudios.

La resistencia a quinolonas es frecuente en bacterias Gram-negativas (Hooper 2001, Neuhauser, 2003); un 73% de las cepas de *P. aeruginosa* testada son resistentes a ciprofloxacino, lo son también un 69% de las cepas de *E. coli*, un 27% de las de *K. pneumoniae* y un 17% de las de *E. cloacae*. Para *A. baumannii*, no hay ninguna cepa con CMI para ciprofloxacino inferior a 128 mg/L. Frente a todas las cepas resistentes a ciprofloxacino, también ozenoxacino y moxifloxacino pierden su actividad.

La actividad de ozenoxacino frente a las cepas de *M. tuberculosis* se encuentra dentro del rango de la reportada para las fluoroquinolonas (Angeby, 2010), también independientemente de la resistencia a rifampicina, isoniazida o estreptomycin. Los resultados para rifampicina, como comparativo utilizado, se corresponden con los habituales para las cepas salvajes y para las resistentes a distintos antibióticos (Angeby, 2010, Diratthakit, 2010).

Los resultados obtenidos para levofloxacino, frente a las diferentes especies de *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Legionella* spp., coinciden con los reportados en la literatura, con alguna ligera variación en el rango de CMI (García, 2000, Jonas, 2001, Nilius, 2002, Pereyre, 2004).

APARTADO III. 4. BIBLIOGRAFÍA

III.4. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, H.J., Laing, N.M., King, C.R., Lulashnyk, B., Hoban, D.J. y Zhanel, G.G. 2009. *In vitro* activity of nemonoxacin, a novel nonfluorinated quinolone, against 2,440 clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**:4915-4920.
- Alba, V., Urban, E., Domínguez, M.A., Nagy, E., Nord, C.-E., Palacín, C. y Vila, J. 2009. *In vitro* activity of nadifloxacin against several gram-positive bacteria and analysis of the possible evolution of resistance after 2 years of use in Germany. *J Antimicrob Chemother*, **33**(3):272-275.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, **48**(S1):5-16.
- Angeby, K.A., Jureen, P., Giske, C.G., Chysshanthou, E., Sturegard, E., Nordwall, M., Johansson, A.G., Werngreen, J., Kahmeter, G., Hoffner, S.E. y Schon, T. 2010. Wild-type MIC distributions of four fluoroquinolones active against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to current critical concentrations and available pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J Antimicrob Chemother*, **65**: 946-952.
- Appelbaum, P.C. 2007. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*, **30**(5):398-408.
- Arsène, S. y Leclercq, R. 2007. Role of *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**(9):3254-325.
- Bhagwat, S.S., Mcghee, P., Kosowska-Shick, K., Patel, M.V. y Appelbaum, P.C. 2009. *In vitro* activity of the quinolone WCK 771 against recent U.S. hospital and community-acquired *Staphylococcus aureus* pathogens with various resistance types. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**:811-813.
- Biedenbach, D.J., Rhomberg, P.R., Mendes, R.E. y Jones, R.N. 2010. Spectrum of activity, mutation rates, synergistic interactions, and the effects of pH and serum proteins for fusidic acid (CEM-102). *Diagn Microbiol Infect Dis*, **66**(3):301-307.
- Boucher, H.W. y Corey, G.R. 2008. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, **46**:344-349.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B. y Barlett, J. 2009. Bag bugs, no drugs: No ESKAPE; An update from the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Report. CID*, **48**:1-12.
- Brook, I. 2002. Secondary bacterial infections complicating skin lesions. *J Med Microbiol*, **51**:808-812.
- Cacho, J., Sanz, F., Blanco, M.A. y Grupo de ETS-Perinatal de SMMC. 2001. La enfermedad silenciosa por *Chlamydia trachomatis*: necesidad urgente de detección y tratamiento en mujeres. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **19**:419-421.
- Christiansen, K.J., Bell, J.M., Turnidge, J.D. y Jones, R.N. 2004. Antimicrobial activities of garenoxacin (BMS284756) against Asia-Pacific region clinical isolates from the SENTRY Program, 1999 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(6):2049-2055.
- CLSI. Anteriormente **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. 1998. Methods for susceptibility testing for bacteria that grows aerobically. M7-A4. Villanova, PA.
- CLSI Anteriormente **NCCLS** 2003. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae* and other aerobic *Actinomycetes*; Approved Standard. NCCLS Document M24-A. NCCLS, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.)
- CLSI. Anteriormente **NCCLS**. 2004. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard, Sixth Edition. NCCLS Document M11-A6. NCCLS, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA
- CLSI. 2006a Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh Edition. CLSI Document M7-A7. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- CLSI . 2006b. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. CLSI Document M45-A. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- Coskun-Ari, F.F. y Bosgelmez-Tinaz, G. 2008. *grlA* and *gyrA* mutations and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of ciprofloxacin-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Med Res*, **13**(8):366-370
- Derrick, J.P., Urwin, R., Suker, J., Feavers, I.M., y Maiden, M.C.J. 1999. Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. *Infect Immun*, **67**(5):2406-2413.
- Disratthakit, A. y Doi, N. 2010. *In vitro* activities of DC-159a, a novel fluoroquinolone against *Mycobacterium* species. *Antimicrob Agents Chemother*, **54** (6):2684-2686.

- Ednie, L.M., Rattan, A., Jacobs, M.R. y Appelbaum, P.C. 2003. Antianaerobe activity of RBX 7644 (ranbezolid), a new oxazolidinone, compared with those of eight other agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**(3):1143-1147.
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. y Vila, J. 2009. Mechanism of action and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*, **2**(1):40-61.
- Farber, J.M. y Peterkin, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*, **55**(3):476-511.
- Ferrero, F., Ossorio, M., Erikson, P. y Duran, A. 2000. *Mycoplasma pneumoniae* en niños con neumonía. *Arch Argent Pediatr*, **98**:12-17.
- Fomin, P., Koalow, S., Cooper, A., Babinchak, I., Dartois, N., De Vane, N., Castaing, N., Tellado, J. en **representación de los grupos de estudio 301 y 306**. 2008. La eficacia y seguridad de la tigeciclina en el tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas – Experiencia Europea. *J Chemother*, **20**(1):13-21.
- Fritsche, T.R., Kirby, J. T. y Jones, R.N. 2004. *In vitro* activity of tigecycline (GAR-936) tested against 11,859 recent clinical isolates associated with community-acquired respiratory tract and gram-positive cutaneous infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **49**:201-209.
- Fung-Tomc, J.C., Minassian, B., Kolek, B., Huckzko, E., Aleksunes, L., Stickle, T., Washo, T., Gradelski, E., Valera, L. y Bonner, D.P. 2000. Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro(6) quinolone, BMS-284756. *Antimicrobial Agents Chemother*, **44**(12):3351-3356.
- García, M.T., Pelaz, C., Giménez, M.J. y Aguilar, L. 2000. *In vitro* activities of gemifloxacin versus five quinolones and two macrolides against 271 Spanish isolates of *Legionella pneumophila*: influence of charcoal on susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(8):2176-2178.
- García-Agudo, L., Huertas, M., Asensio, M.A., Carranza, R. y García-Martos, P. 2011. Antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from outpatient individuals. *Rev Esp Quimioter*, **24**(2):91-95.
- Gemmell, C.G. y cols. 2006. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother*, **57**:589-608.
- Goldstein, F.W. y Acar, J.F. 1995. Epidemiology of quinolone resistance: Europe and North and South America. *Drugs*, **49**(2):36-42.
- Goldstein, E.J., Citron, D.M., Merriam, C.V., Warren, Y.A., Tyrrell, K.L. y Fernández, H.T. 2006. Comparative *in vitro* activities of retapamulin (SB-275833) against 141 clinical isolates of *Propionibacterium* spp., including 117 *P.acnes* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**:379-381.
- Gordon, K.A., Pfaller, M.A., Jones, R.N. & the SENTRY Participants Group. 2002. BMS-284756 (formerly T-3811, a desfluoroquinolone) potency and spectrum tested against over 10,000 bacterial bloodstream infection isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2000). *J Antimicrob Chemother*, **49**:851-855.
- Haas, W., Pillar, C.M., Zurenko, G.E., Lee, J.C., Brunner, L.S. y Morris, T.W. 2009. Besifloxacin, a novel fluoroquinolone, has broad-spectrum *in vitro* activity against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**(8):3552-3560.
- Hecht, D.W. y Osmolski, J.R. 2003. Activities of garenoxacin (BMS-284756) and other agents against anaerobic clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**:910-916.
- Hernández, A., Sánchez, M.B., y Martínez, J.L., 2011. Quinolone Resistance: Much More than Predicted. *Front Microbiol*, **2**:22.
- Higgins, P.G., Stubbings, W., Wisplinghoff, H. y Seifert, H. 2010. Activity of the investigational fluoroquinolone finafloxacin against ciprofloxacin-sensitive and –resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**(4):1613-1615.
- Ho, P.L., Que, T.L., Chiu, S.S., Yung, R.W., Ng, T.K., Tsang, D.N., Seto, W.H. y Lau, Y.L. 2004. Fluoroquinolone and other antimicrobial resistance in invasive pneumococci, Hong Kong, 1995-2001. *Emerg Infect Dis*, **10**(7):1250-1257.
- Hoellman, D.B., Lin, G., Ednie, L.M., Rattan, A., Jacobs, M.R. y Appelbaum, P.C. 2003. Antipneumococcal and antistaphylococcal activities of ranbezolid (RBX 7644), a new oxazolidinone, compared to those of other agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**:1148-1150.
- Hooper, D.C. 2001. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Inf Dis*, **7**(2):337-341.
- Howden, B.P., Ward, P.B., Charles, P.G., Korman, T.M., Fuller, A., du Cros, P., Grabsch, E.A., Roberts, S.A., Robson, J., Read, K., Bak, N., Hurley, J., Johnson, P.D., Morris, A.J., Mayall, B.C. y Grayson, M.L. 2004. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis*, **38**(4):521-528.
- Hurdle, J.G., O'Neill, A.J. y Chopra, I. 2004. Anti-staphylococcal activity of indolmycin, a potential topical agent for control of staphylococcal infections. *J Antimicrob*, **54**:549-552.

- Jacobs, M.R., Bajaksouzian, S., Windau, A., Appelbaum, P.C., Patel, M.V., Gupte, S.V., Bhagwat, S.S., De Souza, N.J. y Khorakiwala, H.F. 2004. *In vitro* activity of the new quinolone WCK771 against Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother, **48**:3338-3342.
- Janniger, C.K., Schwartz, R.A., Szepletowski, A., y Reich, A. 2005. Intertrigo and Common Secondary Skin Infections. Am Fam Physician, **72**(5):833-838.
- Jensen, J.U., Jensen, E.T., Larsen, A.R., Meyer, M., Junker, L., Rønne, T., Skov, R., Jepsen, O.B. y Andersen, L.P. 2006. Control of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) outbreak in a day-care institution. J Hosp Infect, **63**(1):84-92.
- Jonas, D., Engels, I, Friedhoff, C., Spitzmüller, B., Daschner, F.D. y Frank, U. 2001. Efficacy of moxifloxacin, trovafloxacin, clinafloxacin and levofloxacin against intracelullar *Legionella pneumophila*. J Antimicrob Chemother, **47**:147-152.
- Jones, R.N. y Pfaller, M.A. 2002. Ciprofloxacin as a broad-spectrum empiric therapy, -are fluoroquinolones still viable monotherapeutic agents compared with beta-lactams: data from the MYSTIC Program (US)?. Diagn Microbiol Infect Dis, **42**(3):213-215.
- Jones, R.N. y Biedenbach, D.J. 2003. Comparative activity of garenoxacin (BMS-284756), a novel desfluoroquinolone, tested against 8,331 isolates from community-acquired respiratory tract infections: North American results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1999-2001). Diagn Microbiol Infect Dis, **45**:273-278.
- Jones, R.N., Fritsche, T.R., Sader, H.S. y Ross, J.E. 2006. Activity of retapamulin (SB-275833), a novel pleuromutilin, against selected resistant gram-positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother. **50**:2583-2586.
- Jones, R. N., Ross, J.E., Castanheira, M. y Mendes, R.E. 2008. United States resistance surveillance results for linezolid (LEADER program for 2007). Diagn Microbiol Infect Dis, **62**:416-426.
- Keating, G.M. y Scott, L.J. 2004. Moxifloxacin. A review of its use in the management of bacterial infections. Drugs, **64** (20):2347-2377.
- Kirby, J.T., Mutnick, A.H., Jones, R.N., Biedenbach, D.J. y Pfaller, M.A., The SENTRY Participants Group. 2002. Geographic variations in garenoxacin (BMS-284756) activity tested against pathogens associated with skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). Diagn Microbiol Infect Dis, **43**:303-309.
- Lambert, P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J R Soc Med, **95**(41):22-26.
- Lauderdale, T., Shiau, Y., Lai, J., Chen, H. y King, C. 2010. Comparative *in vitro* activities of nemofloxacin (TG-873870), a novel nonfluorinated quinolone, and other quinolones against clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother, **54**:1338-1342.
- Leffler, D.A. y Lamont, J.T. 2009. Treatment of *Clostridium-difficile*-associated disease. Gastroenterology, **136**:1899-1912.
- Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W.M., y Yu, E.W. 2008. Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, **52**(9):3052-3060.
- Martín de Nicolás, M.M., Vindel, A., Torrellas, A. y Sáez-Nieto, J.A. 1995. *In vitro* activity of mupirocin and eleven other antibiotics against 1,500 Spanish clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing hospital infections. Rev Esp Quimioterap, **8**(2):145-150.
- Martin, L.J., Flint, J., Ravel, A., Dutil, L., y Ratnam, S. 2006. Antimicrobial resistance among *Salmonella* and *Shigella* isolates in five Canadian provinces (1997 to 2000). Can J Infect Dis Med Microb, **17**(4):243-250.
- Milatovic, D., Schmitz, F.-J., Brisse, S., Verhoef, J. y Fluit, AD.C. 2000. *In vitro* activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. Antimicrob Agents Chemother, **44**:1102-1107.
- Morrissey I, y George J. 1999. Activities of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases purified as recombinant proteins. Antimicrob Agents Chemother.; **43**(11):2579-85.
- Mulvey, M.R. y Simor, A.E. 2009. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? Can Med Ass J, **180**(4):408-415.
- Nenoff, P., Haustein, U.-F. y Hittel, N. 2004. Activity of nadifloxacin (OPC-7251) and seven other antimicrobial agents against aerobic and anaerobic gram-positive bacteria isolated from bacterial skin infections. Chemotherapy, **50**(4):196-201.
- Neuhauser, M.M., Weinstein, R.A., Rydman, R. y cols. 2003. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. JAMA, **289**(7):885-888.
- Nilius, A.M., Shen, L.L., Hensey-Rudloff, D., Almer, L.S., Beyer, J.M., Balli, D.J., Cai, Y. y Flamm, R.K. 2003. *In vitro* antibacterial potency and spectrum of ABT-492, a new fluoroquinolone. Antimicrob Agents Chemother, **47** (10):3260-3269.

- Noguchi, N., Okihara, T., Namiki, Y., Kumaki, Y., Yamanaka, Y., Koyama, M., Wakasugi, K. y Sasatsu, M.** 2005. Susceptibility and resistance genes to fluoroquinolones in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2002. *Int J Antimicrob Agents*, **25**(5):374-379.
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., y Jung, R.** 2005. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacother*, **25**(10):1353-1364.
- Odou, M.-F., Muller, C., Calvet, L. y Dubreuil, L.** 2007. *In vitro* activity against anaerobes of retapamulin, a new topical antibiotic for treatment of skin infections. *J Antimicrob Chemother*, **59**:646-651.
- Oizumi, N., Kawabata, S., Hirao, M., Watanabe, K., Okuno, S., Fujiwara, T. y Kikuchi, M.** 2001. *In vitro* activity of nadifloxacin against several gram-positive bacteria and analysis of the possible evolution of resistance after 2 years of use in Germany. *J Antimicrob Chemother*, **33** (3):272-275.
- Paulsen, I.T., y cols.** 2003. Role on mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. **299**:2071-2074.
- Pawa, A., Noble, W.C. y Howell, S.A.** 2000. Co-transfer of plasmids in association with conjugative transfer of mupirocin and mupirocin and penicillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **49**:1103-1107.
- Pankuch, G.A, Jacobs, M., Khorakiwala, H., de Souza, N., Patel, M., y Appelbaum, P.** 2001. Antipneumococcal activities of WCK 771A and WCK 919 (two new quinolones) compared to 12 other agents against 177 quinolone-susceptible pneumococci. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (41st : 2001 : Chicago, Ill.). *Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother*. abstract no. F-541.
- Perry, A.L. y Lambert, P.** 2006. *Propionibacterium acnes*. *Lett Appl Microbiol*, **42**(3):185-188.
- Peyre, S., Renaudin, H., Bébéar, C. y Bébéar, C.M.** 2004. *In vitro* activities of the newer quinolones garenoxacin, gatifloxacin, and gemifloxacin against human mycoplasmas. *Antimicrob Agents Chemother*, **48** (8):3165-3168.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Leksmi, M.U, Dharsana, K.S. y Vjila, H.M.** 2007. Listeria-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microb Immunol Infect*, **40**(1): 4-13.
- Rittenhouse, S., Biswas, S., Broskey, J., McCloskey, L., Moore, T., Vasey, S., West, J., Zalacain, M., Zonis, R. y Payne, D.** 2006. Selection of retapamulin, a novel pleuromutilin for topical use. *Antimicrob Agents Chemother*, **50** (11):3882-3885.
- Rodríguez, R., Fuster, F., Torres, A., Prieto, P. y Alberto, J.** 2001. Genital infections and infertility. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **19**(6):261-266.
- Rouquette-Loughlin, C., Dunham, S.A., Kuhn, M., y Shafer, W.M.** 2003. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. *J Bacteriol*, **185**:1101-1106.
- Ruiz, J., Ribera, A., Jurado, A., Marco, F. y Vila, J.** 2005. Evidence for a reserpine-affected mechanism of resistance to tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *APMIS*, **113**:670-674.
- Salas, A.** 2007. *Mycoplasma pneumonia pneumonia*. *Rev Soc Bol Ped*, **46**(3):163-170.
- Schmitz, F.J., Fluit, A.C., Brisse, S., Verhoef, J., Köhrer, K. y Milatovic, D.** 1999. Molecular epidemiology of quinolone resistance and comparative *in vitro* activities of new quinolones against European *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Immunol. Med Microbiol*, **26**:281-287.
- Seral, C., Barcia-Macay, M., Mingeot-Leclercq, Tulkens, P. y Van Bambeke, F.** 2005. Comparative activity of quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and garenoxacin) against extracellular and intracellular infection by *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages. *J Antimicrob Chemother*, **55**:511-517.
- Shopsin, B., Zhao, X., Kreiswirth, B.N. y cols.** 2004. Are the new quinolones appropriate treatment for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*?. *Int J Antimicrob Agents*, **24**(1):32-34.
- Smith, F.J., Noreddin, A.M., Siemens, C.G., Schurek, K.N., Greisman, J., Hoban, C.J., Hoban, D.J. y Zhanel, G.G.** 2004. Designing fluoroquinolone breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* by using genetic instead of pharmacokinetic-pharmacodynamics. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:3630-3635.
- Strahilevitz, J., Truong-Bolduc, Q.-C., y Hooper, D.C.** 2005. DX-619, a Novel Des-Fluoro(6) Quinolone Manifesting Low Frequency of Selection of Resistant *Staphylococcus aureus* Mutants: Quinolone Resistance beyond Modification of Type II Topoisomerases. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(12):5051-5057.
- Streit, J.M., Jones, R.N., Toleman, M.A., Stratchounski, L.S. y Fritsche, T.R.** 2006. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). *Int J Antimicrob Agents*, **27**(5):367-375.
- Sutherland, R., Boon, R.J., Griffin, K.E., Slocombe, B. y White, R.** 1985. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob Agents and Chemother*, **27**(4): 495-498.

- Tanaka, M., Yamazaki, E., Chiba, M., Yoshihara, K., Akasaka, T., Takemura, M. y Sato, K.** 2002. *In vitro* antibacterial activities of DQ-113, a potent quinolone, against clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**(3):904-908.
- Tankovic, J., Mahjoubi, F., Courvalin, P., Duval, J. y Leclercq, R.** 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and rol of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrob Agents and Chemother*, **40**(11): 2558-2561.
- Teras, J., Gardovskis, J., Vaasna, T.; Kupcs, U., Pupelis, G., Dukdaart, G., Dartois, Jouve, S., en representación del grupo de estudio 305.** 2008. Panorama de la eficacia y seguridad de la tigeciclina en el tratamiento de infecciones complicadas de piel y de partes blandas – Una perspectiva Europea. *J Chemother*, **20**(1):22-29.
- Traczewsky, M.M. y Brown, S.D.** 2008. Proposed MIC and disk diffusion microbiological cutoffs and spectrum of activity of retapamulin, a novel topical antimicrobial agent. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**:3863-3867.
- UNICEF, WHO.** 2006. Pneumonia: the forgotten killer of children. New York: United Nations Children´s Fund.
- Vall, M.** 2004. Infecciones de transmisión sexual causadas por *Chlamydia trachomatis*. Consideraciones epidemiológicas. *Ginec Obstetr Clin*, **5**(4):237-238.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenly, T., Reverdy, M.-E. y Ettienne, J.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerging Infectious Diseases*. **9**(8):978-984.
- Verkade, E.J.M., Verhulst, C.J.M.M., Huijsdens, X.W. y Kluytmans, J.A.J.W.** 2010. *In vitro* activity of tigecycline against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, including livestock-associated strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **29**:503-507.
- Vila, J., Fàbrega, A., Roca, I., Hernández, A., y Martínez, J.L.** 2011. Efflux pumps as and important mechanism for quinolone resistance. *Adv Enz Rel Areas Mol Biol*, **77**:165-233.
- Vogt, K., Hermann, J., Blume, U., Gollnick, H., Hahn, H., Haustein, U.F. y Orfanos, C.E.** 1992. Comparative activity of the topical quinolone OPC-7251 against bacteria associated with acne vulgaris. *New Antimicrob Agents*, **11**(10):943-945.
- Waites, K. y Talikington, D.** 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **17**:697-728.
- Woodford, N., Afzal-Shah, Warner, M. y Livermore, D.M.** 2008. *In vitro* activity of retapamulin against *Staphylococcus aureus* isolates resistant to fusidic acid and mupirocin. *J Antimicrob Chemother*. **62**:766-768.
- www.eucast.org
- www.CLSI.org
- Yamakawa, T., J. Mitsuyama, y K. Hayashi.** 2002. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J Antimicrob Chemother*, **49**:455-465.
- Yun, H., Min, Y., Lim, J., Kang, J., Kim, S., Kim, M., Jeong, J., Choi, Y., Kwon, H., Jung, Y., Shim, M. y Choi, E.** 2002. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of DW286, a new fluoronaphthyridone antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**:3071-3074.

Página en blanco

CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD BACTERICIDA Y PERFIL EN CURVAS DE LETALIDAD

APARTADO IV.1. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO IV. Actividad Bactericida y perfil en curvas de letalidad

En este capítulo se describe la evaluación de la actividad bactericida de ozenoxacino, mediante la determinación de la ratio CMB/CMI (comparación entre la concentración mínima bactericida y la concentración mínima inhibitoria) y el estudio del perfil de ozenoxacino en las curvas de letalidad frente a diferentes especies de bacterias Gram-positivas.

IV.1. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.1. Determinación de la ratio CMB/CMI. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB)

Para la valoración de la relación entre la CMI y la CMB de ozenoxacino, levofloxacino y daptomicina frente a unas cepas seleccionadas de bacterias Gram-positivas, se determinó, en primer lugar, la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas usando la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en medio líquido, y posteriormente la concentración mínima bactericida por el método de dilución en agar. A continuación se establecieron las CMI₉₀ y las CMB₉₀, por especies o subgrupos de especies, las ratios CMB/CMI para cada cepa, y finalmente, se calcularon los correspondientes CMB₉₀/CMI₉₀, por especies o subgrupo de especies, también.

IV.1.1.1. Microorganismos

El panel de cepas utilizado fue de 200 aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, procedentes de la colección de cepas de Quotient Bioresearch Ltd., Microbiology (Gran Bretaña):

Características de las cepas utilizadas			
# Cepas	Especie	# Cepas	Fenotipo
50	<i>Staphylococcus aureus</i>	21	Sensibles a meticilina
		20	Resistentes a meticilina
		9	Susceptibilidad intermedia a vancomicina
50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25	Sensibles a meticilina
		25	Resistentes a meticilina
50	<i>Streptococcus pyogenes</i>	33	Sensibles a eritromicina
		17	Resistentes a eritromicina
58	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	18	Sensibles a penicilina
		16	Susceptibilidad intermedia a penicilina
		16	Resistencia a penicilina

IV.1.1.2. Productos

Se utilizaron ozenoxacino (lote A07428E) y daptomicina (lote WS79348), suministrados por Ferrer Internacional, y levofloxacino (lote 1425507), por Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, GB.).

Las soluciones madres de los compuestos, 1.600 mg/L para ozenoxacino, 800 mg/L para daptomicina y 12.800 mg/L para levofloxacino, se preparan igual que en el apartado III.1.2.

Las diluciones en caldo Mueller Hinton ajustado con cationes (CAMHB) para los tres antibióticos, se prepararon a 100x de las ensayadas.

Tabla IV.2	Productos utilizados y diluciones testadas	
	Antibióticos	Diluciones
	Ozenoxacino	0,1 – 1.600 mg/L
	Levofloxacino	6 – 12.800 mg/L
	Daptomicina	0,4 – 800 mg/L

Después de preparar las microplacas, éstas se marcaron y congelaron a $-75 \pm 7^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

IV.1.1.3. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Las CMI se determinaron según el método de microdilución de acuerdo al *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009a), en CAMHB.

El caldo Mueller Hinton utilizado para la determinación de las CMI de daptomicina se suplementó con iones extra de Ca^{2+} a 50 mg/L, a posteriori de la estimación del contenido de calcio inicial; y al caldo Mueller Hinton utilizado para el crecimiento de los estreptococcus se añadió sangre lisada de caballo.

Se controló exactamente el inóculo de cada una de las cepas utilizadas, y se realizó, en el mismo estudio, la determinación de la CMB (CLSI, 2009b).

IV.1.1.4. Determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB)

La CMB se define como la concentración de antimicrobiano que elimina el 99,9% de la población bacteriana inicial (CLSI, 2009b).

Después de determinar el valor de la CMI para cada cepa y antibiótico, se resiembran alícuotas de todos aquellos pocillos en los que se observa inhibición visible del crecimiento, para determinar en cuáles de ellos se ha eliminado hasta un 99,9% de la población que se inoculó al principio del ensayo. Se sembró, con 10 μL de cada uno de esos pocillos, una placa de Mueller Hinton agar (suplementado con un 5% de sangre completa) para su recuento, tras una incubación de 48 horas. Para cada una de las cepas se determinó como CMB aquella concentración de antibiótico que fue capaz de eliminar por completo el crecimiento bacteriano o, que lo hizo en el 99% de las colonias, comparándolo con el inóculo inicial. Se determinaron, además, las concentraciones de antimicrobianos que eliminaron al 90% y al 50% de las cepas bacterianas (CMB_{90} y CMB_{50} , respectivamente).

IV.1.1.5. Cálculo de la ratio CMB/CMI

Para cuantificar la relación entre la CMI y la CMB se divide el valor de la CMB, para cada cepa, por su CMI, ese cociente es la ratio CMB/CMI que indicará la potencia de la actividad bactericida, o por el contrario, la tolerancia de ozenoxacino y levofloxacino frente a las cepas estudiadas (Montanari, 2001, Haas, 2010).

IV.1.2. Determinación de la actividad bactericida de ozenoxacino mediante curvas de letalidad

El objetivo de este estudio es la determinación de la capacidad bactericida o de letalidad de ozenoxacino y de levofloxacino de acuerdo a la metodología CLSI (CLSI, 2009b). Para el estudio con curvas de letalidad se seleccionaron cepas con distintos fenotipos de resistencia de entre los patógenos potencialmente causantes de SSSIs.

IV.1.2.1. Cepas

Las especies bacterianas seleccionadas para este ensayo eran Gram-positivas, pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, con distintos perfiles de susceptibilidad y resistencia a meticilina, levofloxacino, vancomicina y penicilina. Todas las cepas procedían de la colección microbiológica de Quotient Bioresearch Ltd. (Gran Bretaña).

Tabla IV.3 Descripción cepas utilizadas en la determinación de curvas de letalidad			
Patógeno	ID #	Fenotipo	
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	Resistente a meticilina	Sensible a levofloxacino
	25	Sensible a meticilina	Resistente a levofloxacino
	38	Sensible a meticilina	Sensible a levofloxacino
	46	Sensibilidad intermedia a vancomicina	Sensible a levofloxacino
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	56	Sensible a meticilina	Resistente a levofloxacino
	80	Resistente a meticilina	Sensible a levofloxacino
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	103	Sensible a penicilina	Sensible a levofloxacino
	145	Resistente a penicilina	Sensible a levofloxacino
<i>Streptococcus pyogenes</i>	155	Sensible a eritromicina	Sensible a levofloxacino
	190	Resistente a eritromicina	Resistente a levofloxacino

IV.1.2.2. Productos

Ozenoxacino (lote A07428E, Ferrer Internacional SA) y levofloxacino (lote 1425507, Sigma Aldrich, Gillingham, Dorset, GB.).

Las soluciones madres de los compuestos, 1.600 mg/L para ozenoxacino y 12.800 mg/L para levofloxacino, se preparan igual que en el apartado III.1.2.

IV.1.2.3. Medio de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo caldo Mueller Hinton ajustado con cationes (CAMHB: BBL Mueller Hinton Broth II supplied de Becton Dickinson UK Ltd. (Oxford Science Park, Oxford, GB, OX4 4DQ). La sangre de caballo era de TCS Biosciences Ltd. (Botolph Claydon. GB).

IV.1.2.4. Método de determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

La determinación previa de las CMI, para definir las concentraciones adecuadas a utilizar en este ensayo, se realizaron utilizando el método de macrodilución en medio líquido (volumen final 1mL) (CLSI, 2009a).

IV.1.2.5. Método de determinación de velocidad de curvas de letalidad bacteriana

Las curvas de letalidad de ozenoxacino y levofloxacino se realizaron siguiendo la metodología del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009b).

Las concentraciones testadas fueron dos, cuatro y ocho veces la concentración mínima inhibitoria (2x, 4x y 8x CMI) de cada cepa, y los recuentos de viables se realizaron, además de a tiempo cero, a 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas del inicio del ensayo.

Los cultivos se prepararon inoculando colonias, a partir de una placa de pureza recién preparada, en 3 mL de caldo, e incubando durante una noche a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Debido a la autólisis, los cultivos de *S. pneumoniae* se prepararon a una densidad equivalente al estándar McFarland 0,5, a partir de las placas de pureza, en 3 mL de caldo sin incubación, durante una noche. Ambos métodos produjeron un inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

El cultivo de 3 mL fue luego añadido a 18 mL de caldo, e incubado durante 1,5 horas más, a 37°C en un baño maría, para alcanzar la fase de crecimiento logarítmico.

Los cultivos en fase de crecimiento logarítmico fueron posteriormente diluidos 10^{-2} en 20 mL de caldo conteniendo 2, 4 u 8 veces la CMI de cada uno de los antibióticos y, también, en medio libre de los mismos (inóculo inicial de aproximadamente 10^{5-6} UFC/mL). Todos los cultivos fueron incubados 24 horas en un baño maría.

Se tomaron muestras de 1 mL a intervalos de 1, 3, 6 y 24 horas, y tras un doble lavado por centrifugación y reemplazo con medio libre de antibióticos, se subcultivaron en placas con medio libre de antibióticos para verificar el recuento viable total. Las placas control se incubaron a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h, y el resto de las placas durante 48h. A continuación, se realizó el recuento de viables, cuyos resultados se representan gráficamente respecto al tiempo, en el apartado siguiente.

APARTADO IV.2. RESULTADOS

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1. Determinación CMI, CMB y ratio CMB/CMI

Se han determinado las CMI y las CMB individuales para cada una de las 200 cepas de bacterias Gram-positivas ensayadas, y los resultados para ozenoxacino, levofloxacino y daptomicina se presentan, en las tablas siguientes, como CMI₉₀, CMB₉₀ y ratios CMB₉₀/CMI₉₀. Los resultados se han agrupado por especie, y por los distintos perfiles de susceptibilidad o resistencia a algunos antibióticos, incluido levofloxacino, dentro de cada especie. Las cepas en las que se ha detectado una mayor ratio CMB₉₀/CMI₉₀, que ha sido de 4, se presentan y analizan, por separado, en la última tabla de esta sección, la tabla IV.9.

Cepas	Ozenoxacino		
	CMI ₉₀ mg/L	CMB ₉₀ mg/L	Ratio CMB ₉₀ :CMI ₉₀
<i>Staphylococcus aureus</i> MS & MR & VI (n=50)	0,06	0,12	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MR & MS (n=50)	0,06	0,12	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> EryS & EryR (n=50)	0,03	0,03	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> PS & PR (n=50)	0,015	0,03	2

MS: sensible a meticilina, MR: resistente a meticilina, VI: sensibilidad intermedia a la vancomicina, EryS: sensible a eritromicina, EryR: resistente a eritromicina, PS: sensible a penicilina, PR: resistente a penicilina.

En la tabla IV.4 se observan las CMI₉₀ y CMB₉₀, y la ratio entre ellas, para ozenoxacino frente a las diferentes especies, englobando los distintos perfiles de susceptibilidad y resistencia. Ozenoxacino ha presentado valores bajos para ambos parámetros y su ratio CMB₉₀:CMI₉₀ ha fluctuado entre 1 y 2, para las cepas de las cuatro especies bacterianas estudiadas.

Cepas	Fenotipo	n	Ozenoxacino		Levofloxacino		Daptomicina	
			CMI ₉₀	CMB ₉₀	CMI ₉₀	CMB ₉₀	CMI ₉₀	CMB ₉₀
<i>S. aureus</i>	MS	20	0,02	0,06	4,4	5,2	0,5	1
<i>S. aureus</i>	MR	21	0,06	0,12	16	32	1	1
<i>S. aureus</i>	VI	9	0,07	0,12	8	9,6	1	1
<i>S. epidermidis</i>	MS	25	0,06	0,10	6,4	8	1	1
<i>S. epidermidis</i>	MR	25	0,06	0,10	80	80	1	1
<i>S. pyogenes</i>	ES	33	0,01	0,03	0,5	0,5	0,06	0,06
<i>S. pyogenes</i>	ER	17	0,03	0,03	0,7	1	0,25	0,25
<i>S. pneumoniae</i>	PS	18	0,02	0,02	0,65	1	0,25	0,325
<i>S. pneumoniae</i>	PI	16	0,01	0,02	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>S. pneumoniae</i>	PR	16	0,05	0,05	2,5	4,5	0,5	0,5

Como se observa, en la tabla IV.5, ozenoxacino ha sido el producto frente al que las cepas han presentado unas CMI₉₀ y unas CMB₉₀ más bajas, en cada uno de los fenotipos, seguido de daptomicina y, a bastante distancia, de levofloxacino.

Los rangos, para los tres antibióticos, en cada subgrupo de especies, se observan en la tabla IV.6.

Tabla IV.6 Rangos de CMI ₉₀ y CMB ₉₀ de ozenoxacino, levofloxacino y daptomicina frente a todos los subgrupos de cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> y <i>S. pneumoniae</i> .						
Cepas (n)	Ozenoxacino		Levofloxacino		Daptomicina	
	rango CMI	rango CMB	rango CMI	rango CMB	rango CMI	rango CMB
<i>S. aureus</i> MS (20)	<=0,0005-0,06	<=0,0005-0,06	0,06-16	0,06-32	0,25-1	0,25-1
<i>S. aureus</i> MR (21)	<=0,0005-0,06	0,001-0,12	0,06-128	0,12-128	0,25-2	0,25-2
<i>S. aureus</i> VI (9)	0,002-0,12	0,004-0,12	0,12-8	0,12-16	0,5-4	0,5->4
<i>S. epidermidis</i> MS (25)	0,001-0,5	0,002-1	0,06-128	0,12-128	0,06-1	0,12-1
<i>S. epidermidis</i> MR (25)	0,001-1	0,001-1	0,06-128	0,12-128	0,5-1	0,5-1
<i>S. pyogenes</i> ES (33)	0,004-0,03	0,008-0,06	0,25-2	0,25-2	0,06-,25	0,06-0,5
<i>S. pyogenes</i> ER (17)	0,008-0,03	0,008-0,03	0,12-1	0,25-2	0,008-0,25	0,008-0,25
<i>S. pneumoniae</i> PS (18)	0,008-0,25	0,008-0,5	0,25-16	0,25-32	0,12-0,5	0,12-0,5
<i>S. pneumoniae</i> PI (16)	0,004-0,008	0,008-0,015	0,25-0,5	0,25-1	0,12-0,5	0,12-0,5
<i>S. pneumoniae</i> PR (16)	0,008-0,12	0,008-0,25	0,25-0,5	0,25-1	0,25-0,5	0,25-0,5

Se observa en la tabla IV.6, que los valores extremos de CMI para ozenoxacino han sido destacadamente inferiores que para levofloxacino y daptomicina, especialmente para *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Levofloxacino ha sido el producto frente al que las cepas han presentado menor susceptibilidad, y esto se ha reflejado, también, en valores de CMB o más elevados, o inexistentes, para las cepas que son resistentes a levofloxacino; esto ha ocurrido en cada una de las especies y subgrupos, estudiados. En cambio, para ozenoxacino no ha habido ninguna cepa con una CMI o CMB superior a 1 mg/L, aunque los valores de CMI₉₀ hayan sido algo superiores a los reportados en el capítulo III. Con levofloxacino y daptomicina, también se observa que los rangos de los valores de CMI y CMB son muy similares, aunque ambos productos, presentan mejores valores para los estreptococos que no para los estafilococos.

Tabla IV.7 Ratio CMB ₉₀ /CMI ₉₀ de ozenoxacino, levofloxacino y daptomicina frente a las cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> y <i>S. pneumoniae</i> , por subgrupos.					
Cepas	Fenotipo	n	Ratio CMB ₉₀ /CMI ₉₀		
			Ozenoxacino	Levofloxacino	Daptomicina
<i>S. aureus</i>	MS	20	3,00	1,18	2,00
<i>S. aureus</i>	MR	21	2,00	2,00	1,00
<i>S. aureus</i>	VI	9	1,67	1,20	1,00
<i>S. epidermidis</i>	MS	25	1,60	1,25	1,00
<i>S. epidermidis</i>	MR	25	1,60	1,00	1,00
<i>S. pyogenes</i>	ES	33	3,48	1,00	1,00
<i>S. pyogenes</i>	ER	17	1,00	1,43	1,00
<i>S. pneumoniae</i>	PS	18	1,30	1,54	1,30
<i>S. pneumoniae</i>	PI	16	1,88	1,00	1,00
<i>S. pneumoniae</i>	PR	16	1,00	1,80	1,00

Como se puede observar, en la tabla IV.7, todas las ratios CMB₉₀/CMI₉₀ para los tres productos han estado por debajo de 4, límite descrito para los antibióticos bactericidas, en los que su CMB es no más de cuatro veces su CMI. Las ratios, para ozenoxacino frente a los distintos subgrupos de cepas, han sido de entre 1 y 3,5 diluciones, por lo que se confirma la actividad bactericida de ozenoxacino. Levofloxacino presenta una buena actividad bactericida frente a

las cepas evaluadas de *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*, no resistentes a penicilina, con CMB₉₀ inferiores o iguales a 1 mg/L

A continuación, en la tabla IV.8, se tabulan, por separado, las ratios CMB₉₀/CMI₉₀ para las cepas en función de su sensibilidad o resistencia a levofloxacinó.

Cepas	Fenotipo	n	Rango ratio CMB/CMI		
			Ozenoxacino	Levofloxacinó	Daptomicina
<i>S. aureus</i>	MS levoS	16	1-4	1-2	1-2
	MS levoR	4	1-4	1-4	1
	MR levoS	5	1-2	1-2	1
	MR levoR	16	1-2	1-2	1
	VI levoS	2	1-2	2	1
	VI levoR	7	1-2	1-2	1-2
<i>S. epidermidis</i>	MS levoS	21	1-2	1-4	1-2
	MS levoR	4	2	1-2	1
	MR levoS	16	1-4	1-2	1
	MR levoR	9	1-2	1	1
<i>S. pneumoniae</i>	PS levoS	17	1-2	1-2	1-2
	PS levoR	1	2	2	1
	PI levoS	16	1-2	1-2	1-2
	PI levoR	0	-	-	-
	PR levoS	14	1-2	1-2	1
	PR levoR	2	1-2	1-2	1
<i>S. pyogenes</i>	EriS levoS	33	1-2	1-2	1-2
	EriS levoR	0	-	-	-
	EriR levoS	17	1-2	1-2	1-2
	EriR levoR	0	-	-	-

En la tabla IV.8 se observa que, para ninguna de las cepas, la ratio CMB₉₀/CMI₉₀ ha resultado superior a 4, y mayoritariamente ha sido de entre 1-2 (82%) para las quinolonas, mientras que para daptomicina, el 60% de las cepas han presentado una ratio igual a uno, y aproximadamente el 40% restante, entre 1-2.

Cepas	Fenotipo	Ozenoxacino		ratio CMB/CMI
		CMI	CMB	
<i>S. aureus</i> 32	MS levo S	0,001	0,004	4,00
<i>S. aureus</i> 33	MS levo S	<=0,0005	0,002	4,00
<i>S. aureus</i> 31	MS levo R	0,015	0,06	4,00
<i>S. epidermidis</i> 95	MR levo S	0,015	0,06	4,00
Cepas	Fenotipo	Levofloxacinó		ratio CMB/CMI
		CMI	CMB	
<i>S. aureus</i> 41	MS levo R	8	32	4,00
<i>S. epidermidis</i> 52	MS levo S	0,125	0,5	4,00
<i>S. epidermidis</i> 54	MS levo S	0,125	0,5	4,00

MS: sensible a metilina, MR: resistente a metilina, levoS:sensible a levofloxacinó y levoR: resistente a levofloxacinó.

En la tabla anterior se detallan aquellas cepas con ratio CMB/CMI igual a 4 para ozenoxacino, se observa que los valores individuales, tanto de CMI como de CMB, han sido muy reducidos, esto se traduce en que se ha obtenido la eliminación del 99,9% del inóculo bacteriano con una concentración de entre 0,002 y 0,06 mg/L de producto.

En el caso de levofloxacino, se detectan, con ratios de CMB/CMI de 4, una cepa MSSA y dos MSSE (ambas levoS). Se observa que, una de las cepas de MSSA es resistente a levofloxacino y las otras dos, MSSE, poseen una CMB de 0,5 mg/L.

IV.2.2 Curvas de letalidad

IV. 2.2.1. Determinación de las CMI:

Patógeno	ID	Fenotipo	CMI (mg/L)	
			OZN	LEV
<i>S. aureus</i>	3	Resistente a metilina	0,002	0,25
<i>S. aureus</i>	25	Sensible a metilina / Resistente a levofloxacino	0,03	4
<i>S. aureus</i>	38	Sensible a metilina	0,004	0,12
<i>S. aureus</i>	46	Sensibilidad intermedia a vancomicina	0,004	0,25
<i>S. epidermidis</i>	56	Sensible a metilina / Resistente a levofloxacino	0,12	8
<i>S. epidermidis</i>	80	Resistente a metilina	0,015	0,25
<i>S. pneumoniae</i>	103	Sensible a penicilina	0,06	0,5
<i>S. pneumoniae</i>	145	Resistente a penicilina	0,03	0,5
<i>S. pyogenes</i>	155	Sensible a eritromicina	0,015	0,5
<i>S. pyogenes</i>	190	Resistente a eritromicina	0,06	0,5

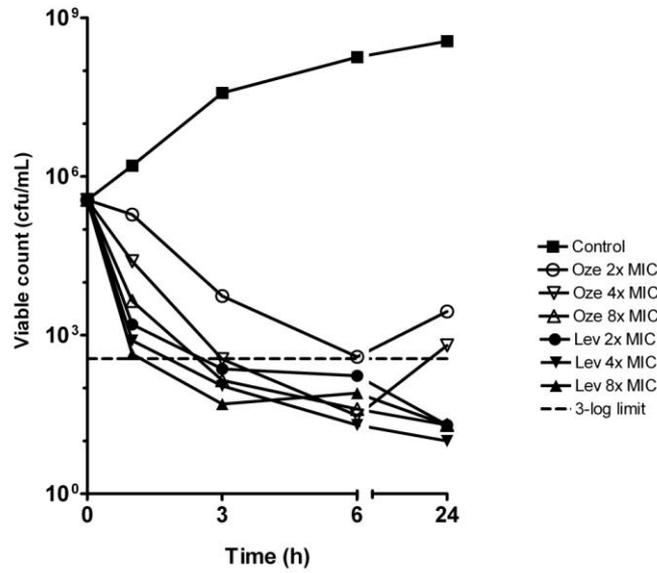
Las CMI para ozenoxacino (OZN) y levofloxacino (LEV), de las cepas que se han utilizado para los experimentos de determinación de curvas de letalidad, se presentan en la tabla IV.10. Las CMI de las cepas para ozenoxacino han sido muy bajas, entre 0,002 y 0,12 mg/L, mientras que para levofloxacino, se han seleccionado dos cepas resistentes (*S. aureus* 25 y *S. epidermidis* 56), y las ocho restantes, con un rango entre 0,25 y 0,5 mg/L.

Se puede observar que, en todos los casos, ozenoxacino ha sido entre 3 y 7 diluciones más activo que levofloxacino.

VI. 2.2.2. Curvas de letalidad:

Los resultados se presentan, en forma de gráficas, para las distintas especies bacterianas cepa por cepa, en las figuras IV.1- IV.10. Una letalidad bacteriana significativa se considera como aquella que consigue una reducción de 3 logaritmos en el recuento de viables, y se refleja, en cada una de las figuras, como una línea punteada.

Figura IV.1: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacinio frente a la cepa de *S. aureus* 3 (MRSA y sensible a levofloxacinio).



Frente a la cepa MRSA, levofloxacinio, a todas las concentraciones testadas, y ozenoxacino, a 4x y 8x su CMI, han sido capaces de reducir el recuento de viables en 3 logs dentro de las 3 primeras horas de incubación (Fig. IV.1). La actividad bactericida (*killing*) de ozenoxacino ha sido similar a la de levofloxacinio, excepto para ozenoxacino a 2x su CMI, y tras 24h de incubación a 4x su CMI, donde ha habido un cierto aumento de viables. Estos resultados se han producido, con las concentraciones testadas para levofloxacinio 125-veces (7 diluciones) más elevadas que las de ozenoxacino, recordamos sus CMI de 0,002 mg/L para ozenoxacino y 0,25 mg/L para levofloxacinio.

Figura IV.2: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacinio frente a la cepa de *S. aureus* 25 (MSSA y resistente a levofloxacinio).

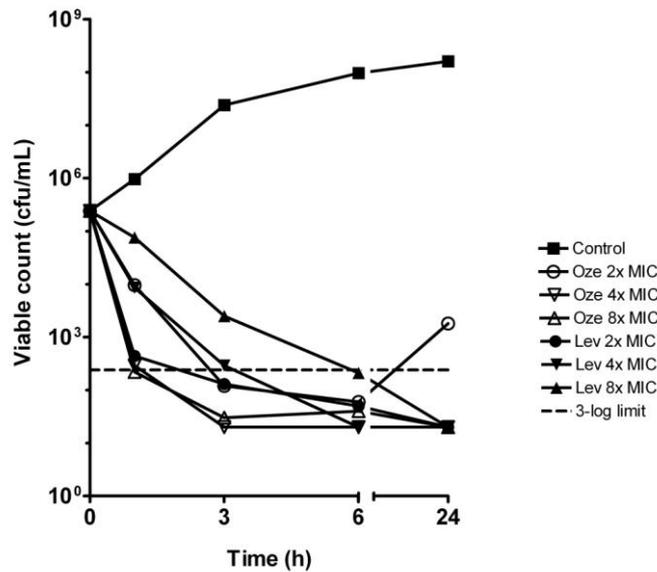
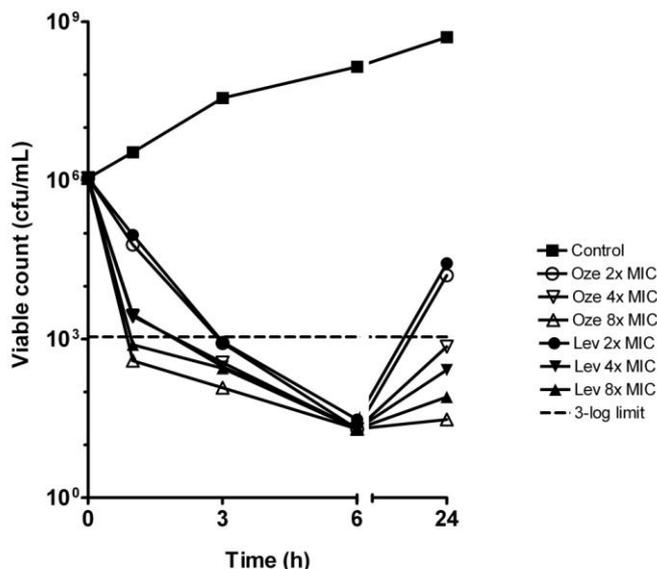


Figura IV.3: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. aureus* 38 (MSSA y sensible a levofloxacino).

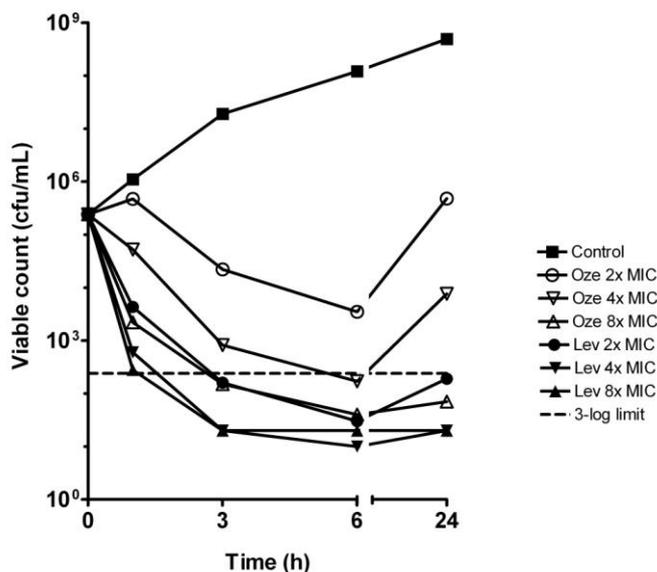


Con las dos cepas MSSA, tanto la resistente como la sensible a levofloxacino (Figs IV.2 y IV.3), se observó una actividad bactericida (*killing*) de ozenoxacino similar a la obtenida frente a la cepa MRSA, sensible a levofloxacino (Fig. IV.1).

Es de destacar que la actividad de levofloxacino frente a la cepa 25 (Fig. IV.2) es menor a 8x CMI que a 4x CMI, que a su vez, es menor que a 2x CMI. Si la diferencia entre concentraciones fuera más elevada se podría atribuir al efecto paradójico que ha sido descrito con anterioridad para quinolonas (Lewin, Hooper 2001 CID). No se han observado resultados similares con ozenoxacino, la concentración x8 CMI posee una mayor actividad bactericida que la x4 CMI, y ésta mayor que la x2 CMI.

En las curvas de letalidad con la cepa *S. aureus* 38 se observa un aumento del recuento de viables en el punto 24 horas, con levofloxacino a todas las concentraciones, y con ozenoxacino a 2x y 4x CMI, mientras que no, a 8x su CMI (Fig. IV.3).

Figura IV.4: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. aureus* 46 (VISA y sensible a levofloxacino).



Ozenoxacino a 2x y 4x su CMI no fue bactericida frente a la cepa de *S. aureus* con sensibilidad intermedia a la vancomicina, mientras que sí lo fue a la concentración de 8x CMI a las 3h (Fig. IV.4). El valor de 8x CMI a ozenoxacino es de 0,03 mg/L, que es una concentración muy baja. Levofloxacino fue más bactericida que ozenoxacino, proporcional al valor de su CMI y en tiempo, pero, esto simplemente puede reflejar la mayor concentración testada de levofloxacino (2 mg/L), debido a su mayor CMI respecto a ozenoxacino, siempre con concentraciones testadas bastante más bajas. Con la cepa VISA, las CMI para levofloxacino son 62 veces (6 diluciones) más elevadas que para ozenoxacino, 2 mg/L vs 0,032 mg/L.

Figura IV.5: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. epidermidis* 56 (MSSE y resistente a levofloxacino).

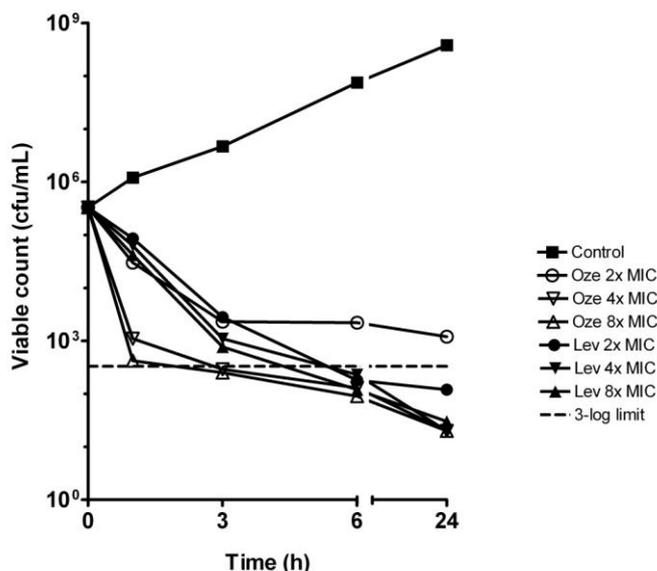
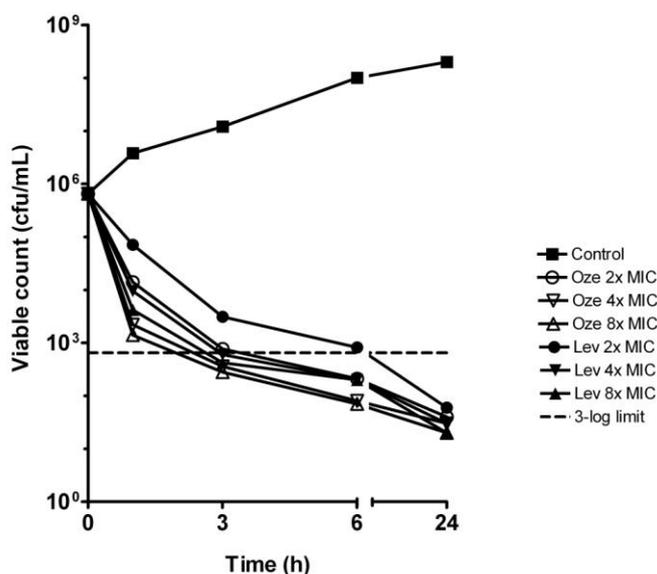


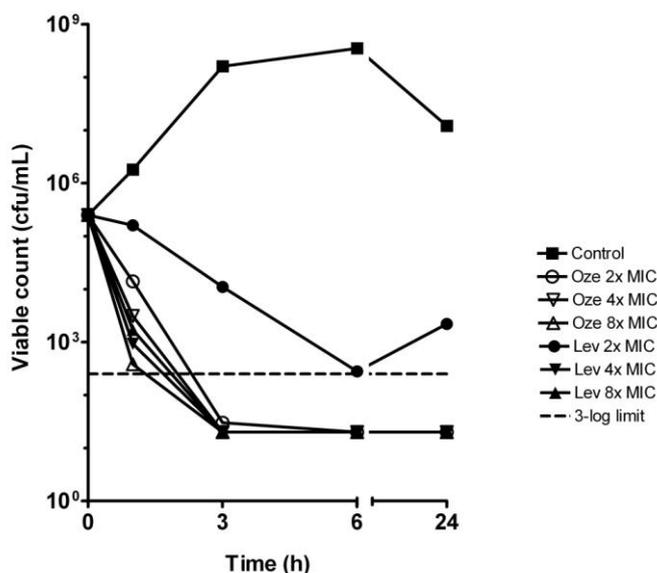
Figura IV.6: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a *S. epidermidis* 80 (MRSE y sensible a levofloxacino).



La actividad bactericida de ambas quinolonas fue similar entre las dos cepas de *S. epidermidis* investigadas (Figs IV.5 y IV.6), siendo ozenoxacino a 2x CMI no bactericida frente a una de ellas, la MSSE y resistente a levofloxacino (Fig. IV.5), y levofloxacino siendo no bactericida a 2x

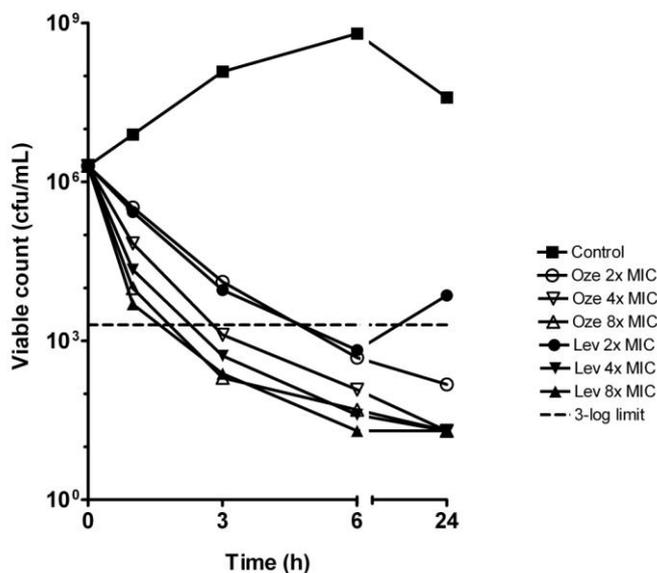
su CMI frente a la otra, MRSE y sensible a levofloxacino (Fig. IV.6). Tanto ozenoxacino como levofloxacino fueron menos rápidamente bactericidas frente a las cepas de *S. epidermidis* (Figs. IV.5 & IV.6) que frente a las cepas de *S. aureus* (Figs. IV.1-4), ya que a las 3h de incubación el efecto bactericida era justo de 3 logs para sólo x4 y x8 CMI, de ozenoxacino para una cepa, y de ozenoxacino y levofloxacino, para la otra cepa. Tampoco en este caso se observa correlación de la actividad bactericida con el fenotipo de resistencia de las cepas.

Figura IV.7: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* 103 (PenS y sensible a levofloxacino).



La cepa de neumococo sensible a penicilina fue clarísimamente eliminada por ozenoxacino a todas las concentraciones testadas (2x, 4x y 8x su CMI), y por levofloxacino a 4x y 8x su CMI (Fig. IV.7).

Figura IV.8: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. pneumoniae* 145 (PenR y sensible a levofloxacino).



La segunda cepa de neumococo testada era resistente a penicilina (y sensible a quinolonas) y fue eliminada a todas las concentraciones de ozenoxacino testadas y, a las de 4x y 8x la CMI de levofloxacino (Fig. IV.8). Estos resultados sugieren que la actividad bactericida de las quinolonas frente a cepas de *S. pneumoniae* puede ser bastante variable, pero parece

independiente de la sensibilidad o resistencia a penicilina. Se observa, en las curvas controles de las cepas de *S. pneumoniae*, que en la fase final de su crecimiento (entre 6 y 24h) hay una disminución del recuento de viables, debido al proceso de autólisis característico.

Figura IV.9: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. pyogenes* 155 (EryS sensible a levofloxacino).

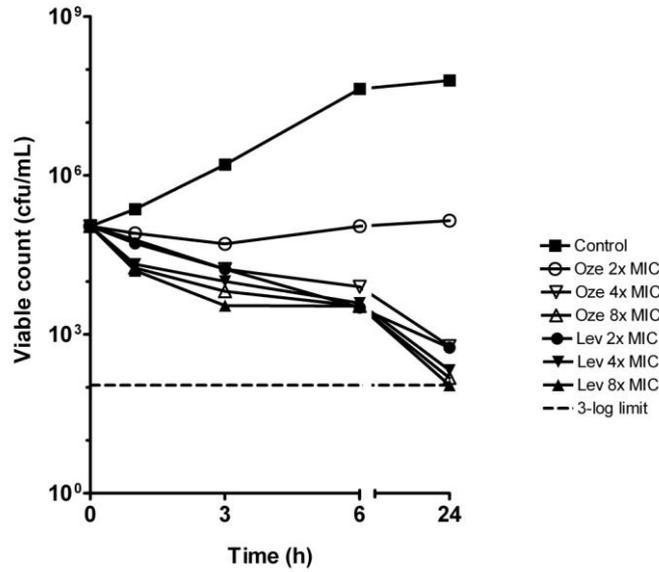
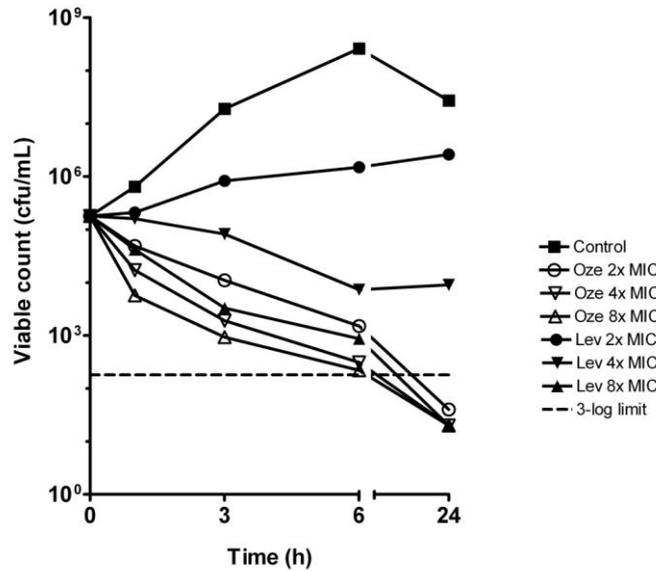


Figura IV.10: Actividad bactericida de ozenoxacino y levofloxacino frente a la cepa de *S. pyogenes* 190 (EryR sensible a levofloxacino).



Las dos cepas de *S. pyogenes* fueron más resilientes a la acción bactericida, tanto de levofloxacino como de ozenoxacino. Se destaca que, frente a una de las cepas (Fig.IV.9), la sensible a eritromicina, ninguna de las dos quinolonas fue bactericida. Frente a la otra cepa de *S. pyogenes*, la resistente a eritromicina (Fig.IV.10), fue necesaria una exposición de 24 h a ozenoxacino (a todas las concentraciones x2, x4 y x8 CMI), o a levofloxacino (sólo a 8x CMI), para conseguir una disminución de 3 logaritmos en el recuento de viables.

Página en blanco

APARTADO IV.3. DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, se definen los antibióticos bactericidas como aquellos en los que el valor de su CMB no es mayor de cuatro veces el de su CMI (Alós, 2003, Eliopoulos, 1984, Hooper, 2001), por lo que ozenoxacino se comporta, claramente, como un antibiótico bactericida, con ratios CMB_{90}/CMI_{90} entre 1 y 2, para las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*.

Al desglosar los resultados para los subgrupos de cepas en función de su perfil de susceptibilidad/resistencia a meticilina, vancomicina, eritromicina, penicilina y levofloxacino se observa que ozenoxacino es el antibiótico más potente, y con menores CMB_{90} , en todos los subgrupos, seguido de daptomicina y de levofloxacino.

Por otro lado, las cepas de estafilococos son mayoritariamente resistentes a levofloxacino, con unos valores de CMI_{90} entre 4 y 80 mg/L, y CMB_{90} , también, elevadas; de esta manera, aunque su ratio CMB/CMI no supere el valor de 4, la potencia bactericida de levofloxacino frente a estafilococos evaluados pierde relevancia.

Con levofloxacino y daptomicina, también se observa que los rangos de los valores de CMI y CMB son muy similares, aunque ambos productos presentan mejores valores para los estreptococos que no para los estafilococos. El hecho que ozenoxacino presente mejor y más homogénea actividad bactericida frente tanto a estafilococos como estreptococos le posiciona mejor como antibiótico para el tratamiento de infecciones causadas, mayoritariamente, por ambos géneros como las SSSIs (Boon, 1987, Bowler, 2001, Perera, 2005).

Para los tres antibióticos y los diferentes subgrupos de cepas, se puede observar que hay muy poca diferencia entre los valores de CMI_{90} y CMB_{90} , presentando unas ratios muy pequeñas. Una ventaja adicional al potencial bactericida de un antibiótico, es, como le ocurre a ozenoxacino, la baja concentración que implica su CMB, ya que es necesaria muy poca concentración de producto para ejercer su acción bactericida sobre la población bacteriana responsable de la infección (Gisby, 2000, Stevens, 2005).

Ozenoxacino y daptomicina no han visto afectada ni su potencia ni su actividad bactericida frente a las cepas de *Staphylococcus* o *Streptococcus* que presentan resistencia a meticilina, vancomicina, levofloxacino, eritromicina o penicilina. Daptomicina mantiene unos valores de CMI por debajo o igual a 0,5-1 mg/L, mientras que para ozenoxacino son entre 10 y 50 veces inferiores.

Evaluando la amplitud de las ratios CMB/CMI para cada antibiótico frente las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* con distintas resistencias, se observa que siendo para todos inferior a 4, ozenoxacino es el producto que en el que oscila más. Como se ha mencionado anteriormente, el hecho que los valores, tanto de CMI como de CMB, para ozenoxacino sean muy bajos para algunas cepas, conduce a que la ratio CMB/CMI sea cercana a 4, especialmente, en algunas de las cepas que tienen menores CMI (Lewin, 1991, Morrissey, 2010).

Los resultados de ratio CMB/CMI para daptomicina obtenidos en este estudio, coinciden con los descritos en la bibliografía (Akins, 2000, Fuchs, 2002, Murillo, 2007).

Al analizar las cepas en función de su susceptibilidad o resistencia a levofloxacino, se observa que, las cepas con ratios de 4 para ozenoxacino son cepas MSSA (dos *levoS* y una *levoR*) y un MRSE (*levoS*). Estas cepas son muy sensibles a ozenoxacino, y, a concentraciones de entre 0,002-0,06 mg/L ya se obtiene la eliminación del 99,9% del inóculo bacteriano.

En el caso de levofloxacino, se detectan, con ratios de CMB/CMI de 4, una cepa MSSA y dos MSSE (ambas *levoS*). No se puede extraer ninguna conclusión de qué características comunes pueden presentar el 2% de cepas marginales, frente a las que ozenoxacino y levofloxacino, aún siendo bactericidas, presentan un ratio CMB/CMI de 4, y no de entre 1 y 2, como la mayoría.

En resumen, las características más destacables de ozenoxacino, a partir de la determinación de las CMB, son, además de su destacada potencia (CMI), su actividad bactericida frente a las

especies patógenas más relevantes en el caso de las infecciones de SSSIs, hecho que permite suponer una mayor eficacia, en la erradicación de este tipo de infecciones. (Bowler, 2001, Shawar, 2009). La ratio entre las CMB y las CMI, de entre 1 y 4, para las especies de bacterias Gram-positivas testadas, confirman la actividad bactericida *in vitro* de ozenoxacino. Tampoco se ha detectado correlación aparente entre los ratios CMB/CMI, para ozenoxacino, y la resistencia a meticilina, penicilina, eritromicina ni levofloxacino, por lo que su elevada actividad bactericida se mantiene incluso frente a cepas resistentes. El incremento de patógenos resistentes a antibióticos presentes en las infecciones de SSSIs permite posicionar a ozenoxacino como antibiótico tópico valioso, por su actividad bactericida, para su erradicación (Chambers, 2005, Gupta, 2007, Patel, 2008, Perera, 2005, Stevens, 2005).

Los valores de CMB de ozenoxacino, para las especies de bacterias Gram-positivas testadas, son valores muy bajos (por debajo de 1 mg/L), por lo que se espera que sean, fácilmente alcanzables por los niveles de producto en el lugar de la infección.

Respecto a la evaluación del producto en los ensayos de curvas de letalidad, trabajos previos indican que las fluoroquinolonas, en general, son rápidamente bactericidas, con CMB de 1 a 4 veces el valor de la CMI (Alós, 2003, Eliopoulos, 1984, Hooper, 2001), aunque también hay compuestos que presentan, frente a determinadas cepas, un efecto de tolerancia (ratio >32) a concentraciones muy elevadas de producto; la tolerancia implica que el microorganismo es capaz de evadir la acción letal del agente antimicrobiano (Drlica 2008, Hooper, 2001, Lewin, 1991, Morrissey, 1997, Wolfson, 1989).

En general, ozenoxacino ha demostrado una potente actividad bactericida dependiente de concentración frente a las cepas de *S. aureus* y de *S. pneumoniae*, aunque se ha probado sólo hasta 8 veces el valor de la CMI. En cambio, se ha observado una lenta actividad bactericida frente a *S. pyogenes* a las 24h, mientras que, la máxima actividad bactericida, para las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pneumoniae* se ha obtenido entre 3 y 6 horas (Drlica, 2008). Será importante evaluar la concentración preventiva de aparición de mutantes del producto, para poder valorar adecuadamente las posibilidades del producto.

La resistencia a la meticilina en estafilococos, a la penicilina en neumococos y a la eritromicina en *S. pyogenes* no ha afectado a la actividad de ozenoxacino. Tampoco ozenoxacino ha perdido su actividad bactericida frente a aquellas cepas de MSSA y MSSE resistentes a levofloxacino, en comparación a las que eran sensibles a levofloxacino. Está descrito en la bibliografía, que a algunas quinolonas las distingue su habilidad para retener su efecto bactericida frente a mutantes resistentes (Hooper 2001), esto puede ser una ventaja relevante den el tratamiento de infecciones causadas por patógenos resistentes (Chambers, 2005, Gupta, 2007, Patel, 2008).

Se observa que hay una disminución del recuento de viables en la fase final del crecimiento (6-24h) de las curvas controles de *S. pneumoniae*, esto se ha asociado en trabajos previos al proceso de autólisis característico (García, 1999, Tomasz, 1970). Entre los diversos factores implicados en esta fase de autólisis, aunque no perfectamente conocidos, estaría la acidificación del medio de cultivo por el crecimiento anaeróbico de *S. pneumoniae* (Restrepo, 2005). Se considera que este hecho no ha interferido en la evaluación de la potente actividad bactericida de ozenoxacino, que se consigue mayoritariamente a las 3 horas, ni en la de levofloxacino, excepto en la concentración de x2 su CMI.

Por otro lado, un fenómeno relacionado con la exposición de las bacterias a un antimicrobiano es la modificación temporal de su sensibilidad. Puede ocurrir que las bacterias, después de haber sido sometidas a concentraciones elevadas de un antibiótico, que sean temporalmente o más sensibles, o por el contrario, se muestren más resistentes al mismo. Como se observa en algunas de las curvas de letalidad en estafilococos, entre las 6 y las 24h aumenta el recuento de colonias. Podría tratarse de persistencia, que es un subtipo de resistencia, difícil de evaluar en algunos casos, ya que normalmente suele perderse este fenotipo al re-evaluar la CMI de colonias procedentes del cultivo a las 24h, como se ha descrito en la bibliografía (Balaban, 2004, Craig, 1990, Udekwu 2009), aunque serían necesarios estudios confirmatorios adicionales.

Los resultados muestran que la actividad bactericida de ozenoxacino a 8x CMI ha sido similar a la de levofloxacino. Sin embargo, a 4x la CMI de levofloxacino, y especialmente a 2x CMI, levofloxacino ha sido más activo que ozenoxacino. Es importante destacar que los experimentos de curvas de letalidad a muy bajos submúltiplos de la CMI, o a muy bajas CMI, como ocurre con ozenoxacino, pueden ser difíciles de valorar (Mouton, 2005, Udekwu, 2009). Además, se destaca que, en concentración absoluta, ozenoxacino es considerablemente más potente que levofloxacino; se están comparando CMB de entre 0,016 y 1 mg/mL para ozenoxacino, con entre 1 y 64 mg/L para levofloxacino, en una franja peligrosa tanto de resistencia bacteriana como de consecución de niveles suficientes de antibiótico. Por ello, estos experimentos, que se basan en múltiplos de la CMI, con CMI tan dispares, pueden infravalorar la potencia bactericida real de ozenoxacino, con unas CMI muy bajas.

Resultaría interesante ensayar la actividad bactericida de ozenoxacino en un mayor rango de concentraciones a un tiempo fijo (p.ej. 3h), y a diferentes inóculos bacterianos (Craig, 1990, Mouton, 2005). Esto podría evaluar mejor la posibilidad de una superior actividad bactericida de ozenoxacino, en comparación a levofloxacino, y podría ser más representativo de las concentraciones clínicas (Mouton, 2005, Udekwu, 2009).

Se considera que, con las concentraciones elevadas que se podrían alcanzar en los lugares de infección en infecciones de piel y estructuras relacionadas, es esperable clínicamente el potente efecto bactericida de ozenoxacino, aunque sería adecuado descartar un posible efecto paradójico a concentraciones elevadas, como se ha descrito que ocurre para otras quinolonas. Para su posible uso sistémico, su actividad bactericida en su lugar de acción estaría, lógicamente, supeditada a los niveles de producto alcanzado, pero las bajas CMB siguen siendo una buena ventaja para ozenoxacino.

Los resultados de las curvas de letalidad, para ozenoxacino, concuerdan con los de la única cepa de *S. aureus* publicada, sensible a meticilina y a ciprofloxacino (Yamakawa, 2001). La actividad bactericida de ozenoxacino se identifica a las 2h (reducción de 3,2 logaritmos), a las concentraciones superiores a 4xCMI (testadas hasta x32), mientras que a 2xCMI consigue una reducción del inóculo inicial de 2,5 logaritmos. En nuestro estudio, para la cepa equivalente *S. aureus* 38 y al tiempo 2h, a x2CMI se consigue una reducción de 2 logaritmos, y a x4 y x8 la CMI de ozenoxacino, se obtienen entre 3 y 3,9 logaritmos de reducción. En la bibliografía se reporta sólo el tiempo 2h, por lo que no se pueden contrastar los datos entre 6 y 24 horas obtenidos en nuestro estudio.

Respecto a los resultados publicados para levofloxacino (Noviello, 2003) para las cepas de *S. aureus*, sensibles y resistentes a meticilina, se reporta que levofloxacino posee efecto bactericida a x4 CMI a tiempos cortos, nuestros datos coinciden, aunque para MRSA se avanzan ligeramente (3h). Para las cepas de *S. pneumoniae*, sensibles y resistentes a penicilina, en la bibliografía se reporta actividad bactericida para levofloxacino a las 12h, con x4 y x2 CMI, respectivamente, en nuestro estudio se detecta entre 3 y 6 horas. Por otro lado, los resultados para *S. pyogenes*, tanto sensible como resistente a eritromicina, coinciden en x8 CMI, y en el tiempo, alrededor de las 6-12 h en la bibliografía (Gradelski, 2001, Noviello, 2003), o entre las 6 y las 24h, en nuestro caso, por falta de puntos intermedios (Noviello, 2003).

En resumen, ozenoxacino ha demostrado una buena actividad bactericida, dependiente de concentración y a tiempos cortos, frente a las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y de *S. pneumoniae*. Sin embargo, la lenta actividad bactericida frente a *S. pyogenes* a las concentraciones testadas, debería completarse con la evaluación del efecto de concentraciones superiores del producto. Es importante destacar, especialmente para clínica, que la actividad bactericida de ozenoxacino no varía frente a cepas que poseen resistencias a otros antibióticos, incluso resistentes a levofloxacino, una MSSA y una MSSE, en comparación a los que eran sensibles a levofloxacino. Estas características del producto podrían favorecer el tratamiento empírico de infecciones, ligado siempre a la epidemiología a la gravedad de las mismas.

Página en blanco

APARTADO IV.4. BIBLIOGRAFÍA

IV.4. BIBLIOGRAFÍA

- Akins, R.L. y Rybak, N.J.** 2000. *In vitro* activities of daptomycin, arbekacin, vancomycin, and gentamicin alone and/or in combination against glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in an infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(7):1925-1929.
- Alós, J.I.** 2003. Current status of antibiotic resistance in three principle species causing infection in primary practice. *Rev Esp Quimioter*, **16**(1):95-98.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chair, R. y cols.** 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, **305**:1622-1625.
- Boon, R.J. y Beale, A.S.** 1987. Response of *Streptococcus pyogenes* to therapy with amoxicillin or amoxicillin-clavulanic acid in a mouse model of mixed infection caused by *S. aureus* and *S. pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**:1204-1209.
- Bowler, P.G., Duerden, B.I. y Armstrong, D.G..** 2001. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*, **14**:244-269.
- Chambers, H.F.** 2005. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. *N Engl J Med*, **352**:1485-1487.
- CLSI.** 2009a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard – eight edition-. CLSI. Document M07-A8. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2009
- CLSI** (anteriormente NCCLS). 2009b.. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline. Document M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valey Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2009.
- Craig, W. y Ebert, S.** 1990. Killing and regrowth of bacteria *in vitro*: a review. *Scand J Infect Dis*, **74**:63-70.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J. y Zhao, X.** 2008. Quinolone-mediated bacterial cell. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(2): 385-392.
- Eliopoulos, G.M., Gardella, A. y Moellering, R.C.** 1984. *In vitro* activity of ciprofloxacin, a new carboxyquinoline antimicrobial agent. *Antimicrob Agents Chemother*, **25**(3):331-335.
- Fuchs, P.C., Barry, A.L. y Brown, S.D.** 2002. *In vitro* bactericidal activity of daptomycin against staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, **49**:467-470.
- García, Y., Gómez, M.J., Ramos, M.C., Gómez-Lus, M.L. y Prieto, J.** 1999. [The postantibiotic effect of amoxicillin/clavulanic acid on *Streptococcus pneumoniae* strains of different serotypes and penicillin sensitivity]. *Rev Esp Quimioter*, **11**(2):157-160.
- Gisby, J.** 2000. Efficacy of a New Cream Formulation of Mupirocin: Comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(2):255-260.
- Gradelski, E., Valera, L, Kolek, B., Bonner, D. y Fung-Tomc, J.** 2001. Comparative killing kinetics of the novel des-fluoro(6) quinolone BMS-84756, fluoroquinolones, vancomycin and β -lactams. *Int J Antimicrob Agents*, **18**:43-48.
- Gupta, K., Macintyre, A., Vanasse, G. y Dembry, L.M.** 2007. Trends in prescribing beta-lactam antibiotics for treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol*, **45**:3930-3034.
- Haas, W., Pillar, C.M., Hesje, C.K., Sanfilippo, J. y Morris, T.W.** 2010. Bactericidal activity of besifloxacin against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, **65**(7):1441-1447.
- Hooper, D.C. y Wolfson, J.S.** 1989. Bacterial resistance to the quinolone antimicrobial agents. *Am J Med*, **87**(6C):17S-23S.
- Hooper, D.C. y Wolfson, J.S.** 1991. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med*, **324**:384-394.
- Hooper, D.C.** 2001. Mechanism of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, **32**(1):S9-S15.
- Lewin, C.S., Morrissey, I. y Smith, J.T.** 1991. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in the anaerobic environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **10**:240-248.
- Montanari, M.P., Mingoia, M. y Valardo, P.E..** 2001. *In vitro* antibacterial activities of AF 3013, the active metabolite of prulifloxacin, against nosocomial and community Italian isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**(12):3616-3622.
- Morrissey I.** 1997. Bactericidal Index: a new way to assess quinolone bactericidal activity *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*, **39**: 713-717.
- Morrissey, I.** 2010. RR-10-00842-01. Grupo Ferrer Internal report

- Mouton, J.W. y Winks, A.A.** 2005. Relationship between minimum inhibitory concentration and stationary concentration revisited: growth rates and minimum bactericidal concentrations. *Clin Pharmacokinet*, **44**:767-768.
- Murillo, O., Doménech, A., García, A., Tubau, F., Cabellos, C., Gudiol, F. y Ariza, J.** 2009. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign body infection by methicillin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**(10):4252-4257.
- Noviello, S., Iannello, F., Leone, S., y Esposito, S.** 2003. Comparative activity of garenoxacin and other agents by susceptibility and time-kill testing against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother*, **52**:869-872.
- Patel, M., Waites, K.B., Hoesley, C.J., Stamm, A.M., Canupp, K.C. y Moser, S.A.** 2008. Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. *J Hosp Infect*, **68**:208-213.
- Perera, G. y Hay, R.** 2005. A guide to antibiotic resistance in bacterial skin infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **19**:531-545.
- Restrepo, A.V.** 2005. Optimization of culture conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiol*, **34**:1-8.
- Shawar, R., Scangarella-Oman, N., Dalessandro, M., Breton, J., Twynholm, Li, G., y Garges, H.** 2009. Topical retapamulin in the management of infected traumatic skin lesions. *Ther Clin Risk Manag*, **5**:41-49.
- Stevens, D.L., Bisno, A.L., Chambers, H.F., Everett, E.D., Dellinger, P., Goldstein, E.J., Gorbach, S.L., Hirschmann, J.V., Kaplan, E.L., Montoya, J.G. y Wade, J.C.** 2005. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. *Clin Infect Dis*, **41**:1373-1406.
- Tomasz, A.**1970. Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J Bacteriol*, **101**(3):860-871.
- Udekwi, K.I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F. y Levin, B.R.** 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, **63**:745-757.
- Wolfson, J.S. y Hooper, D.C.** 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microb Clin Microb Ver*, **2**:378-424.

CAPÍTULO V. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN

APARTADO V.1. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO V. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de resistencia a quinolonas más relevante, también en *S. aureus*, es la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las dianas, GyrA y GrIA, especialmente en sus respectivas subunidades A. Sin embargo, otros mecanismos, como la reducción de la permeabilidad al interior celular y la presencia de bombas de secreción activa, han sido descritos como involucrados en la adquisición de resistencia a las quinolonas (Kaatz, 1997, Ng, 1996, Ferrero, 1994, Ruiz, 2001).

En este capítulo se ha evaluado la actividad de ozenoxacino frente a cepas de *S. aureus* con distintas sustituciones en sus dianas, y se ha determinado su capacidad de generar mutantes resistentes, con el objetivo de estimar las características diferenciales de su mecanismo de acción vs otras quinolonas. La valoración de su capacidad de respuesta a los distintos mecanismos de resistencia en *S. aureus* permitirá preveer su potencia frente a cepas resistentes, al igual que la posibilidad que sea sustrato o no, de bombas de flujo.

V.1. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1.1. Actividad frente a cepas de *S. aureus* resistentes a otras quinolonas

V.1.1.1 Microorganismos

Se evaluó la actividad antibacteriana de ozenoxacino y de otros antibióticos frente a cepas de *S. aureus*, genéticamente caracterizadas, con mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes de la Girasa A y de la Topoisomerasa IV.

Se testaron dos grupos de cepas: el primero procedía del Dpto de Microbiología y Parasitología Clínica del H.Clínic de Barcelona (Ensayo ER-1), y el segundo, de la colección de cepas de I+D Grupo Ferrer (Ensayo ER-2).

En las tablas siguientes se detallan las mutaciones de las cepas utilizadas.

Cepas Ensayo ER-1	Mutaciones QRDR	
	GyrA	GrIA
4-108 MSSA (cepa salvaje)	-	-
4-32E MSSA	Glu ⁸⁸ →Lys	-
5-117 MSSA	-	Ser ⁸⁰ →Phe
4-131 MRSA	Ser ⁸⁴ →Leu	Ser ⁸⁰ →Phe
4-95 MRSA	Ser ⁸⁴ →Leu	Ser ⁸⁰ →Phe Glu ⁸⁴ →Lys

Cepas Ensayo ER-2	Mutaciones QRDR	
	GyrA	GrIA
GF-SA-100	-	-
GF-SA-101	-	Ser ⁸⁰ →Phe
GF-SA-102	Glu ⁸⁸ →Lys	Ser ⁸⁰ →Phe
GF-SA-103	Ser ⁸⁴ →Leu, Glu ⁸⁸ →Lys	Ser ⁸⁰ →Phe

V.1.1.2 Productos

Como comparativos a ozenoxacino se utilizan ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, para las cepas del ensayo ER-1, y ciprofloxacino, moxifloxacino nadifloxacino, ác.fusídico y mupirocina para las cepas del ensayo ER-2. Los productos corresponden a los mismos lotes, y se prepararon de igual manera, que en las secciones anteriores.

V.1.1.3 Método

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se realizó, igual que para EM-1 (capítulo III), de acuerdo al NCCLS (actualmente, CLSI) M7-A4 *Standard agar dilution method* (CLSI, 1998)

V.1.2. Influencia de las bombas de flujo en la actividad de ozenoxacino frente a cepas de *S. aureus*.

V.1.2.1 Microorganismos

Se evaluó la actividad antibacteriana de ozenoxacino y de tres fluoroquinolonas frente a 13 cepas de *S. aureus*, en presencia y ausencia de reserpina. Las cepas procedían de la colección de cepas de I+D Grupo Ferrer.

V.1.2.2 Productos

Como comparativos a ozenoxacino se utilizan ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, los productos corresponden a los mismos lotes, y se prepararon de igual manera, que en las secciones anteriores.

V.1.2.3 Método

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se realizó, igual que para EM-1 (capítulo III), de acuerdo al NCCLS (actualmente, CLSI) M7-A4 *Standard agar dilution method* (CLSI, 1998), y tras añadir 25 mg/L de reserpina al medio.

V.1.3. Generación de cepas con sensibilidad reducida a ozenoxacino

V.1.3.1 Método Determinación de la frecuencia de aparición de mutantes espontáneos con sensibilidad reducida a ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino

V.1.3.1.1 Microorganismos

Tabla V.4	Cepas
Sa-11 Cip S	<i>Staphylococcus aureus</i> sensibles a ciprofloxacino
Sa-12 Cip S	
Sa-17 Cip R	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a ciprofloxacino
Sa-18 Cip R	

V.1.3.1.2 Productos

Ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino. Los productos se prepararon igual que en las secciones anteriores.

V.1.3.1.3 Método

La frecuencia de aparición espontánea de mutantes resistentes a ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino se determinó a diferentes concentraciones de estos antibióticos, por encima de su valor de CMI. La selección de mutantes con un pase de ciprofloxacino, moxifloxacino y ozenoxacino se realizó sembrando un inóculo de aprox. 10^9 bacterias en placas que contenían x2, x4 y x8 CMI de cada quinolona, e incubando durante 5 días a 35°C.

La frecuencia de aparición espontánea de mutantes resistentes es la ratio entre el número de células resistentes y el número de células inoculadas, como unidades formadoras de colonias (UFC/placa). (Schmitz, 1999).

V.1.3.2 Desarrollo *in vitro* de mutantes resistentes de *S. aureus* tras pases sucesivos con quinolonas (ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino) y caracterización genética de las cepas.

La habilidad de las quinolonas para seleccionar mutantes resistentes se cuantifica como el número de pases necesarios para aumentar la CMI inicial de un antibiótico cuatro veces (Kosowska-Shick, 2006, Schmitz, 2000b, Sierra, 2005). Esta fue la primera parte del ejercicio que se realizó para seleccionar mutantes resistentes, la segunda consistió en realizar hasta 28 pases sucesivos, con concentraciones crecientes de las quinolonas, para valorar hasta qué punto aumentaban las CMI de las cepas, y por tanto, su resistencia a estos antibióticos (Sierra, 2005, Yamakawa, 2002).

V.1.3.2.1 Microorganismos

Se seleccionaron dos cepas de *S. aureus* sensibles y dos resistentes a ciprofloxacino para iniciar este estudio.

Tabla V.5		Cepas
Sa-11 Cip S		<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a ciprofloxacino
Sa-12 Cip S		<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a ciprofloxacino
Sa-17 Cip R		<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a ciprofloxacino
Sa-18 Cip R		<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a ciprofloxacino

V.1.3.2.2 Productos

Ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino. Los productos se prepararon de la misma manera que en las secciones anteriores.

V.1.3.2.3 Método

La selección inicial de resistencias se realizó mediante pases sucesivos con concentraciones de los antibióticos desde tres diluciones dobles por debajo hasta tres dobles por encima de la CMI. De cada pase diario sucesivo se cultivó una alícuota de las bacterias. A continuación, las bacterias se cultivaron en el siguiente pase conteniendo cada uno de los antibióticos diluidos. El subcultivo diario se realizó, en primer lugar, hasta que se obtuvieron mutantes con una CMI, para el antibiótico utilizado en la selección, de mínimo cuatro veces la CMI inicial (Sierra, 2005). Para comprobar la estabilidad de la resistencia, es decir, confirmar la estabilidad de la CMI para las cepas, se tomó una alícuota de las bacterias que habían crecido a la mayor concentración, se subcultivó en agar sangre sin presión antibiótica, y se confirmó sus CMI.

La selección de mutantes resistentes se continuó hasta 28 pases sucesivos, con concentraciones crecientes de quinolonas, para identificar hasta qué valor aumentaba la CMI (Kosowska-Shick, 2006).

V.1.3.3 Análisis de los mecanismos de resistencia en las cepas mutantes resistentes a quinolonas de *S. aureus* seleccionadas *in vitro*.

V.1.3.3.1 Caracterización genética de las cepas resistentes

Se investigaron, mediante PCR y secuenciación del DNA, las mutaciones en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *grlA*, de las cepas mutantes resistentes seleccionadas en la sección anterior (tras 28 pases).

Dos sets de primers fueron utilizados para amplificar el fragmento de *gyrA* a partir de los nucleótidos 24 al 671 y el fragmento de *grlA* a partir de los nucleótidos 115 al 509. La PCR se realizó de la siguiente manera: la mitad de una colonia crecida en agar se resuspendió en 25 µl de agua destilada estéril y hervida 10 minutos. Después de un breve paso de centrifugación a 15,000 x g, 25 µl de la mezcla de reacción conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100mM cloruro potásico, 3,0 mM cloruro magnésico, gelatina (0,1% wt/vol), 400 µM deoxinucleósidos trifosfatos y 1 µM de primer fueron añadidos a la vez con 2,5 Unidades de *Taq* polimerasa. Cada mezcla de reacción fue amplificada a los siguientes perfiles de temperatura: 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min. La amplificación se realizó en un termociclador de DNA Modelo 480 (Perkin-Elmer Cetus). Los productos de amplificación del DNA fueron separados mediante un kit de purificación de PCR QiaQuick spin, y, los productos de la PCR purificados fueron procesados directamente para la secuenciación del DNA utilizando el kit de secuenciación cíclica *Taq* DyeDeoxiTerminator Cycle (Sierra, 2002).

V.1.3.3.2. Influencia de las bombas de flujo en la resistencia de las cepas seleccionadas

A continuación, se determinó la CMI, con el mismo método de microdilución, descrito en las secciones anteriores, para los mutantes resistentes seleccionados (tras 28 pases), en ausencia y presencia de reserpina (25 mg/L) (Schmitz, 1998b). La reserpina se utilizó como inhibidor de bombas de flujo como *NorA*, *NorB*, *NorC*, *SdrM*, *MdeA* y *MepA*, descritas para *S. aureus* (Fàbrega, 2009, Vila, 2011), para evaluar si mutaciones en los genes de bombas de flujo podían tener influencia en los niveles de resistencia detectados en las cepas seleccionadas en este ensayo, con ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino (Kaatz, 1993 y 1995, Neyfakh, 1993).

APARTADO V.2 RESULTADOS

V.2. RESULTADOS

V.2.1. Actividad frente a cepas de *S. aureus* con mutaciones en QRDR (resistentes a otras quinolonas)

V.2.1.1. Cepas de *S. aureus* - Ensayo ER-1

Cepas	QRDR	Sustitución	Antibióticos CMI mg/L			
			ozenoxacino	ciprofloxacino	levofloxacino	moxifloxacino
4-108 wt MSSA	GyrA GrlA	- -	0,004	0,125	0,125	0,03
4-32E MSSA	GyrA GrlA	Glu ⁸⁸ →Lys -	0,03 (x7,5)	1 (x8)	0,5 (x4)	0,125 (x4)
5-117 MSSA	GyrA GrlA	- Ser ⁸⁰ →Phe	0,004 (=)	2 (x16)	0,5 (x4)	0,125(x4)
4-131 MRSA	GyrA GrlA	Ser ⁸⁴ →Leu Ser ⁸⁰ →Phe	0,06 (x15)	16 (x128)	4 (x32)	1 (x33)
4-95 MRSA	GyrA GrlA	Ser ⁸⁴ →Leu Ser ⁸⁰ →Phe Glu ⁸⁴ →Lys	0,125 (x31)	128 (x1024)	32 (x256)	8 (x267)

Ozenoxacino ha presentado una potente actividad frente a la cepa de *S. aureus*, 4-108, que no posee ninguna sustitución en la QRDR de las dos dianas, el resto de quinolonas, también, aunque con CMI superiores.

Al analizar la actividad de las quinolonas frente a las cepas, que poseían distintas mutaciones en la región QRDR, se han obtenido distintos grados de actividad, de mayor a menor al aumentar el número de mutaciones, para todas las quinolonas (tabla V.6). Ozenoxacino, en comparación a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino, ha sido el producto que ha presentado las CMI más bajas (mayor actividad) en las cuatro cepas.

Frente a la cepa de *S. aureus* (5-117), que posee una sola mutación en el gen *grlA* de la topoisomerasa IV, la CMI para ozenoxacino no ha aumentado respecto a la que posee la cepa salvaje (0,004 mg/L), mientras que para levofloxacino y moxifloxacino, lo ha hecho 4 veces (0,5 y 0,125 mg/L), y para ciprofloxacino, 16 veces (2 mg/L).

En cambio, frente a cepas con mutaciones en el gen de la girasa A, *gyrA*, como la 4-32E, la CMI de ozenoxacino ha presentado valores 7,5 veces superiores (0,03 mg/L); frente a la cepa 4-131, que posee además una mutación en *grlA*, la CMI ha aumentado 15 veces (0,06 mg/L), y cuando la cepa, como la 4-95, posee una doble mutación en *grlA* y otra en *gyrA*, la CMI ha sido 31 veces más alta (0,125 mg/L).

Las CMI para moxifloxacino y levofloxacino han aumentado 4 veces para la cepa mutante en *gyrA* y también para la mutante en *grlA*, para la doble mutante en *gyrA* y *grlA* han aumentado 32 veces, y, lo han hecho 256 y 267 veces, respectivamente, para la mutante triple en *grlA-gyrA*.

La CMI para ciprofloxacino ha aumentado 8 veces para el mutante en *gyrA*, 16 para el mutante en *grlA*, 128 veces para el doble mutante *grlA-gyrA* y 1024 veces para el triple mutante.

Ozenoxacino ha sido el producto que, comparativamente a las tres fluoroquinolonas, ha perdido menos actividad frente a las cepas de *S. aureus* con mutaciones en los genes que codifican para sus dianas. Las CMI para ozenoxacino se mueven entre 0,004 y 0,125 mg/L para las cepas resistentes, mientras que moxifloxacino lo hace entre 0,125-8 mg/L, levofloxacino entre 0,5 y 32 mg/L, y, ciprofloxacino entre 1 y 128 mg/L.

V.2.1.2. Cepas de *S. aureus* – Ensayo ER-2

Cepas	Mutaciones en QRDRsa		CMI (mg/L) ^b				
	Diana	Substituciones	ozenoxacino	moxifloxacino.	nadifloxacino	levofloxacino	ciprofloxacino
GF-SA-100	GyrA GrlA	-	0,004	0,03	0,03	0,125	0,25
GF-SA-101	GyrA GrlA	- Ser ⁸⁰ →Phe	0,004 (=)	0,125 (x4)	0,03 (=)	0,5 (x40)	1 (x4)
GF-SA-102	GyrA GrlA	Glu ⁸⁸ →Lys Ser ⁸⁰ →Phe	0,06 (x15)	1 (x33)	0,5 (x17)	4 (x32)	8 (x32)
GF-SA-103	GyrA GrlA	Ser ⁸⁴ →Leu, Glu ⁸⁸ →Lys Ser ⁸⁰ →Phe	0,25 (x63)	32 (x1067)	32 (x1067)	>128 (x>1024)	>128 (x>512)

^b10⁴ UFC/pocillo.

Como en el caso anterior, la CMI de ozenoxacino para la cepa salvaje de *S. aureus* (GF-SA-101) ha sido de 0,004 mg/L, menor que las de las otras cuatro quinolonas que van de 0,03 a 0,25 mg/L).

La CMI para la cepa mutante, sólo en *grlA* (GF-SA-101), no se ha modificado para ozenoxacino (0,004 mg/L), ni para nadifloxacino (0,03 mg/L), y sí, ha aumentado 4 veces para moxifloxacino (0,125 mg/L), levofloxacino (0,5 mg/L) y ciprofloxacino (1 mg/L).

Para la cepa doble mutante en *gyrA-grlA* (GF-SA-102), ha aumentado la CMI de todas las quinolonas, 15 veces para ozenoxacino y nadifloxacino (0,06 y 0,5 mg/L), y 32 veces, para moxifloxacino, levofloxacino y ciprofloxacino (1, 4 y 8 mg/L).

Para la cepa triple mutante en *gyrA-grlA* (GF-SA-103) ha aumentado, también, la CMI de todas las quinolonas: 62 veces para ozenoxacino (0,25 mg/L), más de 500 veces para ciprofloxacino (>128 mg/L), y más de 1000 veces para nadifloxacino, moxifloxacino (32 mg/L) y levofloxacino (>128 mg/L). La diferencia entre la respuesta de ozenoxacino vs la del resto de quinolonas, incluido nadifloxacino, es notable, ya que la CMI para ozenoxacino ha aumentado muy poco.

V.2.2 Influencia de las bombas de flujo en la actividad de ozenoxacino

En la tabla V.8 se presentan las CMI para una colección de 12 cepas de *S. aureus*, en presencia y ausencia de reserpina.

Cepas	ozenoxacino		ciprofloxacino		levofloxacino		moxifloxacino	
	-	+ reserpina	-	+ reserpina	-	+ reserpina	-	+ reserpina
<i>S. aureus</i> GF-SA-010	0,002	0,002	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,03
<i>S. aureus</i> GF-SA-110	0,002	0,004	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,03
<i>S. aureus</i> GF-SA-100	0,002	0,004	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,03
<i>S. aureus</i> GF-SA-101	0,004	0,004	1	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125
<i>S. aureus</i> GF-SA-011	0,004	0,004	0,25	0,125	0,25	0,25	0,06	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-200	0,004	0,004	0,125	0,06	0,125	0,125	0,03	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-201	0,002	0,004	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-012	0,004	0,004	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-013	0,004	0,004	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-014	0,004	0,004	0,5	0,125	0,25	0,25	0,06	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-015	0,002	0,004	0,25	0,125	0,25	0,25	0,06	0,06
<i>S. aureus</i> GF-SA-016	0,06	0,06	32	8	4	4	2	2
Media geométrica	0,004	0,005	0,383	0,129	0,225	0,225	0,057	0,071
CMI₅₀	0,004	0,004	0,25	0,06	0,125	0,125	0,03	0,06
CMI₉₀	0,004	0,004	0,9	0,425	0,45	0,45	0,112	0,112
n	13	13	13	13	13	13	13	13

En este grupo de cepas, ozenoxacino (Tabla V.8) ha sido, de nuevo, la quinolona más activa frente a las cepas de *S. aureus* testadas seguida de moxifloxacino y levofloxacino, mientras

que ciprofloxacino ha resultado ser la menos activa, tanto en presencia como en ausencia de reserpina (25 mg/L).

Además, al analizar los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para cada quinolona se ha observado que ni ozenoxacino, moxifloxacino ni levofloxacino han mostrado ninguna variación en sus valores de CMI. Por otro lado, las CMI para ciprofloxacino, que es una quinolona hidrofílica, y más que las otras tres, han disminuido en presencia de reserpina entre 2 y 3 diluciones (entre 4 y 6 veces).

V.2.3. Generación de cepas con sensibilidad reducida a ozenoxacino

V.2.3.1. Resultados de mutantes espontáneos / Determinación de la frecuencia de mutación

La frecuencia de aparición espontánea de mutantes resistentes es la ratio entre el número de células resistentes y el número de células inoculadas, y se ha obtenido, tras haber puesto en contacto a un inóculo de $1 \cdot 10^9$ UFC/mL de diferentes cepas de *S. aureus*, con 2, 4 y 8 veces la CMI para ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino.

Se muestran, en la tabla V.9, los resultados obtenidos con la concentración más alta testada (8x CMI) de los tres antibióticos:

Cepas	Frecuencia de mutación		
	Antibiótico (x8 CMI)		
	ozenoxacino	moxifloxacino	ciprofloxacino
<i>S. aureus</i> Sa-11 Cip S	$\leq 10^{-9}$	$\leq 10^{-9}$	10^{-5}
<i>S. aureus</i> Sa-12 Cip S	$\leq 10^{-9}$	$\leq 10^{-9}$	10^{-5}
<i>S. aureus</i> Sa-17 Cip R	$\leq 10^{-9}$	$\leq 10^{-9}$	10^{-5}
<i>S. aureus</i> Sa-18 Cip R	$\leq 10^{-9}$	$\leq 10^{-9}$	10^{-5}

Han aparecido cepas resistentes en las placas con las diferentes concentraciones de ciprofloxacino, y no, con concentraciones correspondientes a los mismos múltiplos de la CMI para ozenoxacino y moxifloxacino.

Al no recuperarse colonias mutantes de *S. aureus* en las placas con las diferentes concentraciones de ozenoxacino y de moxifloxacino, la frecuencia de aparición de mutantes resistentes espontánea es, en todos los casos, inferior a 10^{-9} .

V.2.3.2. Resultados de selección de cepas resistentes tras pases sucesivos con ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino

En el estudio de selección de mutantes resistentes a quinolonas, con cepas de *S. aureus*, se consideran mutantes resistentes aquellas cepas que han aumentado su CMI inicial en 4 veces, y se compara entre productos, el número de pases necesarios para ello.

En la tabla V.10 se presentan los resultados de CMI para las cepas tras 6-8 pases en presencia de concentraciones subinhibitorias crecientes.

Tabla V.10 Desarrollo <i>in vitro</i> de resistencias frente a ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino. Evolución del aumento de los valores de CMI								
Cepas	Número de pases y CMI frente al antibiótico usado durante la selección (mg/L)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ciprofloxacino-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa-11 Cip S)								
ciprofloxacino Sa-11	0,125	0,5	1	4	4	4	4	4
moxifloxacino Sa-11	0,06	0,125	0,25	0,5	0,5	1	1	1
ozenoxacino Sa-11	0,002	0,004	0,008	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Ciprofloxacino-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa-12 Cip S)								
ciprofloxacino Sa-12	0,5	0,5	2	1	8	8	8	8
moxifloxacino Sa-12	0,06	0,06	0,06	0,125	1	1	1	1
ozenoxacino Sa-12	0,004	0,004	0,008	0,03	0,06	0,06	0,06	0,06
Ciprofloxacino-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa-17 Cip R)								
ciprofloxacino Sa-17	64	64	128	256	256	256	256	256
moxifloxacino Sa-17	4	8	8	16	16	16	32	32
ozenoxacino Sa-17	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1
Ciprofloxacino-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa-18 Cip R)								
ciprofloxacino Sa-18	64	64	128	128	128	128	128	128
moxifloxacino Sa-18	4	8	8	16	16	16	16	16
ozenoxacino Sa-18	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1

En la tabla anterior se presentan los resultados con los 8 primeros pases que se han realizado con el objetivo de aumentar la CMI inicial de las quinolonas cuatro veces, como mínimo.

Con las cepas sensibles a ciprofloxacino (Sa-11 Cip S y Sa-12 Cip S) se ha observado que se aumenta más fácilmente la CMI para las tres quinolonas, que no con las cepas ciprR, que ya de entrada, eran resistentes a ciprofloxacino y moxifloxacino. Ozenoxacino ha necesitado 3 pases para aumentar la CMI de las cepas sensibles cuatro veces, mientras que ha necesitado 6 pases, o más, para conseguir lo mismo con las cepas resistentes a ciprofloxacino.

Para las cuatro cepas utilizadas, tanto sensibles como resistentes a ciprofloxacino, ozenoxacino es el único producto que ha mantenido unas CMI bajas, por debajo de 2 mg/L, en todos los mutantes obtenidos, reflejando la potencia del producto frente a cepas resistentes.

En la tabla V.11 se observan los resultados obtenidos con las cuatro cepas de *S. aureus* tras los 28 pases con concentraciones subinhibitorias crecientes de ozenoxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino. A cada cepa obtenida con una quinolona, se le determina la CMI frente a las tres, ciprofloxacino, moxifloxacino y ozenoxacino. Entre paréntesis se detalla el número de veces (no de diluciones) que aumenta la CMI inicial para el antibiótico utilizado para seleccionar mutantes.

Tabla V.11 Actividad de ciprofloxacino, moxifloxacino y ozenoxacino en las cepas seleccionadas con quinolonas				
Cepas	CMI inicial mg/L	CMI (mg/L) tras 28 pases con quinolonas		
		ciprofloxacino	moxifloxacino	Ozenoxacino
Sa-11 cipS	Cipro 0,125	256 (x2000)	16	1
	Moxi 0,06	256	16 (x300)	1
	Ozen 0,002	256	16	1 (x500)
Sa-12 cipS	Cipro 0,5	64 (x130)	32	2
	Moxi 0,06	256	16 (x300)	1
	Ozen 0,004	128	8	0,5 (x150)
Sa-17 cipR	Cipro 64	256 (x4)	8	1
	Moxi 4	256	16 (x4)	2
	Ozen 0,25	256	32	2 (x8)
Sa-18 cipR	Cipro 64	512 (x8)	16	1
	Moxi 4	256	16 (x4)	1
	Ozen 0,25	128	8	1 (x4)

Se observa que, con la presión antibiótica las cepas inicialmente sensibles a ciprofloxacino aumentan su CMI, frente al antibiótico utilizado en la selección, un mayor número de veces (entre 130 y 2000), que las cepas que eran inicialmente resistentes a ciprofloxacino (entre 4 y 8 veces).

Las máximas CMI obtenidas, después de 28 pases, para ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino con los mutantes resistentes han sido de 2, 256 y 16 mg/L, respectivamente.

De las cuatro cepas iniciales, tras 28 pases con cada una de las tres quinolonas, se han obtenido 12 cepas finales, con similares CMI para los tres antibióticos independientemente del antibiótico utilizado durante la selección. Es decir, las CMI para ozenoxacino de las 4 cepas obtenidas con ozenoxacino varían entre 0,5 y 2 mg/L, y entre 0,5 y 1 mg/L, si son las 8 cepas que se han seleccionado con ciprofloxacino o moxifloxacino. Siempre ozenoxacino es activo frente a las cepas obtenidas bajo presión con estas quinolonas. Para moxifloxacino las CMI frente a las 4 cepas seleccionadas con moxifloxacino son de 16 mg/L, y de entre 8 y 32 mg/L en las 8 cepas obtenidas con ozenoxacino y ciprofloxacino; y, finalmente, las 4 cepas obtenidas seleccionando con ciprofloxacino poseen unas CMI entre 64 y 512 mg/L, y, entre 128 y 256 mg/L, las seleccionadas con ozenoxacino y moxifloxacino.

V.2.3.3. Resultados de la caracterización genética de los mutantes resistentes seleccionados

Tras la secuenciación y amplificación de la region QRDR de los genes de la girasa y la topoisomerasa IV, *gyrA* y *grlA*, en las cepas seleccionadas, se han identificado unas mutaciones que implican las sustituciones en GyrA y GrlA que se detallan en la tabla V.12.

Cepas	Sustituciones		CMI mg/L		
	GyrA	GrlA	ciprofloxacina	moxifloxacina	Ozenoxacina
Sa-11 cipS	----	---	0,125	0,06	0,002
Cip Sa-11	Leu-84	Phe-80	256	16	1
Mox Sa-11	Leu-84	Phe-80	256	16	1
Oze Sa-11	Leu-84	Phe-80	256	16	1
Sa-12 cipS	----	----	0,5	0,06	0,004
Cip Sa-12	Leu-84	Phe-80	64	32	2
Mox Sa-12	Leu-84	Phe-80	256	16	1
Oze Sa-12	Leu-84	Phe-80	128	8	0,5
Sa-17 cipR	Leu-84	Phe-80	64	4	0,25
Cip Sa-17	Leu-84	Phe-80	256	8	1
Mox Sa-17	Leu-84	Phe-80	256	16	2
Oze Sa-17	Leu-84	Phe-80	256	32	2
Sa-18 cipR	Leu-84	Phe-80	64	4	0,25
Cip Sa-18	Leu-84	Phe-80	512	16	1
Mox Sa-18	Leu-84	Phe-80	256	16	1
Oze Sa-18	Leu-84	Phe-80	128	8	1

Las cepas iniciales de *S. aureus* que eran sensibles a fluoroquinolonas no presentaban ninguna mutación en la QRDR de *gyrA* y *grlA*, sin embargo, los mutantes resistentes obtenidos a partir de ellas presentaron una mutación en el codón que codifica para el aminoácido Ser-84 (Ser a Leu) del gen *gyrA* y otra mutación en el codón del aminoácido Ser-80 (Ser a Phe) del gen *grlA*.

Cuando se utilizaron las dos cepas de *S. aureus* resistentes a fluoroquinolonas como cepas iniciales, éstas ya poseían una doble mutación en los genes *gyrA* y *grlA* (Ser a Leu en el aminoácido del codón 84 del gen *gyrA* y Ser a Phe en el codón del aminoácido Ser-80 del gen *grlA*). Tras el análisis de los mutantes resistentes seleccionados en este estudio, se observó que no mostraron ninguna mutación adicional en la QRDR de ninguno de los dos genes, esto sugiere que el aumento detectado en las CMI fue debido a mecanismos de resistencia diferentes a mutaciones en estos genes.

V.2.3.4. Resultados estudio de la influencia de las bombas de flujo en los mutantes resistentes seleccionados

Para evaluar si las bombas de flujo, y posibles mutaciones sobre sus genes, han influido o son la causa del aumento de las CMI de las cepas mutantes, se han determinado las CMI e n presencia y ausencia de 25 mg/L de reserpina, que actúa como inhibidor de muchas de ellas.

Tabla V.13 Actividad antibacteriana de ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino frente a cepas seleccionadas de <i>S. aureus</i> , en presencia y ausencia de reserpina							
# Cepas	CMI inicial mg/L	CMI (mg/L) de los mutantes seleccionados					
		ozenoxacino mg/L	ciprofloxacino mg/L	moxifloxacino mg/L	ozenoxacino + reserpina mg/L	ciprofloxacino + reserpina mg/L	moxifloxacino + reserpina mg/L
Cip Sa-11	0,125	1	256	16	1	256	16
Mox Sa-11	0,06	1	256	16	1	256	16
Oze Sa-11	0,002	1	256	16	1	256	16
Cip Sa-12	0,5	2	64	32	2	64	32
Mox Sa-12	0,06	1	256	16	1	256	16
Oze Sa-12	0,004	0,5	128	8	0,5	128	8
Cip Sa-17	64	1	256	8	1	256	8
Mox Sa-17	4	2	256	16	2	256	16
Oze Sa-17	0,25	2	256	8	2	256	8
Cip Sa-18	64	1	512	16	1	512	16
Mox Sa-18	4	1	256	16	1	256	16
Oze Sa-18	0,25	1	128	8	1	128	8

En la tabla V.13 se puede observar, que las CMI en presencia de reserpina no se han modificado. Si en la selección de mutantes se hubieran producido mutaciones en los genes que codifican para las bombas de flujo, y, éstas hubieran sido responsables de expulsar fuera de las células mayor cantidad de las quinolonas, al bloquear con reserpina estos sistemas de transporte, permanecería más producto en el interior celular, y se habría detectado una menor CMI. Se destaca que las CMI, en presencia de reserpina no se han modificado, ni en una sola dilución para ninguno de los mutantes resistentes obtenidos, al igual que ha ocurrido con las cepas iniciales salvajes.

Página en blanco

APARTADO V.3. DISCUSIÓN

V.3. DISCUSIÓN

Ozenoxacino posee una potente actividad frente a *S. aureus*, incluso frente a cepas con mutaciones en los genes que codifican para la girasa A como para la topoisomerasa IV, que las hacen resistentes a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino. La CMI más alta que se obtiene para ozenoxacino es de 0,25 mg/L, frente a las cepas triple mutantes, mientras que las otras quinolonas evaluadas poseen CMI entre 8 y >128 mg/L.

Ozenoxacino no modifica su CMI frente a cepas que poseen una mutación en *grlA*, y, sí lo hace cuando posee una mutación en *gyrA* (la aumenta 7,5 veces hasta 0,03 mg/L). El observar que sustituciones en la girasa A le afectan ligeramente la actividad, mientras que si están en la topoisomerasa IV no, indica que la diana principal para ozenoxacino en *S. aureus* no es la topoisomerasa IV, sino la girasa A.

A ozenoxacino le ocurre lo mismo que a nadifloxacino, para la que está descrito que su diana principal es la girasa A (Alba, 2009, Nenoff, 2006, Oizumi, 2001, Takei, 2001,). No obstante, se considera que ambas quinolonas poseen actividad dual frente a las dos dianas, ya que conservan una buena actividad frente a la cepa doble mutante. Es frente a la cepa triple mutante donde se observa la actividad diferencial de ozenoxacino, con una CMI mucho menor (CMI de 0,125 mg/L vs 32 mg/L para nadifloxacino) (Takei, 2001, Yamakawa, 2002).

El hecho que ozenoxacino sea tan activo incluso frente a cepas con mutaciones dobles y triples en *grlA-gyrA*, hace suponer que probablemente estará por debajo del hipotético punto de corte de susceptibilidad/resistencia clínico. El número de veces que aumenta la CMI de ozenoxacino, al acumular las cepas mutaciones en los genes de las dos dianas, es muy bajo comparativamente a lo que le ocurre a las otras quinolonas (60 veces vs entre 200 y 2000). Es conocido para las quinolonas, que su CMI aumenta de manera escalonada con el aumento del número de mutaciones en los genes que codifican para las dianas de las quinolonas (Ribera 2002, Ruiz 2001, Vila, 1994). Al comparar el número de veces que aumentan las CMI de las quinolonas con las mutaciones en los genes, se podría considerar que entre ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino existe una similitud (resistencia paralela), mientras que ozenoxacino presenta un patrón disociado, muy claro con los mutantes dobles y triples. De todas maneras, esta categorización de las resistencias cruzadas no se utiliza mucho (Van Bambeke, 2005), y lo realmente importante es que el producto pueda ser activo frente a cepas altamente resistentes a quinolonas. Resultados muy similares se han publicado, para ozenoxacino, frente a cepas con sustituciones en *GyrA* y *GrlA* (Yamakawa, 2002).

Las CMI de levofloxacino y de moxifloxacino, frente a las cepas de *S. aureus* con una sola mutación en *grlA* o en *gyrA*, aumentan sólo 4 veces (a 0,5 y 0,125 mg/L) indistintamente, como corresponde a productos con actividad dual (Ince, 2002, Entenza, 2001, Takei, 2001), aunque a partir de dos mutaciones pierden su actividad. En cambio, las cepas de *S. aureus* con alguna mutación en *grlA* o *gyrA* son todas resistentes a ciprofloxacino, que pierde su actividad gradualmente hasta aumentar su CMI en más de 1000 veces (128 mg/L). Los resultados, para estos compuestos, coinciden con los de la bibliografía (Entenza, 2001, Ince, 2003, Schmitz, 1998c y 2000).

La resistencia a las quinolonas aumenta, además de con mutaciones en los genes de las dianas, gracias a los sistemas de transporte activo, como principalmente *NorA* en *S. aureus*, contribuyen a la expulsión del producto del interior celular (Kaatz 1993 y 1997, Ng, 1996, Takenouchi, 1996, Yoshida, 1990). La expresión constitutiva basal de los genes para bombas de flujo puede influenciar la CMI de un antibiótico en forma de resistencia intrínseca, mientras que, de manera adicional, mutaciones que afecten a la expresión de estos genes para algunas especies y compuestos, pueden elevar las CMI iniciales (Vila, 2011).

Se considera que la actividad de las bombas de flujo, es relevante cuando las CMI se reducen, como mínimo, en dos diluciones (Aeschlimann, 1999, Muñoz-Bellido, 1999, Ng, 1994). Al valorar la actividad de ozenoxacino, levofloxacino, moxifloxacino y ciprofloxacino, en presencia de un inhibidor como reserpina, se observa que los valores de CMI para ciprofloxacino fueron los únicos que resultaron afectados (4-6 veces menores) por el bloqueo de las bombas de flujo.

Está descrito que las quinolonas hidrofóbicas están menos afectadas por las bombas de flujo (Aeschlimann, 1999); ozenoxacino, moxifloxacino y levofloxacino, son compuestos hidrofóbicos, y ciprofloxacino, hidrofílico, esto explicaría los resultados obtenidos (Aeschlimann, 1999, Kaatz, 1993 y 1997, Piddock, 2001, Takenouchi, 1996). También se ha publicado que, concretamente, el tamaño y la hidrofobicidad de los sustituyentes en C7 y C8, más que la de la molécula global, podrían ser los responsables de la afectación de los compuestos por los sistemas de expulsión (Takenouchi, 1996).

En resumen, parece que ozenoxacino, igual que otras quinolonas descritas, como también, garenoxacino, y esparfloxacino (Boos, 2001, Ince, 2002; Piddock, 2001) es un sustrato pobre de bombas de flujo en *S. aureus*, hecho que le permitirá que su actividad se vea menos afectada, en cepas con potentes sistemas de expulsión similares. Está descrito que esparfloxacino interactúa con NorA de manera diferente a como lo hacen las quinolonas hidrofílicas, sin que sea transportado a través de ellas (Ince, 2002), esto podría sugerir que a ozenoxacino, y a otras quinolonas hidrofóbicas, les podría ocurrir lo mismo.

Por otro lado, al estudiar el potencial de ozenoxacino en el desarrollo de resistencias, se observa que la tasa de selección espontánea de mutantes resistentes, después de un solo paso a concentraciones por encima de sus CMI, fue muy bajo para ozenoxacino y moxifloxacino ($\leq 10^{-9}$), mientras que lo fue menos para ciprofloxacino (Schmitz, 2000b). El hecho que a concentraciones por encima de su CMI (entre x2 y x8, en este estudio), ozenoxacino no permita la aparición de cepas resistentes es importante para el control de las resistencias en su uso como antibiótico (Entenza 2001, Griggs, 2003, Ince, 2003, Malik, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, se consideran mutantes resistentes aquellas cepas que hayan aumentado su CMI inicial en 4 veces, en presencia de ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino, y se compara el número de pases necesarios para alcanzar ese aumento. A partir de las cepas de *S. aureus* sensibles a ciprofloxacino, se han detectado mutantes resistentes después de 3-4 pases para cada una de las tres quinolonas testadas, se supone que son mutantes de primer paso. Sin embargo, cuando el ensayo se realizó a partir de cepas resistentes a ciprofloxacino fueron necesarios entre 6-8 pases para ozenoxacino, mientras que tras sólo 3-4 pases se seleccionaron mutantes a ciprofloxacino y moxifloxacino. Es decir a partir de cepas que ya poseían una mutación doble en los genes que codifican para las dos dianas, es más fácil con ciprofloxacino y levofloxacino que adquieran mayor resistencia, que con ozenoxacino. Esta diferencia podría constituir una ventaja para ozenoxacino, ya que a cepas inicialmente resistentes a otras quinolonas, les costaría desarrollar nuevas resistencias en presencia de este antibiótico.

Estos resultados se confirman con el estudio de pases sucesivos, ya que, en todos los casos, las CMI obtenidas para ozenoxacino fueron inferiores a las de moxifloxacino, y ciprofloxacino; para las dos cepas de *S. aureus* ya inicialmente resistentes a fluoroquinolonas, sólo aumentó de 0,5 a 2 mg/L, incluso tras 28 pases, con las tres quinolonas. Es mucho más difícil seleccionar mutantes resistentes con ozenoxacino, que no con ciprofloxacino o moxifloxacino.

De cualquiera de las cepas iniciales, sensibles o resistentes a ciprofloxacino, tras 28 pases con cada una de las tres quinolonas, se han obtenido 12 cepas finales, con similares CMI para los tres antibióticos independientemente del antibiótico utilizado durante la selección. En todos los casos, ozenoxacino es muy activo frente a las cepas obtenidas bajo presión con estas quinolonas, mientras que, son resistentes a moxifloxacino y ciprofloxacino.

Los resultados, para ozenoxacino frente a los mutantes obtenidos con las cepas inicialmente sensibles, Sa11-CipS y Sa12-CipS, fueron muy parecidos a los reportados en la bibliografía (Yamakawa, 2002), para una cepa, también inicialmente sensible a quinolonas, cuya CMI para ozenoxacino no superó 0,03 mg/L, tras 28 pases.

Con el objetivo de identificar los posibles mecanismos que habían intervenido en la aparición de resistencia a las quinolonas, se analizaron las QRDR de los genes *gyrA* y *grlA* de las cepas obtenidas. Mientras que las cepas iniciales de *S. aureus*, sensibles a ciprofloxacino, no poseían ninguna mutación puntual en la region QRDR de los genes de la Girasa A ni de la topoisomerasa IV, en los mutantes resistentes se ha observado que presentaron todos, una

mutación en el codón que codifica para el aminoácido Ser-84 (Ser a Leu) de la girasa A y otra mutación en el codón del aminoácido Ser-80 (Ser a Phe) de la topoisomerasa IV. Está descrito que éstos son los aminoácidos responsables de la interacción con la molécula de quinolona, que suelen concentrar la mayoría de mutaciones. Por ejemplo, en todas las cepas con CMI para ciprofloxacino iguales o superiores a 4 mg/L se ha detectado la mutación Ser80 a Phe, en el gen *grlA*, en combinación con Ser84 a Leu o Glu88 a Lys en el gen *gyrA* (Schmitz, 1998a), como ha ocurrido con todas las cepas resistentes seleccionadas en este ensayo, a partir de cepas sensibles a ciprofloxacino.

En cambio, tras analizar las cepas obtenidas a partir de las inicialmente resistentes a ciprofloxacino, ya con una doble mutación, no se detectaron en las QRDR de los genes *gyrA* y *grlA*, mutaciones adicionales a las originales (Ser a Leu en el aminoácido del codón 84 del gen *gyrA* y Ser a Phe en el aminoácido del codón 80 del gen *grlA*). Esto se describe en la bibliografía para otras quinolonas, y, debería estudiarse en estas cepas si la presencia de otras mutaciones en los genes *gyrA* y *grlA*, fuera de la región QRDR, o en *gyrB* y *grlB*, podrían explicar el aumento de CMI para ozenoxacino, ciprofloxacino y moxifloxacino, al igual que ocurre para mutantes obtenidos con otras quinolonas, como garenoxacino, descrito en la literatura (Horii, 2007, Ince 2002, Ruiz, 2001, Zhao, 2003).

En la bibliografía se describe que, con pases y selección con quinolonas, se obtienen mutantes resistentes, tanto si se parte de cepas sensibles, como resistentes a ciprofloxacino con mutaciones en *gyrA* y *grlA*. Hay productos frente a los cuales el aumento de CMI es más destacado, como ciprofloxacino, que se confirma en este estudio, o como otras quinolonas como ofloxacino, sparfloxacino (Griggs, 2003). Otros productos como moxifloxacino seleccionan mutantes resistentes de menor grado, como los que se obtienen en este estudio (Griggs, 2003). En cambio, resultados como los de ozenoxacino, con sólo un aumento leve o limitado de las CMI, que mantiene a las cepas como sensibles a ozenoxacino, están descritos también para la fluoroquinolona DW286, frente a la que tampoco se obtienen mutantes con CMI más allá de 0,5 mg/L (o 100 veces superiores a la inicial), tras pases sucesivos con concentraciones subinhibitorias de producto (Kim, 2003).

Clásicamente se consideraba que las CMI de las quinolonas aumentaban para cepas con mutaciones en la diana más sensible (principal), y que mutaciones en la diana menos sensible (secundaria) pasaban desapercibidas a no ser que hubiera una mutación en la diana principal (Hooper, 2001). La aparición de quinolonas con potente actividad frente a las dos dianas, mostró que, se observaba una leve afectación de la CMI de cepas con una mutación en una diana, o en la otra, como ocurre con moxifloxacino y levofloxacino en este estudio (Inca, 2003). Se considera que, productos como ozenoxacino, con potente actividad dual (Yamakawa, 2002), ofrecen potenciales ventajas para su uso como antibiótico. Ozenoxacino, además de aumentar su CMI en menor proporción que las otras quinolonas testadas, mantiene una CMI para cepas altamente resistentes a quinolonas no muy elevada, e inferior a un posible hipotético punto de corte de resistencia clínica.

Está descrito en la bibliografía (Durham, 1999) que las mutaciones que confieren un alto nivel de resistencia a ciprofloxacino en *S. aureus* son las situadas en *gyrA*, a pesar de que las primeras que aparecen sean en *grlA* (Ferrero, 1995, Ng, 1996), igual que ocurre para moxifloxacino. Hay estudios que identifican la Topoisomerasa IV como diana principal para ciprofloxacino (Ferrero 1995, Ng, 1996, Takei, 2001); en el caso de moxifloxacino, hay trabajos en los que se defiende que las dos enzimas son la diana principal (Takei, 2001) y en otros la Topoisomerasa IV (Ince, 2003). En nuestro estudio la caracterización genética se realizó a partir de los mutantes obtenidos tras 28 pases, por lo que no se pudo comprobar qué mutaciones aparecían primero (Ferrero, 1995, Ng, 1996).

En este estudio se han aislado mutantes resistentes a ozenoxacino y se han intentado caracterizar; en la bibliografía para ozenoxacino, sólo está descrito un estudio, y para una cepa inicialmente sensible a ciprofloxacino, que tras 28 pases sucesivos no aumentó en más de 2 veces su CMI (Yamakawa, 2002).

Tampoco parece que modificaciones en los sistemas de transporte, hacia el exterior celular, justifiquen el incremento de las CMI de las quinolonas en las distintas cepas mutantes. En

presencia de reserpina en el medio, que debe inhibir las bombas de flujo, las CMI, aumentadas entre 10-1000 veces, no se modifican para ninguna quinolona. Con los resultados de este estudio se concluye que el aumento de resistencia no se debe a una mutación en los genes que codifican para las bombas de flujo que se inhiben con reserpina. A partir de estos resultados, quedaría abierta la posibilidad de que otras bombas no descritas pudieran ser responsables del incremento de CMI. Está descrita la relevancia de los sistemas de transporte y su relación con el incremento de resistencias en quinolonas (Vila, 2011), por lo que, se debería profundizar más, para poder explicar estos resultados.

En la bibliografía se describe que, p.ej. para ciprofloxacino, primero aparecen mutaciones en las dianas principales, y a continuación en los genes que codifican para las bombas de flujo generando cepas con acumulación reducida (Ferrero, 1995), o, también, independientemente unas de otras (Kaatz, 1997). En nuestro caso, no se ha podido detectar este mecanismo ni en las cepas resistentes, que habían adquirido mutaciones en *gyrA* y *griA* a partir de las inicialmente sensibles a ciprofloxacino.

En resumen, ozenoxacino es la quinolona que posee la mejor actividad frente a las cepas testadas de *S. aureus* con sustituciones en la ADN girasa y en la topoisomerasa IV, estando siempre los valores de CMI obtenidos muy por debajo de los de las otras quinolonas, y de un hipotético punto de corte de susceptibilidad-resistencia clínico.

Otra característica importante de un nuevo agente antibacteriano es la habilidad de no seleccionar fácilmente mutantes resistentes. Ozenoxacino presenta una muy baja frecuencia de selección espontánea de mutantes resistentes, comparable a la de moxifloxacino, y mejor que la de ciprofloxacino. Por otro lado, después de 28 pases sucesivos con concentraciones subinhibitorias de ozenoxacino, las CMI de las cepas, ya inicialmente resistentes a ciprofloxacino, aumentaron sólo hasta 2 mg/L, mucho menos que las de ciprofloxacino y moxifloxacino, y sin estar relacionadas con un aumento de la expresión de los sistemas de expulsión a antibióticos conocidos, que podrían implicar resistencias cruzadas con otros compuestos.

En resumen, la habilidad de este compuesto para seleccionar con una baja frecuencia mutantes resistentes en *S. aureus*, su no susceptibilidad a ser expulsado por bombas de flujo, junto a su potente actividad, especialmente frente a bacterias Gram-positivas, le convierte en un buen candidato para ser utilizado en infecciones bacterianas causadas por patógenos susceptibles, que pueden ser resistentes a otras quinolonas o a otros antibióticos.

Otras características, como la definición de las ventanas de selección de mutantes (Credito, 2010, Yamakawa, 2005, Zhao, 1999), además de, como se ha mencionado anteriormente, su capacidad bactericida (Drlica, 2008), para los diferentes microorganismos completará el perfil del producto, para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.

APARTADO V.4. BIBLIOGRAFÍA

V.4. BIBLIOGRAFÍA

Aeschlimann, JR, Kaatz, GW y Ryback, MJ. 1999. The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an in vitro infection model. 1999. J Antimicrob Chemother **44**:343-349.

Alba, V. Urban, E., Dominguez, MA, Nagy, E.; Nord, C-E y Vila, J. 2009. *In vitro* activity of nadifloxacin against several gram-positiv bacteria and analysis of the possible evolution of resistance after 2 years of use in Germany. Intern. J. of Antimicrobial Agents. **33**(3): 272-275.

Boos, M., Mayer, S., Fischer, A., Kohner, K, Scheuring, S, Schmitz F-J et al. *In vitro* development of resistance to six quinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *S.pyogenes*, and *S.aureus*. Antimicrob Agents Chemother **45**:938-42.

Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Y Levy SB. 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to *OmpF* reduction. Antimicrob Agents Chemother. **33**(8):1318–1325.

Credito, K., Kosowska-Shick, K., McGhee, P., Pankuch, G.A., y Appelbaum, P.C. 2010. Comparative study of the mutant prevention concentrations of moxifloxacin, levofloxacin and gemifloxacin against pneumococci. Antimicrob. Agents Chemother.; **54**:673-677.

Deshpande, LM, Fix, AM, y Pfaller, MA. 2002. The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Participants Group, and R.N. Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000): correlations of results from disk diffusion, Etest and reference dilution methods. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **42**: 283-290.

Drlica K, y Zhao X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev, **61**(3):377-392.

Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J. y Zhao, X. 2008. Quinolone-mediated bacterial cell. Antimicrob. Agents Chemother. **52**(2): 385-392.

Entenza JM, Que, YA, Vouillamoz, J, Glauser MP y Moreillon. 2001.Efficacies of Moxifloxacin, Ciprofloxacin and Vancomycin against Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Expressing Various Degrees of Ciprofloxacin Resistance. Antimicrob Agents Chemother, **45**(11): 3076-3083.

Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, D. Lagneaux, J. Crouzet, A. Famechon, y F. Blanche. 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. Mol.Microbiol. **13**:641-653.

Ferrero, L., B. Cameron, y J. Crouzet. 1995. Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob.Agents Chemother. **39**:1554-1558.

Gemmell; C.G. et al., 2006. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **57**:589-608.

Gentry, D.R., Rittenhouse, S.F., McCloskey, L. y Holmes, D.J. 2007. Stepwise exposure of *Staphylococcus aureus* to pleuromutilins is associated with stepwise acquisition of mutations in *rplC* and minimally affects susceptibility to retapamulin. Antimicrob. Agents Chemother.; **51**:2048-2052.

Gisby, J. 2000. Efficacy of a New Cream Formulation of Mupirocin: Comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. , Antimicrob Agents Chemother; **44**(2):255-260.

Griggs, D.J., Marona, H. y Piddock LJV. 2003. Selection of moxifloxacin-resistant *S.aureus* compared with five other fluoroquinolones. J Antimicrob Chemother **51**:1403-1407.

Hooper, D.C. 2001. Mechanisms of action of antimicrobioals: focus on fluoroquinolones. Clin Infect Diseases **32**:S9-S15.

Horii, T., Suzuki, Y., Takeshita, A. Y Maekawa, M.. 2007. Molecular characterization of 8-methoxyfluoroquinolone resistance in a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Chemotherapy; **53**:104-109.

Ince, D., Zhang, X., Silver, C. y Hooper D.C. 2002. Dual Targeting of DNA Gyrase and Topoisomerase IV: Target Interactions of Garenoxacin (BMS-284756, T3811ME). Antimicrob Agents Chemother **46**(11):3370-3380.

Ince, D., Zhang, X y Hooper, DC. 2003. Activity of and resistance to moxifloxacin in *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother, **4**(4):1410-1415.

Kaatz, G.W., Seo, S., y Ruble, C.A.. 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:1086-1094.

Kaatz, G.W., y Seo, S.. 1995. Inducible *norA*-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:2650-2655.

Kaatz, GW., y Seon, SM. 1997. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Genetically Related Strain fo *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, **41**(12): 2733-2737.

- Kim, MJ, Yun, H-J, Kang, J-W, Kim, S., Kwa, J-H. y Choi, E-C. 2003. *In vitro* development of resistance to a novel fluoroquinolone, DW286 in methicillin-resistant *Saureus* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* **51**:1011-1016.
- Kosowska-Shick, K., Clarck, K., Credito, K., McGhee, P., Dewase, B., Bogdanovich, y Appelbaum, P.C. 2006. Single- and multistep resistance selection studies on the activity of retapamulin compared to other agents against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **50** (2):765-769.
- Leyden, JJ . The Role of Topical Antibiotics in Dermatologic Practice, June 25, 2003 (Medscape).
- Malik, M., Hoatam, G., Chavda, K., Kerns, R.J. y Drlica, K.. 2010. Novel approach for comparing the abilities of quinolones to restrict the emergence of resistant mutants during quinolone exposure. **54**: 149-156.
- Muñoz-Bellido, JL., Alonso Manzanares, MA, Martínez Andrés, JA, Gutiérrez Zufiaurre, Ortiz; G., Segovia Hernández, M. y García-Rodríguez. J.A.. 1999. Efflux Pump-Mediated quinolone resistance in staphylococcus aureus strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *griA* and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(2):354-355.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Methods for susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. M7-A4. Villanova, PA
- Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., y Kaatz, G.W. 1993. Fluoroquinolone resistance protein *NorA* of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:128-129.
- Nenoff, P. 2006. Acne vulgaris and bacterial skin infections: review of the topical quinolone nadifloxacin. *Expert Rev. Dermatol.* **1** (5): 643-654.
- Ng, E. Y., M. Trucksis, y Hooper, D.C. 1994. Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob Agents Chemother*; **38**(6):1345-1355
- Ng, E. Y., M. Trucksis, y Hooper, D.C.. 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**:1881-1888.
- Oizumi, N., Kawabata S, Hirao, M., Watanabe,K., Fujiwara, T., y Kikuchi, M. 2001 Relationship between mutations in the DNA gyrase and topoisomerase IV genes and nadifloxacin resistance in clinically isolated quinolone-resistant *S.aureus*. *J. Infect. Chemother* **7** (3): 191-4
- Pawa; A. et al.. 2000. Co-transfer of plasmids in association with conjugative transfer of mupirocin or mupirocin and penicillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **49**:1103-1107.
- Piddock, LJV, Jin YF y Griggs, DJ. 2001. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, **47**:261-270.
- Rattan, A. 1999. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. *Natl Med J India.* **12**(4):162-164
- Ruiz, J., J. M. Sierra, M. T. De Anta, y Vila, J. 2001. Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* obtained *in vitro*. *Int. J.Antimicrob.Agents* **18**:107-112
- Schmitz, FJ, Jones ME, Hofmann, B., Hansen, B., Scheuring, S., Lückefahr, M., Fluit, AD, Verhoef; J., Hadding, U., Heinz, H-P y Körher. 1998. Characterization of *griA*, *griB*, *gyrA*, and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *S.aureus* and Effects of Mutations on Ciprofloxacin MIC, *Antimicrob Agents Chemother* **42**(5):1249-1252.
- Schmitz, F.-J., Fluit, A.C., Lückefahr, M., Engler, B., Hofmann, B., Verhoef, J., Heinz, H.-P., Haddling, U., y Jones, M.E..1998a. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activities of ciprofloxacin, sparfloxacin, and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother* **42**:807-810.
- Schmitz F-J, 1998b. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin. MICs and mutations in *griA*, *griB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *S.aureus*. *J Antimicrob Chemother.* **41**(4):481-4.
- Schmitz, F.-J., von Eiff, C., Gondolf, M., Fluit, A.C., Verhoef, J., Peters, G., Haddling, U., Heinz, H.-P., y Jones, M.E..1999. *Staphylococcus aureus* small colony variants: rate of selection and MIC-values compared to wild-type strains, using ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, and moxifloxacin. *Clin. Microb. Infect.* **5**:376-378.
- Schmitz F-J, Fluit, C., Milatovic, D., Verhoel, J., Heinz, H-P y Brisse, S. 2000a. *In vitro* potency of moxifloxacin, clinafloxacin and sitafloxacin against 248 genetically defined clinical isolates of *S.aureus*. *J Antimicrob Chemother.* **46**:109-113.
- Schmitz, F.-J., Fluit, A.C., Hafner, D., Beeck, Perdikouli, M., Boos, M., Scheuring, S., Verhoef, J., Köhrer, K. y von Eiff, C. 2000b. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin, and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:3229-3231.
- Shawar R, Scangarella-Oman N, Dalessandro M, Breton J, Twynholm M, Li G, Garges H. 2009. Topical retapamulin in the management of infected traumatic skin lesions. *Ther Clin Risk Manag.* **5**(1):41-49.

- Sierra, J. M., F. Marco, J. Ruiz, M. T. Jimenez de Anta, y Vila, J..** 2002. Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. Clin.Microbiol.Infect. **8**:781-790.
- Sierra, J. M., J. G. Cabeza, C. M. Ruiz, T. Montero, J. Hernandez, J. Mensa, M. Llagostera, y Vila, J.** 2005. The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. Clin.Microbiol.Infect. **11**:750-75
- Takei, M., Fukuda, H.; Kishii, R. y Hosaka, M.** 2001. Target Preference of 15 Quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on Antibacterial Activities and Target Inhibition. Antimicrob Agents Chemother, **45**(12):3544-3547.
- Takenouchi, T., Tabata, F., Iwata, Y., Hanzawa, H., Sugawara, M., y Ohya, S.** 1996. Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, **40**(8): 1835-1842.
- Yamakawa, T., J. Mitsuyama, y Hayashi, K..** 2002. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T-3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. J.Antimicrob.Chemother. **49**:455-46
- Yamakawa, T. et al.** 2005. *In vitro* Antibacterial Activity and Mutant Prevention Profile of T-3912 (GF-001001-00): a Non-fluorinated Topical Quinolone. Poster presented at 45th ICAAC Meeting, Dec 2005, Washington, DC
- Yoshida, H., M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, y Konno, M.** 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. J.Bacteriol. **172**:6942-6949.
- Zhao, X., Eisner, W., Perl-Rosenthal, N., Kreiswirth, B., y Drlica, K.** 2003. Mutant prevention concentration of garenoxacin (BMS-284756) for ciprofloxacin-susceptible or -resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **47**(3): 1023-1027.
- Zhao, X. y Drlica, K..** 1999, Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: Measurement and potential use of the mutant selection window. J Inf Dis, **185**: 561-565
- U.S. Environmental Protection Agency Review Manual, Chapter 7: Precautionary Labeling (August, 1997); <http://www.epa.gov/oppfead1/labeling/lrm>

Página en blanco

CAPÍTULO VI. EFICACIA *IN VIVO* DE OZENOXACINO

APARTADO VI.1. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO VI. Eficacia *in vivo* de ozenoxacino

VI.1. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1.1. Modelo de infección dérmica por *S. aureus* en roedores, protocolo general.

Se utilizó un tipo de estudio de infección por vía dérmica con *S. aureus*, en roedores (Gisby, 2000), con el objetivo de evaluar y cuantificar la eficacia de distintas formulaciones de ozenoxacino, comparándolas entre ellas y frente a otros antibióticos de uso dérmico.

Los estudios se realizaron, durante los años 2003-2009, en los Departamentos de Farmacodinamia y Microbiología de Harlan Laboratorios (Sta. Perpétua de la Mogoda, Barcelona), con anterioridad Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado, S.A.L., y fueron dirigidos desde los Dptos de Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación y Desarrollo Farmacéutico del Grupo Ferrer.

VI.1.1.1 Animales

Los estudios se realizaron utilizando ratones (machos, CD-1, de entre 21 y 28g al inicio del experimental), procedentes de Charles River Laboratories France, SA. En un solo caso, en el estudio EV-2, se utilizaron ratas (machos, Sprague Dawley de entre 350 y 410g, al inicio del experimental) para poder realizar extracciones de sangre y conocer la absorción sistémica del ozenoxacino, tras su administración dérmica. Los animales se estabularon en jaulas individuales de Makrolon de 33,2 x 15,0 x 13,0 cm de tamaño y, todos los animales tuvieron acceso a la comida y agua *ad libitum*.

VI.1.1. 2. Microorganismo o cepa infectante

Se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina ATCC 6538, y a los animales se les insertó bajo la piel un hilo empapado con un inóculo de aproximadamente $2.5 \cdot 10^5$ UFC/cm de esta cepa.

En la preparación de las suturas, para impregnar y cargar con *S. aureus* los hilos de sutura, se sumergieron durante treinta minutos en un caldo que se incubó durante una noche con *S. aureus* ATCC 6538, hasta una concentración de 10^8 UFC/mL, previamente ajustada por espectrofotometría. Los hilos se extrajeron del caldo y se dejaron secar sobre un papel de filtro.

Para hacer un control de la carga microbiana de cada hilo, se cortaron dos fragmentos de 1 cm, y cada uno de ellos, se introdujo en un tubo con 1 ml de caldo de extracto de levadura al 0,2%. Tras agitar con un vortex, se realizaron diluciones de este caldo y se transfirieron 100 μ l de las mismas, en duplicado y en paralelo, a placas con agar CLED que se incubaron 24h a 37°C, para realizar el recuento para cada hilo. El resto de los hilos se guardaron en nevera, hasta el momento de su utilización, para ser insertados en los animales de experimentación.

VI.1.1.3. Tratamientos

Los antibióticos administrados por vía dérmica fueron, en el caso de ozenoxacino, suministrados por Ferrer Internacional SA, mientras que mupirocina y retapamulina fueron de origen comercial (Bactobran® / Beecham / GlaxoSmithKline S.A., y Altabax® GlaxoSmithKline Research Triangle Park, NC 27709).

En todos los experimentos se añade un grupo de animales tratado con formulación placebo, con la misma pauta de administración que los que reciben tratamiento con antibióticos (Gisby, 2000, Rittenhouse, 2006). El inóculo inicial corresponde a la carga del fragmento de hilo de sutura, y el recuento de bacterias en la zona de la lesión infectada se realiza al final del tratamiento.

VI.1.1.4. Medios de cultivo

Para el recuento de las colonias de *S. aureus* en el inóculo infectante se utilizó el agar CLED (cistina-lactosa deficiente en electrolitos, SCHARLAU, Sentmenat, España). Para el recuento de la carga microbiana existente en la zona de la lesión se utilizaron tres tipos de agar: agar CLED, agar CLED suplementado con un 2% de carbón activo (PANREAC, Castellar del Vallès, España), y agar CLED suplementado con cloruro magnésico 50mM (PANREAC, Castellar del Vallès, España). Éste parámetro es el que se utiliza para la valoración de la eficacia del tratamiento. Se añade carbón activo o cloruro magnésico a las placas con agar para inactivar (inespecíficamente) los restos de mupirocina, retapamulina u ozenoxacino que hayan quedado en la muestra de piel, y que puedan haber llegado, tras la dilución de la misma, a la placa de agar que se utilizará para el recuento. Cualquier eliminación de bacterias durante el proceso de conteo debido al arrastre de antibiótico, enmascararía la carga real en la zona de la lesión, por lo que se opta por la inactivación de los antibióticos presentes en las muestras de piel, una vez realizada la siembra en agar.

En la mayoría de los casos, los tres tipos de agar se utilizaron para el recuento del grupo control, mientras que, para los grupos tratados con ozenoxacino se utilizó el agar CLED sólo y con cloruro magnésico, y para los grupos tratados con mupirocina y retapamulina, se utilizó el agar CLED sólo y suplementado con carbón activo. El agar CLED es un medio de cultivo diferencial para aislar y contar bacterias, sin electrolitos, para impedir la indebida proliferación de otras especies.

VI.1.1.5. Modelo o protocolo general

En este modelo experimental, realizado mayoritariamente en ratones, el objetivo era confrontar una cepa de *S. aureus* y una herida reciente en la piel de los animales, simulando una incisión (Gisby, 2000) y comparar, o diferentes productos, o diferentes formulaciones, o diferentes patrones de administración del producto.

En todos los experimentos realizados, el día antes del inicio del estudio, se depiló el lomo de los animales y se repartieron en grupos de 10-15 ratones o 12 ratas, de manera aleatoria, y se codificaron en doble ciego. Al inicio de cada experimento, se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico (55 mg/kg, ip) o isoflurano. La infección dérmica se realizó insertando una aguja enhebrada con un hilo de seda empapado con un inóculo de aprox. $2,5 \cdot 10^5$ UFC/cm de *S. aureus*. Se perforó con la aguja de manera que sólo se traspasara la piel a la altura de la cintura torácica (*shoulder girdle*) y saliera aproximadamente un centímetro más abajo. Se anudaron ambos extremos del hilo, para asegurar que éste no se moviera de su posición subcutánea, y se realizó una incisión superficial con un bisturí por encima de la zona entre los dos nudos, sin alcanzar el *panniculus carnosus*. Finalmente, se cerró la incisión con una sutura adhesiva.

Cuatro horas después de la infección, se aplicaron las primeras dosis de tratamiento con las distintas formulaciones. En algunos experimentos se realizó una única aplicación, en otros, se continuó el tratamiento hasta cinco días, tres aplicaciones al día. En las secciones posteriores, y en formato tablas, se detallan las variaciones de los tratamientos efectuadas en los distintos estudios, que básicamente consistieron en diferentes patrones de administración (de 1 a 5 días, y de 1 a 3 veces al día).

Los tratamientos se aplicaron tópicamente sobre la zona afectada en un volumen de aprox 0,1 mL por animal, con una jeringa, y se realizó un masaje de no menos de 30 segundos con la yema del dedo, para facilitar y homogeneizar la absorción del producto.

Aproximadamente, y no menos de, dieciséis horas después de la última aplicación (día 1, 3 ó 5), los animales se sacrificaron por dislocación cervical, y se recortó y pesó una área de la piel de aprox 1 x 2 cm, que incluía la zona de la herida. Estas muestras se homogenizaron, individualmente, en suero fisiológico, y alícuotas de diferentes diluciones se emplacaron en placas con agar CLED, con agar CLED y un 2% de carbón activo, y en placas de agar CLED con 50mM de cloruro magnésico, para evitar el arrastre de los antibióticos, como se ha

explicado anteriormente. Tras incubación de las placas 24h a 37°C, se realizó el recuento del número de colonias. Los valores correspondientes al recuento microbiológico (UFC/placa) se transformaron a Log_{10} , teniendo en cuenta las diluciones realizadas, el peso en gramos de las muestras de piel y el volumen en el que cada muestra fue homogeneizada. Los resultados se expresan en Log_{10} de UFC/g de muestra de piel, y el límite inferior de detección fue de aproximadamente 10^2 UFC/g de muestra de piel.

Además del recuento de colonias de *S. aureus* por gramo de piel, se presentó, por separado, el número de animales a partir de cuyas muestras de piel no se observó crecimiento bacteriano con el objetivo de valorar en aquellos grupos de animales en los que los antibióticos tópicos pudieran tener un efecto mayor. Al realizar la lectura de las placas, hay algunos grupos con placas sin crecimiento o con una sola colonia, cuyo recuento final suele estar en el límite de detección (Rittenhouse, 2006) mientras que, para la mayoría de grupos, hay abundante crecimiento en las placas de agar. Se presentan, en tablas, para cada grupo el número de animales a partir de los cuales no se recuperó *S. aureus* en la muestras de la zona de la lesión.

En el tratamiento estadístico de los datos, en cada estudio, se comparó el resultado de los distintos tratamientos con el de su grupo control, tratado con una formulación placebo. Se realizaron comparaciones entre los grupos tratados con las formulaciones de ozenoxacino y los antibióticos comparativos utilizados, mupirocina, y retapamulina, y también, entre los grupos tratados con distintas formulaciones de ozenoxacino. En función del estudio previo de la normalidad de la población, se utilizaron test estadísticos paramétricos (HSD de Tukey o la prueba t de Student) o no paramétricos (Kruskall-Wallis). Las diferencias entre los signos clínicos o efectos adversos detectados entre grupos se analizaron mediante el test de χ^2 de Pearson, con un nivel de significación del 5%.

Se analizó previamente, en todos los estudios, si los animales que perdieron el hilo de sutura durante el tratamiento presentaban recuentos más bajos que los que lo habían mantenido bajo la piel. Resultados no mostrados indican que no se han detectado diferencias estadísticamente significativas (test de χ^2 de Pearson, con un nivel de significación del 5%) entre ninguno de ellos.

En la tabla VI.1 se avanza de manera resumida las características diferenciales de los distintos estudios realizados, que se detallan, a continuación, en los apartados VI.1.2 – VI.1.11.

Se han realizado nueve estudios consecutivos, en los que el principal objetivo fue evaluar la eficacia *in vivo* del producto, el segundo identificar qué tipo de formulación, y con qué tipo de materia prima, podría ser la más adecuada desde el punto de vista de eficacia y homogeneidad de resultados, y, en tercer lugar, confirmar los resultados obtenidos, frente a productos comparativos.

De manera más detallada y ordenada en el tiempo, se listan los objetivos de los ensayos *in vivo* realizados:

- Evaluar la eficacia de ozenoxacino en un modelo *in vivo* de infección dérmica (EV-1 a EV-9).
- Analizar, en una primera fase, qué tipo de formulaciones podrían ser las más adecuadas, desde el punto de vista de eficacia y homogeneidad de resultados, valorando distintos excipientes, producto solubilizado o en suspensión, y absorción sistémica, con lotes de materia prima sintetizados a escala de laboratorio (EV-2 y EV-3).
- Analizar, si para diferentes lotes de materia prima, ya no a escala de laboratorio, características físico químicas como el tamaño de partícula pueden influenciar en los resultados de eficacia (EV-4 y EV-5).
- Confirmar, con la materia prima micronizada, la eficacia de ozenoxacino en distintos tipos de formulaciones (EV-5).
- Determinar si existe relación dosis-efecto de ozenoxacino en el modelo *in vivo* (EV-6)
- Evaluar la eficacia de las formulaciones de ozenoxacino seleccionadas con un patrón de administración largo (EV-7 y EV-8).
- Comparar la eficacia de las formulaciones seleccionadas de ozenoxacino con la pomada de retapamulina al 1% (EV-9).

Ensayo	Compuesto (*)	# grupos de animales	Tipo de formulación	Concentración de antibiótico	#días de tratamiento	# aplicaciones diarias
EV-1	mupirocina	1	pomada	2 %	4	3
	ozenoxacino (1)	2	gel	1 %		3
						1
EV-2	ozenoxacino (1)	4	gel	1 %	4	3
EV-3	mupirocina	1	pomada	2 %	3	1
	ozenoxacino (1)	1	pomada	1 %		
		2	gel			
		2	crema			
EV-4	mupirocina	1	pomada	2 %	1	1
	ozenoxacino (2)	2	pomada	1 %		
EV-5	mupirocina	2	crema	2 %	1	1
			pomada			
	ozenoxacino (2)	2	crema	1 %		
		1	pomada			
	1	gel				
EV-6	mupirocina	1	pomada	2 %	1	1
	ozenoxacino (3)	4	pomada	0,25 %		
				0,5 %		
				1 %		
				2 %		
EV-7	mupirocina	1	pomada	2 %	5	3
	ozenoxacino (3)	1		1 %		
EV-8	mupirocina	1	crema	2 %	5	3
	ozenoxacino (3)	1		1 %		
EV-9	mupirocina	1	pomada	2%	1	1
	retapamulina	1				
	ozenoxacino (3)	1	pomada	1%		
		1	crema			

(*): tipo de materia prima de ozenoxacino que se utiliza

(1): lotes de laboratorio, tamaño de partícula pequeño

(2): lotes de materia prima sintetizados a escala de 1 Kg aprox., se comparan lotes con producto micronizado y sin micronizar

(3): todos los lotes son con producto micronizado

VI.1.2. Estudio EV-1

El objetivo de este primer estudio, de infección dérmica por *S. aureus* en ratón, fue evaluar y cuantificar la eficacia de ozenoxacino al 1% en una formulación gel en la reducción de la carga microbiana en el lugar de la lesión, valorando dos patrones de administración (tres veces al día y una vez al día), y en comparación a pomada al 2% de mupirocina (tres veces al día), durante tres días.

Antibiótico y tipo de formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino gel 1%	GTP01	micronizado	10	4 (3)	11 (+4, +6, c8h)
Ozenoxacino gel 1%	GTP01	micronizado	8	4 (1)	5 (+4, +6, c24h)
Mupirocina poma 2%	PMUPA	-	10	4 (3)	11 (+4, +6, c8h)
Placebo gel	GPT01	-	10	4 (3)	11 (+4, +6, c8h)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538			2.5·10 ⁵ UFC/cm		

VI.1.3. Estudio EV-2

En el siguiente estudio se valoró el efecto de la solubilización del producto en la formulación, y la influencia del pH, tanto en la actividad antibacteriana como en la absorción sistémica de ozenoxacino. El objetivo de este estudio fue evaluar la posible correlación entre la permeación dérmica y la actividad antibacteriana *in vivo* de cuatro formulaciones de ozenoxacino al 1% en gel, en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* sensible a la meticilina, que se realizó en ratas, en lugar de en ratones, para poder disponer de plasma suficiente para evaluar la absorción sistémica de ozenoxacino.

En el estudio EV-2 se ensayaron geles de ozenoxacino al 1%, con distintas cantidades de potenciadores de la penetración dérmica, con el objetivo de identificar la formulación que aporte mayor eficacia y superior homogeneidad en la respuesta individual. Se buscó correlacionar la actividad con la absorción sistémica del producto, evaluando también el efecto del pH en las formulaciones. Se testó distintas formulaciones tipo gel, una a pH 10 vs otros geles a pH 6,8, en todos los geles el producto está solubilizado.

Tabla VI.3 Estudio EV-2 / Infección dérmica por <i>S. aureus</i> SM en rata					
Antibiótico y tipo formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 1% gel	GLT02	micronizado	12	4 (3)	9 (+4, +6, c8h)
Ozenoxacino 1% gel	GLT03	micronizado	12	4 (3)	9 (+4, +6, c8h)
Ozenoxacino 1% gel	GLT04	micronizado	12	4 (3)	9 (+4, +6, c8h)
Ozenoxacino 1% gel	GLT05	micronizado	12	4 (3)	9 (+4, +6, c8h)
Placebo gel	GPT02	-	12	4 (3)	9 (+4, +6, c8h)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538			2.5·10 ⁵ UFC/cm		

Cuatro horas después de la infección se inició la aplicación de los distintos tratamientos y, seis horas después la segunda aplicación. Tres aplicaciones al día (cada 8 horas) se realizaron durante los dos días siguientes para todos los tratamientos, en el cuarto día sólo se realizó la primera aplicación. Al quinto día, veinticuatro horas después de la última aplicación, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg, ip) y se extrajo mediante punción intracardiaca la máxima cantidad de sangre posible. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y se procesaron, de cada uno de ellos, muestras de piel (1 x 2 cm) que incluían la zona de la herida.

VI.1.4. Estudio EV-3

En este estudio el objetivo fue comparar cinco formulaciones distintas de ozenoxacino al 1%, una pomada, dos geles y dos cremas, además de mupirocina pomada al 2%. El gel del lote GLT06, era la misma formulación que el lote GLT02, utilizada en el estudio EV-2, con el producto solubilizado a pH 6,8, que es con la que se habían obtenido mejor y más homogéneos resultados de eficacia. Como control negativo se utilizó un grupo tratado con una formulación placebo pomada, correspondiente a la pomada de ozenoxacino al 1% de este estudio.

Se modificó también, el patrón de administración, tratando los animales una vez al día, durante los tres días siguientes a la infección.

Tabla VI.4 Estudio EV-3 / Infección dérmica por <i>S. aureus</i> SM en ratón					
Antibiótico y tipo formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT01	micronizado	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Ozenoxacino 1% gel	GLT06	micronizado	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Ozenoxacino 1% gel	GLT07	micronizado	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Ozenoxacino 1% crema	TCT01	micronizado	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Ozenoxacino 1% crema	TCT02	micronizado	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Mupirocina 2% pomada	PMUPB (Bactobran™, Beecham)	-	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Placebo pomada	DPT01	-	15	3 (1)	3 (+4, c24h)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538	2.5·10 ⁵ UFC/cm				

En este ensayo, se realiza una aplicación de los distintos tratamientos a los animales, cuatro horas después de la infección, y, 24 y 48 horas después. Al cuarto día, al menos 20 horas después de la última aplicación, todos los animales fueron sacrificados y las muestras de piel procesadas para el recuento de *S. aureus* viables.

VI.1.5. Estudio EV-4

El objetivo de este estudio fue evaluar y cuantificar la actividad antibacteriana *in vivo* de dos pomadas al 1% de ozenoxacino, fabricadas con distintos lotes de producto y después de un único tratamiento, en el mismo modelo de infección dérmica por *Staphylococcus aureus* en ratón. Se utilizó como comparador un grupo tratado con pomada de mupirocina al 2%, y a los animales del grupo control negativo se les aplicó una pomada placebo (lote DPT02), con los mismos excipientes y proceso de fabricación equivalente a las de ozenoxacino.

De las dos pomadas con ozenoxacino al 1% que se testaron en este estudio, una de ellas (Lote PDT02) se había preparado con producto sin micronizar y la otra (Lote PDT03), con producto micronizado (tabla VI.5). En estos momentos del desarrollo, el escalado del producto permitió trabajar con los primeros lotes de proceso del principio activo, no de laboratorio, que tras su caracterización inicial, permitieron realizar una micronización como última fase de su proceso de síntesis. Los productos que se estudiaron en este ensayo, fueron el correspondiente a antes y después, de esta última fase de micronización, por tanto poseían distintos tamaños de partícula.

Tabla VI.5 Formulaciones Estudio EV-4				
Lotes pomada de ozenoxacino al 1%	Lotes de ozenoxacino	Características	Tamaño de partícula ozenoxacino (µm)	
			Moda	Percentil ₉₀
PDT02	GP003-RD102 T05	sin micronizar	45,75	77,05
PDT03		micronizado	1,17	5,30

Tabla VI.6 Estudio EV-4 / Infección dérmica por <i>S. aureus</i> meticilin sensible en ratón					
Antibiótico y tipo formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT02	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT03	sin micronizar	15	1 (1)	1 (+4)
Mupirocina 2% pomada	PMUPC	-	15	1 (1)	1 (+4)
Placebo pomada	DPT02	-	15	1 (1)	1 (+4)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538	2.5·10 ⁵ UFC/cm				

VI.1.6. Estudio EV-5

En este estudio se compararon tres formulaciones distintas de ozenoxacino al 1% (gel, pomada y crema), todas ellas preparadas con ozenoxacino micronizado (lote T05) y, de nuevo, una formulación crema, preparada con producto sin micronizar (lote GP003-RD102). Las formulaciones crema poseían los mismos excipientes que la anteriormente testada TCT02. Se testaron, también, dos formulaciones con mupirocina al 2%, una pomada y una crema, y al grupo control negativo se le aplicó una pomada placebo.

Antibiótico y tipo de formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 1% gel	GLT08	micronizado	13	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT04	micronizado	12	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 1% crema	TCT03	micronizado	13	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 1% crema	TCT04	no micronizado	13	1 (1)	1 (+4)
Mupirocina 2% pomada	PMUPD	-	13	1 (1)	1 (+4)
Mupirocina 2% crema	CMUPA	-	13	1 (1)	1 (+4)
Placebo pomada	DPT03	-	13	1 (1)	1 (+4)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538		2.5·10 ⁵ UFC/cm			

A los animales, tras la infección, se les aplicó una sola dosis de tratamiento, igual que en el estudio anterior, a las 16 horas fueron sacrificados, y a continuación, las muestras de piel procesadas.

VI.1.7. Estudio EV-6

En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana *in vivo* de pomada con distintas concentraciones de ozenoxacino (0,25%, 0,5%, 1% and 2%), con el objetivo de determinar si existía relación dosis-efecto del producto en el modelo de infección dérmica en ratón, tras una administración única. El producto utilizado, de aquí en adelante, fue siempre ozenoxacino micronizado.

Antibiótico y tipo de formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 0,25% pomada	PDT05	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 0,5% pomada	PDT06	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT07	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 2% pomada	PDT08	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Mupirocina 2% pomada	PMUPE	-	15	1 (1)	1 (+4)
Placebo pomada	DPT04	-	15	1 (1)	1 (+4)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538		2·10 ⁵ UFC/cm			

VI.1.8. Estudio EV-7

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia *in vivo* de una formulación pomada de ozenoxacino al 1%, como la del estudio anterior, después de un tratamiento de 5 días, con aplicaciones tres veces al día, en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en ratón. Como comparador positivo se utilizó un grupo de animales tratados con pomada de mupirocina al 2%, y como control negativo, un grupo tratado con pomada placebo.

Antibiótico y tipo formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número (detalle tratamientos +h)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT09	micronizado	15	5 (3)	12 (+4, +6, c8h)
Mupirocina 2% pomada	PMUPF	-	15	5 (3)	12 (+4, +6, c8h)
Placebo pomada	DPT05	-	15	5 (3)	12 (+4, +6, c8h)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538		2 · 10 ⁵ UFC/cm			

VI.1.9. Estudio EV-8

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia *in vivo*, de una formulación crema de ozenoxacino al 1%, después de un tratamiento de 5 días, con aplicaciones tres veces al día, en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en ratón. Como control positivo se utilizó un grupo de animales tratados con pomada de mupirocina al 2%, y como control negativo, un grupo tratado con placebo crema.

Antibiótico y tipo de formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 1% crema	TCT05	micronizado	5 (3)	12 (+4, +6, c8h)
Mupirocina 2% pomada	PMUPG	-	5 (3)	12 (+4, +6, c8h)
Placebo crema	TPT01	-	5 (3)	12 (+4, +6, c8h)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538		2 · 10 ⁹ UFC/cm		

VI.1.10. Estudio EV-9

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia *in vivo* de dos formulaciones de ozenoxacino al 1%, una crema y una pomada, en el modelo de infección dérmica por *Staphylococcus aureus* en ratón. Se utilizaron como comparativos mupirocina y retapamulina pomadas al 2% y 1%, respectivamente, y como control negativo, un grupo tratado con placebo crema, equivalente a la formulación crema de ozenoxacino. Todos los tratamientos se administraron una sola vez. Retapamulina es el último antibiótico tópico lanzado al mercado para su uso en infecciones no complicadas de piel y de estructuras relacionadas (Cada, 2007, Parish, 2008, Rittenhouse, 2006a, Shawar, 2009, Yang, 2008), por lo que se ha considerado interesante comparar su eficacia *in vivo*, frente a ozenoxacino. Las formulaciones crema y pomada de ozenoxacino al 1% son como las utilizadas en los experimentos anteriores.

Antibiótico y tipo formulación	Lote formulación	API micronizado o sin micronizar	Núm animales	Días de tratamiento (veces al día)	Número tratamientos (detalle frecuencia tratamientos)
Ozenoxacino 1% crema	TCT06	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Ozenoxacino 1% pomada	PDT10	micronizado	15	1 (1)	1 (+4)
Mupirocina 2% pomada	PMUPH	-	15	1 (1)	1 (+4)
Retapamulina 1% pomada	PRETA	-	15	1 (1)	1 (+4)
Placebo crema	TPT02	-	15	1 (1)	1 (+4)
Inóculo <i>S. aureus</i> ATCC 6538		1 · 10 ⁵ UFC/cm ²			

APARTADO VI.2. RESULTADOS

VI.2. RESULTADOS

Los resultados de eficacia de los distintos estudios se muestran en las tablas y figuras siguientes, con los recuentos bacterianos obtenidos en la zona de la lesión extirpada de cada animal. Los valores se expresan como el logaritmo en base 10 de la media aritmética de las unidades formadoras de colonias por gramo de piel. El inóculo infectante fue, tal y como se ha reportado en el apartado VI.1 de materiales y métodos, de alrededor de $2 \cdot 10^5$ UFC/cm²; ésta es la concentración de la carga bacteriana del hilo que se inserta bajo la piel, en una longitud de aproximadamente un centímetro.

En las figuras se representan los recuentos individuales, y en algún caso se añaden figuras con las medias y con la desviación estándar, que reflejan los resultados y las diferencias o similitudes entre grupos de tratamiento.

Se presentan en tablas, también, el número de animales por grupo de tratamiento en los que el recuento de viables fue inferior al límite de detección (aproximadamente 10^2 UFC/mL) para identificar aquellos grupos en los que el tratamiento había sido más efectivo, independientemente de la media del recuento de viables.

Se han evaluado distintos signos clínicos de los animales, desde el peso a la observación de la zona de la lesión y el crecimiento del pelaje. En todos los casos, no han existido signos clínicos destacables ni diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de cada estudio. Los resultados detallados al respecto no se recogen en este documento.

También para cada grupo de animales, se ha valorado si existían diferencias en los resultados entre los animales que habían perdido o mantenido el hilo de sutura bajo la piel y los que lo habían mantenido, hasta la toma de muestras. Resultados no mostrados nos indican que no se han detectado diferencias entre ellos, a pesar de que un pequeño porcentaje de los animales no habían mantenido el hilo al final del mismo.

VI.2.1 Resultados Estudio EV-1

En este estudio se evaluó la eficacia de un gel de ozenoxacino al 1%, en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en ratón, comparado a pomada de mupirocina al 2%, tras un tratamiento de 3 días. El patrón de administración fue para un grupo de ozenoxacino y el grupo de mupirocina de tres veces al día, y para un segundo grupo de ozenoxacino de una administración diaria.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas (Chi-square of Pearson test, $p < 0,05$) en ninguno de los signos clínicos evaluados entre los diferentes grupos, ni días de tratamiento.

Los valores globales (media, error estándar de la media –SEM- y desviación estándar –DS-) correspondientes al recuento microbiológico de las muestras de piel para cada grupo en agar CLED con un 2% de carbón activo, se detallan en la tabla siguiente:

Tabla VI.12		Recuento microbiológico de las muestras de piel / Estudio EV-1		
Tratamiento (lote)	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)		
		Agar CLED agar + 2% carbon activo		
		Media	SEM	DS
Control placebo gel (GDP01)	3 veces al día/ 3 días	7,17	0,061	0,181
Mupirocina pomada 2% (PMUPA)		3,01	0,392	1,241
Ozenoxacino gel 1% (GTP01)		4,96	0,431	1,372
Ozenoxacino gel 1% (GTP01)	Una vez al día/ 3 días	4,42	0,653	1,823

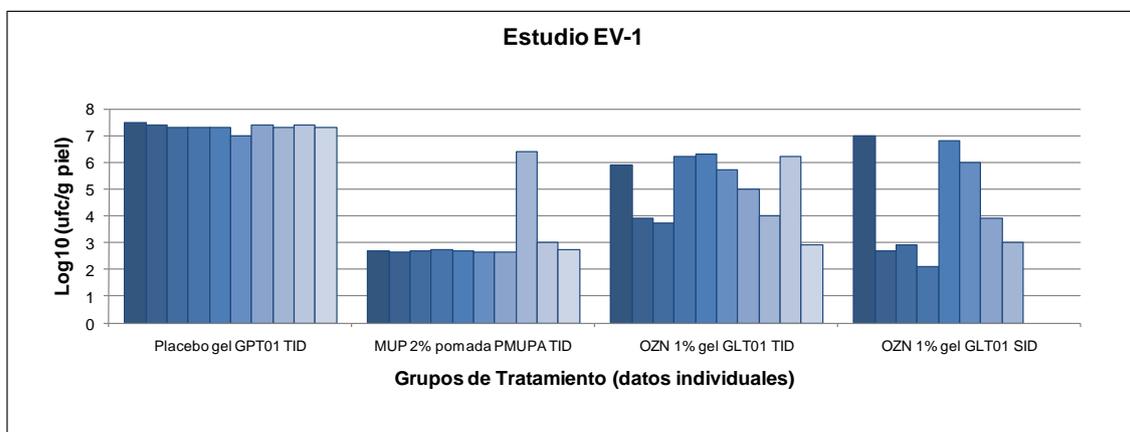
Los valores de recuento de *S. aureus* en la zona de la lesión, obtenidos, en ambos tipos de agar, para todos los grupos de tratamiento han sido diferentes, con significación estadística, de los del grupo control a los que se les aplicó placebo (Tukey's HSD test, $p < 0,05$), demostrando la eficacia de los tratamientos antibióticos sobre la infección. Se ha reproducido la infección en

los animales, y, todos los grupos tratados con formulaciones con antibiótico han visto marcadamente reducida la carga bacteriana en la zona de la infección.

No se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con patrones de administración de gel al 1% de ozenoxacino (tres veces al día vs una vez al día). No se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado tres veces al día con pomada de mupirocina al 2% y los grupos tratados una vez al día y tres veces al día, con gel de ozenoxacino al 1% (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

En la siguiente figura se observan los resultados individuales del recuento de bacterias (UFC/g de piel) que se han obtenido para los distintos grupos de tratamiento, en la que destaca la homogeneidad de los resultados tanto para el grupo control como para el tratado con mupirocina, mientras que menos para los grupos tratados con ozenoxacino. Los valores de DS de la tabla para mupirocina (1,241) son debidos a una única muestra que, tal y como se observa en la figura, se separa del resto. Sin ella, la DS sería de 0,110, mientras que para los grupos tratados con ozenoxacino, los valores altos de DS (0,1372 y 1,823) reflejan el comportamiento del producto en este ensayo.

Figura VI.1. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-1



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se detectó crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente:

Tabla VI.13		Estudio EV-1	
Tratamiento	Patrón de administración	Número de animales en los que no se detecta crecimiento de colonias de <i>S. aureus</i> en las placas / Número total de animales por grupo	
		Agar CLED	Agar CLED + 2% carbon activo
Control placebo gel GDP01	3 veces al día/ 3 días	0/10	0/10
Mupirocina pomada 2% PMUPA		9/10	8/10
Ozenoxacino gel 1% GTP01		3/10	0/10
Ozenoxacino gel 1% GTP01	Una vez al día/ 3 días	3/8	1/8

Entre los animales del grupo tratado con mupirocina al 2% se ha detectado menor presencia de *S. aureus* en la zona de la lesión, hasta el punto de que en las muestras de piel de 8 de los 10 animales no ha habido crecimiento bacteriano, mientras que sí lo ha habido en los tratados con ozenoxacino al 1%.

En resumen, a pesar de que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con ozenoxacino y el grupo tratado con mupirocina, se observan menores valores de recuperado con mupirocina, y por tanto mayor actividad, en comparación con ozenoxacino. Se observa que se diferencia claramente el grupo tratado con mupirocina al 2% (menores recuentos, mayor número de animales sin crecimiento de *S. aureus* en la lesión, y, sobretudo, mayor homogeneidad de resultados entre animales), y los grupos tratados con gel al 1% ozenoxacino (mucha variabilidad en los recuentos, y pocos animales con muestras de piel con recuento de viables por debajo del límite de detección). Mupirocina presenta mayor

homogeneidad de resultados y menores valores de recuento de bacterias que los grupos tratados con ozenoxacino, en este ensayo.

VI.2.2 Resultados Estudio EV-2

En este estudio se evaluó la eficacia de cuatro geles de ozenoxacino al 1%, con distinta composición de excipientes y a dos pH: 6,8 o 10, vs un gel placebo a pH10. El objetivo de este ensayo era obtener una formulación cuyos resultados de eficacia fueran superiores en actividad y homogeneidad a los del estudio anterior. Todos los grupos de animales fueron tratados tres veces al día durante 4 días, y no se incluyó mupirocina en este ensayo. Este ensayo se realizó en ratas para poder disponer de suficiente muestra de plasma para poder valorar la presencia del producto en sangre y correlacionar con las características de las distintas formulaciones.

No se han detectado anomalías, en este estudio en rata, en ninguno de los signos clínicos evaluados durante el mismo, como crecimiento del pelo, lesiones, inflamación o enrojecimiento de la piel en la zona de la infección. No se han observado diferencias estadísticamente significativas (Chi-square of Pearson, $p < 0,05$) para los parámetros evaluados entre los distintos grupos, ni con las formulaciones gel a pH 6.8, ni con las a pH 10.

En la tabla siguiente se presentan los valores correspondientes al recuento microbiológico de las muestras de piel para cada grupo de tratamiento y tipo de medio de cultivo.

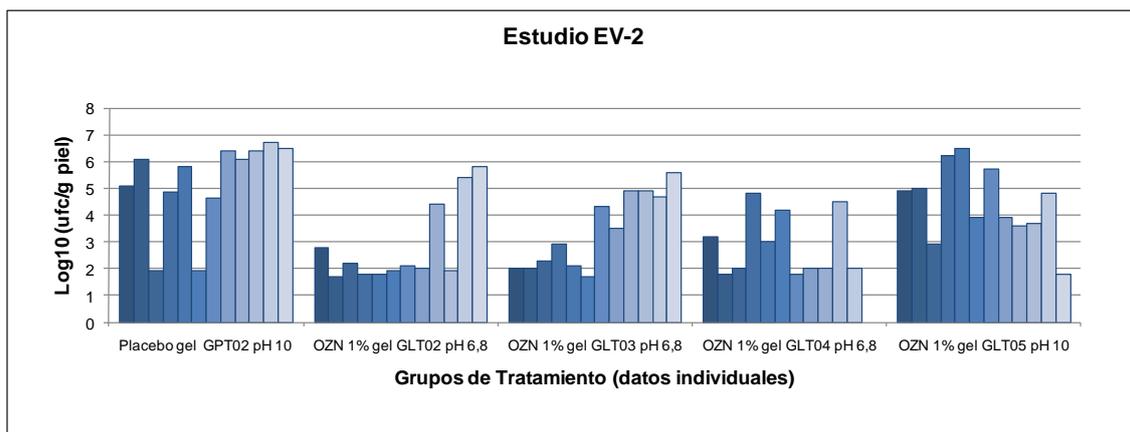
Tabla VI.14				
Recuento microbiológico de las muestras de piel / Estudio EV-2				
Tratamiento	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)		
		Agar CLED + 50mM MgCl ₂		
		Media	SEM	SD
Control gel placebo GPT02 pH10	3 veces al día / 4 días	5,26	0,485	1,679
Ozenoxacino 1% gel GLT02 pH6.8		2,82	0,432	1,497
Ozenoxacino 1% gel GLT03 pH6.8		3,39	0,406	1,408
Ozenoxacino 1% gel GLT04 pH6.8		2,77	0,351	1,166
Ozenoxacino 1% gel GLT05 pH10		4,40	0,396	1,373

Los valores obtenidos en agar CLED para los tratamientos con los lotes GLT02, GLT03 y GLT04 de geles de ozenoxacino al 1% han sido significativamente distintos de los del grupo control (Tukey's HSD test, $p < 0,01$). En agar CLED + 50mM MgCl₂, los grupos tratados con los lotes GLT02 y GLT04 han mostrado diferencias con los del grupo control (Test de Tukey HSD con un nivel de significación de 0,01. El grupo tratado con el lote GLT03 ha presentado diferencias del grupo control con un nivel de significación de 0,05. No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el lote de ozenoxacino gel a pH 10, lote GLT05, y el grupo control, placebo, en ninguno de los medios de cultivo. Tampoco se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro formulaciones de ozenoxacino al 1%.

Respecto a la variabilidad de los resultados, dentro de cada grupo, se observa, en la tabla VI.19 y en la figura VI.2, que no ha mejorado respecto a los del estudio anterior tabla VI.17. En el caso del grupo tratado con placebo, en este modelo en rata, presenta mucha mayor variabilidad de respuesta que en el estudio anterior, en ratón.

En la siguiente figura se observan los resultados individuales del recuento de bacterias (UFC/g de piel) obtenidos en los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.2. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-2



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente:

Tabla VI.15		Estudio EV-2	
Tratamiento	Patrón de administración	Número de animales en los que no se detecta crecimiento de colonias de <i>S. aureus</i> en las placas / Número total de animales por grupo	
		Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂
Control gel placebo GPT02 pH10	3 veces al día / 4 días	1/12	2/12
Ozenoxacino 1% gel GLT02 pH6.8		9/12	7/12
Ozenoxacino 1% gel GLT03 pH6.8		6/12	4/12
Ozenoxacino 1% gel GLT04 pH6.8		7/12	4/12
Ozenoxacino 1% gel GLT05 pH10		2/12	1/12

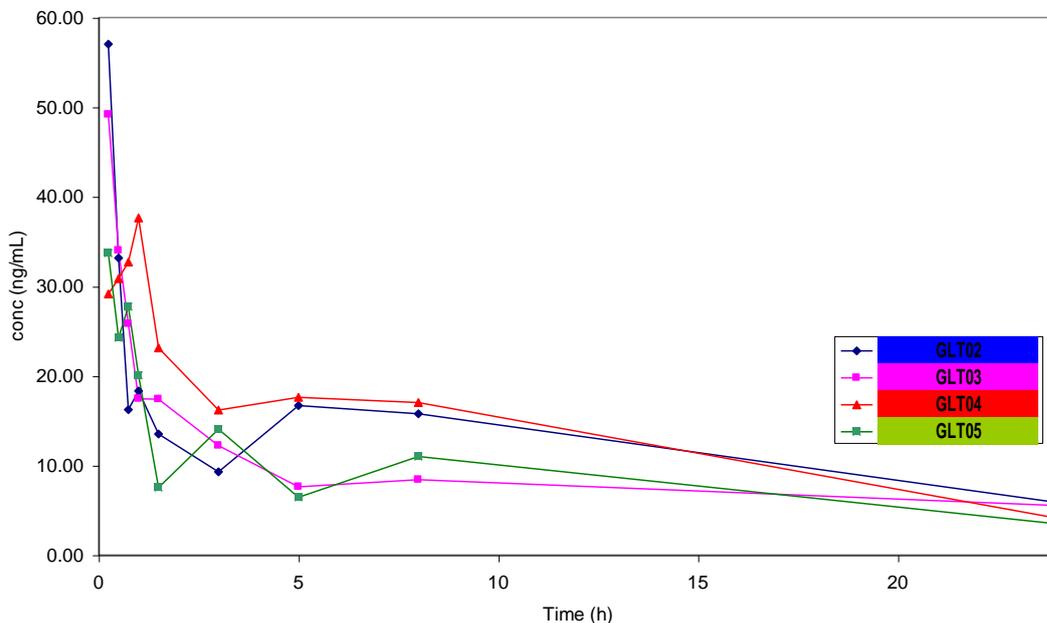
Se observa en las dos tablas anteriores que ha habido una relevante disminución del recuento de bacterias en las muestras de piel, para aquellos grupos tratados con gel de ozenoxacino a pH 6,8 (lote GLT02), que concuerda con el hecho que se hayan detectado 7 animales con recuento por debajo del límite de detección de colonias, en un mismo grupo. De manera global, se observa que 16 de los 60 animales tratados, presentan recuentos por debajo del límite de detección para *S. aureus*, en la zona de la lesión; entre ellos, hay dos de los animales del grupo control, por lo que parece que establecer la infección en el modelo de rata ha sido más difícil que en el modelo de ratón, a raíz de los resultados globales que se presentan en esta sección.

A pesar de la similitud, en el análisis estadístico, entre los resultados de los cuatro grupos tratados con ozenoxacino gel al 1%, el grupo que ha presentado mayor homogeneidad de los resultados individuales ha sido la formulación GLT02, con unos buenos resultados de eliminación de bacterias en el recuento en piel (en 7 de 12 animales por debajo del límite inferior), tal y como se había obtenido con mupirocina en el ensayo precedente, y que era el objetivo al modificar las formulaciones de ozenoxacino.

La tabla VI.20 y la figura VI.3 muestran los parámetros cinéticos obtenidos de un análisis compartimental y las curvas con los resultados de absorción de ozenoxacino.

Tabla VI.16		Farmacocinética en plasma, después de la administración repetida de 4 geles de ozenoxacino al 1%, en un modelo de eficacia en infección dérmica por <i>S. aureus</i> en rata (EV-2)					
No de animales	Patrón de administración	Dosis	Parámetros (unidades)	Resultados			
				GLT02	GLT03	GLT04	GLT05
60 (5 grupos de 12 animales)	0,1 mL 3 veces/día 3 días	2,6 mg/kg 0,26mg/cm ²	T _{max} (h)	0,3	1	0,3	0,3
			C _{max} (ng/mL)	33,7	37,6	49,2	57
			AUC _{0-t} (h·ng/mL)	209,4	326,9	215,6	301,2
			AUC _{0-inf} (h·ng/mL)	285,3	377,3	406,8	402,9

Figura VI.3



Los resultados del análisis de la penetración dérmica han revelado que no había diferencias significativas entre los niveles plasmáticos obtenidos tras la administración de las cuatro formulaciones en gel de ozenoxacino al 1%, con C_{max} de entre 33,7 y 57 ng/mL. El producto ha sido rápidamente absorbido (T_{max} entre los 15 y 60 minutos) y se ha observado una liberación lenta y sostenida de la piel a la sangre hasta 24 horas después de la aplicación de las formulaciones, como se presenta en la figura VI.3.

Por actividad, las formulaciones se ordenaron, de mayor a menor: GLT02, GLT04, GLT03 y GLT05, mientras que por niveles plasmáticos, las formulaciones con mayor absorción fueron la GLT05 y la GLT03, seguidas de la GLT04 y la GLT02. No se ha detectado correlación entre los resultados de actividad y las concentraciones plasmáticas observadas (se completa en capítulo VII), aunque la formulación que mejor, y más homogénea, actividad presentó había sido la que menos se había absorbido (GLT02), y las que peor actividad demostraron (GLT05 y GLT03) fueron las que más se habían absorbido. No hay suficientes datos, ni lo bastante robustos, como para establecer esta relación inversamente proporcional entre los geles de ozenoxacino, ni atribuirlos a los distintos excipientes cuyo objetivo era actuar como favorecedores de la absorción.

Los resultados de este estudio sí permiten seleccionar a la formulación GLT02, como el gel que ha presentado mejores resultados de eficacia y homogeneidad.

VI.2.3 Resultados Estudio EV-3

En este ensayo se estudió la actividad del gel con el que se habían obtenido mejores resultados en el estudio anterior, junto a una formulación pomada, dos cremas y otro gel, todos con ozenoxacino al 1%. Los tratamientos se administraron una vez al día durante 3 días, y se incluyó un grupo tratado con mupirocina pomada al 2%. El objetivo era valorar si con otro tipo de formulación era posible mejorar la eficacia *in vivo* de ozenoxacino, detectada con los geles en el estudio anterior.

Durante el estudio, no se han observado lesiones significativas en la piel de los animales, ni enrojecimiento del área tratada ni crecimiento anormal del pelaje con ninguna de las formulaciones. Sólo un animal del grupo control, tratado con pomada placebo, había presentado inflamación en la zona de la infección. No se han observado diferencias

estadísticamente significativas (Pearson's χ^2 test, $p < 0.05$) para ninguno de los signos clínicos observados entre los diferentes grupos.

Los valores globales correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento y con los diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla siguiente.

Tratamiento	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)						
		Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂		Agar CLED + 2% carbón activo			
		Media	Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
Control pomada placebo (DPT01)	1 vez al día / 3 días	6,46	6,42	0,186	0,719	6,44	0,201	0,698
Mupirocina 2% pomada (PMUPB)		3,60	-	-	-	3,95	0,351	1,358
Ozenoxacino 1% pomada (PDT01)		3,06	3,00	0,251	0,973	-	-	-
Ozenoxacino 1% gel (GLT06)		3,48	3,54	0,227	0,880	-	-	-
Ozenoxacino 1% gel (GLT07)		3,19	3,34	0,244	0,945	-	-	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT01)		3,78	3,16	0,285	1,105	-	-	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT02)		2,93	3,37	0,331	1,280	-	-	-

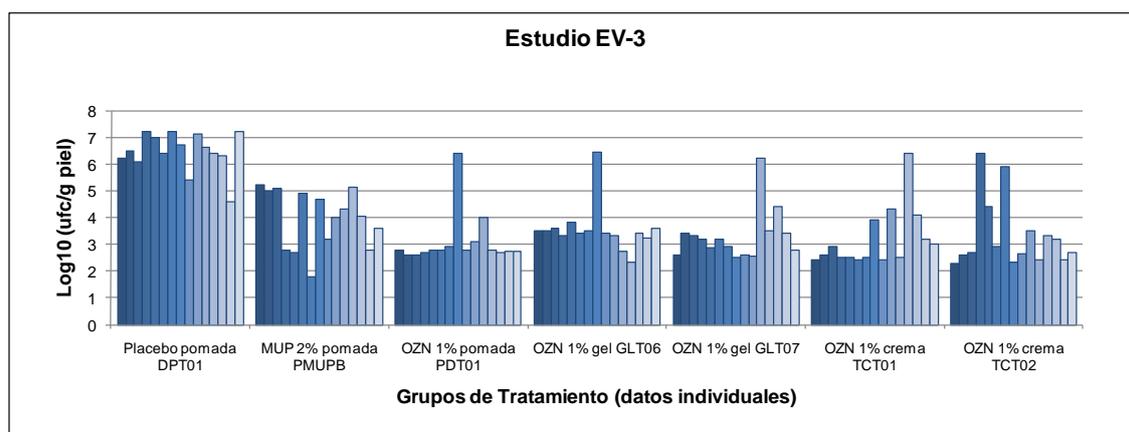
Los valores obtenidos para los grupos tratados con los antibióticos ozenoxacino y mupirocina han sido diferentes, con significación estadística, de los del grupo placebo, que había presentado recuentos superiores (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

No se han encontrado diferencias entre las distintas formulaciones pomada, geles y cremas con ozenoxacino al 1%, aunque de mayor a menor actividad se ordenarían las formulaciones como pomada, cremas y geles. Tampoco se han detectado diferencias entre los distintos tipos de formulaciones con ozenoxacino al 1% y la pomada con mupirocina al 2%.

La homogeneidad de respuesta intragrupo ha mejorado un poco, respecto a los estudios anteriores, sobretodo con la pomada y los geles, y algo menos con las cremas. En el caso de la pomada y los geles, un solo animal posee un recuento mayor, sin el que, la variabilidad de los recuentos baja hasta niveles de DS de entre 0,3-0,5. Los resultados para el grupo tratado con placebo son equivalentes a los grupos tratados más homogéneos, mejores que en EV-2 y peores que en EV-1. El grupo tratado con mupirocina presenta una no muy buena homogeneidad de respuesta, aunque mejor que en EV-2, en rata.

En la siguiente figura se observan los resultados individuales del recuento de bacterias (UFC/g de piel) que se han obtenido en los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.4. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-3



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente.

Tabla VI.18		Estudio EV-3		
Tratamiento	Patrón de administración	Número de animales en los que no se detecta crecimiento de colonias de <i>S. aureus</i> en las placas / Número total de animales por grupo		
		Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
Control pomada placebo (DPT01)	1 vez al día / 3 días	0/15	0/15	0/15
Mupirocina 2% pomada (PMUPB)		5/15	-	4/15
Ozenoxacino 1% pomada (PDT01)		4/15	8/15	-
Ozenoxacino 1% gel (GLT06)		1/15	0/15	-
Ozenoxacino 1% gel (GLT07)		10/15	4/15	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT01)		6/15	7/15	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT02)		11/15	7/15	-

Se observa que, en las muestras de piel de todos los animales tratados con placebo se han recuperado bacterias, al igual que en casi todos los animales tratados con el gel de ozenoxacino lote GLT06, a diferencia de lo que había ocurrido en el ensayo anterior con esta formulación en el modelo en rata. Por otro lado, los grupos tratados con la pomada y las cremas de ozenoxacino, siempre al 1%, han presentado los mejores resultados con erradicación de *S. aureus* en las muestras de piel procedentes del 50% de los animales. El grupo tratado con pomada de mupirocina al 2% y el gel de ozenoxacino al 1%, lote GLT07, han presentado 4 animales, de 15, en los que no se han recuperado colonias de *S. aureus* de la zona de su lesión.

Las mejores formulaciones parecen, a raíz de estos resultados, de eficacia, las dos cremas (lotes TCT01 y TCT02) y la pomada (PDT01) de ozenoxacino al 1%.

Los resultados en este estudio han demostrado una importante reducción de la infección bacteriana en todos los grupos tratados, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los recuentos de colonias para los grupos tratados han sido, en todos los casos, muy bajos, por lo que el número de animales en los que no se ha detectado crecimiento tampoco ha repercutido en la aparición de diferencias entre los grupos. La homogeneidad de los valores se ha visto aumentada, en todas las formulaciones con ozenoxacino, especialmente en la formulación pomada lote PDT01, y en los dos geles GLT06 y GLT07.

La comparación entre los geles GLT06 y GLT07 no ha mostrado diferencias; en el primero de los geles se había solubilizado el principio activo en el gel a pH 6,8, con la adición de hidróxido sódico, y en el GLT07, no. La solubilización del producto, en el lote GLT06, no ha tenido una influencia positiva en la actividad del producto, en este modelo de ratón. La homogeneidad de los resultados entre grupos, ha mejorado respecto a estudios anteriores, pero con las dos formulaciones tipo gel, por lo que se puede atribuir a variabilidad experimental.

En resumen, en el estudio EV-3, se incluyeron en el proceso de selección nuevas formulaciones de ozenoxacino, un gel, una pomada y dos cremas, y tras el estudio de su actividad *in vivo*, los resultados enfocaron a la selección de la pomada y las dos cremas, como mejores formulaciones por eficacia y homogeneidad de respuesta.

VI.2.4 Resultados Estudio EV-4

En este estudio se comparó la eficacia en el modelo de infección dérmica en ratón de dos pomadas de ozenoxacino al 1% fabricadas con dos lotes distintos de materia prima, uno micronizado y el otro no, por tanto, con distintas características físico-químicas, que podrían influir en la absorción y/o eficacia *in vivo* del producto. Éste fue el primer estudio en el que tanto los tratamientos como el placebo se administraron una sola vez.

No se han observado lesiones significativas en la piel de los animales, durante el estudio, ni enrojecimiento del área tratada. El crecimiento del pelaje ha sido normal en todos los grupos, y no se han observado diferencias estadísticamente significativas (Pearson's χ^2 test, $p < 0,05$) para ninguno de los signos clínicos observados entre los diferentes grupos. Ni la formulación preparada con producto sin micronizar (cristales de mayor tamaño), ni la con ozenoxacino

micronizado (menor tamaño de partícula, posible mayor reactividad o absorción) han ocasionado, una vez incorporados en la formulación pomada (en suspensión) ningún efecto adverso destacable en la piel de los animales.

Las medias correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento, con los diferentes medios de cultivo, se muestran en la tabla siguiente.

Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)						
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂			Agar CLED + 2% carbón activo		
			Media	Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
Control placebo pomada (DPT02)	-	Administración única	7,14	7,04	0,138	0,533	7,17	0,145	0,542
Mupirocina 2% pomada (PMUPC)	-		4,59	-	-	-	4,82	0,224	0,867
Ozenoxacino 1% pomada (Lote PDT02)	micronizado		2,82	2,83	0,218	0,843	-	-	-
Ozenoxacino 1% pomada (Lote PDT03)	sin micronizar		3,55	3,68	0,318	1,232	-	-	-

Se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de animales tratados con antibióticos y el grupo control, con placebo, en los tres tipos de agar utilizados para el recuento (Tukey's HSD test, $p < 0,05$). Es decir, que el recuento microbiológico en las zonas de la lesión ha sido significativamente menor para los animales tratados con ozenoxacino al 1% (10^2 - 10^3 UFC/g piel) y los tratados con mupirocina al 2% (10^4 UFC/g piel) que para los tratados con placebo (10^7 UFC/g piel).

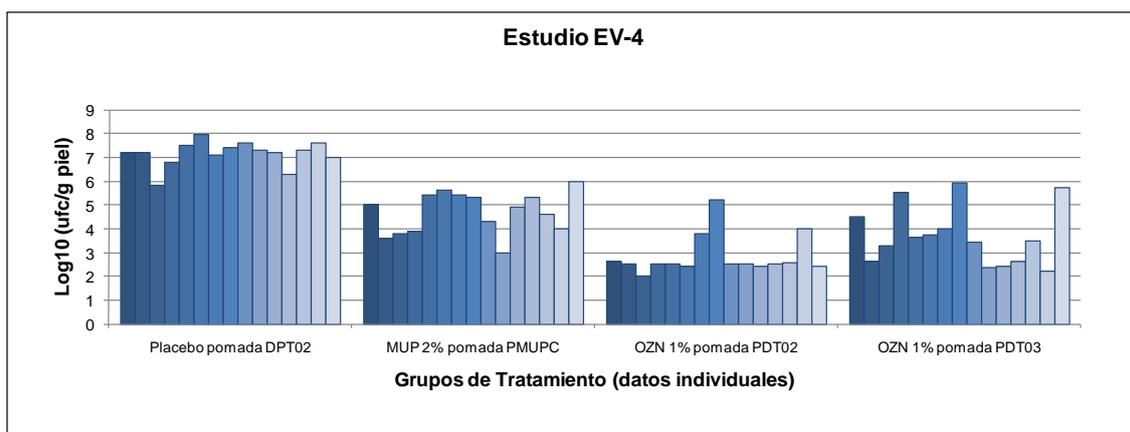
Al comparar ozenoxacino y mupirocina, se observa que, en este estudio, con las dos formulaciones pomada con ozenoxacino al 1% se han obtenido mejores resultados, también con significación estadística, que con la de mupirocina al 2% (Tukey's HSD test, $p < 0,05$). Se comparan los resultados en agar CLED.

Al comparar los resultados obtenidos con la formulación pomada de ozenoxacino al 1%, preparada con ozenoxacino micronizado vs la preparada con ozenoxacino sin micronizar, en agar CLED + 50 mM MgCl₂, se ha observado que la fabricada con producto micronizado (lote pomada PDT02) obtuvo mejores resultados que la que contenía ozenoxacino sin micronizar (lote pomada PDT03), con diferencias estadísticamente significativas (Tukey's HSD test, $p < 0,05$).

La homogeneidad de resultados intragrupos ha sido buena en el grupo placebo, tratado con pomada de mupirocina y pomada de ozenoxacino, con producto micronizado (DS entre 0,53 y 0,87), y bastante peor para el grupo tratado con pomada con ozenoxacino sin micronizar (DS igual a 1,23); como se observa también en la figura VI.5.

En la siguiente figura se observan los resultados individuales del recuento de bacterias (UFC/g de piel) que se han obtenido para los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.5. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-4



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente:

Tabla VI.20		Estudio EV-4			
Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Número de animales sin crecimiento de <i>S. aureus</i> en las placas / Número de animales por grupo		
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
Control placebo pomada (DPT02)	-	Administración única	0/15	0/15	0/15
Mupirocina 2% pomada (PMUPC)			0/15	-	0/15
Ozenoxacino 1% pomada (PDT02)			11/15	6/15	-
Ozenoxacino 1% pomada (PDT03)			1/15	0/15	-

Se ha observado crecimiento de colonias de *Staphylococcus* en todas las muestras de los animales del grupo control, del grupo tratado con mupirocina, y del grupo tratado con pomada de ozenoxacino sin micronizar. En cambio, en el grupo tratado con pomada de ozenoxacino micronizado se han identificado 6, de 15 animales, en los que no se ha detectado presencia de *S. aureus* en la zona de la lesión, tras el tratamiento.

De los resultados de este estudio destacamos que la eficacia de mupirocina es moderada y menor que la observada anteriormente, con administraciones repetidas. El recuento de viables en los animales tratados con placebo es mayor que en los dos estudios precedentes, aunque es similar al primer estudio con 10⁷ UFC/mL, en el que mupirocina presentaba mayor actividad (aunque la diferencia entre la magnitud de la reducción no es muy relevante, en EV-1 fue de 3,3 logs y en EV-4 de 2,5 logs). El tratamiento con pomada de mupirocina al 2% deja el recuento de *S. aureus* en la zona de la lesión de casi 10⁵ UFC/g de piel.

La mejor actividad la presenta el lote de pomada con 1% de ozenoxacino previamente micronizado (Lote PDT02), al valorar el recuento de colonias tanto en las placas con agar CLED solo, como con 50 mM MgCl₂, además de una muy buena homogeneidad en la respuesta de los animales. La formulación de ozenoxacino, preparada con producto sin micronizar (Lote PDT03) demostró una buena actividad *in vivo*, tras valorar el recuento, en estos dos tipos de placas, aunque inferior a la del producto micronizado.

VI.2.5 Resultados Estudio EV-5

La actividad *in vivo* de ozenoxacino al 1% se evaluó en tres formulaciones diferentes gel, pomada y crema (GLT08, PDT04 y TCT03) preparadas con ozenoxacino micronizado (lote producto T05) y la misma formulación crema (TCT04) preparada con ozenoxacino sin micronizar (lote producto GP003-RD102). En este ensayo, dos formulaciones de mupirocina al 2%, crema y pomada, se utilizaron como comparativos.

No se han observado lesiones significativas en la piel de los animales, durante el estudio, ni inflamación ni enrojecimiento del área tratada. El crecimiento del pelaje ha sido normal en todos los grupos. No se han observado diferencias estadísticamente significativas (Pearson's χ^2 test, $p < 0.05$) para ninguno de los signos clínicos observados entre los diferentes grupos.

Los valores globales correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento y con los diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla siguiente:

Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)						
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂			Agar CLED + 2% carbón activo		
			Media	Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
Control placebo pomada (DPT03)	-	administración única	7,34	7,31	0,106	0,384	7,35	0,124	0,401
Mupirocina 2% pomada (PMUPD)	-		6,13	-	-	-	6,21	0,183	0,658
Mupirocina 2% crema (CMUPA)	-		6,24	-	-	-	6,33	0,168	0,606
Ozenoxacino 1% gel (GLT08)	micronizado lote T05		4,22	3,95	0,276	0,994	-	-	-
Ozenoxacino 1% pomada (PDT04)			4,64	4,44	0,163	0,563	-	-	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT03)			4,19	3,77	0,148	0,511	-	-	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT04)	sin micronizar lote GP003/RD10 2		4,55	4,34	0,225	0,779	-	-	-

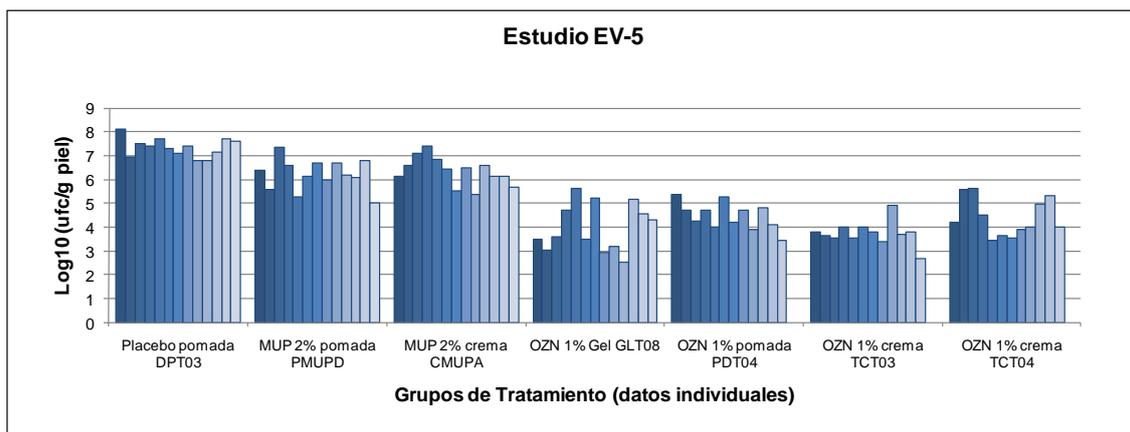
Todos los grupos tratados con antibiótico han presentado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control tratado con placebo (Tukey's HSD test, $p < 0,05$), en los tres tipos de agar utilizados para el recuento. Adicionalmente, todos los grupos tratados con ozenoxacino al 1% (gel, pomada y cremas) han mostrado diferencias estadísticamente significativas (Tukey's HSD test, $p < 0,05$), con los dos grupos tratados con pomada y crema de mupirocina al 2%, en los recuentos realizados en agar CLED. No se han detectado diferencias entre el grupo tratado con crema con ozenoxacino micronizado y el sin micronizar, aunque los resultados son ligeramente mejores en disminución del recuento y homogeneidad para el grupo tratado con producto micronizado.

De nuevo, seguramente por realizar sólo un tratamiento, los recuentos no son tan bajos como en experimentos con administraciones repetidas (reducciones hasta 10^2 aprox UFC/g piel), también las formulaciones con mupirocina presentan recuentos altos de 10^6 UFC/g piel, recordamos que en el ensayo anterior fue de casi 10^5 UFC/g piel.

Respecto a la variabilidad de los resultados se observa que la homogeneidad es buena en todos los grupos, especialmente en el placebo y en los tratados con pomada y crema de ozenoxacino micronizado. El grupo tratado con gel de ozenoxacino presenta una variabilidad muy similar a la del estudio EV-3, pero peor que las formulaciones pomada y crema de este ensayo. El tratamiento de los animales con las dos formulaciones de mupirocina ha producido una respuesta bastante homogénea, para ambas formulaciones, algo mejor que en los estudios anteriores, aunque, como ya se ha comentado, menor eficacia en la disminución del recuento.

En la siguiente figura se observan los resultados individuales del recuento de bacterias (UFC/g de piel) que se han obtenido en los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.6. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-5



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* en las muestras de piel, procedentes de la zona de la lesión, se detalla en la tabla siguiente.

Tabla VI.22		Estudio EV-5			
Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Número de animales sin crecimiento de <i>S. aureus</i> en las placas / Número de animales por grupo		
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
Control placebo pomada (DPT03)	-	administración única	0/13	0/13	0/13
Mupirocina 2% pomada (PMUPD)			0/13	-	0/13
Mupirocina 2% crema (CMUPA)			0/13	-	0/13
Ozenoxacino 1% gel (GLT08)	micronizado lote T05		1/13	1/13	-
Ozenoxacino 1% pomada (PDT04)			0/12	0/12	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT03)	sin micronizar		0/13	0/13	-
Ozenoxacino 1% crema (TCT04)			0/13	0/13	-

El número de animales con muestras de piel a partir de las cuales no se han recuperado bacterias ha sido prácticamente inexistente (2/90).

En esta ocasión, las dos formulaciones con el producto de referencia, mupirocina, han mostrado una actividad antibacteriana moderada, sin diferencias entre la crema y la pomada. Las cuatro formulaciones con ozenoxacino al 1% han presentado una buena actividad con similares niveles de recuperado de bacterias. La formulación gel ha presentado menor homogeneidad de resultados entre los distintos animales, mientras que la crema TCT03 ha sido la más activa y con mayor homogeneidad. En estas condiciones experimentales, las formulaciones con ozenoxacino al 1% fueron más activas que la de mupirocina al 2% (pomada y crema), con diferencias estadísticamente significativas, al comparar los resultados en agar CLED (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

Las tres formulaciones con producto micronizado no han presentado diferencias estadísticamente significativas entre ellas, ni tampoco las dos cremas de ozenoxacino entre sí (producto micronizado y sin micronizar). La formulación crema con ozenoxacino micronizado (TCT03) ha presentado un recuento algo menor, y por tanto, mayor actividad, que su equivalente con producto sin micronizar (TCT04).

El lote de ozenoxacino pomada al 1% (PDT04) demostró ligeramente menor actividad que la observada en el estudio previo.

Estos resultados, permiten seleccionar tanto la materia prima micronizada para su uso en las formulaciones dérmicas, como confirmar la eficacia de las formulaciones con ozenoxacino, y la mayor homogeneidad de la crema y la pomada.

VI.2.6 Resultados Estudio EV-6

En este estudio se valoró el efecto dosis respuesta de ozenoxacino con pomadas de ozenoxacino con distintas concentraciones de producto, siempre micronizado. Una formulación de pomada mupirocina al 2%, se utilizó como comparativo, y los tratamientos se aplicaron una sola vez.

No se han observado efectos locales significativos tras la aplicación de los tratamientos, al igual que en los estudios anteriores. El crecimiento del pelaje ha sido normal en todos los grupos. No se han observado diferencias estadísticamente significativas (Pearson's χ^2 test, $p < 0,05$) para ninguno de los signos clínicos observados entre los diferentes grupos.

Los valores globales correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento y con los diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla siguiente.

Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)						
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂			Agar CLED + 2% carbón activo		
			Media	Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
Control Placebo pomada (DPT04)	-	Administración única	6,63	6,19	0,148	0,573	6,58	0,124	0,479
Mupirocina 2% pomada (PMUPE)	-		4,49	-	-	-	4,57	0,192	0,745
Ozenoxacino 0,25% pomada (PDT05)	micronizado		5,31	4,98	0,231	0,895	-	-	-
Ozenoxacino 0,5% pomada (PDT06)			4,53	4,17	0,335	1,296	-	-	-
Ozenoxacino 1% pomada (PDT07)			3,48	3,49	0,237	0,918	-	-	-
Ozenoxacino 2% crema (PDT08)			3,52	3,31	0,235	0,911	-	-	-

Se aplicó el test de Kruskal-Wallis y se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Las diferencias entre los grupos se analizaron con el test de HSD de Tukey. Al utilizar este test las medias de los tratamientos se ordenaron de menor a mayor.

Todos los grupos tratados con ozenoxacino o mupirocina han presentado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con placebo (Tukey HSD $p < 0,05$). Los grupos tratados con ozenoxacino al 1% o al 2% han presentado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con mupirocina al 2% (Tukey HSD $p < 0,05$).

Ozenoxacino, a las concentraciones testadas (0,25%, 0,5%, 1% y 2%) en la formulación pomada ha demostrado una clara relación dosis-efecto, y se han detectado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control tratado con una pomada placebo. Las formulaciones de ozenoxacino al 1% y 2%, con las que se ha obtenido la mayor eficacia, han presentado también diferencias estadísticamente significativas frente a la formulación de ozenoxacino al 0,25% y frente a la pomada de mupirocina al 2% (Tukey HSD $p < 0,05$).

La homogeneidad de la respuesta intragrupo ha sido muy buena para el grupo tratado con placebo, y también para mupirocina ha sido buena y similar a los resultados de los últimos ensayos, mientras que para los grupos tratados con las pomadas de ozenoxacino ha sido moderada. En general, la variabilidad para la pomada de ozenoxacino no ha sido elevada, muy similar a la del resto de ensayos y mucho mejor que las primeras formulaciones en gel. El grupo tratado con pomada de ozenoxacino al 0,5% presenta una variabilidad mayor al resto, y no hay correlación aparente con la concentración de ozenoxacino. En la figura VI.7, con los datos individuales, se observa que la variabilidad de la respuesta en los animales en los grupos tratados con ozenoxacino, ha sido superior al placebo y a mupirocina, aunque para la pomada al 1%, la respuesta de dos animales se separa de la del resto.

En las siguientes figuras se observan los resultados individuales y por grupo del recuento de bacterias (UFC/g de piel) obtenidos en los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.7. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-6

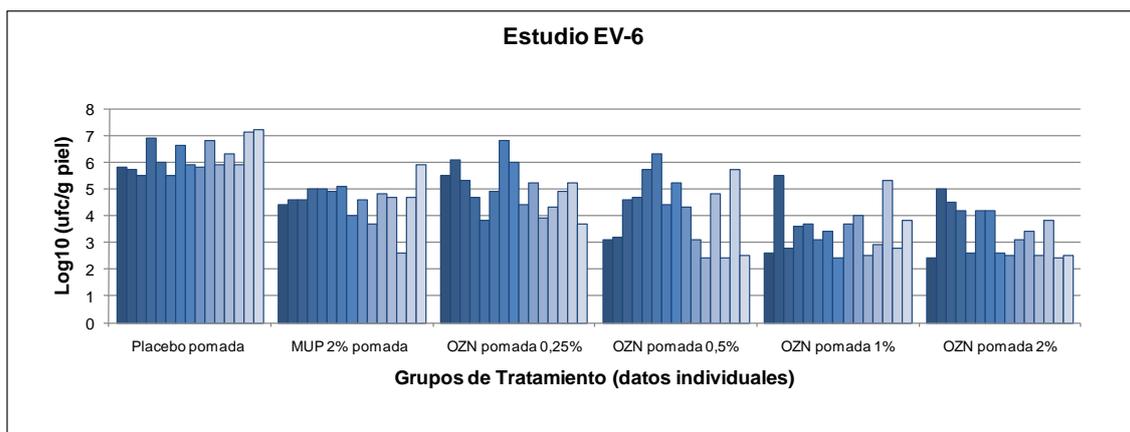
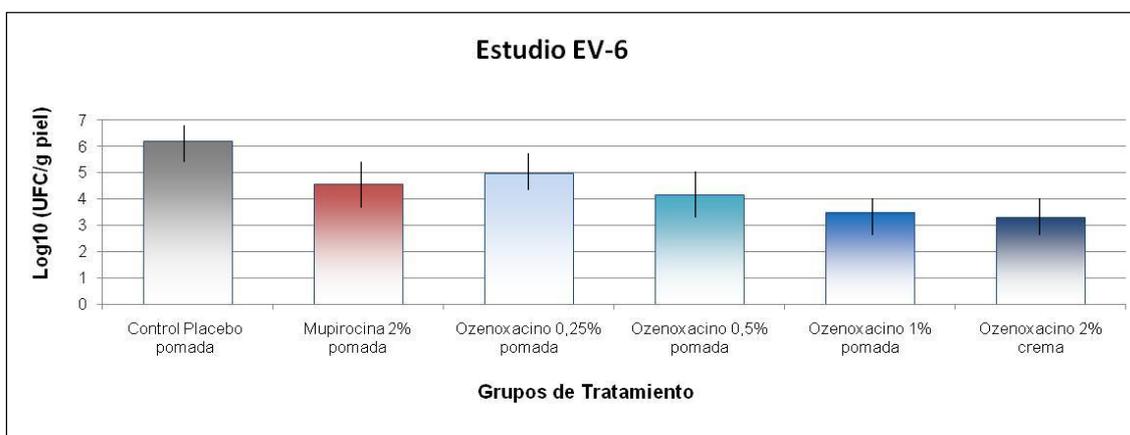


Figura VI.8. Recuento microbiológico en los distintos grupos del estudio EV-6 (Log₁₀ (UFC/g piel ± DS))



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente:

Tabla VI.24		Estudio EV-6			
Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Número de animales sin crecimiento de <i>S. aureus</i> en las placas / Número de animales por grupo		
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
Placebo pomada (DPT04)	-	Administración única	0/15	0/15	0/15
Mupirocina 2% pomada (PMUPE)			0/15	-	0/15
Ozenoxacino 0,25% pomada (PDT05)			0/15	0/15	-
Ozenoxacino 0,5% pomada (PDT06)			0/15	3/15	-
Ozenoxacino 1% pomada (PDT07)			2/15	2/15	-
Ozenoxacino 2% crema (PDT08)			6/15	6/15	-

Se ha observado que sólo en el grupo de animales tratado con un 2% de ozenoxacino, se han detectado animales con muestras de piel a partir de las cuales no se recuperaron bacterias (6/15). En los grupos tratados con mupirocina al 2% y con ozenoxacino al 0,25%, no hubo ningún animal en el que no se detectara crecimiento de *S. aureus* en sus muestras de piel, post-tratamiento. En cambio, en los grupos tratados con pomadas de ozenoxacino al 0,5 y 1% se detectaron algunos animales, aunque pocos, sin crecimiento de colonias (3 y 2 de 15, respectivamente) en las muestras de piel procedentes de la zona de la lesión.

VI.2.7 Resultados Estudio EV-7

En este estudio se valoró el efecto de una pomada de ozenoxacino al 1% en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en ratón, tras un tratamiento de 3 veces al día durante 5 días, junto al de mupirocina pomada al 2% y al de una pomada placebo.

No se han observado efectos locales graves en la piel de los animales, durante el estudio. El crecimiento del pelaje ha sido normal en todos los grupos. No se han observado diferencias estadísticamente significativas (Pearson's χ^2 test, $p < 0.05$) entre los distintos efectos clínicos detectados en los animales.

Los valores globales correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento y con los diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla siguiente.

Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)					
			Agar CLED + 50mM MgCl ₂			Agar CLED + 2% carbón activo		
			Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
Placebo pomada DPT05	-	5 días 3 veces al día	6,32	0,264	1,022	6,53	0,218	0,816
Mupirocina 2% pomada PMUPF			-	-	-	4,92	0,236	0,913
Ozenoxacino 1% pomada DPT09	micronizado		3,56	0,248	0,962	-	-	-

En las condiciones experimentales del estudio, tras 5 días de tratamiento tres veces al día, la pomada de ozenoxacino al 1% ha inducido una disminución estadísticamente significativa del crecimiento bacteriano en la zona de la infección, respecto al efecto de la formulación placebo utilizada en el grupo control (Student t-test $p < 0,01$).

El grupo tratado con mupirocina al 2% también ha presentado una disminución del recuento de bacterias en la zona de la lesión, estadísticamente significativa, respecto al grupo tratado con placebo (Student t-test $p < 0,01$).

La variabilidad de la respuesta de los animales, intragrupo, ha aumentado bastante para el grupo tratado con placebo, tras administraciones repetidas durante 5 días, es algo superior para mupirocina, y se mantiene para ozenoxacino, respecto a los estudios con una sola aplicación del tratamiento antibiótico. Las desviaciones estándar están todas alrededor de 0,9.

En las siguientes figuras se observan los resultados individuales y por grupo del recuento de bacterias obtenidos en los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.9. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-7

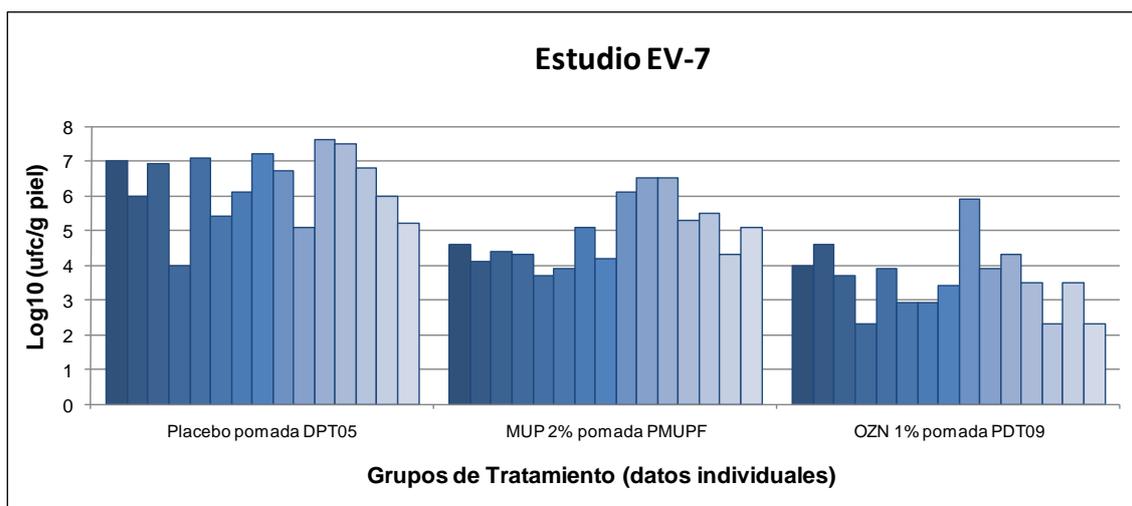
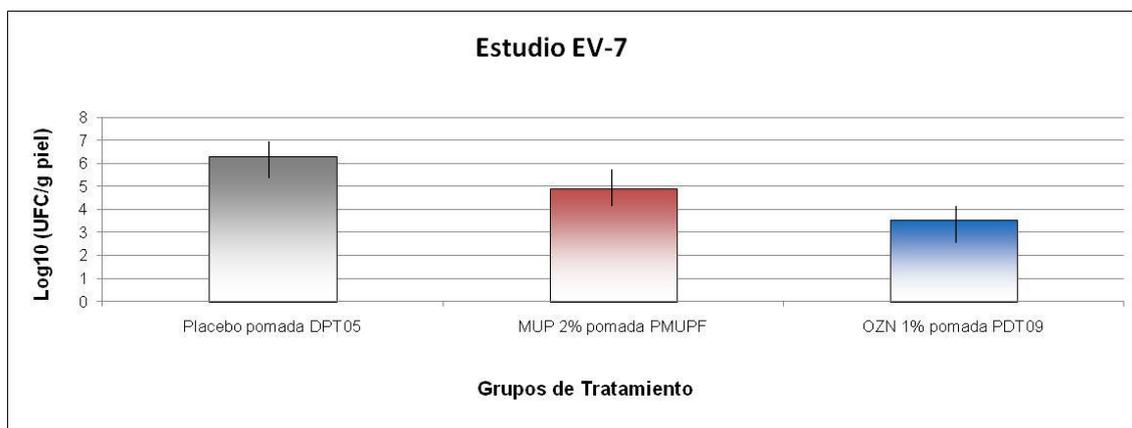


Figura VI.10. Recuento microbiológico en los distintos grupos del estudio EV-7 (Log₁₀ (UFC/g piel ± DS))



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente:

Tabla VI.26		Estudio EV-7		
Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Número de animales sin crecimiento de <i>S. aureus</i> en las placas / Número de animales por grupo	
			Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
placebo pomada DPT05	-	5 días 3 veces al día	0/15	0/15
Mupirocina 2% pomada PMUPF			-	0/15
Ozenoxacino 1% pomada DPT09			2/15	-

Se ha observado que el número de animales tratados con muestras de piel a partir de las que no se han recuperado bacterias era prácticamente inexistente: 2 animales de 15, en el caso de ozenoxacino al 1%, y ninguno en el caso de mupirocina al 2%.

VI.2.8 Resultados Estudio EV-8

En este estudio se valoró el efecto de una crema de ozenoxacino al 1% en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en ratón, tras un tratamiento de 3 veces al día durante 5 días, junto al de mupirocina pomada al 2% y al de una crema placebo.

No se han observado efectos locales adversos en la piel de los animales, durante el estudio. El crecimiento del pelaje ha sido normal en todos los grupos. No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los signos clínicos observados (Pearson's χ^2 test, $p < 0,05$).

Los valores globales correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento y con los diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla siguiente.

Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)					
			Agar CLED + 50mM MgCl ₂			Agar CLED + 2% carbón activo		
			Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
Placebo crema TPT01	-	5 días 3 veces al día	6,67	0,171	0,640	6,80	0,145	0,544
Mupirocina 2% pomada PMUPG			-	-	-	5,01	0,218	0,846
Ozenoxacino 1% crema TCT05	micronizado		3,10	0,154	0,596	-	-	-

En las condiciones experimentales del estudio, tras 5 días de tratamiento, tres veces al día, la crema de ozenoxacino al 1% ha inducido una disminución estadísticamente significativa del crecimiento bacteriano en la zona de la infección, respecto al grupo tratado con placebo (Student t-test $p < 0,01$), mayor que la que se obtenía en los tratamientos únicos.

El grupo tratado con mupirocina al 2% también ha presentado una disminución del recuento de bacterias en la zona de la lesión, estadísticamente significativa, respecto al grupo tratado con placebo (Student t-test $p < 0,01$).

La respuesta al tratamiento de los distintos animales de cada uno de los grupos ha sido muy homogénea para las cremas de ozenoxacino y placebo, y aunque buena, algo inferior para la pomada de mupirocina, que se mantiene en el rango de los últimos ensayos. En la figura VI.11 se observa los excelentes resultados obtenidos con ozenoxacino crema al 1%.

En las siguientes figuras se observan, además de los resultados individuales, las medias del recuento de *S. aureus* en las zonas de la lesión (UFC/g de piel) obtenidos tras los distintos tratamientos.

Figura VI.11. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-8

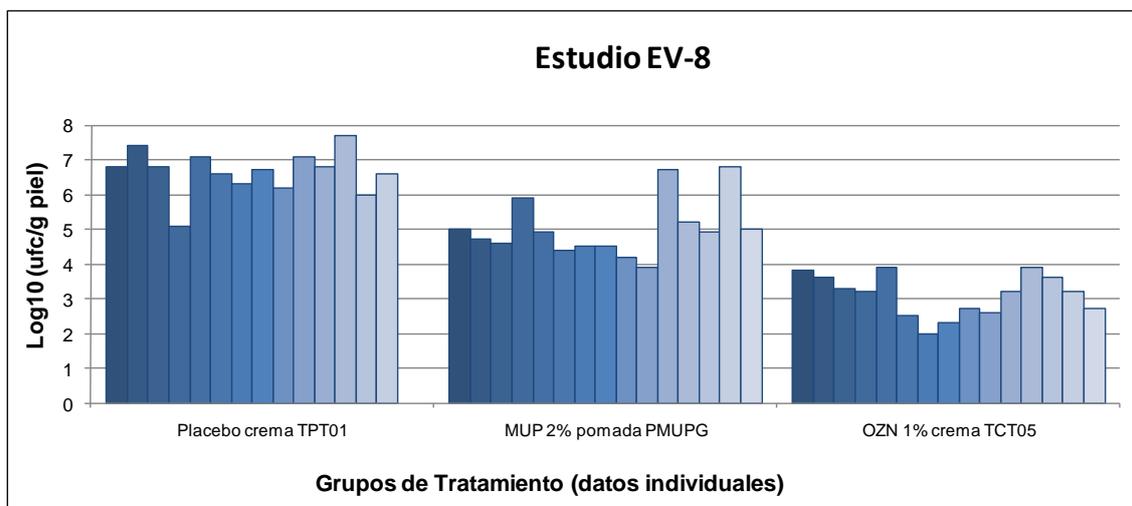
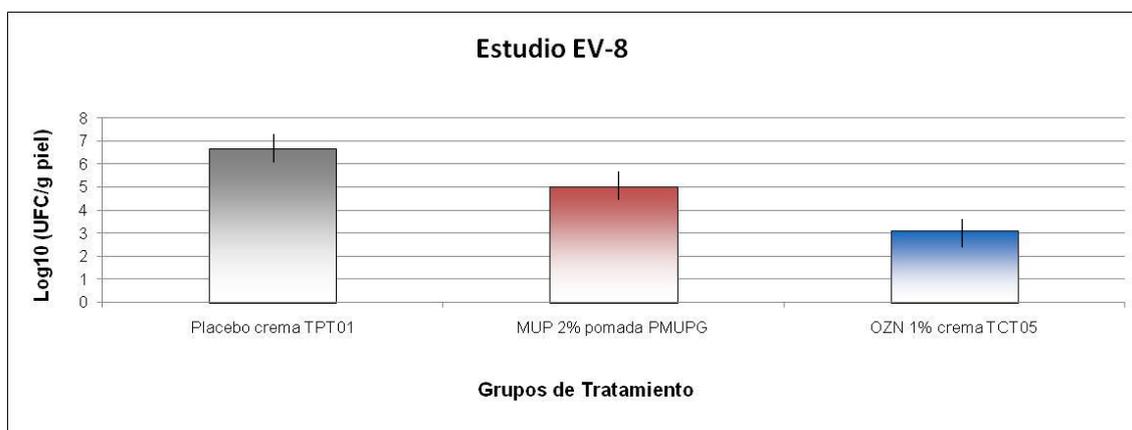


Figura VI.12. Recuento microbiológico en los distintos grupos del estudio EV-8 (Log₁₀ (UFC/g piel ± DS))



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla siguiente:

Tabla VI.28		Estudio EV-8		
Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Número de animales en los que no se detecta crecimiento de colonias de <i>S. aureus</i> en las placas / Número total de animales por grupo	
			Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
Placebo crema TPT01	-	5 días 3 veces al día	0/15	0/15
Mupirocin 2% pomada PMUPG			-	0/15
Ozenoxacino 1% crema TCT05			2/15	-

Se observa que el número de animales con muestras de piel, de la zona de la lesión, a partir de las cuales no se recuperaron bacterias era prácticamente inexistente, tanto para ozenoxacino (2/15) como para mupirocina (0/15).

Los resultados individuales muestran la eficacia de los productos en los grupos tratados con antibióticos, ozenoxacino al 1% y mupirocina al 2%, respecto al grupo tratado con placebo, y la menor variabilidad de la respuesta que se ha obtenido con los tratamientos, pero también la homogeneidad en el aislamiento de *S. aureus* en prácticamente todas las muestras de piel.

En la figura VI.12, en la que se representa la media de los valores, se observa claramente la eficacia de ozenoxacino crema al 2%, en este ensayo, respecto a los otros dos grupos.

VI.2.9 Resultados Estudio EV-9

En este estudio se evaluó la actividad, en el modelo de infección dérmica por *S. aureus* en ratón, de dos formulaciones de ozenoxacino al 1% (pomada y crema), y de las pomadas, retapamulina al 1% y mupirocina al 2%. Los animales fueron tratados con una única administración de los productos, y al grupo control se le administró una crema placebo.

No se han observado lesiones significativas en los animales durante el estudio, ni enrojecimiento ni inflamación en el área tratada y el crecimiento del pelaje ha sido normal en todos los grupos. No se han observado diferencias estadísticamente significativas en los signos clínicos entre ninguno de los grupos (Pearson's χ^2 test, $p < 0.05$).

Los valores globales correspondientes al recuento microbiológico de los distintos grupos de tratamiento y con los diferentes medios de cultivo se muestran en la tabla siguiente.

Tratamiento	Patrón de administración	Log ₁₀ (UFC/g piel)								
		Agar CLED			Agar CLED + 50mM MgCl ₂			Agar CLED + 2% carbón activo		
		Media	SEM	DS	Media	SEM	DS	Media	SEM	DS
placebo crema TPT02	Administración única	7,26	0,144	0,557	7,24	0,128	0,496	7,18	0,128	0,498
Ozenoxacino 1% crema TCT06		4.13	0.190	0,734	3.82	0.206	0,798	-	-	-
Ozenoxacino 1% pomada PDT10		3.94	0.272	1,052	3.39	0.242	0,937	-	-	-
Mupirocin 2% pomada PMUPH		5,30	0,206	0,798	-	-	-	5,17	0,189	0,731
Retapamulina 1% pomada PRETA		4,89	0,295	1,114	-	-	-	4.95	0.244	0,946

En las condiciones experimentales del estudio, después de una única aplicación, las dos formulaciones con ozenoxacino al 1% han mostrado diferencias estadísticamente significativas (One-way ANOVA, $p < 0,01$) respecto al grupo tratado con placebo (Student-Newman-Keul's test, $p < 0,05$), pero no se han observado diferencias entre ellas dos. De igual manera, tanto retapamulina como mupirocina han presentado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con placebo, sin haberse observado diferencias significativas entre ellas dos.

Además, los grupos de animales tratados con ozenoxacino han presentado recuentos inferiores de *Staphylococcus aureus* en las zonas de las lesiones respecto a las pomadas de retapamulina y mupirocina. Esto se traduce en que ambos grupos tratados con las formulaciones de ozenoxacino al 1% han mostrado diferencias estadísticamente significativas, en la disminución de la infección, respecto a los grupos tratados con la pomada al 2% de mupirocina y al 1% de retapamulina (Student-Newman-Keul's test, $p < 0,05$).

En este ensayo, los mejores resultados de homogeneidad han sido para el grupo tratado con placebo, seguido de los tratados con ozenoxacino crema al 1% y mupirocina pomada al 2%, que se concuerdan con la de los estudios precedentes. Las pomadas al 1%, tanto de ozenoxacino como de retapamulina, muestran un poco más de variabilidad, pero también en la línea de los estudios anteriores.

En las siguientes figuras se observan los resultados, individuales y por grupo, del recuento de bacterias (UFC/g de piel) obtenidos en los distintos grupos de tratamiento.

Figura VI.13. Recuento microbiológico en las lesiones de los animales del estudio EV-9

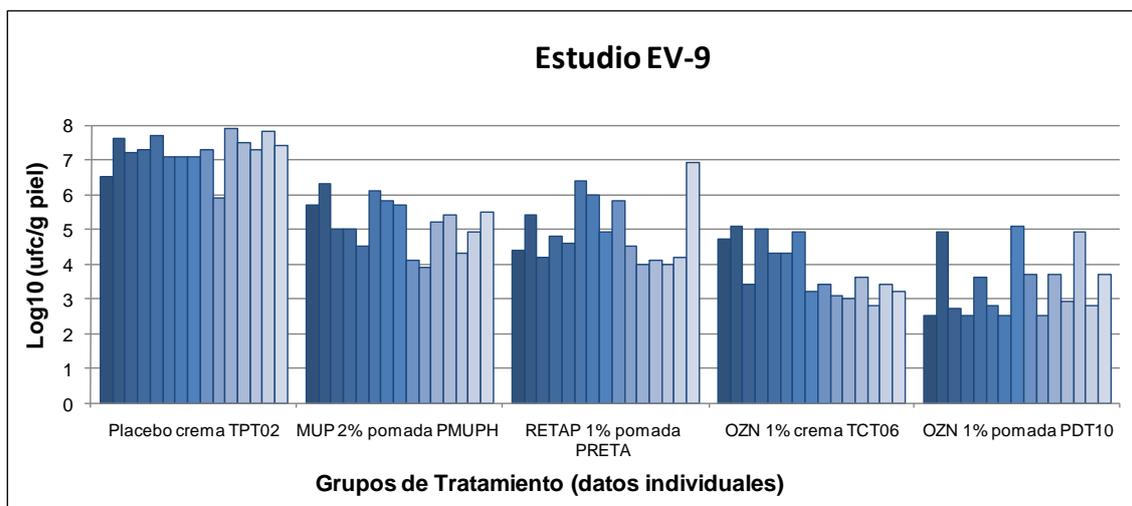
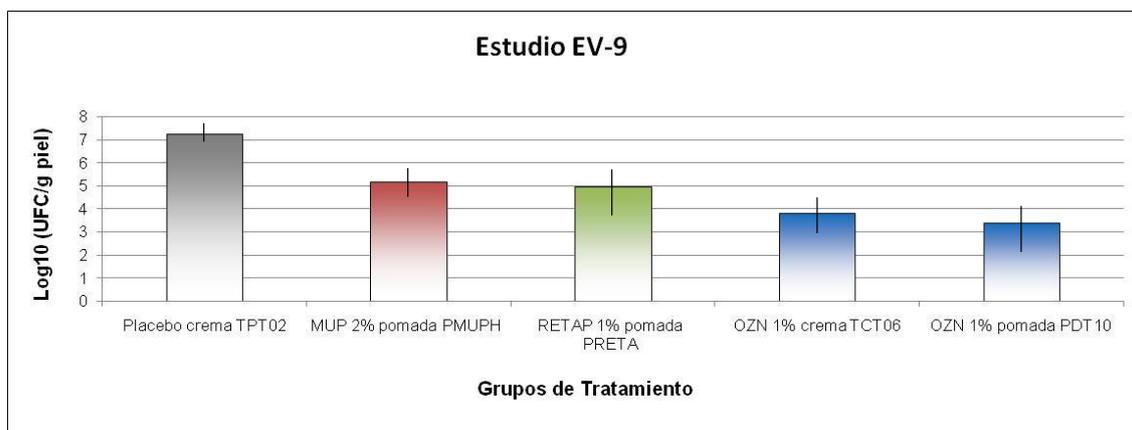


Figura VI.14. Recuento microbiológico en los distintos grupos del estudio EV-9 (Log₁₀ (UFC/g piel ± DS))



El número de animales, dentro de cada grupo de tratamiento, en los que no se ha detectado crecimiento de colonias de *S. aureus* se detalla en la tabla VI.30.

Tabla VI.30		Estudio EV-9			
Tratamiento	API micronizado o sin micronizar	Patrón de administración	Número de animales en los que no se detecta crecimiento de colonias de <i>S. aureus</i> en las placas / Número total de animales por grupo		
			Agar CLED	Agar CLED + 50mM MgCl ₂	Agar CLED + 2% carbón activo
placebo crema TPT02	-	Administración única	0/15	0/15	0/15
Ozenoxacino 1% crema TCT06	micronizado		0/15	0/15	-
Ozenoxacino 1% pomada PDT10			1/15	0/15	-
Mupirocin 2% pomada PMUPH			-	0/15	-
Retapamulina 1% pomada PRETA	-		0/15	-	0/15

El número de animales con muestras de piel a partir de las cuales no se han recuperado bacterias ha sido prácticamente inexistente, sólo en un animal del grupo tratado con ozenoxacino pomada no han recuperado bacterias de las muestras de piel.

De nuevo, se observa que el número de animales con muestras de piel a partir de las cuales no se recuperan bacterias es prácticamente inexistente. Estos resultados coinciden con los de todos los ensayos en los que se ha administrado un sólo tratamiento a los animales, en ningún

caso, ha sido suficiente para conseguir una erradicación de bacterias en la zona de la lesión extirpada y analizada. Los resultados obtenidos en los dos últimos ensayos, después de administrar tratamiento antibiótico durante 5 días, tres veces al día, no han mostrado una erradicación o disminución drástica de la población bacteriana infectante de la zona de la lesión, aunque sí se eficacia de los tratamientos, que es el objetivo principal.

En resumen, todos los grupos de animales tratados con formulaciones con antibiótico presentaron una disminución de la infección respecto al grupo tratado con placebo y como se puede observar en las figuras, la eficacia de las formulaciones con ozenoxacino en la reducción de la infección fue mayor que la de retapamulina y mupirocina, además de presentar una respuesta homogénea al tratamiento, en todos los casos.

VI.2.10. Resultados Conjuntos Estudios EV-1 - EV-9

En la tabla siguiente se presentan, para su evaluación conjunta, todos los datos de eficacia, obtenidos en los distintos experimentos *in vivo* en el modelo de infección dérmica utilizado de las distintas formulaciones de ozenoxacino y de los antibióticos tópicos comercializados mupirocina crema y pomada, y retapamulina pomada.

Los recuentos de colonias de *S. aureus* en los animales de los grupos tratados, en los distintos experimentos realizados, se presentan como la diferencia respecto a los recuentos de sus respectivos grupos controles. En negrita se marcan aquellos valores que presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al antibiótico comparativo, utilizado en el mismo estudio.

En la columna de la derecha se reportan las desviaciones estándar obtenidas para cada uno de los grupos de tratamiento, en los distintos ensayos. No se incluyen los resultados para los grupos tratados con formulaciones placebo, aunque ha habido mucha homogeneidad entre los distintos experimentos. Excepto en el ensayo EV-2, en rata, en el que se obtuvo una gran variabilidad (DS 1,679) y en el primero en ratón EV-1, en que la variabilidad fue muy pequeña (0,181), en el resto de ensayos, tanto para pomada como para crema, ha habido una buena o moderada homogeneidad, con DS alrededor de 0,6, y con recuentos altos, en los animales tratados con placebo, que indican un mantenimiento de la infección en la zona de la lesión.

Respecto a las formulaciones con ozenoxacino, se observa que la homogeneidad de los resultados intragrupo ha aumentado a lo largo del desarrollo y evaluación de nuevas formulaciones, a partir de los geles iniciales que presentaban una elevada variabilidad entre animales. Por otro lado, las dos formulaciones de ozenoxacino preparadas con producto sin micronizar presentaron mayor variabilidad, además de menor eficacia que sus equivalentes preparadas con producto micronizado.

Es de destacar, de todas maneras, la variabilidad experimental en este ensayo, debido a las diferencias entre animales, a la diferente implantación de la infección a partir del hilo insertado bajo la piel, y a otras posibles causas experimentales, ya que se han detectado pequeñas diferencias entre ensayos para las mismas formulaciones.

En la tabla VI.31, resumen, con los resultados comparativos de todos los grupos de tratamiento respecto a sus controles, se puede observar la eficacia de todas las formulaciones de ozenoxacino y mupirocina, respecto a su placebo (excepto en un caso *, para el gel GLT14, en EV-2, ya comentado anteriormente).

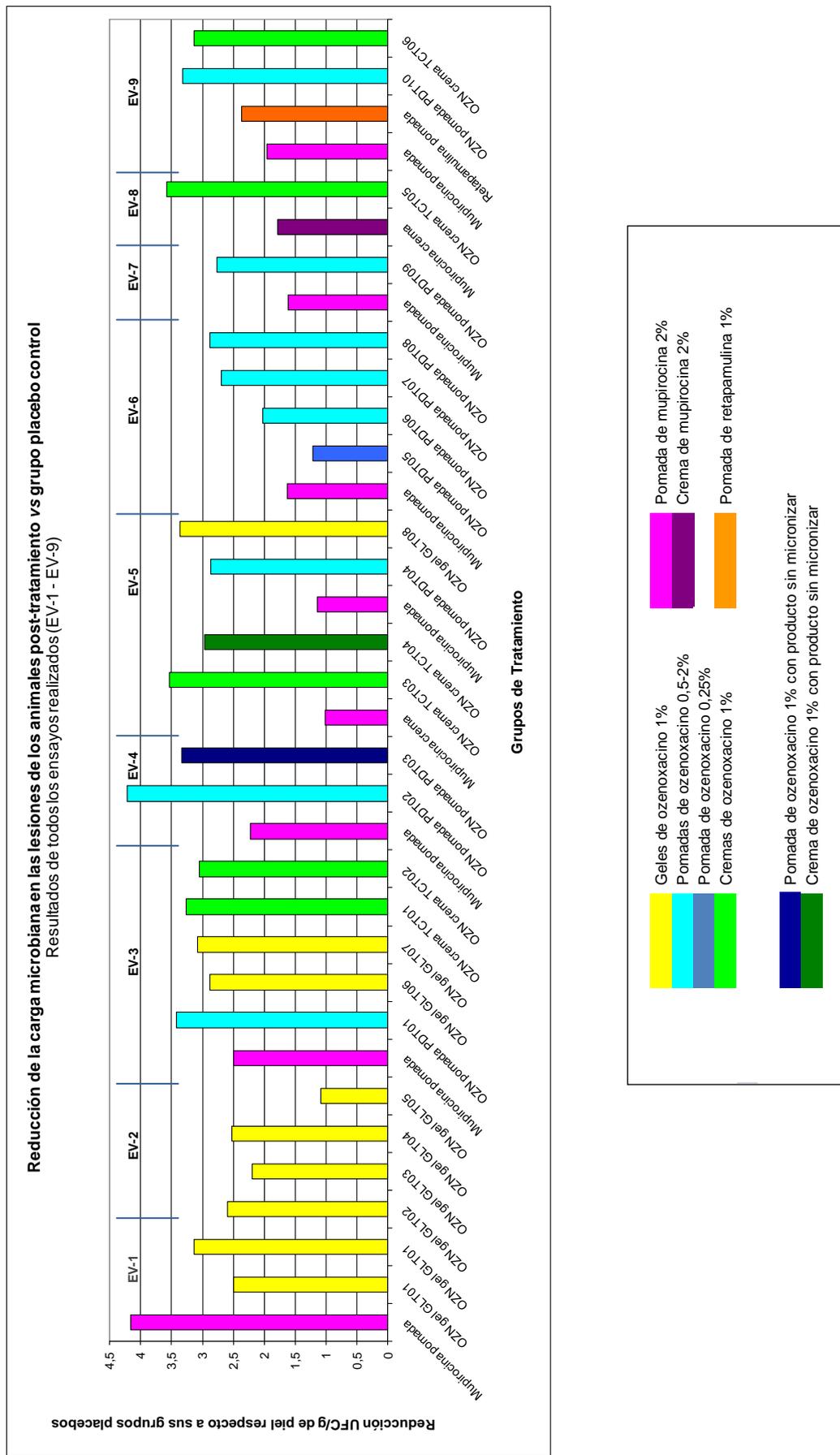
Tabla VI.31 Resumen de los resultados para los distintos grupos de tratamiento vs placebo, de los estudios EV-1 – EV-9					
Ensayo	Tratamiento antibiótico (lote)	# días de tratamiento	# aplicaciones diarias	Diferencia entre el Log ₁₀ del recuento (UFC/g piel) de cada grupo tratado vs su grupo control	Desviaciones Estándar
EV-1	mupirocina 2% pomada (PMUPA)	4	3	4,16	1,181
	ozenoxacino 1% gel (GLT01)			2,5	1,241
				3,13	1,372
EV-2	ozenoxacino 1% gel (GLT02)	4	3	2,59	1,497
	ozenoxacino 1% gel (GLT03)			2,19	1,408
	ozenoxacino 1% gel (GLT04)			2,52	1,166
	ozenoxacino 1% gel (GLT05)			1,09 *	1,373
EV-3	mupirocina 2% pomada (PMUPB)	3	1	2,49	1,358
	ozenoxacino 1% pomada (PDT01)			3,42	0,973
	ozenoxacino 1% gel (GLT06)			2,88	0,880
	ozenoxacino 1% gel (GLT07)			3,08	0,945
	ozenoxacino 1% crema (TCT01)			3,26	1,105
	ozenoxacino 1% crema (TCT02)			3,05	1,280
EV-4	mupirocina 2% pomada (PMUPC)	1	1	2,22	0,865
	ozenoxacino 1% pomada (PDT02)			4,21	0,843
	ozenoxacino 1% pomada (PDT03)			3,34	1,232
EV-5	mupirocina 2% crema (CMUPA)	1	1	1,02	0,658
	ozenoxacino 1% crema (TCT03)			3,54	0,606
	ozenoxacino 1% crema (TCT04)			2,97	0,994
	mupirocina 2% pomada (PMUPD)			1,14	0,563
	ozenoxacino 1% pomada PDT04			2,87	0,511
	ozenoxacino 1% gel (GLT08)			3,36	0,779
EV-6	mupirocina 2% pomada (PMUPE)	1	1	1,62	0,745
	ozenoxacino 0,25% pomada (PDT05)			1,21	0,895
	ozenoxacino 0,5% pomada (PDT06)			2,02	1,296
	ozenoxacino 1% pomada (PDT07)			2,7	0,918
	ozenoxacino 2% pomada (PDT08)			2,88	0,911
EV-7	mupirocina 2% pomada (PMUPF)	5	3	1,61	0,913
	ozenoxacino 1% pomada (PDT09)			2,76	0,962
EV-8	mupirocina 2% crema (CMUPB)	5	3	1,79	0,850
	ozenoxacino 1% crema (TCT05)			3,57	0,596
EV-9	mupirocina 2% pomada (PMUPG)	1	1	1,96	0,798
	retapamulina 2% pomada (PRETA)			2,37	0,937
	ozenoxacino 1% pomada (PDT10)			3,32	0,731
	ozenoxacino 1% crema (TCT06)			3,13	0,946

*: único grupo de animales tratado con antibiótico que no presentaba diferencias estadísticamente significativas respecto a su grupo control tratado con vehículo/placebo.
 Valores en negrita: grupos que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al antibiótico comparativo, en su mismo estudio

Los valores de eficacia obtenidos, como disminución de la carga bacteriana, con los distintos patrones de administración de las formulaciones con ozenoxacino no son proporcionales al mayor número o mayor frecuencia de aplicaciones de los tratamientos.

En la figura siguiente, VI.15, se representan los valores de disminución del recuento microbiano, respecto al grupo control, obtenidos con todas las formulaciones de ozenoxacino, mupirocina y retapamulina.

Figura VI.15. Resumen de los resultados de todos los estudios (EV-1 – EV-9)



A partir de esta gráfica resumen, se puede observar que excepto en los dos primeros experimentos con geles, en el resto de ensayos, las formulaciones con ozenoxacino al 0,5, 1 ó 2% han superado en todos los casos (e independiente del patrón de administración) a las formulaciones con mupirocina al 2% y retapamulina al 1%, administradas con el mismo patrón, y en el mismo estudio.

Las mayores reducciones se han obtenido con las formulaciones de ozenoxacino al 1%, pomada y crema. Con la pomada al 1% de ozenoxacino, se ha disminuido el recuento, en UFC/g de piel, de *S. aureus* entre 2,7 y 4,21 log₁₀, y con la crema al 1%, entre 3 y 3,57 log₁₀.

Respecto a los tratamientos con pomada de mupirocina al 2%, los mejores valores se obtuvieron en los tres primeros ensayos (tratamientos de 4, 3 y 1 día, tres, una y una vez al día). En en los cuatro últimos ensayos la eficacia con mupirocina ha sido menor, independientemente de si el tratamiento había durado 1 o 5 días, y los animales se han tratado una sola vez o tres veces al día. De las dos veces que se trataron los animales con mupirocina crema al 2%, la primera se ha obtenido una eficacia bastante baja, mientras que en la segunda es muy similar a la obtenida con pomada de mupirocina, a la misma concentración.

Página en blanco

APARTADO VI.3. DISCUSIÓN

VI.3. DISCUSIÓN

Las infecciones de piel y estructuras relacionadas causadas por cepas de *S. aureus* sensibles o resistentes a meticilina han emergido como un problema relevante tanto a nivel hospitalario como extra-hospitalario (McCaig, 2006, Moran, 2006), por lo que se han utilizado modelos animales eficaces, rápidos y coste-efectivos para evaluar, tanto la eficacia como la seguridad de nuevos productos y formulaciones.

En estos estudios, la eficacia se ha evaluado comparando la reducción bacteriana en las muestras de piel de los animales, provocada por la acción de ozenoxacino, de mupirocina y de retapamulina.

El modelo de infección seleccionado presenta ligeras diferencias con respecto a la realidad clínica o patologías infecciosas de piel que nos interesan. Este modelo coloca el microorganismo patógeno sobre un soporte (hilo) y favorece que la carga microbiana aumente; y tras un tratamiento antibiótico efectivo, esta población bacteriana disminuye. Por lo tanto, no se estima la eficacia de los productos a partir de una curación completa de la infección, sino que se cuantifica una disminución de la carga microbiana, en la zona de la lesión infectada (Ali, 2009, Cho, 2011, Gisby, 2000, Pastagia, 2011).

Este modelo ha permitido evaluar la eficacia y el aumento de homogeneidad de las formulaciones, tras los trabajos de optimización desde los geles iniciales hasta las pomadas y cremas. Se han podido identificar mejoras respecto a los grupos tratados con placebo, y frente a los tratados con otros antibióticos tópicos del mercado (mupirocina y retapamulina). En los distintos estudios se han testado diferentes geles, cremas y pomadas con el objetivo de identificar aquellos excipientes o formulaciones que consiguieran demostrar una buena eficacia y mejores resultados que los comparativos.

Se considera, como medida adicional de la potencia de los productos, el número de animales en cuyas muestras de piel prácticamente no se detectan colonias de *S. aureus*. Al convertir el recuento en UFC/g de piel, el límite de detección inferior se convierte en 10^2 ufc/ g de piel, aproximadamente. Valorando los animales con recuento prácticamente inexistente, a partir de las placas de agar, estamos, de hecho, valorando el número de animales con recuentos alrededor de su límite inferior de sensibilidad (Rittenhouse, 2006).

El inóculo inicial en la lesión está controlado por la carga del fragmento de hilo de sutura insertado bajo la piel, no se ha incluido un subgrupo para efectuar un control a tiempo cero, y el recuento de bacterias en la zona infectada se realiza al final del tratamiento. Por otro lado, los resultados de los grupos tratados con antibiótico se comparan con los del grupo tratado con placebo y no se han incluido en los experimentos grupos de animales sin tratar. Los resultados obtenidos en los grupos sin tratar o tratados con formulaciones placebos son muy similares a los descritos en la bibliografía (Gisby, 2000, Rittenhouse, 2006).

La información de tolerabilidad dérmica obtenida de todas las formulaciones utilizadas, mediante la valoración de los signos clínicos adversos de los animales, ha permitido confirmar, en la totalidad de los estudios realizados, la buena respuesta del tratamiento en las zonas tratadas, al igual que se describe para los comparativos utilizados (Ali, 2009, Cho 2011, Gisby, 2000). Ha habido tres casos en los que se podía esperar una peor tolerabilidad de las formulaciones de ozenoxacino: en el caso del gel a pH 10, o en el caso de las formulaciones pomada y crema de ozenoxacino, preparadas a partir de producto sin micronizar (Hoet, 2004, Niazi, 2004a y b, Mitchnick 1999). De haber dispuesto de alguna formulación que hubiera sido peor tolerada dérmicamente por los animales, se podría haber detectado en los ensayos realizados a dosis repetidas, aunque la valoración completa de la tolerabilidad se realiza en los estudios regulatorios, no mostrados.

Las distintas pautas de administración utilizadas han permitido valorar la rápida acción del producto, sobretudo frente a los otros antibióticos tópicos utilizados (mupirocina y retapamulina), y comparar eficacias. Después de los tratamientos únicos, se ha conseguido una reducción bacteriana en la zona de la lesión, pero no una erradicación, que tampoco se ha alcanzado tras tratamientos repetidos (de hasta 15 dosis). Una explicación, más allá de la

variabilidad entre estudios, podría ser que, el producto aplicado sobre la piel se mantuviera (más de 8h o 16h) e impidiera que, el procedente de sucesivas aplicaciones, penetrara y marcara diferencias en eficacia, de manera proporcional según el número de aplicaciones.

Respecto al formato de resultados evaluados, en general, las diferencias en el recuento de los grupos tratados con antibiótico respecto a los grupos control, se considera que es la mejor estrategia para comparar eficacia entre productos o formulaciones, tal y como describe la mayor parte de la bibliografía publicada (Ali 2009, Cho, 2011, Gisby, 2000), aunque en un estudio publicado con retapamulina se destacan también aquellos tratamientos que consiguen erradicar o dejar el recuento de *S. aureus* por debajo del límite de cuantificación en la zona de la lesión (Rittenhouse, 2006), tal y como, de manera complementaria, se ha realizado en los estudios descritos en este trabajo.

En todos los experimentos realizados, la aplicación de los tratamientos antibióticos (ozenoxacino, mupirocina y retapamulina), ha provocado una disminución significativa de la infección respecto a los grupos tratados con placebo. Sólo en el estudio EV-2, un gel de ozenoxacino al 1% preparado a pH 10, no fue significativamente distinto del grupo control, aunque redujo ligeramente la carga bacteriana.

Los inóculos de los hilos de sutura cargados con una suspensión de *S. aureus* han sido controlados y homogéneos a lo largo de los distintos estudios, y, no parece que sean los responsables de las pequeñas diferencias que se han detectado entre estudios, en los recuentos del grupo placebo (Cho, 2011, Tseng, 2011). En todos los grupos tratados con placebos el recuento era elevado, y superior al de los tratados; sólo en el modelo en rata, hubo animales por debajo del límite inferior de cuantificación.

La eficacia del tratamiento comparado con mupirocina se ha demostrado, en todos los estudios, siempre con diferencias significativas respecto a los grupos tratados con placebo (reducciones de entre entre 1 y 4,2 UFC/g de piel). En la bibliografía (Gisby, 2000, Pastagia, 2011, Rittenhouse, 2006), la reducción obtenida de UFC/g piel, en este mismo modelo con tratamientos más largos, es de entre 3-4 log₁₀. En estudios realizados con cepas resistentes a meticilina (Cho, 2011, Pastagia, 2011), la eficacia de mupirocina, p.ej., está descrita como menor, ya que su CMI frente a la cepa resistente es, también, superior. En los estudios presentados en este documento, la reducción bacteriana es inferior a la reportada en los trabajos publicados, aunque hay que tener en cuenta que se ha aplicado el producto siguiendo patrones de administración más reducidos que los descritos. Únicamente, uno de los trabajos más antiguos publicados, en un modelo similar de infección por MRSA en ratón (Rode, 1989), describe una potente actividad bactericida *in vivo* de mupirocina, que implica una erradicación bacteriana superior al 99% (tras dos aplicaciones) y del 98,3% (tras una única aplicación).

En el único estudio en el que se han comparado, *in vivo*, formulaciones de ozenoxacino con retapamulina pomada, se han obtenido mejores resultados con ozenoxacino. Aún así, se trata de un solo estudio, con una sola administración de los productos, y en un modelo experimental; serán necesarios más datos para conocer mejor su eficacia comparativa. En el caso de mupirocina, los resultados son equivalentes a los de la mayoría de los estudios, como se detalla en el apartado VI.2.11, y a los de la bibliografía (Gisby, 2000, Pastagia, 2011, Rittenhouse, 2006).

Los resultados de los ensayos, en los que se ha administrado un sólo tratamiento a los animales, demuestran, que en ningún caso, éste ha sido suficiente para conseguir una erradicación de bacterias en la zona de la lesión, aunque tampoco lo han sido los tratamientos repetidos, en los estudios EV-7 y EV-8, en los que los antibióticos se han aplicado tres veces al día, durante 5 días. Al valorar los resultados globales, se puede observar, que la máxima reducción detectada, entre los grupos tratados y su grupo placebo, ha sido de 4,21 log₁₀ UFC/g piel de *S. aureus*, para la pomada de ozenoxacino al 1%, y que por encima de reducciones de 4logs, están sólo dos grupos, uno tratado con una formulación pomada de ozenoxacino al 1% y otro con una formulación pomada de mupirocina (tratamiento 4días, reducción de 4,16 log₁₀ UFC/g piel). Con ello se resume que, mayoritariamente, el efecto de las formulaciones en la disminución del recuento bacteriano es de alrededor de 2-3 log₁₀ UFC/g piel, como se reporta en la bibliografía relacionada (Gisby, 2000, Rittenhouse, 2006).

Se ha comparado la eficacia de formulaciones a diferentes pHs, con diferentes tamaños de materia prima y con producto en solución o en suspensión, con el objetivo de favorecer desde las primeras fases del proyecto, el potencial de ozenoxacino (Niazi, 2004a), en eficacia, homogeneidad de respuesta, rapidez de acción y no absorción a través de la piel, para evitar pérdidas de eficacia y generación de resistencias (Ali, 2009, Kudenber, 2005, Tseng, 2011). Los resultados obtenidos, tras la evaluación de trece formulaciones distintas, han permitido identificar dos formulaciones al 1% de ozenoxacino, pomada y crema, con unos buenos resultados de eficacia y seguridad. De igual manera, este modelo ha sido descrito en la selección y optimización de distintas formulaciones de otros productos, como mupirocina (Amrutiya, 2009).

A lo largo de todos los estudios de este capítulo, se han visto diferencias entre formulaciones y productos de eficacia *in vivo*, pero también, una variabilidad inter-experimento que seguro se ha visto incrementada por las distintas variaciones de los diseños de los ensayos (Cho, 2011, McRipley, 1976, Rittenhouse, 2006b). En la bibliografía se describe, como otras posibles causas, variaciones en el fenotipo de la cepa infectante, en la profundidad en la inserción del hilo y del estado inmunitario de los ratones, además de las pautas de administración y los inóculos iniciales, ya mencionadas (Tseng, 2011). Se podrían realizar nuevos estudios, intentando controlar estos parámetros y con cepas con distintos perfiles de resistencia, para completar el conocimiento. Aún así, se considera que para los objetivos de identificación y optimización de formulaciones dérmicas de ozenoxacino, estos ensayos han sido de utilidad, permitiendo la selección de una formulación crema y otra pomada de ozenoxacino al 1%, con datos muy positivos.

En resumen, estos resultados de eficacia *in vivo*, junto a la potencia *in vitro* de ozenoxacino son un sólido *background* para esperar un efecto clínico terapéutico en las infecciones no complicadas de piel y estructuras relacionadas, después de una aplicación tópica repetida del producto (McCaig, 2006, Moran, 2006).

Página en blanco

APARTADO VI.4. BIBLIOGRAFÍA

VI.4. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, H.S., Neima, L. y Siddique, H.** 2009. *In vitro* comparison to evaluate the effect of different vehicles in the effectiveness of topically applied mupirocin. *J Sc Tech*, **10**(3):146-163.
- Amrutiya, N., Bajaj, M. y Madan, M.** 2009. Development of microsponges for topical delivery of mupirocin, *AAPS*, **10**(2):402-410.
- Cada, D.J. y Baker, D.E.** 2007. Retapamulin 1% ointment. *Hosp Pharm*, **42**(9):846-855.
- Cho, J.S., Zussman, J., Donegan, N. y Miller, L.** 2011. Noninvasive *in vivo* imaging to evaluate immune responses and antimicrobial therapy against *Staphylococcus aureus* and USA300 MRSA skin infections. *J Invest Dermatol*, **131**(4):907-915.
- Cookson, B.D., Lacey, R.W., Noble, W.C., Reeves, D.S., Wise, R. y Redhead, R.J.** 1990. Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **335**:1095-1096.
- Gisby, J. y Bryant, J.** 2000. Efficacy of a new cream formulation of mupirocin: comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**(2):255-260.
- Hoet, P.H., Bruske-Hohlfeld, I. y Salata, O.V.** 2004. Nanoparticles, known and unknown health risks. *J Nanobiotechn*, **2**(1):12.
- Hommos, A.** 2006. Nanostructured lípido Carriers in dermal and personal care. Tesis doctoral. www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/.../thesis_Aiman_Hommos.pdf
- Kratzer, C., Tobudic, S., Macfelda, K., Graninger, W. y Georgopoulos, A.** 2007. *In vivo* activity of a novel polymeric guanidine in experimental skin infection with methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**(9):3437-3439.
- Kugenberg, E., Norstrom, T., Petersen, T.K., Duvold, T., Yerson, D.I. y Hughes, E.** 2005. Establishment of a superficial skin infection model in mice by using *S.aureus* and *S.pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(8):3435-3441.
- Larese, F.F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M. y Maina, G.** 2009. Human skin penetration of silver nanoparticules through intact and damaged skin. *Toxicology*, **255**:33-37.
- McCaig, L.F., McDonald, L.C. y Mandal, S.** 2006. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis*, **12**:1715-1723.
- McRipley, R.J. y Whitney, R.R.** 1976. Characterization and quantitation of experimental wound infections used to evaluate topical antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **10**:38-44.
- Mitchnick, M.A., Fairhurst, D. Y Pinnell, S.R.** 1999. Microfine zinc oxide (Z-cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. *J Am Acad Dermatol*, **40**(1):85-90.
- Moran, G.H., Krishnadasan, A. y Gorwiz, R.J.** 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*, **355**:666-774.
- Niazi, S.K.** 2004a. Skin irritation and sensitization testing of generic transdermal drug products. In *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations. Semisolid Products (Chapter.6)*
- Niazi, S.K.** 2004b. Guidance on formulating semisolid drugs. In *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations. Semisolid Products (Chapter.6)*
- Parish, L.C. y Parish, J.L.** 2008. Retapamulin: a new topical antibiotic for the treatment of uncomplicated skin infections. *Drugs Today*, **44**(2):91-102.
- Pastagia, M., Euler, C., Chahales, P., Fuentes-Duculan, J., Krueger, J. G. y Fischetti, V.A.** 2011. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**(2):738-744.
- Rittenhouse, S., Biswas, S., Broskey, J., McCloskey, L., Moore, T., Vasey, S. y cols.** 2006a. Selection of retapamulin, a novel pleuromutilin for topical use. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**:3882-3885.
- Rittenhouse, S., Singley, S., Hoover, J., Page, R. y Payne, D.** 2006b. Use of the surgical wound infection model to determine the efficacious dosing regimen of retapamulin, a novel topical antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**(11): 3886-3888.
- Rode, H., de Wet, P.M. y Millar, A.J.** 1988. Bactericidal efficacy of mupirocin in multi-antibiotic resistant *S. aureus* burn wound infection. *J Antimicrob Chemother*, **21**:589-595.

Rode, H., Hanslo, D., de Wet, P.M., Millar, A.J. y Cywes, S. 1989. Efficacy of mupirocin in methicillin-resistant *S. aureus* burn wound infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **33(8)**:1358-1361.

Rouse, M.S., Rotger, M., Piper, K.E., Steckelberg, J.M., Scholz, M., Andrews, J. y Patel, R. 2005. *In vitro* and *in vivo* evaluations of the activities of lauric acid monoester formulations against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **49(8)**:3187-3191.

Shawar, R., Scangarella-Oman, N., Dalessandro, M., Breton, J., Twynholm, M., Li, G. y Garges, H. 2009. Topical retapamulin in the management of infected traumatic skin lesions. *Ther Clin Risk Manag*, **5(1)**:41-49.

Tseng, C.W., Sánchez-Martínez, M., Arruda, A. y Liu, G.Y. 2011. Subcutaneous infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Vis Exp*, **9(48)**:pii 2528.

Yamakawa, T., Mitsuyama, J. y Hayashi, K. 2002. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of T3912, a novel non-fluorinated topical quinolone. *J Antimicrob Chemother*, **49**:455-465.

Yang, L.P.H. y Keam, S.J. 2008. Retapamulin. A review of its use in the management of impetigo and other uncomplicated superficial skin infections. *Drugs*, **68(6)**:855-873.

CAPÍTULO VII. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE OZENOXACINO

APARTADO VII.1.MATERIALES Y MÉTODOS

VII. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE OZENOXACINO

En este capítulo se resume la investigación realizada sobre la absorción sistémica de ozenoxacino tras su aplicación dérmica.

La evaluación de la farmacocinética de ozenoxacino se ha dividido en dos partes: la absorción y la farmacocinética después de la absorción. La absorción del producto se ha estudiado en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, y también en ensayos clínicos en humanos (Aguzzi, 2008, Bronaugh, 1999, OECD, 2010).

En primer lugar, se realizaron estudios *in vitro*, a partir de muestras de piel humana extirpada de donantes, utilizando el modelo de célula de Franz (Franz, 1975 y 1978, OECD, 2004b). A continuación, se realizaron ensayos en animales de experimentación, rata y *minipig*; esta última especie, por poseer una estructura de piel muy similar a la humana (OECD, 2004a). Estos estudios han soportado el uso de ozenoxacino, en pomada al 1% y en crema al 2%, en el desarrollo clínico posterior.

Finalmente, se realizaron tres ensayos clínicos de fase I, en los que se investigó la permeación transdérmica en voluntarios sanos a partir de formulaciones con ozenoxacino: Un ensayo tras dosis únicas de tres concentraciones ascendentes de ozenoxacino en pomada, y dos ensayos, tras dosis repetidas de una sola concentración, pomada al 1% y crema al 2% de ozenoxacino.

VII.1. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1.1. Absorción *in vitro*

VII.1.1.1. Célula de Franz

El ensayo en Célula de Franz es un modelo de permeación en piel *in vitro* que se usa frecuentemente en el desarrollo de formulaciones (Elewsky, 2007). El equipo consiste en dos cámaras separadas por una membrana, que en nuestro caso, fue piel humana. El producto a evaluar se aplica sobre la membrana, en la cámara superior, mientras que la cámara inferior contiene el fluido receptor, del cual se sacan muestras, en intervalos regulares, para evaluar la cantidad de producto permeado.

La permeación transdérmica se valoró en este estudio *in vitro* a través de muestras de piel humana extirpada de donantes, utilizando el modelo de célula de Franz. El estudio se realizó con pomada al 1% y crema al 1 y al 2% de ozenoxacino.

Para valorar la absorción del producto a través de la piel, se aplicó tópicamente sobre muestras de piel humana extirpada, ozenoxacino al 1%, en dos formulaciones pomada y crema, y también, crema al 2%. Los experimentos se realizaron en Célula de Franz (OECD, 2004a), a diferentes tiempos y simulando dosis infinitas.

Fragmentos de piel humana (150-200 μm de grosor) se obtuvieron de donantes *post-mortem*, que no sufrían patologías dérmicas, y se mantuvieron congeladas hasta el momento del ensayo (OECD, 2004b, WHO, 2006). El estudio de permeación se realizó en células de difusión de Franz (sistema MicroetteTM, Hanson, EEUU). El día del experimento, las muestras se descongelaron sumergidas en solución fisiológica a 37°C y se cortaron en discos de 1,8 cm^2 . Se controló, en todas las muestras y antes de su uso en el ensayo, que el parámetro TEWL (Pérdida de Agua Transepidermica) estuviera por debajo de 15 $\text{g/m}^2\cdot\text{h}$ (Bronaugh, 1991, Gysler, 1999). En el compartimento receptor de las celdas, la parte inferior de las muestras de piel se bañó con una solución de Transcutol-Agua (1:1, v/v) como fluido receptor de referencia por su compatibilidad con la piel y con las características de solubilidad del producto (OECD, 2004c). El fluido receptor se mantuvo en constante agitación a 32°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$).

Se aplicó, aproximadamente, 150 mg/cm² de cada formulación sobre las muestras de piel, por triplicado. El ensayo cumplió las condiciones de experimento en dosis infinita (>10 mg/cm²) (Gysler, 1999), en las que se asegura un exceso de disponibilidad de la formulación a testar en el compartimento donador, y por lo tanto, se obtienen unas condiciones de estado estacionario. Las dosis de ozenoxacino aplicadas a las diferentes muestras de piel fueron de 2,9mg (pomada al 1%), 2,7 mg (crema al 1%), y 5,3 mg (crema al 2%), tras aplicar las siguientes cantidades de las formulaciones dérmicas: 121 mg/cm² de pomada, y de 119,7 mg/cm² y 152,7 mg/cm², de las cremas del 1 y 2%.

A continuación, se extrajeron automáticamente muestras de 1 mL de la fase receptora a los tiempos de 1h, 6h, 12h, 18h y 24h después de la aplicación de las formulaciones en la parte superior de la epidermis. El compartimento donador permaneció ocluido durante todo el ensayo.

Las cantidades de ozenoxacino permeado a través de las distintas muestras de piel, tras la aplicación de las distintas formulaciones, se cuantificaron mediante un método con cromatografía líquida/espectrometría de masas.

Método de análisis	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/ESI+	Especificidad, precisión y exactitud, linealidad y rango, límite de cuantificación y estabilidad	40 ng/mL

VII.1.2. Absorción *in vivo*

El objetivo de los modelos *in vivo* realizados fue determinar y evaluar la exposición o absorción sistémica de ozenoxacino, en ratas y *minipigs*, después de una administración por vía dérmica de distintas formulaciones de ozenoxacino, con aplicaciones de producto de entre 0,1 y 4 mg/cm², como se resume en la tabla VII.2.

Especie (Estudio)	Formulación	Concentración ozenoxacino en la formulación	Dosis de ozenoxacino administrada	Área de aplicación	Tiempo de exposición	Duración del tratamiento
Rata EV-2	Gel GLT11	1%	0,26 mg/cm ²	2 cm ²	8 h	3 d
	Gel GLT12	1%				
	Gel GLT13	1%				
	Gel GLT14	1%				
Rata EA-1	Pomada	0%	0 mg/cm ²	10% BSA	24 h	28 d
		1%	0,1 mg/cm ²			
		6,3%	0,63 mg/cm ²			
		40%	4 mg/cm ²			
<i>Minipig</i> EA-3	Pomada	0%	0 mg/cm ²	10% BSA	24 h	28 d
		1%	0,1 mg/cm ²			
		6,3%	0,63 mg/cm ²			
		40%	4 mg/cm ²			
<i>Minipig</i> EA-4	pomada	0%	0 mg/cm ²	10% BSA	24 h	14 d
		1%	0,1 mg/cm ²			
		20%	2 mg/cm ²			
	crema	0%	0 mg/cm ²	10% BSA	24 h	14 d
		1%	0,1 mg/cm ²			
		20%	2 mg/cm ²			

VII.1.2.1 Rata

VII.1.2.1.1. Rata Ensayo EV-2

Este primer ensayo corresponde al descrito y analizado en el capítulo anterior, EV-2, de idéntico código. Durante el desarrollo de las formulaciones dérmicas, y con el objetivo de

evaluar la absorción dérmica en el modelo de eficacia en el tratamiento de infección dérmica por *S. aureus* en rata (capítulo VI, apartado V1.1.3, estudio EV-2), se testaron cuatro geles de ozenoxacino al 1%. Se aplicaron dosis de 0,1mL (2,6 mg/kg ó 0,26 mg/cm²) en la piel erosionada de ratas depiladas, tres veces al día durante 3 días. A continuación, se valoraron las muestras de plasma a diferentes tiempos y, la carga microbiana en la zona de la lesión.

Los niveles plasmáticos de ozenoxacino se determinaron utilizando un método validado de HPLC con detección por UV.

Tabla VII.3 Resumen Método analítico utilizado		
Método de análisis EV-2	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
HPLC/ Detección UV	Selectividad, recuperado, precisión y exactitud, curva de calibración, límite inferior de cuantificación, límite inferior de detección, estabilidad	0,08 µg/mL

VII.1.2.1.2. Rata Estudio EA-1

Se evaluó la exposición o la absorción sistémica de ozenoxacino, en ratas hembras y machos (Sprague Dawley de 200-250 g, al inicio del experimental), después de una administración por vía dérmica de ozenoxacino pomada a distintas concentraciones. Este ensayo formó parte de un estudio de toxicología, en el que las dosis fueron administradas diariamente durante un periodo de 28 días, de acuerdo con la tabla anterior VII.3.

Las formulaciones se aplicaban directamente sobre la piel en un área definida del 10% de la superficie corporal (BSA), con un masaje de aproximadamente 30 segundos, para favorecer la absorción del producto de manera homogénea entre los distintos grupos.

Para valorar la absorción sistémica de ozenoxacino, se aplicaron distintas formulaciones pomada de ozenoxacino al 0%, 1%, 6,3% y 40%, sobre la piel de los animales, administrando unas dosis de entre 0-4 mg/cm² en el 10% de la BSA. Las aplicaciones se realizaron una vez al día, durante 28 días.

Los niveles plasmáticos de ozenoxacino se determinaron utilizando un método validado de Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de Masas.

Tabla VII.4 Resumen Método analítico utilizado		
Método de análisis EA-1	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/MS	Precisión y exactitud, linealidad, límite inferior de concentración, límite de cuantificación, recuperado, especificidad y estabilidad	0,500 ng/mL

VII.1.2.2 Minipig

VII.1.2.2.1. Pomada Estudio EA-3

El objetivo de este modelo *in vivo* fue determinar y evaluar la exposición sistémica de ozenoxacino, en *minipigs* machos y hembras tipo Gottingen después de una administración por vía dérmica de pomada de ozenoxacino a distintas concentraciones.

Para valorar la absorción sistémica, en *minipig* Gottingen, tras la aplicación dérmica de la pomada de ozenoxacino, se aplicaron distintas formulaciones al 0%, 1%, 6,3% y 40%, sobre la piel de los animales. Las dosis de ozenoxacino que se administraron fueron de 0, 0,1, 0,63 y 4 mg/cm² en el 10% de la superficie corporal (BSA), y, las formulaciones se aplicaron una vez al día, durante 28 días.

Los niveles plasmáticos de ozenoxacino se determinaron utilizando un método validado de HPLC acoplado a la Espectrometría de Masas.

Tabla VII.5		
Resumen Método analítico utilizado		
Método de análisis EA-3	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/MS	Precisión y exactitud, linealidad, límite inferior de concentración, límite de cuantificación, recuperado, especificidad y estabilidad	0,500 ng/mL

VII.1.2.2.2. Crema y pomada Estudio EA-4

El objetivo de este ensayo *in vivo* fue determinar y evaluar la absorción sistémica de ozenoxacino, en *minipigs* machos tipo Gottingen tras la aplicación dérmica de las formulaciones pomada y crema de ozenoxacino al 0%, 1% y 20%, administrando un volumen de 0,01mL/cm², y por tanto, unas dosis de entre 0,1 y 2 mg/cm² en el 10% de la superficie corporal (BSA), una vez al día, durante 14 días.

Los niveles plasmáticos de ozenoxacino se determinaron utilizando un método validado de Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de Masas.

Tabla VII.6		
Resumen Método analítico utilizado		
Método de análisis EA-4	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/MS	Precisión y exactitud, linealidad, límite inferior de concentración, límite de cuantificación, recuperado, especificidad y estabilidad	0,500 ng/mL

VII.1.3. Absorción en humanos

La absorción sistémica y la seguridad y tolerabilidad de la aplicación tópica de ozenoxacino se evaluó en dos estudios clínicos de fase I para la formulación pomada al 1%, dosis única y dosis repetida (Estudios EC-1 y EC-2, respectivamente), y, en uno adicional de dosis repetida, para la crema al 2% (Estudio EC-3).

VII.1.3.1. Estudio EC-1: Dosis única ascendente pomada de ozenoxacino al 1%.

Estudio clínico de fase I, abierto (*open label*), con dosis única ascendente y en grupos paralelos, para evaluar la absorción sistémica y la tolerabilidad de la aplicación tópica de pomada de ozenoxacino al 1%, en voluntarios sanos.

Estudio realizado en Simbec Research Limited (GB), bajo supervisión médica.

El objetivo principal del estudio era evaluar la absorción sistémica después de una aplicación tópica de ozenoxacino, pomada al 1%, analizando los parámetros farmacocinéticos derivados de las concentraciones plasmáticas de ozenoxacino.

Los objetivos secundarios fueron evaluar la seguridad y tolerabilidad de la aplicación tópica de la pomada de ozenoxacino al 1%.

Producto:

Cada sujeto recibió la aplicación tópica de una de las siguientes dosis de la pomada al 1% de ozenoxacino.

Tratamiento A = Aplicación reducida en la piel (0,05 g pomada en 9 cm² de piel equivalente a un 0,05% BSA).

Tratamiento B = Aplicación media en la piel (0,5 g pomada en 90 cm² de piel equivalente a un 0,5% BSA).

Tratamiento C = Aplicación extensa en la piel (5 g pomada en 900 cm² de piel equivalente a un 5% BSA).

Metodología

Este estudio en paralelo, de dosis única ascendente, se realizó en 24 voluntarios sanos varones caucásicos. Cada sujeto recibió una única aplicación de pomada de ozenoxacino al 1%, en el día 1. Los sujetos llegaron a la unidad, en la mañana del día -1, y se estuvieron allí hasta 36 horas después de la aplicación del producto. Los voluntarios volvieron a la unidad de fase I, para los controles siguientes (48 h, 72 h, y 96 h post-dosis) en los que les extrajeron muestras de sangre. La evaluación de las cohortes se realizó en el Día 5 (96 horas después de la aplicación del producto).

Los niveles plasmáticos se determinaron utilizando un método validado de Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de Masas.

Tabla VII.7	Resumen Método analítico utilizado	
Método de análisis	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/MS	Precisión y exactitud, linealidad, límite inferior de concentración, límite de cuantificación, recuperado, especificidad y estabilidad	0,488 ng/mL

Los datos de Seguridad se obtuvieron, rutinariamente, durante todo el estudio clínico y durante su período de seguimiento, monitorizando todos los efectos adversos, signos vitales y tolerabilidad total.

Criterio de evaluación:

- Farmacocinética: Las variables farmacocinéticas a determinar, para la ratio y extensión de la absorción de ozenoxacino, eran t_{max} , C_{max} , C_{av} , C_{min} , AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$, además del cálculo del $t_{1/2}$.
- Seguridad y tolerabilidad local: La seguridad se testó en términos de la proporción global de sujetos con efectos adversos. La tolerabilidad local en el sitio de aplicación se evaluó como picores, edema, eritema y otros signos o síntomas dermatológicos observados por el investigador y/o descritos por el paciente. Los cambios en los valores de laboratorio (analíticos) y los signos vitales fueron monitorizados.

Duración del estudio

Participación de cada sujeto durante 5 días.

VII.1.3.2 Estudios de Dosis Repetida

VII.1.3.2.1 Estudio EC-2 Pomada

Estudio clínico de fase I, *doble ciego*, cruzado dos a dos, dosis repetidas, controlado por placebo, para evaluar la absorción sistémica y la tolerabilidad de la aplicación tópica en voluntarios sanos, de la pomada de ozenoxacino al 1%.

Estudio realizado en la unidad de fase I de Simbec Research Limited (GB), bajo supervisión médica.

El objetivo principal del estudio fue evaluar la absorción sistémica después de aplicaciones repetidas por vía tópica de ozenoxacino, analizando los parámetros farmacocinéticos derivados de las concentraciones de plasma.

Los objetivos secundarios fueron evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la pomada de ozenoxacino, después de aplicaciones repetidas por vía tópica.

Productos:

Aplicación tópica, sobre un 0,5% de la superficie corporal (BSA), de 0,5 g in 90 cm² de pomada de ozenoxacino al 1% y de pomada placebo.

Tratamiento A: 0,5 g de pomada de ozenoxacino al 1% aplicado sobre una superficie de 90 cm²
Tratamiento B: 0,5 g de placebo pomada aplicado sobre una superficie de 90 cm².

Metodología:

Éste fue un estudio clínico de dosis multiple, cruzado (*2-way crossover*), doble ciego, randomizado y controlado por placebo. En este estudio se incluyeron 20 voluntarios sanos varones de raza caucásica. Todos los sujetos completaron el estudio.

Cada sujeto recibió 19 aplicaciones durante cada periodo del estudio (3 aplicaciones por día - 08:00, 16:00 y 00:00) durante 6 días, y, una única aplicación en la mañana del Día 7, de acuerdo a un código de randomización.

Cada uno de los periodos duró 11 días (del Día -1 al 10, correspondiente a 72h después de la dosis del Día 7). Cada voluntario permaneció en el centro desde el Día -1 hasta, como mínimo, 24 horas después de la dosis del Día 7, y regresaron para la toma de muestras de las 48 y 72 horas siguientes.

Hubo un período mínimo de 14 días de lavado/*wash-out* entre la dosis del Día 7, del periodo 1, y la dosis del Día 1, del periodo 2.

Las muestras de sangre (6mL) para la medición de las concentraciones plasmáticas de ozenoxacino, se recogieron antes de la primera y segunda dosis, el Día 1, antes de la segunda dosis el Día 2, antes de la primera y tercera dosis el Día 3 y el Día 4, antes de cada dosis el Día 5 y el Día 6, antes de la dosis del Día 7 y 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después de la dosis del Día 7.

Los niveles plasmáticos se determinaron utilizando un método validado de Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de Masas.

Tabla VII.8 Resúmen Método analítico utilizado		
Método de análisis	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/MS	Precisión y exactitud, linealidad, límite inferior de concentración, límite de cuantificación, recuperado, especificidad y estabilidad	0,488 ng/mL

Criterio de evaluación:

- **Farmacocinética:** Las variables farmacocinéticas a determinar, para la ratio y extensión de la absorción de ozenoxacino, eran t_{max} , C_{max} , C_{av} , C_{min} , AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$, además del cálculo del $t_{1/2}$.
- **Seguridad y Tolerabilidad Local:** La seguridad se valoró en términos de la proporción global de sujetos que presentaban efectos adversos. La tolerabilidad local en el sitio de aplicación se evaluó en función de picores, edema, eritema y otros signos o síntomas dermatológicos observados por el investigador y/o sujeto. Cambios en los valores del laboratorio (analíticos), el ECG y los signos vitales fueron monitorizados.

Duración del estudio:

Aproximadamente 7 semanas, para cada individuo.

VII.1.3.2.2 Estudio EC-3 Crema

Estudio clínico de fase I, *doble ciego*, cruzado dos a dos, dosis repetidas, controlado por placebo, para evaluar la absorción sistémica y la tolerabilidad de la aplicación tópica en voluntarios sanos, de la crema de ozenoxacino al 2%.

Estudio realizado en la unidad de fase I de Simbec Research Limited (GB), bajo supervisión médica.

El objetivo principal del estudio fue evaluar la absorción sistémica después de aplicaciones repetidas por vía tópica de ozenoxacino, analizando los parámetros farmacocinéticos derivados de las concentraciones de plasma.

Los objetivos secundarios fueron evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la crema de ozenoxacino, después de aplicaciones repetidas por vía tópica.

Productos:

Aplicación tópica, sobre un 0,5% de la BSA, de 0,5 g in 90 cm² de crema de ozenoxacino al 2% y de crema placebo.

Tratamiento A: 0,5 g de crema de ozenoxacino al 2% aplicado sobre una superficie de 90 cm²
Tratamiento B: 0,5 g de placebo crema aplicado sobre una superficie de 90 cm².

Metodología:

Éste fue un estudio clínico de dosis múltiple, cruzado (*2-way crossover*), doble ciego, randomizado y controlado por placebo. En este estudio se incluyeron 20 voluntarios sanos varones de raza caucásica. Todos los sujetos completaron el estudio.

Cada sujeto recibió 19 aplicaciones durante cada periodo del estudio (3 aplicaciones por día - 08:00, 16:00 y 00:00) durante 6 días y una única aplicación en la mañana del Día 7, de acuerdo a un código de randomización.

Cada uno de los periodos duró 11 días (del Día -1 al 10, correspondiente a 72h después de la dosis del Día 7). Cada voluntario permaneció en el centro desde el Día -1 hasta, como mínimo, 24 horas después de la dosis del Día 7, y regresaron para la toma de muestras de las 48 y 72 horas siguientes.

Hubo un período mínimo de 14 días de lavado/*wash-out* entre la dosis del Día 7, del periodo 1, y la dosis del Día 1, del periodo 2.

Las muestras de sangre (6mL) para la medición de las concentraciones plasmáticas de ozenoxacino, se recogieron antes de la primera y segunda dosis, el Día 1, antes de la segunda dosis el Día 2, antes de la primera y tercera dosis el Día 3 y el Día 4, antes de cada dosis el Día 5 y el Día 6, antes de la dosis del Día 7 y 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas después de la dosis del Día 7.

Los niveles plasmáticos se determinaron utilizando un método validado de Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de Masas.

Método de análisis	Parámetros estudiados	Límite inferior de cuantificación
LC/MS/MS	Precisión y exactitud, linealidad, límite inferior de concentración, límite de cuantificación, recuperado, especificidad y estabilidad	0,488 ng/mL

Criterio de evaluación:

- Farmacocinética: Las variables farmacocinéticas a determinar, para la ratio y extensión de la absorción de ozenoxacino, eran t_{max} , C_{max} , C_{av} , C_{min} , AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$, además del cálculo del $t_{1/2}$.
- Seguridad y Tolerabilidad Local: La seguridad se valoró en termino de la proporción global de sujetos que presentaban efectos adversos. La tolerabilidad local en el sitio de aplicación se evaluó en funtion del itching, edema, eritema y otros signos o síntomas dermatológicos observados por el investigador y/o sujeto. Cambios en los valores del laboratorio (analíticos), el ECG y los signos vitales fueron monitorizados.

Duración del estudio:

Aproximadamente 7 semanas, para cada individuo.

APARTADO VII.2. RESULTADOS

VII.2. RESULTADOS

VII.2.1. Absorción *in vitro*

VII.2.1.1. Célula de Franz

En el ensayo de penetración transdérmica *in vitro* realizado a partir de piel humana, utilizando el modelo de célula de Franz, no se ha detectado ozenoxacino en las muestras del líquido receptor, ni tras la aplicación de pomada de ozenoxacino al 1%, ni de crema de ozenoxacino al 1%, ni al 2%. Se han valorado muestras desde 1h hasta 24h después del inicio del ensayo, y los resultados han estado, en todos los casos, por debajo del límite de cuantificación del método analítico utilizado en este estudio (40 ng/mL).

Por tanto, los resultados obtenidos han mostrado que el porcentaje de la dosis de ozenoxacino que ha podido permear a través de la piel, a partir de las cantidades administradas de las formulaciones durante un periodo de 24 horas, es inferior al 0,013% para la pomada de ozenoxacino al 1%, por debajo del 0,010% para la crema de ozenoxacino al 1%, e inferior al 0,005% para la crema de ozenoxacino al 2%. Teniendo en cuenta que se han administrado aproximadamente entre 110 y 153 mg de las formulaciones por cm², que corresponden a entre 2 y 5 mg de ozenoxacino por cm², se estaría hablando de una permeación del producto, a través de la piel humana, inferior a 0,2-0,5 µg/cm².

VII.2.2. Absorción *in vivo*

VII.2.2.1 Rata

VII.2.2.1.1 Rata Ensayo EV-2

Los resultados de absorción dérmica de cuatro geles de ozenoxacino al 1% aplicados en el ensayo de eficacia en la infección dérmica por *S. aureus* en rata (EV-2), se presentan y comentan, también, en este capítulo de absorción. Se aplicaron dosis de 0,1mL (2,6 mg/kg ó 0,26 mg/cm²) en la piel erosionada de ratas depiladas, tres veces al día durante 3 días, y se extrajeron muestras para la valoración de ozenoxacino.

Las curvas de concentración-tiempo en plasma, claramente, han mostrado una función bifásica con una absorción y distribución rápidas, y una eliminación muy lenta. Los valores de T_{max} obtenidos han oscilado entre los 15 y 60 minutos, indicando una aparente rápida absorción. El valor de C_{max} estuvo entre 33,7 y 57 ng/mL. Hubo un efecto de liberación sostenida de la piel al torrente sanguíneo hasta 24h post-administración.

# animales	Patrón de administración	Dosis	Parámetros (unidades)	Resultados			
				GLT11	GLT12	GLT13	GLT14
60 (5 grupos de 12 animales)	0,1 mL 3 veces/día 3 días	2,6 mg/kg 0,26mg/cm ²	T _{max} (h)	0,3	1	0,3	0,3
			C _{max} (ng/mL)	33,7	37,6	49,2	57
			AUC _{0-t} (h·ng/mL)	209,4	326,9	215,6	301,2

VII.2.2.1.2. Rata Estudio EA-1

Los resultados de este ensayo (Tabla VII.11) han mostrado que no hubo absorción en el día 1 (todos los resultados estaban por debajo del límite de cuantificación), excepto en algunos animales del grupo de la dosis intermedia (6,3 mg/cm²).

En cambio, sí se han detectado niveles de ozenoxacino en el análisis de las muestras de plasma recogidas el día 28, el perfil de la concentración media en el tiempo de ozenoxacino en plasma, fue similar entre machos y hembras, para cada dosis y se observó absorción destacable en cada uno de los grupos. Las C_{max} estuvieron entre 4-5 ng/mL para la dosis de

0,1mg/cm², 32-52 ng/mL para la de 0,63 mg/cm², y por sobre de 330 ng/mL para la de 4mg/cm².

Las distintas C_{max} se han obtenido a T_{max} entre 0h (pre-dosis) y 1 h (post-dosis), y luego se ha observado un declive, de manera irregular. La C_{max} ha sido aproximadamente comparable entre machos y hembras a cada una de las dosis, igual que la AUC_{last} a las dosis de 0,1 y 0,63mg/cm²; mientras que a la de 4 mg/cm² ha sido un 167% superior para las hembras. La C_{max} y la AUC_{last} aumentaron de manera proporcional.

Grupo	Dosis (mg/cm ²)	Género	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{last}	AUC _{last} (ng·h/mL)	t _{1/2}
Día 1							
2	0,1	M	0 ^a	NA	NA	0 ^a	NE
		F	0 ^a	NA	NA	0 ^a	NE
3	0,63	M ^b	11,1	8	8	22,2	NE
		F ^b	62,5	24	24	500	NE
4	4	M	0 ^a	NA	NA	0 ^a	NE
		F	0 ^a	NA	NA	0 ^a	NE
Día 28							
2	0,1	M	5,74	0	8	21,6	8,9
		F	4,34	0,25	8	17,1	NE
3	0,63	M	32,4	0	24	279	8,5
		F	52,5	0	24	313	10,5
4	4	M	329	0	24	1500	18,4
		F	355	1	24	4000	21,6

NA: no aplica / NE: no estimado
a: todas las concentraciones plasmáticas estaban por debajo del límite de cuantificación (LOQ)
b: resultados derivados de una única concentración cuantificable

Los resultados de absorción a día 1, para algunos animales del grupo de 0,63 mg/cm² pueden ser debidos a variabilidad experimental, o a una mayor liberación de ozenoxacino, desde la formulación a la piel, a partir de una formulación al 6,3%, que no a partir de una del 40%. En cambio, los datos obtenidos tras 28 días de administración, muestran que la absorción es mayor en el grupo tratado con pomada al 40% respecto al de 6,3%, esto puede ser consecuencia de la liberación sostenida del producto durante 28 días que hace que se comporte distinto a cuando es administrado una sola vez.

VII.2.2.2 Minipig

VII.2.2.2.1. Minipig Pomada Estudio EA-3

No se ha detectado absorción de ozenoxacino en el día 1, tras la administración dérmica de dosis de ozenoxacino entre 0,1 y 4 mg/cm², ya que todos los resultados estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación (0,5 ng/mL), para todos los animales. En el día 28, no se han detectado niveles en los animales de las dosis bajas, en cambio, sí ha habido niveles medibles intermitentes en algunos animales, para las dosis medias y altas, como se observa en la tabla VII.12. Las concentraciones, en este ensayo, han sido bastante variables.

Tabla VII.12 Parámetros Farmacocinéticos durante 28 días tras administración dérmica diaria de ozenoxacino en <i>minipig</i>						
Dosis (mg/cm ²)	Género		C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC _{last} (ng·h/mL)	t _{1/2}
Día 1						
0,1	M	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
	F	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
0,63	M	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
	F	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
4	M	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
	F	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
Día 28						
0,1	M	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
	F	Media	0 ^b	NA	0 ^b	NE
		DS	NA	NA	NA	NA
0,63	M	Media	10,3	24	110	NE
		DS	17,9	NA	190	NA
	F	Media	8,91	24	80,4	NE
		DS	16,9	NA	153	NA
4	M	Media	1,06 ^c	8 ^d	18,4 ^c	NE ^c
		DS	0,23	NA	6,16	NA
	F	Media	5,56	8	87	18,8 ^d
		DS	4,74	NA	74,3	NA

NA: no aplica / NE: no estimado
a: media para t_{max} y t_{last}, n=4
b: todas las concentraciones plasmáticas estaban por debajo del límite de cuantificación (LOQ)
c: n=3
d: n=4

Después de aplicaciones repetidas del producto durante 28 días, la absorción para el grupo al que se le había aplicado 0,1 mg/cm² (dosis estimada como *target dose* en humanos) está, también, por debajo del límite de cuantificación. Niveles intermitentes de hasta 10,3 ng/mL se detectan para las dos dosis altas de 0,63 y 4 mg/cm² tras su administración repetida en *minipig*. Por otro lado, la AUC para el grupo al que se le había administrado la dosis alta es de 18,4-87,0 ng·h/mL.

VII.2.2.2.2. *Minipig* pomada y crema, Estudio EA-4

Los resultados, valorados en C_{max} y AUC₀₋₂₄ que se han obtenido, para las dos formulaciones, muestran que los datos son muy similares entre las pomadas y las cremas de ozenoxacino, que no se observa absorción de las formulaciones al 1%, tras el día uno, y sí, aunque muy limitada, tras 14 días de aplicación. Los resultados de absorción para las formulaciones con concentraciones del 20% de producto fueron detectables ya a día 1, además de a día 14. Los datos globales indican que la exposición sistémica no fue superior con la crema a la obtenida con la pomada.

La máxima exposición, después de la administración de la crema al 20% de ozenoxacino (2mg/cm² de producto) en el día 14, fue muy baja con C_{max} de 12,4 ng/mL y AUC_{0-last} de 76,9 ng·h/mL, y la de la pomada, como se ha comentado, fue algo superior con C_{max} de 38,2 ng/mL y AUC_{0-last} de 285 ng·h/mL, aunque, también, dentro de un rango muy bajo de absorción.

Formulación Dosis	Muestras	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} ng·h/mL)
Ozenoxacino pomada al 1% 0,1 mg/cm ²	Día 1	-	-
	Día 14	1,46	7,23
Ozenoxacino pomada al 20% 2 mg/cm ²	Día 1	3,77	28,2
	Día 14	38,2	285
Ozenoxacino crema al 1% 0,1 mg/cm ²	Día 1	-	-
	Día 14	0,76	-
Ozenoxacino crema al 20% 2 mg/cm ²	Día 1	2,36	19,8
	Día 14	12,4	76,9

En la tabla VII.14 se presentan, de manera general, los resultados de los cinco ensayos de absorción *in vivo* realizados, para facilitar su comparación y posterior discusión.

Especie (Estudio)	Formulación	Dosis de ozenoxacino administrada	C _{max} ng/mL	AUC _{0-last} ng·mL/h	Día	C _{max} ng/mL	AUC _{0-last} ng·mL/h
Rata (EV-2)	Gel	0,26 mg/cm ²	33-57	200-300	←Día 3	No aplica	
Rata (EA-1)	Pomada	0,1 mg/cm ²	-	-	←Día 1	4-5	20
		0,63 mg/cm ²	11-60	22-500		32-52	279-300
		4 mg/cm ²	-	-	Día 28→	330	1500-4000
<i>Minipig</i> (EA-3)	Pomada	0,1 mg/cm ²	-	-	←Día 1	-	-
		0,63 mg/cm ²	-	-		9-10	80-100
		4 mg/cm ²	-	-	Día 28→	1-5	20-90
<i>Minipig</i> (EA-4)	pomada	0,1 mg/cm ²	-	-	←Día 1	1,46	7,23
		2 mg/cm ²	3,77	28,2		38,2	285
	crema	0,1 mg/cm ²	-	-	Día 14→	0,76	-
		2 mg/cm ²	2,36	19,8		12,4	76,9

Las T_{max} para las ratas, tras 28 días de aplicación, fueron a tiempos más cortos, cercanos a la hora, mientras que para los resultados del estudio de *minipigs* estuvieron entre las 8-24h, esto indica una absorción más lenta y sostenida en el tiempo para *minipigs*, y muy rápida en ratas. Los resultados en rata indican que la absorción ha sido bastante mayor que en *minipigs*, tanto a la concentración de 0,63 mg/cm², como, sobretodo a la de 4mg/ cm².

Los resultados para la pomada en *minipig*, administrada 28 días (EA-3) ó 14 días (EA-4) han concordado en las concentraciones de 0,1, 0,63 y 2 mg/cm², mientras que ha habido una disminución considerable de absorción para la pomada al 40% (4 mg/ cm²) respecto la del 20% (2 mg/cm²). En el estudio EA-4, los resultados de absorción de ozenoxacino tras la aplicación de la pomada y la crema al 1% han sido muy similares, absorbiéndose un poco menos la crema que la pomada, tras 14 días de aplicación. En los grupos tratados con pomada y crema de ozenoxacino al 20%, ha ocurrido lo mismo, tanto al día 1 como 14 de aplicación. En todos los casos, la absorción de ozenoxacino a través de la piel en *minipig* ha sido mucho menor que la observada en rata.

VII.2.2. Absorción en humanos

VII.2.2.1. Dosis única ascendente pomada. Estudio EC-1

Absorción

Después de la aplicación tópica, a dosis única, de la pomada de ozenoxacino al 1%, las concentraciones plasmáticas para cada nivel de dosis han estado por debajo del límite inferior de cuantificación (BLQ = 0,488 ng/mL). Estos resultados indican que no se ha observado una absorción sistémica detectable en plasma, después de la administración única por vía tópica de 0,05g, 0,5 g y 5 g de ozenoxacino pomada al 1% (equivalente a 0,5 mg, 5 mg y 50 mg de ozenoxacino, respectivamente).

El límite inferior de cuantificación que permite el método analítico utilizado, de 0,488 ng/mL, se considera el mínimo clínicamente relevante. No se creyó necesario disminuirlo más, aunque técnicamente hubiera sido posible, ya que valores inferiores a 0,488 ng/mL no hubieran aportado mayor representación ni significación clínica.

Seguridad:

Después de la aplicación única de la pomada de ozenoxacino al 1%, once (11) efectos adversos se han reportado durante los periodos de tratamiento del estudio. No se han detectado efectos adversos severos o graves durante el ensayo clínico, ya que todos han sido clasificados como moderados o intermedios en intensidad.

No se han reportado efectos adversos relacionados con el producto después de la aplicación de 0,05 g and 0,5 g de ozenoxacino pomada al 1%.

Se han detectado, tras la aplicación de 5 g de pomada de ozenoxacino al 1%, cinco (5) efectos adversos que se consideraron como posiblemente relacionados con el tratamiento. Tres, de estos efectos adversos, han sido episodios de dolor de cabeza, un episodio de dificultades (soplos) respiratorios y otro de picores.

VII.2.2.2 Dosis repetida

VII.2.2.2.1 Dosis repetida pomada. Estudio EC-2

Absorción

Los resultados para el segundo estudio clínico de fase I con pomada de ozenoxacino han mostrado que, todas las concentraciones plasmáticas de ozenoxacino detectadas han estado por debajo del límite de cuantificación (BLQ = 0,488 ng/mL). Por lo tanto, estos resultados indican que no se ha observado una detectable absorción sistémica en plasma, después de administraciones tópicas repetidas de 0,5g de ozenoxacino pomada al 1% (equivalente a 5 mg de ozenoxacino) durante 7 días (3 veces al día), en una superficie que representa aproximadamente el 0,5% de la superficie corporal (BSA).

Seguridad:

Noventa y seis (96) efectos adversos se han reportado después de las aplicaciones del producto activo o de la formulación placebo. Cuarenta y siete (47) han aparecido después de la aplicación de ozenoxacino al 1%, mientras que cuarenta y nueve (49) lo han sido después de la aplicación del placebo.

El 66,0 % (31/47) de los efectos adversos reportados después de la aplicación de la pomada de ozenoxacino, y el 65,3 % (32/49) de los efectos adversos recogidos durante la aplicación del placebo se han considerado como debidos probablemente a la medicación del estudio (tanto placebo como activo).

Los efectos adversos más comunes detectados (como probables o posiblemente relacionados con la medicación del estudio) han sido pruritos y eritema en el lugar de la aplicación. No se han reportado efectos adversos graves. Un efecto adverso (diarrea) se ha clasificado como severo, el resto lo han sido como moderados o de intensidad intermedia.

VII.2.2.2.2 Dosis repetida crema. Estudio EC-3

Absorción

Los resultados para el estudio clínico de fase I con crema de ozenoxacino han mostrado que, después de la aplicación tópica repetida de 0,5g de crema al 2% (equivalente a 10mg de ozenoxacino), 3 veces al día durante 7 días, todas las concentraciones plasmáticas de ozenoxacino detectadas han estado por debajo del límite de cuantificación (BLQ = 0,488 ng/mL). Por lo tanto, no se ha observado absorción sistémica.

Seguridad:

Ciento ochenta y tres (183) efectos adversos se han reportado en este estudio. Ochenta y dos (82) lo han sido después de la administración de la crema de ozenoxacino al 2%, mientras que ciento un (101) efectos adversos se han reportado después de la administración de la crema placebo.

Como efectos adversos posiblemente relacionados con la medicación del estudio se han considerado un 47,6 % (39/82) de los detectados después de la aplicación del producto activo, y un 58,4 % (59/101) de los reportados después de la aplicación del placebo.

Los efectos adversos detectados como más comunes, después de las aplicaciones repetidas de crema placebo y de crema con ozenoxacino al 2% han sido eritema marginal debido al adhesivo del apósito (adhesive dressing) que se utilizó para cubrir la zona, y, prurito en el lugar de aplicación de las formulaciones. No ha habido diferencias clínicas significativas en los resultados de tolerabilidad total entre el placebo y el producto activo. No se han detectado otros efectos adversos relacionados con el producto, durante el estudio, y es de destacar que, no se han reportado efectos adversos severos, en ningún caso.

No ha habido hallazgos anormales clínicamente significativos en los exámenes físicos durante el estudio. No se han detectado resultados, clínicamente significativos, en la evaluación de los signos vitales. No se han reportado ni ECGs, ni resultados bioquímicos, hematológicos o procedentes del uroanálisis anormales, con significación clínica, en ningún momento del estudio.

APARTADO VII.3. DISCUSIÓN

VII.3. DISCUSIÓN

VII.3.1. Absorción *in vitro* en modelo de piel humana extirpada

En el ensayo de liberación *in vitro*, utilizado para estimar la penetración de ozenoxacino a través de piel humana y vehiculizado en dos formulaciones dérmicas (pomada al 1%, y crema al 1% y 2%) no se ha conseguido detectar el paso del producto desde la parte superior de la piel al líquido receptor.

Con un límite inferior de cuantificación de 40 ng/mL no se ha detectado ningún valor para ozenoxacino en 24h. Por tanto, los resultados obtenidos, en las condiciones de estado estacionario *in vitro* muestran que el máximo porcentaje de la dosis de ozenoxacino que puede, teóricamente, haber permeado a través de la piel en 24h, es inferior al 0,013% para las tres formulaciones evaluadas. Teniendo en cuenta que se han aplicado entre 2 y 5 mg de ozenoxacino por cm², se estaría hablando de una permeación a través de la piel humana inferior a 0,2-0,5 µg/cm².

Los resultados obtenidos van en la línea deseada para el desarrollo del producto, como antibiótico de uso tópico, para que presente la mínima absorción posible a través de la piel y que no pueda llegar al torrente sanguíneo y distribuirse por el organismo, ya que el lugar de la infección diana para este producto por esta vía de administración, son las capas superiores de la piel (Aguzzi, 2008, Nagabushan, 2010, Schöfer, 2010).

Publicaciones en este modelo para otros productos de uso tópico indican, de algunos como clorhexidina, que presentan nula permeación en 300 µm de piel incluso a las 24h (Cornwell, 1995, Karpanen, 2008 y 2011); y de distintas formulaciones de mupirocina, que el producto se libera y desaparece rápidamente de las capas superiores de la piel (hasta un 100% en las primeras horas) (Amrutiya, 2009). En la línea de la aproximación realizada con ozenoxacino, se han utilizado ensayos similares para la optimización de nuevas formulaciones de mupirocina, para conseguir mayor retención y una pauta de administración diaria de 1 ó 2 aplicaciones (Amrutiya, 2009). Por otro lado, está descrita para el ác. fusídico, una alta permeabilidad a través de la piel, y que las concentraciones locales (en epidermis y dermis) que se pueden alcanzar tras administraciones tópicas son más altas que las conseguidas tras la administración sistémica del producto (Scott, 1991, Stüttgen, 1988).

Tal y como se ha demostrado para otros productos dérmicos, la correlación entre los resultados de permeación obtenidos entre estudios *in vitro* e *in vivo* es elevada (Wagner, 2000 y 2002, WHO, 2006). En base a ello, los resultados obtenidos con las formulaciones pomada y crema de ozenoxacino al 1 y 2%, permiten considerar que ofrecen garantías para continuar la investigación y el desarrollo preclínico del producto.

VII.3.2. Absorción *in vivo*

A pesar de las diferencias experimentales, los resultados de los dos estudios de absorción en rata, indican que en esta especie existe una clara absorción de ozenoxacino a través de la piel, al ser administrado por vía dérmica para dosis de entre 0,1 y 4 mg/cm² (1-40%). Se observa una absorción y distribución rápidas, y una eliminación muy lenta, ya que hubo un efecto de liberación sostenida de la piel al torrente sanguíneo hasta 24h post-administración.

La rata es un animal de experimentación ampliamente utilizado (OECD, 2004a), y que aporta una información inicial valiosa, pero se descarta en este desarrollo, ya que su piel se considera poco parecida a la humana, con lo que los resultados de absorción se preveen distintos, o no extrapolables, y existen otras especies que pueden ser de mayor utilidad (Brennan, 1991). Se seleccionó continuar la evaluación de la absorción transdérmica del producto en *minipig*, por ser una especie con piel muy similar a la humana (Jewel, 2007, Mortensen 1998, Wester, 1980).

Los resultados en los dos estudios en *minipigs*, con crema y pomada de ozenoxacino, hasta concentraciones del 40%, han mostrado resultados muy similares. La absorción de la pomada,

administrada durante 14 o 28 días, concuerda para las formulaciones entre 1-20%, mientras que disminuye la absorción de ozenoxacino en pomada al 40% (4 mg/ cm²) respecto a la del 20%. Por otro lado, entre las formulaciones pomada y crema, a la concentración del 1%, preseleccionada para su uso en humanos, la absorción es negligible aunque se absorbe un poco menos la crema.

En todos los casos, la absorción de ozenoxacino a través de la piel en *minipig* es mucho menor que la observada en rata. A pesar de disponer de pocos datos, se observa en ratas, que las T_{max} tras 28 días de aplicación, fueron a tiempos más cortos, cercanos a la hora, mientras que en *minipigs* estuvieron entre las 8-24h; esto indica una absorción mucho más lenta y sostenida en el tiempo para *minipigs*, y muy rápida en ratas.

La conclusión de los estudios realizados es que la absorción sistémica, en *minipig*, de ozenoxacino aplicado dérmicamente en formulación al 1%, durante 28 días, es inferior a 0,488 ng/mL, que es el límite inferior de cuantificación.

Estos resultados globalmente demuestran una negligible absorción de ozenoxacino formulado como crema al 1% en *minipigs*, cuya similitud de la piel con la humana hace que se pueda concluir, de los estudios preclínicos, que la absorción de ozenoxacino a través de la piel será muy baja a la dosis diana en humanos de 0,1 mg/cm², en un máximo del 5% de la BSA.

VII.3.2. Absorción en humanos

En los tres estudios clínicos de absorción, realizados en voluntarios sanos, no se ha detectado niveles de ozenoxacino en plasma que estuvieran por encima del límite inferior de cuantificación (0,488 ng/mL), por lo que no se han podido determinar los parámetros farmacocinéticos. En el primer estudio, a dosis única, no se detectaron niveles ni tras la administración de 50 mg de producto en una superficie de 900 cm². En los dos estudios de administración repetida, no se detectó ozenoxacino en plasma, ni tras tres aplicaciones diarias durante siete días de 5 ó 10 mg en 90 cm² de piel. La cantidad de formulación aplicada, en los estudios de dosis repetidas, ha sido de 5 g de pomada al 1% o crema al 2%, cantidades muy superiores a las hipotéticas a aplicar en humanos, a partir de la información disponible para otros productos similares.

Respecto a la seguridad de ozenoxacino, se destaca que el producto resulta dérmicamente muy bien tolerado tras la aplicación a dosis únicas, incluso elevadas, y a dosis repetidas, en estudios con voluntarios sanos (OECD, 2002). Los efectos adversos más comunes, en muy baja proporción, posiblemente relacionados con el producto son prurito y eritema en el lugar de aplicación, en la línea de los descritos para los comparativos (Gelmetti, 2008, Koning, 2008, Nagabushan, 2010).

Respecto al límite de cuantificación del método analítico, de 0,488 ng/mL, se considera que es suficiente para garantizar seguridad clínica (Nagabushan, 2010). Por tanto, los resultados obtenidos con las formulaciones de ozenoxacino, de no detección de niveles por encima de este valor, se creen suficientes para estimar el no paso del producto al torrente sanguíneo, ni su distribución por el organismo. En esta fase del desarrollo se está estudiando el producto en piel intacta y no lesionada, con sus características diferenciales (Bouwstra, 2006), posteriores estudios completarán su caracterización y seguridad.

La información disponible, que se resume a continuación, sobre la absorción sistémica de las formulaciones tópicas de mupirocina, ác.fusídico y retapamulina indica que, compartiendo el mismo límite de cuantificación, se han detectado niveles superiores, que aún así, tampoco se consideran relevantes.

En el caso de retapamulina, se considera que es un producto con absorción sistémica mínima, habiéndose detectado hasta 7,6 ng/mL tras aplicaciones diarias durante 7 días en 800 cm², con resultados positivos para el 3%(día 1) y el 82% (día 7) de los voluntarios (Cada, 2007). Por otro lado, en un estudio sobre 200cm² de piel erosionada, se detectaron niveles de hasta 22,1 ng/mL en más del 95% de los voluntarios, tanto al día 1 como 7 (Cada, 2007).

De igual manera, para mupirocina, se define como mínima, la absorción sistémica de 0,070-1µg/mL a través de piel intacta y tras dosis repetidas, tanto en adultos como en niños (CDER, 1996, Gilbert, 1989, GSK, 2001, US EPA, 1996, Williford, 1999). Una característica diferencial de mupirocina es su rápido metabolismo sistémico (GSK, 2001), por lo que estos valores no se considera que tengan importancia, desde el punto de vista de niveles bajos de antibiótico circulantes en plasma, o en distintas localizaciones del organismo, que puedan causar problemas de resistencia.

Se considera positivo que se valoren como despreciables los niveles de retapamulina y mupirocina detectados en plasma (GSK, 2001, Rittenhouse, 2006, Schaefer, 1996, Nagabushan, 2010), junto a la idoneidad del límite de cuantificación del método analítico utilizado. Estos hechos refuerzan las conclusiones de los estudios, en la línea de que los valores obtenidos hasta el momento, con las formulaciones pomada y crema de ozenoxacino, los posicionarían dentro del grupo de productos tópicos con absorción negligible o no relevante.

Estos resultados demuestran globalmente una absorción sistémica despreciable de ozenoxacino, formulado como pomada al 1% y crema al 2%, y una excelente tolerancia dérmica de las dos formulaciones, tras administraciones repetidas en humanos. La hipótesis de que el producto no presentaría una absorción relevante en humanos, basada en los resultados obtenidos en los estudios de absorción *in vitro* e *in vivo*, se ha confirmado en los tres estudios clínicos realizados hasta el momento, y, para las dos formulaciones en evaluación.

Estos resultados soportan el posible uso de ozenoxacino para el tratamiento tópico de infecciones no complicadas de piel y estructuras relacionadas, ya que se puede preveer que la absorción sistémica a través de la piel de ozenoxacino será muy baja, aún en piel erosionada o en pacientes, a la dosis diana seleccionada para humanos (0,1 mg/cm² aproximadamente, en un máximo del 5% BSA).

Ozenoxacino, como antibiótico tópico que no se absorbe, podría ser una alternativa útil a los productos de uso oral o parenteral debido al menor riesgo de generar resistencias bacterianas y de causar efectos secundarios (Cho, 2011, Elston, 2009, Gemmell, 2006, Goldfarb, 1988, Kraus, 1997, Leyden, 2003), además de incorporarse al grupo de antibióticos tópicos disponibles (GSK, 2007, Moonsammy, 1997, Parish, 2008, Shawar, 2009, Turnidge, 1999, Vowels, 1996, Ward, 1986, Werner, 1999, Yang, 2008). Por otro lado, los beneficios que puede aportar el uso de este producto para el tratamiento tópico de infecciones de piel y de estructuras relacionadas causadas por patógenos susceptibles, con el aumento de resistencias a otros antibióticos (Deshpande, 2002, Gentry, 2007, Nagabushan, 2010, Pawa, 2000, Shanson, 1990), merecen ser investigados en posteriores estudios clínicos.

Página en blanco

APARTADO VII.4. BIBLIOGRAFÍA

VII.4. BIBLIOGRAFÍA

Aguzzi, C., Rossi, S., Bagnasco, M., Lanata, L., Sandri, G., Bona, F., Ferrari, F., Bonferoni, M.C. y Caramella, C. 2008. Penetration and distribution of thiocolchicoside through human skin: comparison between a commercial foam (Miotens) and a drug solution. *AAPS PharmSciTech*, **9**(4):1185-1190.

Amrutiya, N., Bajaj, M. y Madan, M. 2009. Development of Microsponges for Topical Delivery of Mupirocin. *AAPS*, **10**(2):402-410.

Bouwstra, J.A. y Ponec, M. 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta*, **1758**(12):2080-95.

Brennan, P., Johnson, D., Rider, S., Cone, N., Goldman, M., Buckpitt, A. y Chung, H. 1991. Dermal absorption of niclosamide in rats and minipigs. *Biopharm- Drug. Dispos.* **12**(7):547-556.

Bronaugh, R.L. y Maibach, H.I. 1991. *In vitro* percutaneous absorption. In: Principles, Fundamentals and Applications. Eds., CRC Press, Boca Ratón.

Bronaugh, R.L. y Maibach, H.I. 1999. Percutaneous absorption. Marcel Dekker Ink, NewYork 1999. pp. 117-132, pp. 587-596.

Cada, D.J. y Baker, D.E. 2007. Retapamulin 1% ointment. *Hosp Pharm*, **42**(9):846-855.

CDER. 1996. Application number: NDA 50746 Bactroban cream clinical pharmacology biopharmaceutics review. www.accessdata.fda.gov

Cho, J.S., Zussman, J., Donegan, N. y Miller, L. 2011. Noninvasive *in vivo* Imaging to evaluate immune responses and antimicrobial therapy against *Staphylococcus aureus* and USA300 MRSA skin infections. *J Invest Dermatol*, **131**(4):907-915.

Cornwell, P.A. y Barry, B.W. 1995. Effects of penetration enhancer treatment on the statistical distribution of human skin permeabilities. *Int Journal of Pharmaceutics*, **117**:101-112.

Deshpande, L.M., Fix, A.M., y Pfaller, M.A. 2002. The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Participants Group, and R.N. Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000): correlations of results from disk diffusion, Etest and reference dilution methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **42**: 283-290.

Elewsky, B.E. 2007. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulation *in vitro* in the human cadaver skin model. *Adv Ther*, **24**(2):239-246.

Elston, D.M. 2009. Topical antibiotics in dermatology: emerging patterns of resistance. *Dermatol Clin*, **27**(1): 25-31.

Franz, T.J. 1975. Percutaneous absorption: on the relevance of *in vitro* data. *J Invest Dermatol*, **64**:190-195.

Franz, T.J. 1978. The finite dose technique, as a valid *in vitro* model for the study of percutaneous absorption in man. In: Skin: Drug application and evaluation of environmental hazards, current problems in dermatology. Vol 7. Simon, G., Paster, Z., Klingber, M. and Kaye, M. (Eds), Basel, Switzerland S. Karger. pp.58-68.

Gelmetti, C. 2008. Local antibiotics in dermatology. *Dermatol Ther*, **21**:187-195.

Gemmell, C.G. y cols. 2006. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother*, **57**:589-608.

Gentry, D.R., Rittenhouse, S.F., McCloskey, L. y Holmes, D.J. 2007. Stepwise exposure of *Staphylococcus aureus* to pleuromutilins is associated with stepwise acquisition of mutations in *rpC* and minimally affects susceptibility to retapamulin. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**:2048-2052.

Gilbert, M. 1989. Topical 2% mupirocin versus 2% fusidic acid ointment in the treatment of primary and secondary skin infections. *J Am Acad Dermatol*, **20**(6):1083-1087.

Goldfarb, J., Crenshaw, D., O'Horo, J., Lemon, E. y Blumer, J.L. 1988. Randomized clinical trial of topical mupirocin versus oral erythromycin for impetigo. *Antimicrob Agents Chemother*, **32**(12):1780-1783.

GSK. GlaxoSmithKline Inc. 2001. Product Monograph. Bactroban® (mupirocin). Control No.:072194.

GSK. GlaxoSmithKline. 2007. Altanax. Altanax oficial FDA information, side effects and uses. <http://www.drugs.com/pro/altanax.html>.

Gysler, A., Kleuser, B., Sippl, W., Lande, K., Korting, H.D. y Schafer-Korting, M. 1999. Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharm Res*, **16**:1386-1391.

Jewel, C., Prusakiewicz, J.J., Ackermann, C., Payne, N.A., Fate, G. y Williams, F.M. 2007. The distribution of esterases in the skin of the minipig. *Tox Lett*, **173**(2):118-123.

- Karpanen, T.J., Worthington, T., Conway, B.R., Hilton, A.C., Elliot, T.S.J. y Lambert, P.A.** 2008. Penetration of chlorhexidine into human skin. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**(10):3633- 3636.
- Karpanen, T.J., Casey, A.L., Conway, B.R., Lambert, P.A. y Elliot, T.S.J.** 2011. Antimicrobial activity of a chlorhexidine intravascular catheter site gel dressing. *J Antimicrob Chemother*, **24**(2):239-246.
- Koning, S., van der Wouden, J.C., Chosidow, O., Twynholm, M., Singh, K.P., Scangarella, N. y cols.** 2008. Efficacy and safety of retapamulin ointment as treatment of impetigo: Randomized double-blind multicentre placebo-controlled trial. *Br J Dermatol*, **158**:1077-1082.
- Kraus, S., Eron, L., Bottenfield, G., Henkel, T. y Cupo, M.A.** 1997. Comparison of a new formulation of mupirocin calcium (MC) with oral cephalexin (C) in the treatment of secondarily infected traumatic lesions (SITL). 37th ICAAC / 28 Septiembre-1 Octubre. Poster session: Skin and soft tissue infections. Poster LM-65.
- Leyden, J.J.** The role of topical antibiotics in dermatologic practice. June 25, 2003 (Medscape).
- Moonsammy, G., Marsh, R., Henkel, T. y the Mupirocin Collaborative Study group SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Colledgeville, P.A.** 1997. Potential use of mupirocin calcium ointment in eliminating *Staphylococcus aureus* (SA) outbreak in a hospital setting. 37th ICAAC / 28 Septiembre-1 Octubre. Poster session: Skin and soft tissue infections. Poster LM-66.
- Mortensen, J.T., Brink, P. y Lichtenberg, J.** 1998. The *minipig* in dermal toxicology. A literature review. *Scand J Lab Anim Sci*, **25**(1):77-83.
- Nagabushan, H.** 2010. Retapamulin: A novel topical antibiotic. *Indian J Dermatol Venereol Leporl*, **76**:77-79.
- OECD.** 2002. Series on Testing and Assessment, Number 16, Unclassified, ENV/JM/MONO(99)6; Detailed Review Document on Classification System for Skin Irritation/Corrosion in OECD Member Countries.
- OECD.** 2004a. Test Guideline 427. Skin absorption: *in vivo* method. Organisation for Economic Co-operation and Development, París.
- OECD TG 428.** 2004b. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test Guideline 428. Skin absorption: *in vitro* method. OECD, París.
- OECD.** 2004c. Environmental Health and Safety Publications. OECD Series on Testing and Assessment No 28. Guidance Document for the conduct of Skin Absorption Studies (2004). OECD. París.
- OECD.** 2010. OECD Guidance notes on dermal absorption. TG 417 Draft October 2010.
- Parish, L.C. y Parish, J.L.** 2008. Retapamulin: a new topical antibiotic for the treatment of uncomplicated skin infections. *Drugs Today*, **44**(2):91-102.
- Pawa, A. y cols.** 2000. Co-transfer of plasmids in association with conjugative transfer of mupirocin or mupirocin and penicillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **49**:1103-1107.
- Rittenhouse, S., Biswas, S., Broskey, J., McCloskey, L., Moore, T., Vasey, S. y cols.** 2006. Selection of retapamulin, a novel pleuromutilin for topical use. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**:3882-3885.
- Schaefer, H. y Redelmeier, T.E.** 1996. Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- Schöfer, H. y Simonsen, L.** 2010. Fusidic acid in dermatology: an updated review. *Eur J Dermatol*, **20**(1):6-15.
- Scott, R.C., Corrigan, M.A., Smith, F. y Mason, H.** 1991. The influence of skin structure on permeability: an intersite and interspecies comparison with hydrophilic penetrants. *J Invest Dermatol*, **96**: 921-925.
- Shanson, D.C.** 1990. Clinical relevance of resistance to fusidic acid in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, **27**:495-498.
- Shawar, R., Scangarella-Oman, N., Dalessandro, M., Breton, J., Twynholm, M., Li, G. y Garges, H.** 2009. Topical retapamulin in the management of infected traumatic skin lesions. *Ther Clin Risk Manag*, **5**(1):41-49.
- Stüttgen, G. y Bauer, E.** 1988. Penetration and permeation into human skin of fusidic acid in different galenical formulation. *Arzneim Forsch*, **38**:730-735.
- Turnidge, J.** 1999. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents*, **12**:S23-S34.
- US EPA.** 1996. US EPA 870.7600.
- Vowels, B.R., Feingold, D.S., Sloughfy, C., Foglia, A.N., Konnikov, N., Ordoukhanian, E., Starkey, P. y Leyden, J.J.** 1996. Effects of topical erythromycin on ecology of aerobic cutaneous bacterial flora. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**(11):2598-2604.

CAPÍTULO VII. Absorción transdérmica de ozenoxacino
Apartado VII.4. BIBLIOGRAFÍA

Wagner, H., Kostka, K.H., Lehr, C.M. y Schaefer, U.F. 2000. Drug distribution in human skin using two different *in vitro* test systems: comparison with *in vivo* data. *Pharm Res*, **17**:1475-1481.

Wagner, H., Kostka, K.H., Lehr, C.M. y Schaefer, U.F. 2002. Human skin penetration of flufenamic acid *in vivo/in vitro* correlation (deeper skin layers) for skin samples for the same subject. *J Invest Dermatol*, **118**:540-544.

Ward, A. y Campoli-Richards, D.M. 1986. Mupirocin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, **32**:425-444.

Werner, A. y Russell, A.D. 1999. Mupirocin, fusidic acid and bacitracin: activity, action and clinical uses of three topical antibiotics. *Vet Dermatol*, **10**:225-240.

Wester, R.C. y Noonan, P.K. 1980. Relevance of animal models for percutaneous absorption. *Int J Pharm*, **7**:99-110.

WHO. 2006. EHC 235. Dermal absorption. Environmental Health Criteria (EHC) 235. ISBN 978 92 4 1572 35 4.

Williford, P.M. 1999. Opportunities for mupirocin calcium cream in the emergency department. *J Emerg Med*, **17**(1):213-220.

Yang, L.P.H. y Keam, S.J. 2008. Retapamulin. A review of its use in the management of impetigo and other uncomplicated superficial skin infections. *Drugs*, **68**(6):855-873.

Página en blanco

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	
1	Ozenoxacino presenta una excelente actividad frente a bacterias Gram-positivas, especialmente <i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> y estreptococos, con distintos perfiles de sensibilidad y resistencia a antibióticos, siendo, además, más activo que ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.
2	Ozenoxacino presenta una excelente actividad frente a las cepas MRSA sensibles a ciprofloxacino, incluso multiresistentes a otros antibióticos, mientras que, mantiene una buena actividad frente a las cepas MRSA resistentes a ciprofloxacino.
3	Ozenoxacino posee una potente actividad frente a enterobacterias (<i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> spp, <i>Shigella</i> spp, <i>E.cloacae</i> y <i>Kl.pneumoniae</i>), ligeramente inferior a ciprofloxacino y similar a moxifloxacino y levofloxacino. Esta actividad no se conserva en el caso de cepas resistentes a ciprofloxacino
4	Ozenoxacino presenta una buena actividad frente a las cepas de <i>P. aeruginosa</i> sensibles a ciprofloxacino, ligeramente inferior a ciprofloxacino, y similar a la de levofloxacino y moxifloxacino, que no se conserva, en el caso de que las cepas sean resistentes a ciprofloxacino.
5	Ozenoxacino presenta muy buena actividad frente a bacterias Gram-negativas exigentes tales como <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Helicobacter pylori</i> ; actividad ligeramente superior a ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino.
6	Ozenoxacino presenta una excelente actividad frente a bacterias anaerobias tales como <i>B.fragilis</i> , y, <i>Cl.perfringens</i> , y una moderada actividad frente a las cepas de <i>Cl.difficile</i> , siempre mejor que las quinolonas evaluadas conjuntamente.
7	Ozenoxacino posee una excelente actividad frente especies de patógenos atípicos como <i>Chlamydia</i> spp, <i>Mycoplasma</i> spp, <i>Ureaplasma</i> spp, <i>Legionella</i> spp, siempre superior a levofloxacino; y una buena actividad frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , similar a levofloxacino y mejor que rifampicina.
8	Ozenoxacino presenta mejor actividad que mupirocina y ác. fusídico frente a los patógenos, incluso multiresistentes, implicados en infecciones de piel y estructuras relacionadas (SSSI).
9	Ozenoxacino posee, a las concentraciones testadas en este estudio, una excelente actividad bactericida frente a <i>S. aureus</i> y <i>S. pneumoniae</i> , y, una actividad bactericida más lenta frente a <i>S. pyogenes</i> .
10	Ozenoxacino es muy activo frente a cepas de <i>S. aureus</i> con mutaciones en los genes <i>gyrA</i> y <i>grlA</i> , y mantiene una potente actividad frente a cepas con una mutación doble en <i>grlA</i> y una simple en <i>gyrA</i> .

11	Ozenoxacino no es sustrato de los sistemas de transporte que se inhiben por reserpina, y que afectan a otras quinolonas en bacterias Gram-positivas.
12	Ozenoxacino no favorece la selección de mutantes resistentes, en <i>S. aureus</i> , mediante ensayos en un solo paso o, en múltiples pasos.
13	Ozenoxacino es eficaz en el modelo de infección dérmica por <i>S. aureus</i> en ratón, siendo superior a las formulaciones de mupirocina y retapamulina.
14	Ozenoxacino no se absorbe en humanos tras aplicaciones dérmicas de pomada al 1% y crema al 2% (hasta 7 días, tres veces al día), administrando 5-10mg en 90cm ² .
15	Las formulaciones dérmicas de ozenacino, en pomada y crema, han demostrado una tolerabilidad local excelente en los estudios realizados en voluntarios sanos.

