



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Estudios de eficacia antimicrobiana  
frente a la infección de cuerpo extraño por  
*Staphylococcus aureus*: aplicación de un modelo  
*in vivo* y un modelo dinámico *in vitro***

Cristina El Haj Hidalgo

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Ciencias Clínicas**

**Estudios de eficacia antimicrobiana frente a la infección de  
cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus*: aplicación de un  
modelo *in vivo* y un modelo dinámico *in vitro***

Memoria presentada por

Cristina El Haj Hidalgo

Para optar al grado de Doctora

Barcelona, abril 2017



El Dr. **Javier Ariza Cardenal**, Catedrático de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y el Dr. **Óscar Murillo Rubio**, médico adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari de Bellvitge, hacen constar que la tesis doctoral titulada

**“Estudios de eficacia antimicrobiana frente a la infección de cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus*: aplicación de un modelo *in vivo* y un modelo dinámico *in vitro*”**

que presenta la licenciada Cristina El Haj Hidalgo ha sido realizada bajo su dirección en la Facultad de Medicina del Campus de Bellvitge, Universidad de Barcelona, la consideran finalizada y autorizan su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda.

En Barcelona, abril 2017

Dr. Javier Ariza Cardenal

Dr. Óscar Murillo Rubio



Esta tesis se ha realizado con el apoyo económico de

**Red Española para la Investigación en Patología Infecciosa**

Los estudios han sido financiados por el

**Fondo de Investigaciones Sanitarias**

**Ministerio de Sanidad**

Beca FIS 10/01001 (2011-2013) y FIS 13/00550 (2014-2017)



A mis padres y a mi hermano,





*Discovery consists of seeing what everybody has seen,  
and thinking what nobody has thought.*

Albert Szent



## AGRADECIMIENTOS

La memoria aquí presentada es el fruto de los trabajos realizados durante un largo trayecto en los que han participado de forma directa o indirecta muchas personas sin las cuales no hubiera sido posible. Y aunque esta etapa se acaba, me llevo conmigo cantidad de recuerdos, experiencias, alegrías y un largo etcétera que engloban 5 años en el Laboratorio de Infección Experimental, donde llegué con la idea de realizar unas prácticas de máster y tuve la suerte de incorporarme a un grupo de investigación dirigido por dos grandes médicos, científicos, docentes y personas que me despertaron el interés y entusiasmo por el mundo de la investigación. Mi agradecimiento al Profesor Javier Ariza y al Dr. Oscar Murillo por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Xavier, la meva admiració i el meu agraïment infinit. Gràcies per confiar en mi i donar-me la oportunitat de formar part d'un projecte d'investigació. No puc passar per alt la dedicació constant i el suport que m'has transmès. T'estaré sempre agraïda per formar-me al món de la investigació, amb rigor i esperit crític, però també amb un entusiasme contagiós que ha fet que tingués curiositat, ganes de fer experiments i de saber més. Gràcies per compartir els bons moments i en els no tant bons animar-me a continuar endavant, per fer-me creure en la "màgia", que no se sap com sempre apareix. Pels teus consells invaluables tan professionals com personals. Al Dr. Oscar Murillo, per introduir-me al món dels biofilms i explicar-me la història que hi ha darrera de cada experiment. El meu més sincer agraïment per l'encertada orientació que ha permès un bon aprofitament del treball realitzat, per escoltar els dubtes i ajudar-me a resoldre's. També per la teva disponibilitat, paciència i recolzament en tot moment. Sense la teva ajuda i suport no hagués estat possible. Tots dos m'heu ensenyat la ciència i a fer ciència d'una manera que hauria de ser exemple de tots.

A la Dra. Carmen Cabellos per confiar en mi des del principi, per fer-me sentir una més al laboratori i sobretot per fer-me veure el costat positiu de les coses. Carme moltes gràcies.

A tot l'equip "bone team". En especial a Alba i a Joan, companys en aquesta "aventura" al món dels reactors. Per tot el que hem rigut, xerrat i viscut, gràcies!! A Jaime, por ayudarme en los inicios y siempre estar dispuesto a echar una mano. A Carmen por cederme el testigo y a Kevin por su ayuda y entusiasmo diario.

A la Dra. Carmen Peña per donar-me ànims i a Silvia por compartir las largas horas de laboratorio durante su estancia.

A tot l'equip del Servei de Microbiologia. A la Dra. M<sup>a</sup>Angeles Dominguez y Jordi Càmara por su colaboración. A la Dra. Fe Tubau pel seu recolzament continuo. Gràcies Fe per tota la teva ajuda i suport, perquè he sigut "molt pesada" i sempre m'has rebut amb un somriure. Gràcies també per compartir les celebracions amb mi.

A Sara Martí i a Josep Maria Sierra per aclarir-me dubtes sobre els biofilms. A Susana Arnedo por abrirnos las puertas del Departamento de Anatomía Patológica, por su amabilidad y su ayuda y al Dr. Ribera per la seva col·laboració amb les fotografies al microscopi.

A la Dra. Nuria Lloberas per la seva col·laboració activa. Gràcies Nuria per ensenyar-me el món de la farmacocinètica, per la teva paciència, disponibilitat i amabilitat, per ajudar-me amb els nivells de cotrimoxazol, per les converses sobre investigació i la vida, per animar-me a continuar.

A todo el personal del Estabulario de Bellvitge, en especial a Pilar y a Pedro. Pilar, gràcies pel teu entusiasme, per ajudar-me als meus inicis amb els animals. Pedro, cómplice indispensable, agradecerte de corazón toda tu ayuda y dedicación. Mil gracias por todo, por estar conmigo las largas horas de estabulario, por hacerlo todo más fácil, por estar dispuesto siempre a echarme una mano. Sin ti no hubiera sido posible.

I am deeply grateful to Dr. Sendi and Corinne Ruppen for giving me the opportunity to work with them and expand my knowledge about foreign-body infections.

A Mireia, companya durant molt temps al laboratori i amiga. Gràcies per la teva ajuda i suport tant ara, tot i la distancia, com al començament, per ser un equip, per compartir hores al laboratori i milers d'històries.

A tots els estudiants en pràctiques des dels inicis, en especial a Jordi i Ariadna, dels quals em vaig emportar la seva amistat.

A Eli i a Paula pel seu suport constant, per escoltar-me i compartir experiències. Agrair també a tot el equip del laboratori de Nefrologia i Endocrino: Pere, Gema, Cristian, Elia, Noelia, Claudia, Cristofer per estar sempre disposats a donar un cop de mà, pels riures,

perquè les hores sola al laboratori haurien sigut difícils sense vosaltres. A Núria per compartir conmigo horas de estabulario, por las conversaciones entre operación y operación, gracias!

Esta tesis, como no podría ser de otra manera, la comparto con mis padres y mi hermano. Sin ellos no estaría aquí. Gracias por enseñarme a ser constante, por apoyarme en todo momento, por escucharme y aconsejarme, por las idas y venidas al laboratorio día sí y día también, por entenderme. Por estar conmigo en las situaciones difíciles, por hacerme confiar en mi misma y compartir las alegrías. Esta tesis es vuestra.

A mis abuelos, referencia continua en mi vida, y a mi tío Carlos, porque allá donde estén estarán orgullosos. A mi prima Estefanía y a mi tía Carmen por escucharme y respaldarme en todo momento.

I want to thank the whole family, uncles, aunts and cousins for their constant support.

Als amics d'ara i de sempre, per entendre'm sobretot en aquesta etapa final, en especial a Pol, per les llargues converses sobre investigació i la vida. Per aconsellar-me i animar-me, per les convivències. Ja ho tenim!



## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados de la presente tesis doctoral han sido previamente publicados en revistas científicas y comunicados en congresos.

### Publicaciones en revistas

1. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabo J, Ariza J. 2014. **"Comparative efficacies of cloxacillin-daptomycin and the standard cloxacillin-rifampin therapies against an experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*".** Antimicrob Agents Chemother; 58:5576-80.
2. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza M, Tubau F, Cabo J, Ariza J. 2015. **"Daptomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*."** Int J Antimicrob Agents; 46:189-95.
3. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Garcia-Somoza M, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. 2017. **"The anti-biofilm effect of macrolides in a rat model of *S. aureus* foreign-body infection: Might it be of clinical relevance?"**. Med Microbiol Immunol; 206:31-39.
4. El Haj C, Ribera A, Lloberas N, Tubau F, Fontova P, Ariza J, Murillo O. **"Drawbacks of the use of cotrimoxazole in foreign-body infections"**. Enviado para publicación.

### Comunicaciones en congresos:

1. C. El Haj, O. Murillo, J. Lora-Tamayo, M. Vivas, F. Tubau, J. Cabo, C. Cabellos, J. Ariza. **"Estudio de la actividad in vitro de la combinación Cloxacilina-Daptomicina frente a altos inóculos de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina como fase preliminar a su aplicación en un modelo animal de infección de cuerpo extraño"** (P-140) SEIMC XVII-Zaragoza 29-31 de Mayo 2013



2. C. El Haj, O. Murillo, C. Garrigos, M. Vivas, J. Lora-Tamayo, F. Tubau, X. Cabo, C. Cabellos, J. Ariza. **“High Efficacy of the combination Daptomycin plus Rifampin in an Experimental Foreign-Body Infection by Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*.”** (B-487), Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Denver, 11-13 de Septiembre 2013
3. C. El Haj, O. Murillo, A. Ribera, M. Vivas, J. Lora-Tamayo, F. Tubau, C. Cabellos, X. Cabo, J. Ariza **“Eficacia de la combinación de daptomicina y rifampicina en un modelo animal de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* sensible a meticilina”.** En REIPI, Vall d’Hebron, 27 de Noviembre 2013
4. C. El Haj, O. Murillo, A. Ribera, M. Vivas, J. Lora-Tamayo, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, J. Ariza. **“Eficacia comparativa de la combinación cloxacilina- Daptomicina en la infección experimental de cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina”.** (P-114) SEIMC XVIII-Valencia 9-11 de abril 2014.
5. C. El Haj, O. Murillo, A. Ribera, M. Vivas, J. Lora-Tamayo, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, J. Ariza. **“The effect of combination therapy with clarithromycin in an experimental foreign-body infection by clarithromycin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”.** (EP155); Experimental pathogenesis and treatment; European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen (ECMMID), 25-27 April 2015.
6. C. El Haj, O. Murillo, A. Ribera, M. Vivas, D. García-Somoza, F. Tubau, C. Cabellos, J. Cabo, J. Ariza. **“Estudio comparativo del efecto de claritromicina en terapia combinada en la infección de cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus* resistente a claritromicina.** (P-256); SEIMC XIX - Sevilla 28-30 mayo 2015.
7. C. El Haj, O. Murillo, A. Ribera, C. Ruppen, J. Gómez, F. Tubau, C. Cabellos, J. Ariza. **“Estudio de la actividad in vitro de Ácido Fusídico en solitario y en combinación frente *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a meticilina”.** (P-057). SEIMC XX. – Barcelona 26-28 de mayo 2016.

8. C. El Haj, O. Murillo, A. Ribera, F. Tubau, N. Lloberas, P. Fontova, J. Ariza. **“Inconvenientes en el uso de cotrimoxazol en las infecciones estafilocócicas de cuerpo extraño”**. (P-330). SEIMC XXI.-Málaga 11-13 mayo 2017



## ÍNDICE



## ÍNDICE

	Págs.
Abreviaturas	17
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
<b>1. Infecciones asociadas a dispositivos y cuerpos extraños</b>	<b>23</b>
<b>2. Infecciones de implantes ortopédicos</b>	<b>24</b>
2.1 Epidemiología	24
2.2 Clasificación	25
2.3 Patogénesis: biofilm bacteriano	26
2.3.1 Ciclo de vida	26
2.3.2 Características del biofilm	28
2.4 Etiología de la infección de prótesis articular	30
<b>3. <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>30</b>
3.1 Características microbiológicas	30
3.2 Factores de virulencia	31
3.2.1 Adherencia bacteriana	31
3.2.2 Persistencia bacteriana	32
3.2.3 Evasión de los mecanismos de defensa del huésped	32
3.2.4 Penetración e invasión	33
3.3 Regulación génica	33
3.4 Crecimiento de <i>S.aureus In Vitro</i> : fase exponencial y fase estacionaria	34
<b>4. Antibioterapia de las infecciones de implantes ortopédicos causadas por <i>S.aureus</i>.</b>	<b>37</b>
<b>5. Modelos de infección experimental</b>	<b>42</b>
5.1 Modelos <i>in vitro</i>	42
5.1.1 Modelos estáticos	42
5.1.2 Modelos dinámicos	42
5.1.2.1 Modelo CDC (Centers for Diseases Control) Biofilm Reactor	44
5.2 Modelos <i>in vivo</i>	45

5.2.1	Modelo <i>in vivo</i> de infección de cuerpo extraño en rata por <i>S.aureus</i>	47
<b>II.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	51
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	57
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	61
1.	<b>Selección de las cepas de <i>S.aureus</i>.</b>	61
2.	<b>Agentes antimicrobianos</b>	61
3.	<b>Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i></b>	61
3.1	Concentración mínima inhibitoria y bactericida	61
3.2	Curvas de letalidad	62
3.3	Determinación de la concentración mínima de erradicación de biofilm	64
4.	<b>Tiempo de generación</b>	67
5.	<b>Estudios poblacionales y de exposición a daptomicina</b>	67
5.1	Análisis poblacionales	67
5.2	Estudio de exposición a daptomicina	67
6.	<b>Actividad anti-biofilm de claritromicina</b>	69
7.	<b>Modelo animal</b>	70
7.1	Metodología para la estandarización	70
7.2	Obtención y procesamiento de las muestras	71
7.3	Diseño experimental del modelo de infección de cuerpo extraño en rata: protocolo esquemático.	73
8.	<b>Modelo de CDC Biofilm Reactor</b>	75
8.1	Metodología para la estandarización	75
8.2	Obtención y procesamiento de las muestras	78
8.3	Diseño experimental-protocolo esquematizado	79
9.	<b>Estudios de farmacocinética</b>	80
9.1	Metodología	80

9.1.1	Modelo <i>in vivo</i>	80
9.1.2	CDC Biofilm Reactor	81
9.2	Determinación de los niveles de antibiótico	83
9.2.1	Método del bioensayo	83
9.2.2	Cromatografía líquida de alta eficacia	86
9.3	Selección de las dosis de antibiótico: criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos	87
9.4	Grupos terapéuticos	89
9.4.1	Modelo animal	89
9.4.2	Modelo <i>in vitro</i> de CDC Biofilm Reactor	89
9.4.3	Farmacocinética particular de cotrimoxazol	90
9.4.4	Problemática del ácido fusídico	91
<b>10.</b>	<b>Evaluación del desarrollo de resistencia antibiótica durante el tratamiento</b>	92
<b>11.</b>	<b>Visualización del biofilm al microscopio</b>	94
<b>12.</b>	<b>Estudios estadísticos</b>	95
<b>13.</b>	<b>Ámbito de trabajo y medios disponibles para la realización del proyecto</b>	95
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS (por Objetivos)</b>	101
1.	Objetivo 1	101
2.	Objetivo 2 (artículo 1 y 2)	113
3.	Objetivo 3 (artículo 3)	129
4.	Objetivo 4 (artículo 4)	139
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	159
1.	Estandarización de modelos de infección experimental de cuerpo extraño	159
2.	Eficacia de daptomicina y sus combinaciones en el modelo animal por <i>S.aureus</i> sensible a meticilina (SASM)	163



3.	Eficacia anti-biofilm de claritromicina en el modelo animal por SASM y <i>S.aureus</i> resistente a metilina (SARM)	166
4.	Alternativas terapéuticas orales a la pauta clásica de rifampicina-levofloxacino o rifampicina-linezolid en la infección por SASM y SARM	169
<b>VII. CONCLUSIONES</b>		179
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>		187

## **ABREVIATURAS**

**SASM:** *Staphylococcus* sensible a meticilina

**SARM:** *Staphylococcus* resistente a meticilina

**AUC:** area under the concentration-time curve (área bajo la curva)

**C:** concentración

**f:** free; libre

**C<sub>max</sub>:** concentración máxima

**C<sub>min</sub>:** concentración mínima

**CMI:** concentración mínima inhibitoria

**CMB:** concentración mínima bactericida

**CMEB:** concentración mínima de erradicación de biofilm

**DAIR:** Debridement, Antibiotic and Implant Retention

**HPLC:** high performance liquid chromatography; cromatografía líquida de alta eficacia

**UPLC (UV):** Ultra performance liquid chromatography; Cromatografía Líquida de Ultra-alta eficacia (con detección Ultra Violeta)

**MHA:** Mueller-Hinton Agar

**MHB:** Mueller-Hinton Broth (caldo de Mueller-Hinton)

**TSA:** Trypticase Soy Agar

**TSB:** Trypticase Soy Broth (caldo de tripticasa-soja)

**LC:** líquido de las cajas

**CV:** coverslips

**MO:** microscopio óptico

**SEM:** microscopio electrónico de barrido

## ABREVIATURAS

**TEM:** microscopio electrónico de transmisión

**DAP:** daptomicina

**CXA:** cloxacilina

**RIF:** rifampicina

**LVX:** levofloxacino

**CLR:** claritromicina

**LZD:** linezolid

**TMP:** trimetoprim

**SMZ:** sulfametoxazol

**TMP-SMZ:** cotrimoxazol

**AF:** Ácido fusídico

**Cl:** Clearance

**PBS:** phosphate buffered saline (solución tampón fosfato salino)

**Ip:** intraperitoneal

**Sc:** subcutánea

**Vd:** volumen de distribución

**Vs:** volumen cámara suplementaria

**Vc:** volumen constante

**t<sub>½</sub> :** tiempo de vida media

### **Unidades:**

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**µg:** microgramos

**mg:** miligramos

**Kg:** kilogramos

**min:** minutos

**h:** horas

**mM:** milimolar

**M:** molar

**mm:** milímetros

**μL:** microLitros

**mL:** mililitros

**L:** litros

**nm:** nanómetros



## **INTRODUCCIÓN**



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Infecciones asociadas a dispositivos y cuerpos extraños

El uso de dispositivos médicos ha supuesto uno de los mayores avances de la medicina en las últimas décadas y ha revolucionado la mayoría de las especialidades médico-quirúrgicas. Su utilización se ha multiplicado de forma exponencial, ya sea en la implantación de válvulas cardíacas, marcapasos, endoprótesis y catéteres intravasculares, implantes ortopédicos, catéteres urinarios, derivaciones del líquido cefalorraquídeo y muchos otros[1]. Todos ellos tienen en común la implantación de un cuerpo extraño y el riesgo de la infección asociada al implante como una de las principales complicaciones. La presencia del material extraño favorece la colonización microbiana y su subsiguiente infección con formación del biofilm microbiano. A pesar de las diferencias en el diseño del material de los cuerpos extraños, sus infecciones comparten patrones fisiopatológicos comunes que son:

1. Una alta susceptibilidad a la infección: un número pequeño de microorganismos, frecuentemente de baja patogenicidad, los cuales normalmente podrían ser eliminados por las defensas del huésped, son capaces de producir la infección asociada al cuerpo extraño.
2. Una microflora característica con predominio de *S.epidermidis* y *S.aureus*, pero que incluye también bacterias gram negativas y hongos.
3. La formación del biofilm microbiano condiciona su resistencia antimicrobiana a las diferentes familias de antibióticos y a los mecanismos defensivos del huésped y determina la persistencia de la infección en muchas ocasiones si no se procede a la retirada del dispositivo [2].

Con todo, las infecciones asociadas a dispositivos en el territorio intravascular presentan características específicas en su comportamiento y manejo clínico respecto de las infecciones desarrolladas en el territorio extravascular y requieren una aproximación diferenciada. Entre el grupo de infecciones extravasculares, las infecciones de implantes osteoarticulares ocupan una especial relevancia. En el presente proyecto de investigación se ha desarrollado un modelo animal de infección de cuerpo extraño y un modelo dinámico *in vitro* con un sistema CDC Biofilm Reactor



## INTRODUCCIÓN

que remedan el biofilm de las infecciones extravasculares y en consecuencia el de las infecciones osteoarticulares.

## **2. Infecciones de implantes ortopédicos**

### **2.1 Epidemiología**

Las prótesis osteoarticulares constituyen uno de los mayores avances en la tecnología médica moderna, consiguiendo eliminar el dolor y restablecer la función articular. El número de pacientes sometidos a cirugía protésica ha crecido de forma exponencial en los últimos años. Las indicaciones incluyen traumatismos, enfermedades inflamatorias, degenerativas o neoplásicas, necrosis aséptica, alteraciones del desarrollo epifisario o displasias, entre otras [3]. En España, el número de artroplastias practicadas (cirugía de colocación de prótesis articular) es alrededor de 30.000/año, con mayor frecuencia de rodilla seguida por la de cadera. Otras articulaciones como hombros o tobillos son substituidas de forma mucho menos frecuente [4]. La duración estimada de la viabilidad de las prótesis es de 10 a 15 años, aunque algunas sobrepasan ampliamente ese tiempo. La infección es una de las causas más frecuentes de fracaso de la prótesis, junto con su aflojamiento, la fractura de hueso o la rotura del implante[3].

Las infecciones de prótesis son un problema sanitario de primera magnitud por su dificultad diagnóstica y terapéutica, así como su elevado gasto económico (más de 14.000 euros), que llega a multiplicar por 2 el coste del proceso sin la infección [3,5]. La frecuencia global de infección de prótesis en nuestro país es de alrededor del 3 al 4%, con una incidencia algo más elevada en rodilla que en cadera [6,7]. Estas infecciones ocurren con mayor frecuencia en pacientes con una artroplastia de revisión y en pacientes con diabetes mellitus, artritis reumatoide, obesidad, neoplasia e inmunosupresión. Los factores directamente relacionados con el procedimiento quirúrgico: condiciones de esterilidad del quirófano, duración de la intervención quirúrgica y tipo de procedimiento utilizado son muy determinantes [8,9].

## 2.2 Clasificación

Las infecciones de prótesis se han clasificado en base al tiempo transcurrido desde su implantación hasta la aparición de la infección y su presunta patogenia.

Las clasificaciones más utilizadas son la de Tsukayama, popularizada en 1990 y la clasificación de Zimmerli que dividen las infecciones de prótesis en cuatro categorías.

Son las siguientes, según autor:

AUTOR	TIPO DE INFECCIÓN PROTÉSICA	DEFINICIÓN
Tsukayama[10,11]	Cultivos intraoperatorios positivos (CIOP)	≥2 cultivos intraoperatorios positivos recogidos en pacientes sometidos a revisión por presunto “aflojamiento aséptico” de la prótesis
	Infección posquirúrgica precoz (IPP)	Se manifiesta en el primer mes tras la colocación la prótesis
	Infección crónica tardía (ICT)	Los síntomas de infección se manifiestan tras el primer mes desde la colocación la prótesis
	Infección hematógena aguda (IHA)	Los síntomas de infección aparecen de forma precoz como consecuencia de una bacteriemia (ya sea sospechada o sea probada)
Zimmerli[12]	Precoz	Los síntomas de la infección aparecen entre los tres primeros meses tras la colocación de la prótesis
	Retardada	Los síntomas de la infección aparecen entre los 3 meses y los 2 años tras la colocación de la prótesis
	Tardía	La infección ocurre a partir de los 2 años tras la colocación de la prótesis, como consecuencia de una bacteriemia (ya sea sospechada o sea probada)

**Tabla 1. Clasificación de las infecciones de prótesis. Fuente: Guía GEIO-SEIMC [13].**

La forma clínica de cultivos intraoperatorios positivos (CIOP) y la infección crónica tardía reflejan un mismo escenario clínico: el aflojamiento de la prótesis colocada meses o años antes, con la diferencia de qué en el momento del diagnóstico, en la forma CIOP, ya se ha implantado una nueva prótesis sustituyendo a la infectada. También, estas categorías son equivalentes (exceptuando la limitación del tiempo) a la categoría de infección retardada de Zimmerli. Finalmente, la forma de infección hematógena de Tsukayama es similar a la infección tardía de Zimmerli (de nuevo, exceptuando el límite de tiempo, puesto en 2 años). Las infecciones post quirúrgicas

## INTRODUCCIÓN

precoces y las infecciones hematógenas (tardías, según la clasificación de Zimmerli) podrían ser consideradas como infecciones agudas, mientras que las infecciones crónicas tardías y retardadas corresponden a infecciones crónicas [13].

Esta clasificación de las infecciones de prótesis es útil para la determinación del tratamiento tanto médico como quirúrgico. En los casos de IPP e IHA puede plantearse realizar inicialmente un desbridamiento con retención de la prótesis, mientras que en las ICT es necesario proceder a la retirada de la prótesis, seguida de un recambio en uno o dos tiempos [7,13,14].

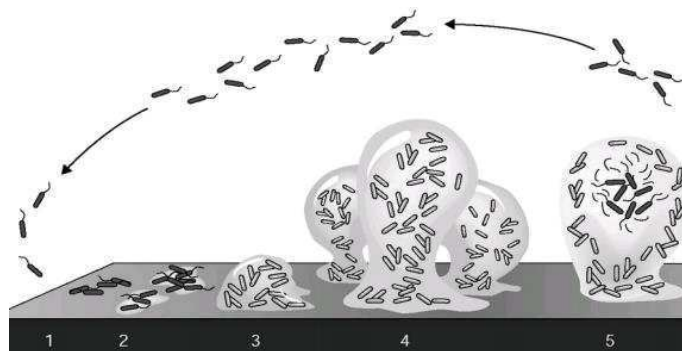
### **2.3 Patogénesis: biofilm bacteriano**

#### **2.3.1 Ciclo de vida**

En la patogénesis de este tipo de infecciones hay interacciones entre el microorganismo causante de la infección, el implante y el huésped. La ausencia de riego sanguíneo del implante dificulta la acción defensiva del huésped y la carga bacteriana necesaria para provocar la infección en presencia de cuerpo extraño es mucho menor (100.000 veces menos) [7,9]. Las infecciones de prótesis son causadas por microorganismos virulentos u oportunistas capaces de formar biofilm. La formación de este biofilm permite a las bacterias adaptarse a las condiciones de un entorno hostil. El ciclo de vida de un biofilm tiene cuatro etapas: adhesión celular, agregación celular, maduración del biofilm y desprendimiento celular (véase Figura 1).

La etapa de adhesión celular está mediada por factores como la carga eléctrica, la hidrofobicidad, la topografía y el tiempo de exposición del implante. Durante la artroplastia, las proteínas del huésped como el fibrinógeno, la fibronectina y la vitronectina son absorbidos sobre la superficie del implante después de su inserción, resultando en la formación de una capa proteica. Este estado de la superficie del biomaterial ayuda a la colonización bacteriana a través de interacciones entre proteínas bacterianas y del huésped. A continuación, se produce una agregación celular. Esta etapa se caracteriza por una proliferación celular en capas, así como por una adhesión celular, formando microcolonias de una o varias especies. Estas estructuras organizadas son entonces rodeadas por una matriz de polisacárido extracelular producida por las

mismas células bacterianas (llamada *slime*), resultando en una masa de alta densidad bacteriana [15]. Este proceso está mediado por componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas de adhesión de la matriz (MSCRAMMS) y un polisacárido llamado PIA (polysaccharide intercelular adhesin) [16,17]. En el caso del biofilm formado por estafilococos, la adhesión celular está mediada por proteínas de adhesión al biofilm tales como la proteína asociada a la acumulación (Aap), la proteína de la matriz extracelular (Emp), la proteína A y la proteína G de *Staphylococcus aureus*. En esta etapa el biofilm todavía es relativamente inestable y susceptible a la erradicación. Para alcanzar su maduración dentro del biofilm deben ocurrir cambios fisiológicos como la regulación del pili, los flagelos y los exopolisacáridos. Esta etapa está principalmente regulada por el gen regulador accesorio (*agr*) del llamado sistema de *quorum sensing* o mecanismo de señalización celular. Durante la maduración, hay una acumulación en el entorno de autoinductores lo que permite a las bacterias percibir la densidad de la población. La acumulación de estos autoinductores activa receptores específicos que alteran la expresión génica y modifican el fenotipo bacteriano [18]. De manera que el biofilm adopta formas sésiles las cuales son resistentes a la erradicación. En la maduración del biofilm, pueden liberarse bacterias planctónicas de la superficie, las cuales se dispersan e invaden otros lugares próximos o distantes, iniciando de nuevo el ciclo [19,20].



**Figura 1. Ciclo de vida de un biofilm: 1. Etapa de adhesión celular: adhesión reversible; 2. Adhesión irreversible y síntesis de la matriz; 3. Etapa de agregación celular: formación de microcolonias; 4. Etapa de maduración y 5. Etapa de dispersión. Fuente: Vozza 2012.**

### **2.3.2 Características del biofilm**

Como se ha comentado anteriormente, las bacterias en el biofilm están rodeadas de una matriz extracelular hidratada formada por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular bacteriano. Las bacterias en las capas superficiales del biofilm están en fase planctónica y son susceptibles a los mecanismos de defensa del huésped específicos (anticuerpos) y no específicos (fagocitos) y son fácilmente erradicadas por los antibióticos. En contraste, las bacterias de las capas más profundas del biofilm están protegidas del sistema inmunitario del huésped y el material extracelular forma una barrera relativamente impermeable a los anticuerpos y fagocitos, estos últimos pueden llegar a atravesar con dificultad la barrera pero pueden ser desactivados [21]. En el interior del biofilm la oxigenación del medio es escasa, hay un alto contenido de productos ácidos de desecho, un pH bajo y una reducción en la aportación de nutrientes, provocando una reducción en la actividad metabólica y un incremento del tiempo de generación de las células bacterianas que se encuentran en este microambiente y se comportan como células durmientes [22].

En este microambiente las bacterias presentan tolerancia antibiótica (véase Figura 2) y su susceptibilidad antibiótica se ve notablemente reducida respecto de la observada en el laboratorio de Microbiología cuando se determina su susceptibilidad en la fase planctónica. Debido a la presencia de la matriz de polisacárido y a la alta densidad celular, el agente antimicrobiano penetra de forma lenta o incompleta en el biofilm, lo que afecta a su difusión. El entorno osmótico dentro del biofilm puede estar alterado, lo que induce a las bacterias a una respuesta al estrés. Esta respuesta podría contribuir al cambio en las proporciones de porinas en las células bacterianas, reduciendo así la permeabilidad de la envuelta celular a los antibióticos. Las bacterias de las capas más profundas del biofilm presentan un metabolismo más lento que las que se encuentran en la periferia (están en fase estacionaria), lo que las protege de aquellos antibióticos que son activos frente a factores implicados en el crecimiento y duplicación de bacterias en fase planctónica. Además, estas bacterias presentan unos patrones de expresión génica que no se observan en las células que están en fase planctónica. Todos estos factores explican las diferencias de susceptibilidad antibiótica observada en estos dos modos de crecimiento bacteriano [23,24].

A pesar de la diversidad entre las bacterias de diferentes regiones del biofilm que exhiben patrones variados de expresión génica, éstas actúan como comunidades con heterogeneidad funcional y estructural como un organismo pluricelular [25]. Hay canales de agua por donde circulan los nutrientes, asemejándose a un sistema circulatorio rudimentario. La liberación de moléculas de señalización de célula a célula (*quorum sensing*) induce a la población bacteriana a responder de forma sincronizada a los cambios en los patrones de expresión genética implicados en la diferenciación del biofilm [26,27].

Así pues la resistencia antibiótica de los biofilms bacterianos depende de las características fisiológicas de las bacterias individuales de la biocapa y de la propia ultraestructura [28].



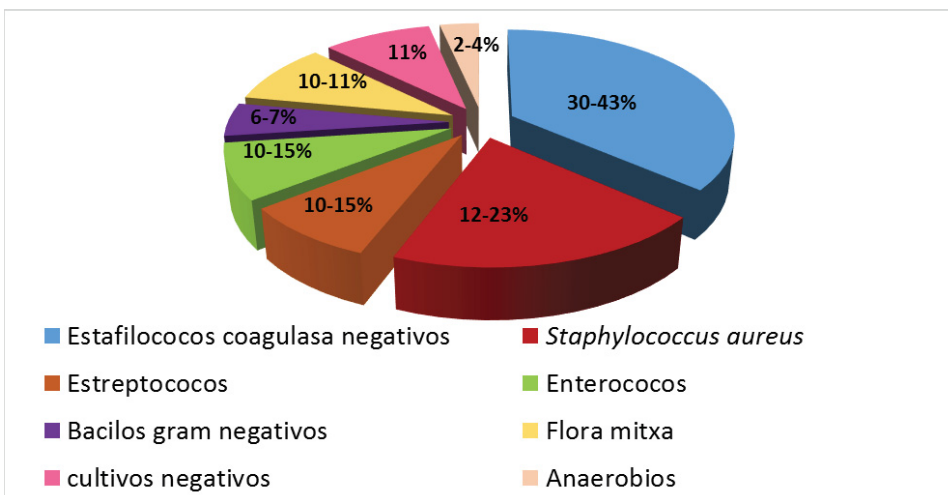
**Figura 2. Mecanismos de tolerancia antibiótica. Se observan zonas de baja penetración (amarillo), de respuesta al estrés (verde), el microambiente alterado (rojo) y las bacterias persistentes (morado). Fuente: ©MSU Center for Biofilm Engineering.**

Todo ello hace que las infecciones de cuerpo extraño sean consideradas de difícil tratamiento, ya que raramente son erradicadas exclusivamente con antibioterapia. Se requiere una estrategia de tratamiento dirigida contra el biofilm que incluye un desbridamiento quirúrgico para disminuir el inóculo inicial y eliminar los tejidos desvitalizados, acompañada o no de retirada del cuerpo extraño y un plan antibiótico prolongado. En el caso de las infecciones postquirúrgicas precoces y las hematógenas agudas se puede intentar un tratamiento conservador con desbridamiento y retención del implante, conocido como DAIR (de sus siglas en inglés Debridement, Antibiotic and Implant Retention), cuyo objetivo es salvar la prótesis y a la vez curar la infección [7,13,29].

## INTRODUCCIÓN

### 2.4 Etiología de la infección de prótesis articular

Los microorganismos involucrados en este tipo de infecciones son diversos. Los más frecuentes son los estafilococos, con una frecuencia del 30 al 43% para estafilococos coagulasa negativos (predominan en la infección crónica (tardía)) seguido de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo, principal agente etiológico en la infección precoz y hematógena) con una frecuencia del 12 al 23%. Los estreptococos y enterococos son los agentes causales en alrededor del 10-15% de los casos, mientras que los bacilos gram negativos parecen haber aumentado en su frecuencia, oscilando ésta (según las series) entre un 6-7% hasta un 25-27% de infecciones. Finalmente, los microorganismos anaerobios representan sólo el 2-4% de los casos, en un 10-11% se identifica una flora mixta y alrededor del 11% los cultivos son negativos [30,31]



**Figura 3. Porcentajes de frecuencia de los microorganismos causantes de infecciones de prótesis.**

### 3. *Staphylococcus aureus*

#### 3.1 Características microbiológicas

Las bacterias de la especie *Staphylococcus aureus* son cocos gram positivos de 0.5-1.5µm de diámetro y presentan un patrón de agrupación característico parecido a un racimo de uvas (del griego *staphylé*: racimo y *coccus*: baya, uva). Son bacterias

inmóviles, no forman esporas y generalmente no poseen cápsula. La mayoría son anaerobias facultativas, catalasa positivas (a diferencia de los estreptococos); capaces de producir la enzima coagulasa, enzima de superficie que convierte fibrinógeno en fibrina, lo que diferencia a *S.aureus* de las demás especies del género *Staphylococcus*. Las colonias se presentan lisas tras su incubación de un color amarillento o dorado debido a que producen un pigmento carotenoides (el nombre *aureus* que significa dorado) (Figura 4).



**Figura 4.** Placa de agar sangre con colonias de *Staphylococcus aureus*.

*S.aureus* fermenta manitol, produce DNAsa y tiende a formar colonias hemolíticas  $\beta$  [32,33]. Se estima que aproximadamente el 20-30% de la población está permanentemente colonizada por *S.aureus*, mientras que otro 30% son portadores intermitentes. Esta colonización representa un incremento del riesgo de infección al proporcionar una reserva de bacterias que pueden introducirse en el organismo cuando se ve comprometida la defensa del huésped. Cuando se rompen las barreras mecánicas es cuando *S.aureus* es capaz de alcanzar tejidos más profundos y producir la infección [34–37].

### **3.2 Factores de virulencia**

*S.aureus* ha desarrollado numerosos factores de virulencia para su supervivencia e invasión del huésped. Entre los cuales encontramos:

#### **3.2.1 Adherencia bacteriana**



## INTRODUCCIÓN

*S.aureus* es capaz de adherirse a los tejidos del huésped mediante proteínas de superficie. Se conocen como *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM). Estas proteínas reconocen a moléculas (fibrinógeno, fibronectina y colágeno) y desempeñan un papel relevante en la patogenia de infecciones asociadas a dispositivos protésicos, endocarditis, osteomielitis y artritis. Destaca el factor de agregación, las proteínas de unión al fibrinógeno, a la fibronectina o a las sialoproteínas óseas. Los MSCRAMM se producen en bacterias que están en fase de crecimiento exponencial lo que favorece la colonización de superficies [38,39].

### **3.2.2 Persistencia bacteriana**

Cuando *S.aureus* coloniza la superficie tisular o protésica tiene la capacidad de formar una biocapa bacteriana mediada principalmente por la producción del polisacárido de adhesión intracelular (PIA) mediado a su vez por un gen *ica*. Como se ha comentado anteriormente, la formación de esta biocapa protege a la bacteria de las defensas del huésped, así como de la acción de los antimicrobianos. Algunas bacterias son capaces de formar lo que se conoce como small-colony variant (SCV), subpoblaciones bacterianas que presentan un crecimiento más lento que sus homólogas de tipo salvaje, con rasgos fenotípicos y patogénicos distintivos. Se encuentran en un estado de semilatenia y pueden sobrevivir dentro de células eucariotas, de manera que evaden los mecanismos de defensa del huésped; presentan susceptibilidad reducida a los antibióticos y además pueden revertir a su estado wild-type produciendo infecciones recurrentes [40,41].

### **3.2.3 Evasión de los mecanismos de defensa del huésped**

Algunos aislados de *S.aureus* son capaces de producir una cápsula polisacárida, especialmente los tipos 5 y 8, con características antifagocíticas y de formación de abscesos. Posee una proteína de superficie llamada proteína A (una MSCRAMM) que es capaz de unirse a la fracción constante de las inmunoglobulinas G (IgG), de manera que éstas no pueden ser reconocidas y así inactiva la actividad opsonizante de esta Ig. Produce también una proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIPS) que interfiere en la migración de los polimorfonucleares (PMN) a los lugares de infección[42]. Otra de las proteínas que ayuda a *S.aureus* a evadir al sistema inmunitario es la proteína de

adhesión celular (Eap). Esta proteína juega un papel importante en la adherencia, pero también en la internalización de *S.aureus* por las células eucariotas y es capaz de modular la respuesta inflamatoria [43]. También puede producir citotoxinas capaces de destruir los PMN [32,39].

Otro de los mecanismos que permite a *S.aureus* evadir el sistema inmunitario del hospedador es su capacidad de supervivencia intracelular.

#### **3.2.4 Penetración e invasión**

*S.aureus* después de la colonización se replica en el foco inicial de la infección y es capaz de producir una gran cantidad de enzimas como proteasas, lipasas, hialuronidasa, fosfolipasa C y elastasas que facilitan la supervivencia bacteriana y ayudan a la instauración de la infección [33,44].

*S.aureus* depende de estos factores de virulencia para colonizar y replicarse en el entorno del sistema inmunitario del huésped.

### **3.3 Regulación génica**

*S.aureus* posee un conjunto de genes que regulan la expresión de los determinantes de virulencia. Para ello dispone de dos sistemas reguladores de dos componentes: el regulador génico accesorio (agr) [45] y el elemento accesorio estafilocócico (sae) [46]. El locus agr regula muchos genes, de los cuales 23 están relacionados con la virulencia [47]. Es responsable del aumento de expresión de muchas exoproteínas y la disminución de la síntesis de proteínas asociadas a la pared bacteriana. Agr forma parte de una vía de transducción de señales de detección de quórum que capta y reacciona al número de bacterias [48]. Por otro lado el locus sae regula la expresión de factores de virulencia envueltos en la adhesión bacteriana, la toxicidad y la evasión del sistema inmunológico [49]. Además, dispone de sistemas reguladores globales, por ejemplo, el regulador accesorio estafilocócico A (sarA) que aumenta la expresión de algunos factores de virulencia y disminuye otros. Todos ellos trabajan de forma interactiva para asegurar la regulación y expresión de los genes de virulencia solo cuando se requieren.

## INTRODUCCIÓN

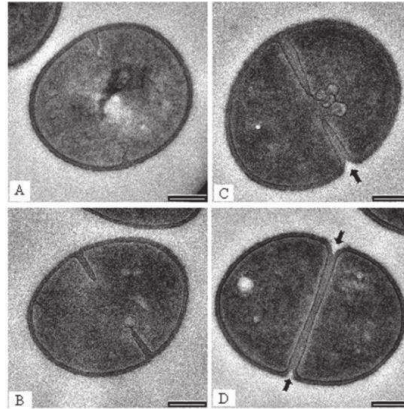
Los sistemas regulados agr y sarA tienen papeles opuestos en lo que respecta al biofilm. Agr limita su formación y ayuda a su dispersión [50] mientras que sarA promueve su formación [51,52].

El control de la producción de determinantes de virulencia dispone de numerosos sistemas de regulación que permite a la bacteria responder a la densidad bacteriana y señales del entorno. Es un proceso complejo que requiere de la expresión coordinada de estos factores durante la infección.

### **3.4 Crecimiento de *S.aureus in vitro*: fase exponencial y fase estacionaria**

Como ocurre en el resto del mundo bacteriano, en el caso de *S.aureus*, los cultivos en el laboratorio muestran un crecimiento bacteriano tanto a nivel celular como poblacional, es decir un incremento en el número de células. El conocimiento de cómo crecen las poblaciones bacterianas y los diferentes estados fisiológicos de estas bacterias son importantes a la hora de entender cómo ocurren y se desarrollan las infecciones, ya que hay una dicotomía entre las células que están en crecimiento y aquellas que están en estado de no crecimiento (durmientes). Sin embargo, todos estos estados poseen la capacidad potencial de poder crecer y replicarse y pueden de esta manera considerarse viables.

En cualquier bacteria en crecimiento, hay una elongación continua hasta que la célula se divide en dos células hijas, lo que se denomina fisión binaria (véase Figura 5). Las dos células se alargan hasta alcanzar aproximadamente dos veces su longitud original y luego se forma un tabique (septo) que separa a la célula en dos células hijas. Por definición, el tiempo transcurrido en el proceso en que una célula se divide para formar dos, se llama tiempo de generación. Durante el tiempo de generación, todos los constituyentes celulares aumentan proporcionalmente, se dice que están en crecimiento equilibrado.



**Figura 5. Fisión binaria de *S.aureus* visto al TEM. Se inicia la formación del septum(A). El borde delantero de cada porción del septo tiene una intrusión de membrana de plasma unida a ella (B y C). Las intrusiones de membrana todavía se pueden ver en los bordes delanteros. El septo es completo y bisecta la célula para formar dos células hijas (D). Fuente: Touhami et al. [53].**

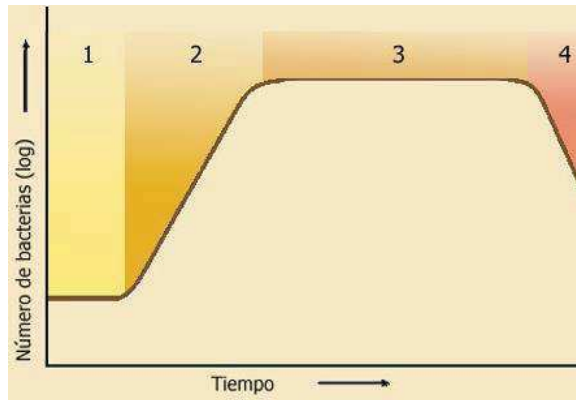
El tiempo necesario para completar una generación en las bacterias es muy variable y depende de varios factores, tanto nutricionales como genéticos. En general, este tiempo es más corto que en células eucariotas. En la naturaleza es probable que las células microbianas crezcan mucho más despacio que a su velocidad máxima, porque raramente se presentan a la vez las condiciones y los recursos que permiten un crecimiento óptimo.

Durante el tiempo de generación tanto el número de células como la masa celular se duplica, lo que llamamos crecimiento exponencial. En un sistema cerrado o con medio no renovado, también llamado cultivo monofásico o en *batch*, el crecimiento exponencial de una población no puede continuar indefinidamente y se obtiene una curva de crecimiento. Esta curva de crecimiento describe un ciclo celular que se divide en fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (véase Figura 6).

Cuando se inocula un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino sólo tras un período de tiempo en el cual la bacteria se adapta a las condiciones. Este periodo se le llama fase lag o de latencia, la cual puede ser breve o prolongada (Figura 6, fase 1).

## INTRODUCCIÓN

La fase exponencial de crecimiento (Figura 6, fase 2) es ese periodo de tiempo en que la bacteria está dividiéndose, aumentando el número de células y la masa en el cultivo. El tiempo que dure este periodo irá en función de los recursos disponibles y de otros factores. Estas células en fase exponencial tienen un muy buen estado fisiológico y son las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales.



**Figura 6. Curva de crecimiento de una población bacteriana donde se observa el número de bacterias durante el tiempo y las fases de latencia (1), fase exponencial (2), fase estacionaria (3) y fase de muerte (4). Fuente: Geopaloma, 2008.**

En un sistema de cultivo cerrado, las bacterias tienen un crecimiento limitado debido a que el suministro de nutrientes está acotado. Un nutriente esencial del medio de cultivo se agota y llega a ser un factor limitante del crecimiento o se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen cesar el crecimiento exponencial y las células pasan a fase estacionaria. En fase estacionaria no hay un aumento ni descenso neto del número de bacterias, sino que las células pasan a estar durmientes, utilizando la energía y su metabolismo para sobrevivir (Figura 6, fase 3). Es en esta fase que las bacterias presentan mayor tolerancia a antibióticos, como hemos comentado anteriormente.

Si se continúa la incubación después de que la población ha alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero finalmente mueren (Figura 6, fase 4) [54].

Estas características del crecimiento bacteriano deben tenerse en cuenta cuando se estudia la actividad antibacteriana *in vitro* en infecciones asociadas a biofilm.

#### **4. Antibioterapia de las infecciones de implantes ortopédicos causadas por *S.aureus*.**

Como se ha comentado, la presencia del biofilm dificulta la penetración y la acción de los antibióticos. Por ello en este tipo de infecciones la antibioterapia requiere la acción concomitante de una intervención quirúrgica para reducir el inóculo inicial y eliminar los tejidos desvitalizados presentes en la prótesis y facilitar así la acción antimicrobiana[7]. Las bacterias pueden mostrar una resistencia fenotípica a antibióticos inicialmente considerados activos según los estudios del antibiograma convencional. Las bacterias del biofilm se encuentran formando capas. En la biocapa más superficial encontramos bacterias en fase planctónica, mientras que en las más profundas están en fase estacionaria y se muestran especialmente resistentes a los antibióticos. La antibioterapia utilizada en este tipo de infecciones requiere de antibióticos que, además de haberse mostrado activos en los estudios de antibiograma convencional, sean capaces de penetrar en las biocapas más profundas y a la vez sean efectivos frente a bacterias en fase estacionaria [55]. Hay que tener en cuenta que los criterios farmacodinámicos de eficacia no son los mismos en una infección de cuerpo extraño que en una infección producida por bacterias en fase planctónica. Aunque no están bien establecidos, se ha considerado que el mejor parámetro de eficacia para este tipo de infecciones es el área bajo la curva (AUC) respecto a la concentración mínima bactericida en fase estacionaria (CMBest.) de dicho fármaco y microorganismo [56,57]. Apenas existen ensayos controlados con criterios de evidencia sobre los tratamientos más idóneos. El papel de los diversos antibióticos con actividad anti-estafilocócica en estas infecciones es diferente dependiendo del microorganismo causante y la antibioterapia disponible [30].

En el caso de las infecciones protésicas agudas, donde existe un alto inóculo bacteriano tanto en fase planctónica (infección purulenta y bacteriémica) como estacionaria (infección con biofilm), se considera que el tratamiento inicial debe incluir antibióticos que muestran gran actividad frente a bacterias en fase planctónica mientras

## INTRODUCCIÓN

que el tratamiento oral secuencial debe orientar su acción antibiótica frente a bacterias del biofilm. De esta manera, en una etapa inicial, aquellas bacterias que están replicándose tras realizar el desbridamiento serán eliminadas y seguidamente se actuará frente a bacterias que se encuentran en fase estacionaria.

La antibioterapia recomendada para este tipo de infecciones (véase Tabla 2) tiene como base el antibiótico rifampicina, por su actividad bactericida anti-estafilocócica frente a bacterias que se encuentran en fase estacionaria y su capacidad de penetración celular y tisular [29,58,59]. Sin embargo no puede administrarse en monoterapia debido al rápido desarrollo de resistencias [60–62]. Se ha demostrado tanto en estudios clínicos como experimentales la eficacia de los tratamientos combinados con rifampicina y su protección frente a la aparición de cepas resistentes [63–66].

Otro agente antimicrobiano con gran actividad anti-estafilocócica son las fluoroquinolonas de más reciente generación (levofloxacin, especialmente, y moxifloxacin), tratamiento oral con buena biodisponibilidad que permite un tratamiento prolongado. Debido a que la mayoría de cepas de *S.aureus* sensible a meticilina (SASM) son susceptibles a este antibiótico, es el tratamiento de elección para las infecciones producidas por esta bacteria. Se ha visto además que su combinación con rifampicina tiene una gran efectividad [62,67]. Sin embargo, las cepas de *S.aureus* meticilín-resistente (SARM) presentan resistencia a las fluoroquinolonas de forma mayoritaria. En este caso y en aquellos en que no se puede administrar este antibiótico debido a alergia y/o intolerancia la combinación de rifampicina con clindamicina, linezolid, trimetoprim-sulfametoxazol o ácido fusídico suelen ser las alternativas utilizadas [30,68,69].

El beta-lactámico cloxacilina y el glicopéptido vancomicina han sido considerados antibióticos clásicos de referencia, frente a SASM y SARM respectivamente. Ambos antibióticos de administración parenteral tienen actividad bactericida mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana frente a bacterias que están en fase replicativa y pierden actividad en las capas más profundas del biofilm [7]. Por esta razón ambos antibióticos se han utilizado en la fase inicial de tratamiento, frente a las

bacterias que podrían estar replicándose tras haber realizado el desbridamiento, usualmente en combinación precoz con rifampicina. Para los beta-lactámicos el índice farmacodinámico que mejor correlaciona con su eficacia clínica es el tiempo (T) durante el cual la concentración del antibiótico supera la Concentración Mínima Inhibitoria ( $T > CMI$ ) [70,71]; mientras que vancomicina obedece una cinética dependiente de concentración [72]. Se ha demostrado sin embargo que la adición de rifampicina a beta-lactámicos antagoniza la acción de éstos [73,74] por lo que su administración suele retrasarse unos días. Por otro lado, el tratamiento con vancomicina se ha mostrado como un tratamiento subóptimo y de eficacia menor a la observada con cloxacilina en las infecciones por SASM [75]. A menudo, las bacterias en el biofilm presentan modificaciones en cuanto al grosor de la pared que comportan una cierta tolerancia a este antibiótico [76–79].

La irrupción de daptomicina en los últimos años ha supuesto un replanteamiento en la búsqueda de una mejor antibioterapia para estas infecciones de difícil tratamiento. Daptomicina es un lipopéptido cíclico, con un espectro de actividad selectivo frente a gram positivos, incluyendo las cepas con resistencia a meticilina. Su mecanismo de acción difiere del de los otros antibióticos con actividad anti-estafilocócica: despolariza el potencial de membrana de estas bacterias produciendo la salida de iones potasio, una rápida inhibición de síntesis de proteínas, DNA y RNA. Su actividad es rápida y bactericida frente a bacterias en fase estacionaria, sin ocasionar lisis celular. Necesita la presencia de iones calcio para poder unirse a la membrana y su administración tiene que ser por perfusión intravenosa. Inicialmente las dosis utilizadas fueron de 4 y 6mg/kg/día por la cautela de su principal efecto secundario, la elevación de las creatinfosfoquinasa y la rabdomiolisis. Debido a su capacidad de penetración en el biofilm, su desarrollo clínico se ha realizado en el tratamiento de infecciones complicadas de piel, endocarditis del lado derecho, en algunos casos de bacteriemias por *S.aureus* y en los últimos años en infecciones osteoarticulares [80–86]. Su perfil farmacocinético y actividad bactericida concentración dependiente, junto con la observación de fallos terapéuticos y desarrollo de cepas resistentes con las dosis administradas, motivó su utilización en dosis superiores (hasta 10mg/kg/día) y en combinación con buena tolerancia. Actualmente, se considera la principal opción de tratamiento para las infecciones de difícil tratamiento



## INTRODUCCIÓN

causadas por SARM [29,87–89], recomendando su utilización en combinación para lograr la mejor eficacia antimicrobiana [90–93].

Recientemente se ha demostrado que la combinación de cloxacilina con el lipopéptido daptomicina mejora la actividad de daptomicina frente a SARM y que además protege frente a la aparición de resistencias a este antibiótico [94–97]. Diversos trabajos realizados *in vitro* y en modelos experimentales en animales que han evaluado la combinación de daptomicina a altas dosis con rifampicina han mostrado resultados esperanzadores debido a su gran eficacia frente al biofilm producido por SARM y a la protección frente a la aparición de resistencias, tanto a rifampicina como a daptomicina, que ofrece la combinación [63,98,99]. Sin embargo, son pocos los estudios clínicos realizados [100–102].

	Terapia recomendada	Alternativa en pacientes con alergia a beta-lactámicos	Duración recomendada
<b>Fase inicial del tratamiento ( bacterias en fase planctónica)</b>			
<u>Tratamiento dirigido</u>			
SASM*	(Cloxacilina o Cefazolina) ± Daptomicina iv	Daptomicina + Fosfomicina iv	x 7-14 días
SARM*	Vancomicina o Daptomicina ± (Cloxacilina o Fosfomicina) iv	Daptomicina + Fosfomicina iv	x 7-14 días
<i>*considerar añadir Rifampicina después del 5º día de tratamiento</i>			
<b>Fase secuencial del tratamiento (bacterias del biofilm)</b>			
<i>Staphylococcus spp</i>			
<u>Tratamiento de elección</u>			
	Rifampicina + Levofloxacino po	-	Hasta completar 8 semanas de tto.
<u>Alternativas sin fluoroquinolonas</u>			
	Rifampicina po + (Daptomicina o Fosfomicina) iv	-	x 2-4 semanas, entonces tto. oral.
	Rifampicina + (LNZ, Ác.Fusídico, CMX, Clindamicina, o Minociclina) po	-	Hasta completar 8 semanas de tto.
<u>Alternativas sin rifampina</u>			
	Daptomicina iv + (Fosfomicina o Cloxacilina) iv	-	x 2-6 semanas entonces tto. oral.
	Daptomicina iv + (LNZ o CMX o Levofloxacino) po	-	x 2-6 semanas entonces tto. oral.
	Levofloxacino + (LNZ, CMX, Clindamicina o Ác.Fusídico) po	-	Hasta completar 8 semanas de tto.
	LNZ + (CMX o Ác.Fusídico) po	-	Hasta completar 8 semanas de tto.
	Clindamicina + Ác.Fusídico vo	-	Hasta completar 8 semanas de tto.
	Levofloxacino o Moxifloxacino po	-	Hasta completar 8 semanas de tto.

**Tabla 2. Terapia antimicrobiana dirigida en el manejo de infecciones de prótesis por *S.aureus* con DAIR. Fuente: Guía GEIO-SEIMC [13]**

**Abreviaciones:** x: duración; CMX: cotrimoxazol; Ác.Fusídico: ácido fusídico; LNZ: linezolid; iv: tratamiento intravenoso; po: per os (tratamiento oral); tto.: tratamiento.

**Dosis recomendadas** (asumiendo función renal normal): Cloxacilina, 2 g/4h ev; Vancomicina, 1g/12h iv; Daptomicina, 8-10 mg/kg/24h iv; Rifampicina, 600 mg/24h po; Levofloxacino, 500-750 mg/24h po; Moxifloxacino, 400 mg/24h po; Linezolid, 600 mg/12h po; Ácido Fusídico, 500 mg/8h po; Fosfomicina, 2 g/6h iv; Cotrimoxazol 800/160 mg/8h po; Clindamicina, 600 mg/6-8h po; Minociclina, 200 mg/24h po.

## **5. Modelos de infección experimental**

A lo largo de los últimos 25 años, se han ido desarrollando diversos modelos experimentales para el estudio de la formación y las características del biofilm de microorganismos concretos en un ambiente específico. Estos modelos han permitido pese a sus limitaciones conocer mejor las particularidades de estas infecciones, así como la actividad de los fármacos estudiados. Deben distinguirse dos tipos diferenciados de modelos: los modelos *in vitro* y los modelos *in vivo*.

### **5.1 Modelos *in vitro***

Los modelos *in vitro* son modelos simplificados que permiten estudiar la arquitectura, formación y fisiología de los biofilms. Son modelos de bajo coste, fáciles de manejar y reproducibles. Mimetizan de forma general con las características biológicas de un biofilm como son el gradiente de nutrientes, de gases, productos metabólicos, la alta densidad celular y la formación de la matriz extracelular [103]. Entre los modelos *in vitro* encontramos:

#### **5.1.1 Modelos estáticos**

Los modelos cerrados o estáticos están limitados en el aporte de nutrientes como en la aeración. Sin embargo, han sido de los más utilizados durante años debido a su sencillez. Son ejemplo de ello el modelo en placa de microtiter y el novedoso modelo “Calgary” para la formación de biofilm. Estos sistemas permiten estudiar la formación del biofilm en superficie, cuantificar su masa como las células viables. Se utilizan para el estudio de tolerancia y resistencia antibiótica del biofilm [104,105].

#### **5.1.2 Modelos dinámicos**

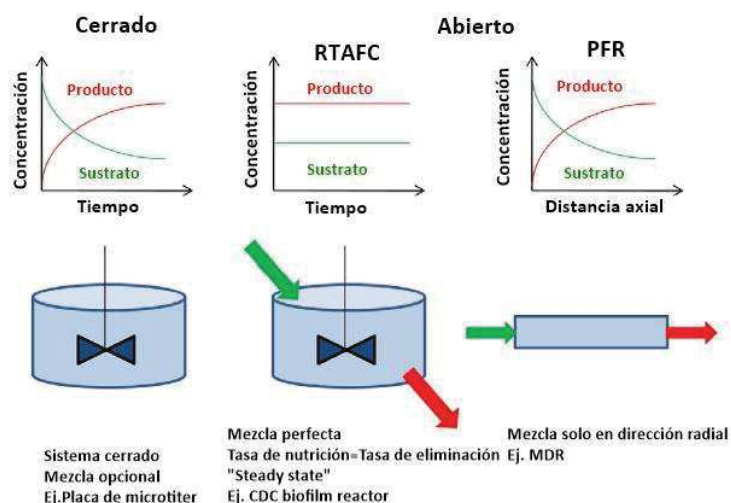
Son sistemas abiertos en los que, a diferencia de los modelos estáticos, se aporta medio con nutrientes de forma continuada y a la vez se eliminan los residuos, subproductos metabólicos, células muertas, etc. Estos sistemas facilitan un control de los parámetros ambientales (fuerzas de cizalla), lo que permite realizar estudios de resistencia química y física de los biofilms. Habitualmente se requiere de un equipo especializado y personal altamente cualificado. Estos sistemas se dividen en dos grandes grupos:

- Reactores de tanque agitado con flujo continuo (RTAFC)
- Reactores tubulares o “plug flow reactor” (PFR)

Los sistemas de reactores de tanque agitado con flujo continuo son perfectamente mezclados y la tasa de nutrientes que se añade al reactor es idéntica a la tasa de eliminación del medio, de esta manera el sistema opera en un estado constante, sin cambios de concentración en el tiempo. Cuando la tasa de dilución es más elevada que el tiempo de generación del microorganismo presente en el reactor, las células planctónicas son eliminadas del reactor y solo las células en fase estacionaria adheridas a la superficie permanecen y son capaces de multiplicarse [106]. Es un ejemplo de ello el modelo CDC Biofilm Reactor (véase siguiente apartado).

En los sistemas de reactores tubulares, el afluente se mueve con una simple conexión en la dirección del flujo (dirección axial) y la mezcla (a través de la infusión) solamente ocurre en la dirección radial [106]. Es un ejemplo el dispositivo modificado de Robbin (MDR) que permite evaluar el efecto de materiales con superficies modificadas o materiales impregnados con agentes antimicrobianos bajo condiciones de flujo [107,108] y ha sido extensamente utilizado como garganta artificial para estudiar la formación de biofilm en prótesis derivadas de laringe [109,110].

Mientras que en los primeros sistemas las condiciones son idénticas en todo el reactor, esto no ocurre en el segundo caso, donde las condiciones ambientales cambian progresivamente a través del reactor (Figura 7).



**Figura 7. Diferencias conceptuales entre los sistemas cerrados y abiertos de reactor de tanque agitado con flujo continuo (RTAFC) y de “plug flow reactor” (PFR). Fuente: T. Coenye et al. 2010[111]**

Etiquetados a veces de simplistas, los modelos *in vitro* han contribuido a nuestro conocimiento del biofilm y todavía se utilizan para estudiar los genes relacionados con la formación y regulación del biofilm, así como el estudio de la eficacia de diferentes agentes antimicrobianos. Sin embargo, estos modelos no tienen en cuenta factores ambientales, factores del huésped, sistema inmunitario, etc. lo que limita en ocasiones la interpretación de los resultados.

### **5.1.2.1 Modelo CDC (Centers for Diseases Control) Biofilm Reactor**

El modelo de CDC Biofilm Reactor es un modelo de reactor de tanque agitado con flujo continuo y fue desarrollado por Donlan et al. en el año 2002 [112]. Consiste en un recipiente de cristal con un tapón de polietileno con ocho brazos de polipropileno desmontables. En cada brazo se insertan tres cupones también desmontables, donde se puede formar el biofilm y están orientados de forma perpendicular al deflector giratorio. En el reactor, el agitador magnético está situado en el centro del recipiente lo que proporciona un flujo continuo de nutrientes sin gradientes (introducido en el reactor por una bomba peristáltica) en las superficies con el biofilm [113,114].

Los estudios previos han demostrado que éste es un modelo experimental fiable para el estudio de la formación de biofilms de un amplio rango de organismos [114,115]. Además, ha sido reconocido como una herramienta adecuada para el crecimiento de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* bajo altas fuerzas de cizalla y flujo continuo por la “American Society for Testing and Materials” (ASTM método estándar E5262-07).

En este modelo, el biofilm se forma de manera simultánea en los 24 cupones idénticos que contiene y permite su estudio en el tiempo [116], la caracterización de su estructura [113], permite testar procedimientos de desinfección y limpieza de dispositivos [117] así como el efecto de agentes antimicrobianos [118]. Otras aplicaciones incluyen la prueba de materiales impregnados con agentes antimicrobianos [119] y la simulación de incrustaciones en catéteres urinarios [120].

Su utilización puede contemplarse como paso previo a los estudios *in vivo* en los animales y también como una alternativa simplificada a éstos, en casos en que los estudios en el modelo animal comportan una particular dificultad. Nuestro grupo disponía de experiencia previa con este sistema en un modelo de infección por *Pseudomonas aeruginosa* [121] y el grupo de Rybak et al. ha reportado diversos estudios en un modelo de infección por *S.aureus* [118,122]. Así decidimos incorporar dicho modelo de CDC Biofilm Reactor con *S.aureus* en nuestro Laboratorio de Infección Experimental.

Si bien este modelo ha sido ampliamente utilizado, se observan ciertas diferencias entre los estudios publicados por lo que concierne al tiempo de acondicionamiento del biofilm (es decir al tiempo de formación de este), así como la restricción del medio utilizado [114,121–123]. Como punto de partida nos propusimos por un lado estandarizar el modelo para conseguir un biofilm lo suficientemente maduro y a la vez que nos permitiera discernir entre las diferentes pautas terapéuticas para luego evaluar los tratamientos.

## **5.2 Modelos *in vivo***

En una infección hay interacciones entre el huésped y las bacterias causantes de la infección, así como entre estas mismas bacterias. La complejidad de estas interacciones dinámicas influye y determinan el destino de la infección. Para el estudio de las infecciones es importante utilizar un modelo adecuado que tenga en cuenta este tipo de interacciones. Como se ha comentado, los estudios *in vitro* simplifican mucho la infección y por ello hace algunos años se introdujeron los modelos *in vivo* para validar los resultados *in vitro* y como primer paso para probar hipótesis y trasladar su información a organismos superiores o a entornos clínicos [124] .

Los modelos animales de infección relacionados con la formación de biofilm permiten estudiar las interacciones del biofilm con el huésped, incluyendo los componentes de defensa y los fluidos corporales, permitiendo hacer un estudio del efecto de las terapias en el biofilm, la toxicidad de un fármaco o su biodisponibilidad. Se han utilizado una variedad de animales en este tipo de estudios, desde cabras a chinchillas para mimetizar la infección. Para realizar este tipo de estudios hay que tener

## INTRODUCCIÓN

en cuenta por un lado el microorganismo que se quiere estudiar, así como el modelo animal más adecuado para poder obtener unos resultados lo más aproximados posibles a la realidad clínica [125].

En el caso de las infecciones relacionadas con dispositivos se han desarrollado numerosos modelos *in vivo* para validar datos *in vitro* sobre cuestiones mecánicas así como para estudiar la prevención y curación dirigida de forma específica a los estilos de vida de las biopelículas [126–128]. Hay dos tipos de modelos animales de infección de cuerpo extraño: los modelos de lugar específico y los modelos subcutáneos. En los modelos de lugar específico el cuerpo extraño se inserta en el órgano o en la misma posición que se utiliza en la clínica. El primer trabajo publicado sobre infecciones en implantes ortopédicos y prótesis articulares utilizando un modelo de osteomielitis en conejo data de 1885 [129]. A pesar de que los conejos se han utilizado mucho en este tipo de modelos, también se han utilizado otros animales y se ha desarrollado una gran variedad de tipos de cuerpos extraños y lugares de infección. Estos modelos se aproximan más a la situación clínica, permitiendo el estudio de la influencia de diversos tipos de materiales tales como acero inoxidable, titanio, cromo cobalto, polietileno o polimetilmetacrilato en la adhesión bacteriana [130,131]. Sin embargo, este tipo de modelos son complicados de realizar y costosos.

En los modelos subcutáneos, el cuerpo extraño se inserta en un “bolsillo” subcutáneo de manera que no hay contacto con ninguna estructura u órgano específico. Son un ejemplo de ello la inserción de piezas de catéteres o el modelo de caja también llamado “tissue-cage model” entre otros. Estos modelos permiten estudiar diferentes aspectos de la infección como la respuesta inmunitaria del huésped y la eficacia de diferentes tratamientos y son más fáciles de realizar que los modelos de lugar específico [126,132].

### **5.2.1 Modelo *in vivo* de infección de cuerpo extraño en rata por *S.aureus***

El modelo de “tissue cage” fue desarrollado en la década de 1980, inicialmente en cobayas, para estudiar la patogénesis de las infecciones de cuerpo extraño por *S.aureus*. En este modelo se inserta un cuerpo extraño de forma subcutánea en el animal que proporciona una superficie artificial donde el biofilm puede formarse y puede ser fácilmente extraído y analizado. Este modelo ha sido ampliamente aceptado y se ha desarrollado utilizando otros animales como ratas, ratones y ponis [126,133–135], así como con otros tipos de microorganismos diferentes a *S.aureus* [56,136–138], permitiendo así el estudio de diferentes aspectos del biofilm, de la respuesta inmunitaria del huésped, la eficacia de diferentes antibióticos y los mecanismos de resistencia a diversos antimicrobianos. A pesar de sus muchas ventajas, hay que tener en cuenta que este modelo simplifica la infección, la localización del cuerpo extraño es subcutánea y hay ausencia de funcionalidad.

Siguiendo nuestra línea de investigación, iniciada por el Dr. Murillo, el modelo de infección de cuerpo extraño utilizado en el presente proyecto de tesis ha sido el modelo de tissue-cage en rata. Este modelo, basado en el de Lucet et al.[139], reproduce la situación en que se encuentra la infección por cuerpo extraño en clínica: persistencia de la infección en el tiempo, presencia de bacterias adherentes y biofilm, tolerancia fenotípica antibiótica con altas CMBs en las bacterias del interior de dicho biofilm y anomalías funcionales en células fagocíticas [61,140]. Este modelo, a diferencia del modelo desarrollado en cobayas, permite el estudio de infecciones tanto agudas como crónicas, así como ensayos terapéuticos largos (de 7 a 21 días) y el uso de betalactámicos (las cobayas presentan intolerancia a este antimicrobiano).

En los años previos al presente proyecto de tesis doctoral, nuestro grupo incorporó el modelo de infección de cuerpo extraño en rata para el estudio de la eficacia antimicrobiana frente a la infección por SASM y fue el motivo de la tesis del Dr. Murillo “Problemática de la antibioterapia en la infección de prótesis articular. Una aproximación mediante un modelo animal de infección de cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus* meticilín-sensible”. Los trabajos realizados fueron exitosos y constataron la gran eficacia de levofloxacino a dosis elevadas, confirmaron que la



## INTRODUCCIÓN

terapia combinada más activa era la de las fluoroquinolonas con rifampicina y que en esta combinación rifampicina tenía un cierto efecto antagonista [141,142].

No obstante, el modelo utilizado de infección de 3 semanas de evolución, resultaba muy exigente y laborioso y reproducía más bien la situación de una infección de prótesis ya evolucionada, en las que la eficacia antimicrobiana era reducida y por tanto las diferencias entre las diversas pautas antimicrobianas difíciles de demostrar. Así en los trabajos posteriores de nuestro grupo, realizados en un modelo de infección por SARM y que fueron motivo de la tesis doctoral de la Dra. Garrigós, "Estudio de la eficacia antimicrobiana en la infección experimental asociada a cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina", se redujo el tiempo de evolución de la infección a 3 días, lo que reproducía con más fidelidad una infección aguda y permitía una mejor diferenciación entre la actividad antimicrobiana de las diversas pautas de antibioterapia estudiadas. Los resultados más relevantes de estos estudios en la infección por SARM fueron la gran eficacia que mostró daptomicina a dosis elevadas en combinación con rifampicina, siendo el tratamiento más efectivo y la mejora de la actividad de daptomicina en combinación con cloxacilina [97,99].

En el presente proyecto de tesis, se trasladó la experiencia acumulada de un modelo de infección aguda por SARM a un modelo de infección por SASM, en el que se pudiera modular el grado de exigencia de la infección aguda (modelo de biofilm de 3 días y 7 días). Esta mayor elaboración de los tipos de infección desarrollados permitiría una mejor adaptación de los modelos en función de las diferentes pautas antimicrobianas a estudio.

**JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

**E HIPÓTESIS DE TRABAJO**



## II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como se ha desarrollado en el capítulo previo de la Introducción, las infecciones de prótesis articulares suponen un problema sanitario de primera magnitud, debido a la falta de tratamientos efectivos y al alto coste económico que ello supone. Entre ellas, las causadas por *Staphylococcus aureus* tienen una particular relevancia, por su frecuencia y dificultad de manejo clínico. En los últimos años se han hecho diversos estudios clínicos multicéntricos que han proporcionado información valiosa para abordar estas infecciones. Entre ellos nuestro grupo ha podido contribuir de forma significativa en los trabajos colaborativos de la Red Española de Investigación de Patología Infecciosa (REIPI) reconocida por el ISCIII y el Grupo de Estudio de la Infección Osteoarticular de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas (GEIO-SEIMC). A pesar de disponer de pautas de antibioterapia bien estandarizadas, los resultados clínicos cuando se hace una aproximación terapéutica conservadora en las infecciones agudas, intentando la erradicación microbiana sin retirada de la prótesis, distan de ser óptimos. Es en este escenario, en el que el infectólogo se encuentra particularmente interpelado, ya que la exigencia de la eficacia bactericida antimicrobiana requerida es muy grande. Así, diversas alternativas y combinaciones terapéuticas no han sido bien establecidas y deben ser exploradas.

Los modelos *in vitro* e *in vivo* han contribuido de forma muy decisiva al conocimiento y manejo adecuado de las enfermedades infecciosas y en particular al de las infecciones osteoarticulares y las asociadas a biofilm. En este terreno, el conocimiento de los diversos mecanismos implicados en la tolerancia antibiótica fenotípica bacteriana en el seno de biofilm y su repercusión variable en las diversas familias de antibióticos ha resultado fundamental para progresar en el diseño de mejores pautas terapéuticas. Nuestro grupo tiene una amplia trayectoria en el campo de la infección experimental de cuerpo extraño desarrollada en el Laboratorio de Infección Experimental de la UB en el Campus de Bellvitge, actividad que ha estado integrada como plataforma de Infección Experimental de REIPI. Se estandarizó primero un modelo de infección de cuerpo extraño de evolución prolongada (biofilm de 3 semanas de evolución) por SASM en la rata, que permitió abordar principalmente la eficacia de la rifampicina y las fluoroquinolonas. Posteriormente, se desarrolló un

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS DE TRABAJO

modelo de infección aguda (biofilm solo de 3 días) en SARM, que dio pie al estudio de la eficacia de daptomicina y en particular la de sus combinaciones con cloxacilina y con rifampicina.

En el presente proyecto, nos planteamos incorporar algunos de los hallazgos observados en los anteriores estudios en la infección por SARM al modelo de infección por SASM. Así se consideró desarrollar un modelo de infección de cuerpo extraño de evolución aguda por SASM con exigencia variable (biofilm de 3 o 7 días) en la rata, para dar la salida más adecuada a la comparativa de eficacia de las diferentes pautas de antibioterapia, en función de sus particulares características. También se planteó estandarizar un modelo dinámico de biofilm *in vitro*, mediante el sistema CDC Biofilm Reactor, como una alternativa simplificada del modelo *in vivo*, que pudiera servir de screening como paso previo a estudios en el modelo *in vivo* y también para poder evaluar aquellas pautas antimicrobianas de difícil utilización en la rata. Asimismo, nos pareció de especial interés, comprobar el comportamiento de daptomicina en solitario y en sus combinaciones en la infección por SASM y estudiar algunos aspectos específicos de las pautas antimicrobianas anti-estafilocócicas, hasta ahora poco conocidos. Entre ellos, abordamos el de la eficacia anti-biofilm de la claritromicina y el de antibióticos alternativos como cotrimoxazol y ácido fusídico en monoterapia o en combinación con rifampicina, en comparación con las combinaciones más utilizadas de rifampicina-levofloxacin o rifampicina-linezolid

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

1. La estandarización de un modelo de infección aguda de cuerpo extraño por SASM, de exigencia variable (biofilm de 3 o 7 días de evolución) en la rata, permitiría adecuar mejor el modelo a utilizar en función de la actividad de las pautas antimicrobianas a estudio.
2. La estandarización de un modelo dinámico de biofilm *in vitro* mediante el sistema del CDC Biofilm Reactor sería útil como herramienta complementaria al modelo *in vivo*.
3. La eficacia de daptomicina en monoterapia o en sus diversas combinaciones en la infección por SASM podría ser similar a la observada en la infección por SARM y podría

incorporarse, por tanto, a las pautas de tratamiento de infección de prótesis articular por SASM.

4. La claritromicina podría tener un efecto anti-biofilm frente a *S.aureus*, independiente de su actividad estrictamente antimicrobiana, y proporcionar un beneficio terapéutico adicional en este tipo de infecciones.

5. Cotrimoxazol y ácido fusídico podrían suponer una alternativa terapéutica en las infecciones estafilocócicas de cuerpo extraño, pero su eficacia real no es conocida.

6. Las combinaciones de rifampicina con linezolid o cotrimoxazol son pautas alternativas de eficacia similar, pero comparativamente inferior a la de la pauta estándar de rifampicina con levofloxacino.



## **OBJETIVOS**





### **III. OBJETIVOS**

- 1. Estandarización de modelos de infección experimental de cuerpo extraño**
  - 1a.** Modelo de infección de evolución aguda de exigencia variable por SASM en la rata
  - 1b.** Modelo dinámico de biofilm *in vitro* por SASM y SARM en un sistema CDC Biofilm Reactor
  
- 2. Eficacia de daptomicina y sus combinaciones en el modelo animal por SASM**
  - 2a.** Eficacia de daptomicina-cloxacilina
  - 2b.** Eficacia de otras combinaciones de daptomicina
  
- 3. Eficacia anti-biofilm de claritromicina en el modelo animal por SASM y SARM**
  
- 4. Alternativas terapéuticas orales a la pauta clásica de rifampicina- levofloxacino o rifampicina-linezolid en la infección por SASM y por SARM.**
  - 4a.** Eficacia de cotrimoxazol y ácido fusídico en monoterapia en el modelo animal
  - 4b.** Eficacia de cotrimoxazol y su combinación con rifampicina en el modelo de biofilm *in vitro* CDC Biofilm Reactor



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Selección de las cepas de *S.aureus*.**

Se utilizaron diversas cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles (SASM) y resistentes a meticilina (SARM). Las cepas de SASM fueron una de colección American Type Culture (ATCC) 29213 y dos de origen clínico (casos con bacteriemia osteoarticular: cepas HUB2 y HUB3), que fueron seleccionadas por su resistencia a claritromicina, característica indispensable para realizar los estudios del objetivo número 3. Las cepas de SARM fueron una de la colección ATCC (BAA-39; Hungarian) y una de origen clínico de una infección osteoarticular (HUB1) sensibles a rifampicina. Para los estudios con cotrimoxazol se seleccionó la cepa ATCC 29213 y HUB1 por ser sensibles a este antibiótico.

### **2. Agentes antimicrobianos**

En los estudios *in vitro* se utilizó la sustancia purificada de cada antibiótico, resuspendida siguiendo las recomendaciones de sus respectivos laboratorios. Para los estudios *in vivo* se usaron preparados comerciales con las convenientes diluciones para conseguir un volumen final adecuado para ser administrado a los animales. Los antibióticos fueron suministrados por: Ácido Fusídico (Farmacia Carreras, Barcelona, España), Claritromicina (Laboratorios Abbot, Madrid, España), Cloxacilina (Laboratorios Normon, Madrid, España), Daptomicina (Novartis, Barcelona, España), Rifampicina (Sanofi-Aventis, Madrid, España), Levofloxacino, Trimetoprim y Sulfametoxazol (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### **3. Estudios de sensibilidad *in vitro***

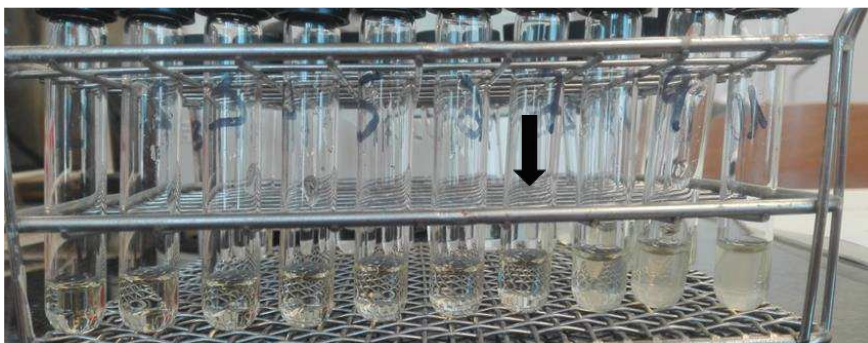
#### **3.1 Concentración mínima inhibitoria y bactericida**

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de cada antibiótico para cada cepa en fase exponencial siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) por los métodos de macro y microdilución [143].

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se determinaron también las CMBs con inóculos en fase estacionaria siguiendo el protocolo previamente descrito [144].

Se describe CMI como la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento macroscópico bacteriano y CMB la concentración mínima de antibiótico capaz de erradicar el 99.9% del inóculo inicial.



**Figura 8. Método de macrodilución para la determinación de la CMI. Se observan tubos con concentraciones decrecientes de antibiótico (de izquierda a derecha) y la CMI (primer tubo de mínima concentración de antibiótico donde no se observa turbidez (flecha)).**

En los estudios realizados para CDC Biofilm Reactor, se recuperaron bacterias de los cupones y el medio de cultivo y se determinaron las CMBs para cloxacilina siguiendo el protocolo descrito. En el caso de los estudios para cotrimoxazol y el posible efecto de la timidina inherente en la rata en su actividad, se determinaron las CMIs para la cepa SASM 29213 con una modificación del protocolo previamente descrito. Se utilizaron muestras del líquido de las cajas de los animales que contenía diversas concentraciones del antibiótico, así como la timidina del animal y se mezclaron en una proporción 1:1 con Mueller Hinton Broth (MHB (Becton Dickinson, Madrid, España)). En los dos casos se compararon las CMIs y CMBs obtenidas para cada antibiótico con las de la cepa original.

### **3.2 Curvas de letalidad**

Las curvas de letalidad son el método más utilizado para evaluar el efecto bactericida de un antibiótico. La información obtenida con diversas curvas de letalidad con concentraciones distintas de antibiótico revela si el efecto antimicrobiano es tiempo- o concentración-dependiente [145].

Se realizaron curvas de letalidad en fase exponencial con inóculos estándar, inóculos elevados y en fase estacionaria.

Las curvas de letalidad en fase exponencial con inóculos estándar se realizaron siguiendo las recomendaciones de CLSI [146]. Las concentraciones de antibiótico utilizadas fueron entre  $\frac{1}{4}$  xCMI y 128 xCMI en base a los niveles séricos alcanzados en suero humano con las dosificaciones convencionales. Se incubó la cepa en tubos de 10mL de trypticase soy broth (TSB (Becton Dickinson, Madrid, España)) hasta alcanzar concentraciones 0.5McFarland. Después, a partir de estos tubos se prepararon inóculos de  $10^5$  UFC/mL en tubos con 10mL de MHB a los que se añadieron un antibiótico en solitario o en combinación y se incubaron durante 24h en agitación a 37°C. Se extrajeron muestras para realizar recuentos bacterianos a las 0, 6 y 24 horas de haber iniciado el experimento. La actividad antimicrobiana se calculó a partir de los descensos en los recuentos bacterianos al finalizar el experimento.

Las curvas de letalidad en fase exponencial con inóculos elevados ( $10^8$  UFC/mL) se realizaron siguiendo la misma metodología que la utilizada con inóculos estándar, con una modificación en la preparación del inóculo. Se dejó crecer la cepa bacteriana en tubos de 10mL de TSB hasta alcanzar concentraciones 1 McFarland. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en menor volumen de MHB para concentrarlo y alcanzar inóculos de  $10^9$  UFC/mL. Luego se realizaron diluciones 1/10 en el tubo final para obtener inóculos de  $10^8$  UFC/mL.

En las curvas de letalidad en fase estacionaria se utilizaron concentraciones de antibiótico de un rango mayor que en fase exponencial debido a la tolerancia antibiótica que presentan estas bacterias. Las concentraciones de antibiótico utilizadas estuvieron entre la concentración máxima del antibiótico alcanzada en el líquido de las cajas en los animales y la concentración valle (concentración previa a la administración de la siguiente dosis de antibiótico). En todos los casos, las concentraciones utilizadas eran alcanzables en el suero humano. La preparación del inóculo requirió en este caso de 16 horas de incubación, para luego ser centrifugado y resuspendido en un volumen menor para concentrarlo hasta  $10^9$  UFC/mL como se ha comentado anteriormente. Luego se realizó la dilución 1:10 en el tubo final que contenía un medio restrictivo (4%MHB y 1%



## MATERIAL Y MÉTODOS

de glucosa (VWR International Eurolab, Barcelona, España)) para mantener las bacterias en fase durmiente. Igual que anteriormente, se incubaron en agitación durante 24 horas a 37°C. En este caso, se extrajeron muestras a las 0, 8 y 24h de haber iniciado el experimento, para dar un mayor margen inicial de actuación a los antibióticos.

Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de las muestras extraídas en todas las curvas y se incubaron en placas de Trypticase Soy Agar (TSA, Becton-Dickinson, Madrid, España) con 5% de sangre y se incubaron a 37°C durante 48 horas.

Todos los experimentos realizados con daptomicina contenían calcio (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania) a concentración de 50mg/L.

La actividad del antibiótico se definió como bactericida cuando conseguía erradicar el 99,9 % del inóculo inicial (esto es, un descenso en el recuento bacteriano final  $\geq 3$  log UFC/ml). En los estudios de actividad de las combinaciones de antibióticos se definió como efecto sinérgico el aumento  $\geq 2$ log UFC/mL en la letalidad de la combinación respecto al antibiótico en solitario más activo, indiferencia como un cambio menor de 2 log (aumento o descenso) y antagonismo como un descenso en la letalidad de la combinación  $\geq 2$  log. Todas las curvas de letalidad tuvieron tres o más replicas.

### **3.3 Determinación de la concentración mínima de erradicación de biofilm**

Para calcular la concentración mínima de erradicación de biofilm (CMEB) se siguió el protocolo desarrollado por Harrison et al. [147] en placas de microtiter de 96 pocillos (Innovotech Inc., Edmond, Canadá) que contienen unas tapas con clavijas donde se forma el biofilm (Figura 9).



**Figura 9. Placa de microtiter de 96 pocillos con tapa que contiene las clavijas donde se adhiere el biofilm formado. Fuente:©Innovotech Inc.**

Inicialmente se descongelaron las cepas y se hicieron dos subcultivos consecutivos en placas de agar. Se preparó a continuación una suspensión de la cepa en medio líquido (MHB) y se incubó en agitación a 37°C hasta 1 McFarland. Seguidamente se hizo una dilución 1:30 del inóculo en MHB con 0.25% de glucosa. En una placa de microtiter se dispuso de 100 µl de esta dilución en cada uno de los pocillos y se cerró con la tapa de manera que las clavijas encajaran perfectamente en los pocillos. Se realizó un control del inóculo.

Se dejó incubar la placa en agitación a 37°C durante 21-24h. Pasado el periodo de incubación, se limpiaron las clavijas en 200µl de solución tampón fosfato salino (PBS, (LabClinics S.A, Barcelona, España)) durante 1 minuto.

Se preparó luego una nueva placa de microtiter donde en cada pocillo se colocó 200 µl del antibiótico a estudiar a diferentes concentraciones. La tapa que contenía las clavijas donde se había formado el biofilm se colocó encima de la placa de microtiter de manera que quedaban sumergidas en el medio con antibiótico. Se incubó de nuevo en agitación a 37°C durante 24 horas (Figura 10).

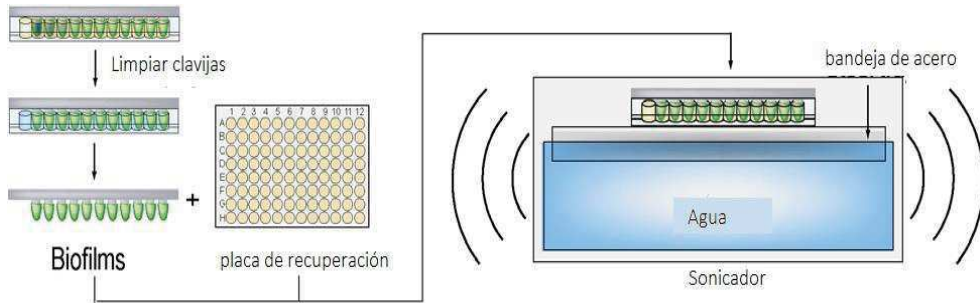


**Figura 10. Exposición de los biofilms a diferentes concentraciones de antibiótico. Tras la incubación de los biofilms, se hace un lavado y se trasladan a una placa que contiene las diferentes concentraciones de antibiótico. Fuente: ©Innovotech Inc.**

Pasado el periodo de incubación, se limpiaron las clavijas en 200µl de PBS durante 1 minuto. En una nueva placa de microtiter se colocaron 200µl de MHB suplementado con 0.25% de glucosa. Se puso la tapa de clavijas encima de la nueva placa de microtiter y se sonicó en un baño de ultrasonidos (BRANSON 5510; Afora) durante 5-10 minutos para que el biofilm de las clavijas pasara al medio de cultivo. Luego se desechó la tapa y se

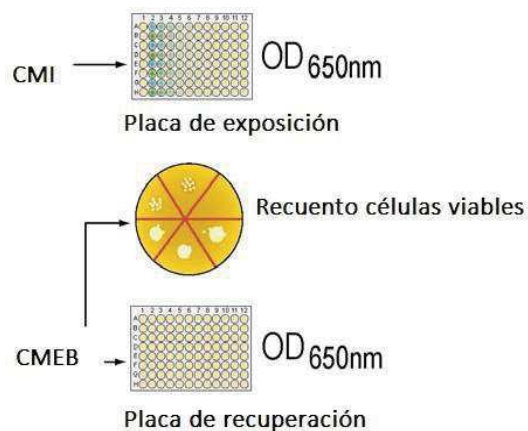
## MATERIAL Y MÉTODOS

colocó una tapa sin clavijas y se incubó de nuevo a 37°C durante 24h (Figura 11). Al día siguiente se hizo la lectura de la densidad óptica (DO) a 650nm para identificar si había crecimiento.



**Figura 11. Recuperación de las bacterias del biofilm superviviente al antibiótico. Fuente: ©Innovotech Inc.**

Las determinaciones de CMI se realizaron en la placa de exposición tras el periodo de incubación. Las determinaciones de CMEB se llevaron a cabo colocando una gota de las diluciones recuperadas del medio en una placa (para obtener recuento de células viables) o mediante la evaluación cualitativa de crecimiento en los pocillos de la placa de recuperación tras el periodo de incubación (Figura 12).



**Figura 12. Determinaciones de CMI y CMEB a partir de las placas incubadas. Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; CMEB, concentración mínima de erradicación del biofilm; OD, densidad óptica. Fuente: ©Innovotech Inc.**

Se describe la CMEB como la menor concentración de antibiótico capaz de prevenir el crecimiento de forma visible en el medio recuperado utilizado para recoger las células del biofilm.

#### **4. Tiempo de generación**

Para comparar el crecimiento entre las diferentes cepas, incubamos un inóculo bacteriano equivalente a  $10^5$  UFC/mL en MHB durante 24h en agitación a 37°C. Se recogieron muestras en diferentes puntos horarios de la curva para calcular el número de bacterias que había en cada momento.

El tiempo de generación (g) se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{donde } \mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t - t_0}$$

$N$  es el número de bacterias en el tiempo  $t$ , y  $N_0$  el número de bacterias en el tiempo  $t_0$ .

#### **5. Estudios poblacionales y de exposición a daptomicina.**

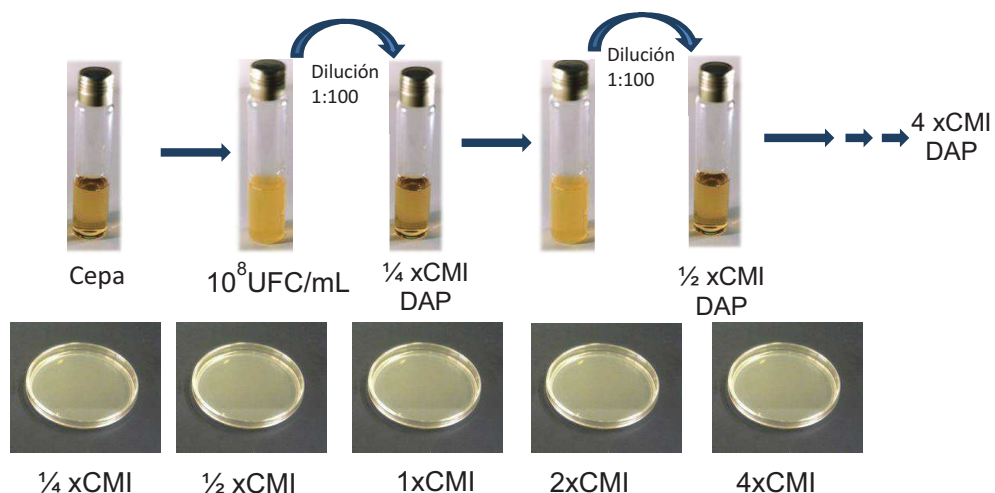
##### **5.1 Análisis poblacionales**

El análisis poblacional se realizó para observar si en las cepas wild-type, así como en las cepas recuperadas del modelo animal había presencia de subpoblaciones resistentes a daptomicina. Tanto las cepas recuperadas del líquido de las cajas tras finalizar las pautas terapéuticas (*ex vivo*) como las cepas sin exponer se incubaron en 10 mL de TSB en agitación y a 37°C overnight. Luego se resuspendieron y ajustaron a una concentración de  $10^8$  UFC/mL. Después se realizaron diluciones de la suspensión y se cultivaron 0.1mL en placas de Mueller-Hinton Agar (MHA, (Becton Dickinson, Madrid, España)) que contenían diferentes concentraciones de daptomicina. Se dejaron incubar estas placas durante 24-48 horas. En el caso que creciera alguna colonia en las placas, se recultivaba de forma consecutiva en placas que no contenían antibiótico durante 5 días y se determinó su CMI. Todas las placas con daptomicina contenían calcio a concentración de 50mg/L.

##### **5.2 Estudio de exposición a daptomicina**

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las cepas originales susceptibles a daptomicina se incubaron por triplicado en agitación a 37°C (a concentraciones de  $10^8$  UFC/mL) y fueron expuestas a concentraciones crecientes de daptomicina durante 7 días. Las cepas fueron resuspendidas en MHB (diluciones 1:100) que contenía  $\frac{1}{4}$  xCMI de daptomicina y se incubaron durante 24h a 37°C en agitación. Los cultivos con un crecimiento visual a las 24h fueron recogidos y diluidos de nuevo (1:100) en MHB que ahora contenía una concentración de daptomicina que doblaba la anterior (desde  $\frac{1}{4}$  X CMI hasta 4 X CMI) (Figura 13). Así mismo se sembraron en placas de MHA (diluciones 1:10) que contenían diferentes concentraciones de antibiótico para seleccionar las cepas resistentes y se incubaron durante 24-48h. En el caso que creciera alguna colonia en las placas, se reactivaba de forma consecutiva en placas que no contenían antibiótico y se determinó la CMI para daptomicina. Estos experimentos se realizaron también con medio que contenía una concentración de claritromicina constante (50mg/L, 20% del valor de CMI) en combinación con daptomicina. Todos los tubos y las placas con daptomicina contenían calcio a concentración de 50mg/L.

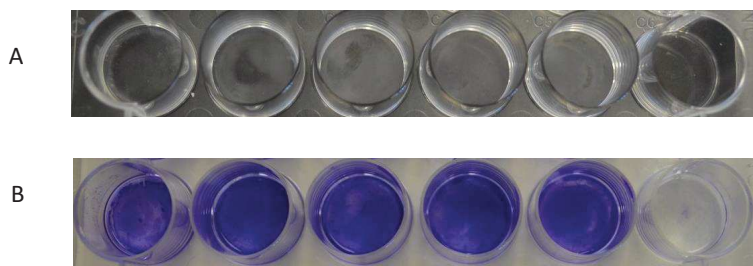


**Figura 13. Representación del estudio de exposición a daptomicina (DAP). La cepa era expuesta a concentraciones crecientes del antibiótico y tras 24 horas de incubación se seleccionaban aquellos tubos donde había habido crecimiento (turbidez visible) para exponerlo a una concentración mayor. Así mismo se sembraban en placas que contenían diferentes concentraciones de antibiótico para seleccionar las cepas resistentes.**

## 6. Actividad anti-biofilm de claritromicina

El protocolo utilizado está basado en el de Bauer et al.[148]. Los biofilms se obtuvieron tras 24h de incubación a 37°C en MHB suplementado con glucosa de un inóculo inicial de *S.aureus* de  $10^7$  UFC/mL ( $DO_{620nm}=0.01$ ) en placas de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) con un volumen total de medio por pocillo de 400µL. Tras finalizar el periodo de incubación, el medio se eliminó y los pocillos se limpiaron con PBS dos veces para eliminar las posibles bacterias residuales en fase exponencial. Seguidamente el biofilm se fijó a los pocillos con metanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Luego se eliminó y se dejaron secar los pocillos a temperatura ambiente de 30 minutos a 1 hora y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.2% (peso/volumen) en 20% de etanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El exceso de cristal violeta se eliminó tras tres lavados con agua y el biofilm teñido fue resolubilizado por la adición de ácido acético glacial al 33% (vol/vol) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) e incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Se determinó la absorbancia del cristal violeta de cada pocillo a una DO de 570nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas.

Para evaluar el efecto de claritromicina en la formación del biofilm, se añadieron diferentes concentraciones del antibiótico al inicio del proceso (antes de la incubación de los biofilms) y se mantuvieron durante 24 horas. La actividad anti-biofilm de claritromicina fue evaluada también frente a biofilms maduros de 24h (Figura 14). Al final del período de incubación el medio fue reemplazado por medio nuevo suplementado con glucosa al 0.25% que contenía concentraciones crecientes de claritromicina (2, 16, 32, 64 y 128mg/L) y reincubado durante 24 horas a 37°C.



**Figura 14. Biofilm formado durante 24h y expuesto a antibiótico durante 24 horas más (A) y el mismo biofilm tras ser teñido con cristal violeta (B).**

## MATERIAL Y MÉTODOS

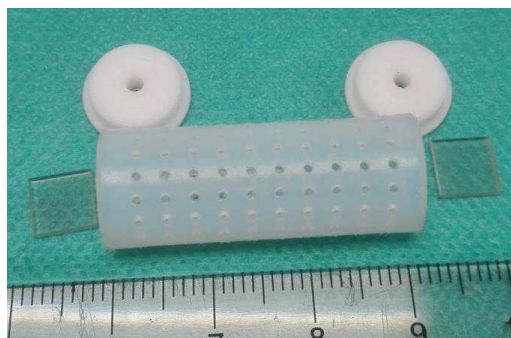
### **7. Modelo animal**

#### **7.1 Metodología para la estandarización**

El protocolo experimental cumple la legislación europea (Directiva 2010/63/EU) y la española (RD 53/2013) en la experimentación animal y fue aprobada por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona. El modelo está basado en el de Lucet et al.[139], si bien se hicieron algunas modificaciones. Se utilizaron ratas Wistar macho de 225 a 250 gramos de peso (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales se mantuvieron en cuarentena durante 7 días a la llegada al Estabulario del Campus Bellvitge y luego pasaron a la sala en condiciones *ad libitum*.

El material y procedimientos para la realización del modelo se detallan a continuación:

i. Cajas de Teflón y piezas de metacrilato: las cajas de Teflón utilizadas son cilíndricas y multiperforadas (150 agujeros de 1 mm de diámetro) con las medidas: 30 mm de largo, 12 mm de diámetro externo y 10 mm de diámetro interno. Los extremos se cierran cada uno con una tapa que tiene un agujero de 2mm de diámetro que permite el acceso al interior de la caja por punción con una aguja. Las piezas de metacrilato (también llamadas coverslips, CV) tienen unas dimensiones de 7x7x1 mm y se introducen dos en el interior de cada caja de Teflón. Todo el material (cajas de Teflón, tapas y piezas de metacrilato) fueron suministradas por la empresa Mecanizados del Besós S.A, Barcelona, España (Figura 15).



**Figura 15. Caja de teflón multiperforada con dos tapas que contienen un orificio cada una y las piezas de metacrilato.**

ii. Anestesia, analgesia y sacrificio de los animales. Los anestésicos, ketamina (80 mg/kg; Ketolar 50, Pfizer, Barcelona, España) y xilacina (10 mg/kg; Xilagesic 2%, Farmacia Palau Roig, Barcelona, España), se administraron por vía intraperitoneal a los animales que fueron sometidos a cirugía. A todos éstos, antes de la cirugía y cada 24 horas durante los 3 días posteriores a la cirugía se les administró analgésico, buprenorfina (0.01mg/kg, Metacam, Centauro Serv. Vet., Barcelona, España) por vía subcutánea. Para los procedimientos de obtención de muestras, se utilizó anestesia inhalada con isoflurano (Forane, Abbott, Madrid, España). El sacrificio de los animales se realizó mediante inyección intracardíaca de una sobredosis de tiopental (Tiobarbital, Braun, Barcelona, España) con el animal previamente anestesiado.

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

## **7.2 Obtención y procesamiento de las muestras**

La obtención y procesamiento de muestras se realizaron de acuerdo con la metodología anteriormente descrita la cual permite mantener la viabilidad de las células bacterianas durante su procesamiento [61,139].

i. Líquido del interior de las cajas de Teflón.

El líquido de las cajas (LC) se obtuvo mediante punción percutánea. Se extraían de 0,2-0,4 mL de líquido de las cajas (Figura 16) y se sometían a un proceso de sonicación mediante un baño de ultrasonidos (150 W durante 1 min, BRANSON 5510; Afora) para minimizar la agregación celular. A partir del LC se realizaron recuentos bacterianos y estudios de resistencia antibiótica. Para realizar los recuentos bacterianos se sembraba



## MATERIAL Y MÉTODOS

tanto una muestra directa como las diluciones 1:10 de la muestra en placas de TSA con un 5% de sangre y se incubaban a 37°C durante 48 horas. Tras el tiempo de incubación se obtenían los recuentos bacterianos en forma de log UFC/mL. El límite de detección fue de 10UFC/mL.



**Figura 16. Extracción del líquido de las cajas de teflón por punción percutánea.**

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

Las piezas de metacrilato, también llamadas Coverslips (CV), una vez recuperadas se introducían en un tubo de ensayo que contenía 1mL de PBS. Se procedía entonces a hacer un lavado mecánico con agitación (vórtex) y se transfería de nuevo a un tubo con fosfato salino (PBS) para repetir el lavado. Se realizaba un total de 3 lavados. Tras los lavados se transferían los CV a un nuevo tubo que contenía PBS con Tripsina 6 U/mL; Trypsin 500 mg, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se incubaba a 37°C durante 20 minutos para su digestión enzimática (“proceso de tripsinización”). Una vez finalizado el proceso, se sonicaba la muestra (150W, 1 minuto). A partir del líquido de cada tubo, se realizaban los recuentos bacterianos y los estudios de resistencia. La metodología fue la misma que la descrita en el procesamiento de los LC.

iii. Extracción de sangre mediante punción intracardiaca.

Este procedimiento se realizó para los estudios de farmacocinética y en el sacrificio del animal. Se anestesió a los animales a partir de inhalación de isoflurano y se procedió a realizar la punción intracardiaca con aguja de 25G. Se extrajeron muestras de 0.3mL de sangre o se procedía al sacrificio del animal por inyección letal de tiopental sódico.

### **7.3 Diseño experimental del modelo de infección de cuerpo extraño en rata: protocolo esquemático.**

El modelo anteriormente estandarizado por nuestro grupo utilizó un biofilm muy maduro, con un periodo de infección de 3 semanas, de gran exigencia antimicrobiana para los estudios con SASM, lo que reproducía una infección protésica tardía o crónica del humano. Más adelante, el grupo modificó este modelo, reduciendo el tiempo de formación de biofilm a tres días para SARM, acercándose más a una situación de una infección protésica aguda en humanos.

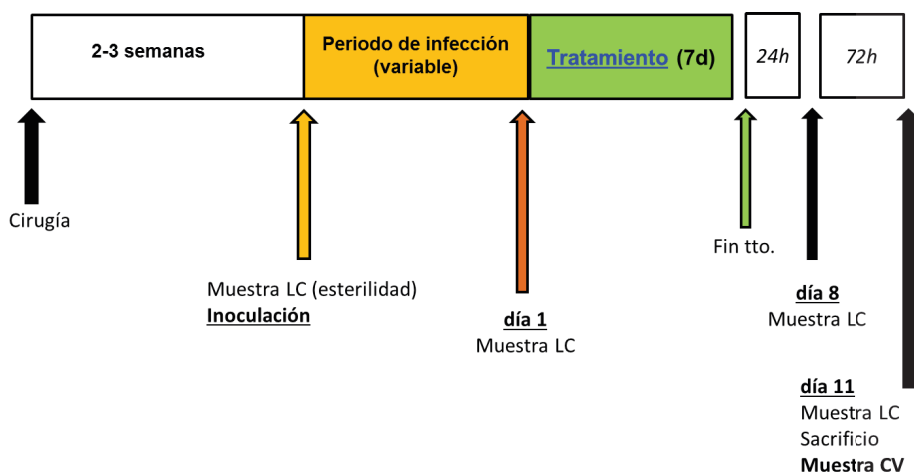
En el actual proyecto de tesis nos propusimos fijar un periodo de infección aguda en el modelo *in vivo* para SASM, de exigencia variable. En los estudios donde se evaluaron antibióticos y combinaciones de alta eficacia, determinamos un periodo de infección de exigencia intermedia. Se realizaron pruebas de exigencia antibiótica con biofilms formados de 5, 7 y 10 días.

En los estudios de evaluación de la potencial actividad anti-biofilm de claritromicina, buscamos un periodo de infección de menor exigencia, equivalente al modelo utilizado anteriormente para SARM. El objetivo fue comprobar qué actividad anti-biofilm tenía claritromicina frente a las dos cepas de SASM y SARM, en combinación con daptomicina y daptomicina-rifampicina. Por ello, se realizaron pruebas de exigencia antibiótica en un periodo de infección de 3 días para una cepa SASM y se comparó el tratamiento de daptomicina, el tratamiento anteriormente más eficaz de daptomicina-rifampicina y los controles.

Una vez estandarizado el modelo de 3 días, se observaron los biofilms tanto en microscopia óptica (tinción con hematoxilina) como por microscopia electrónica, para ver el estado del biofilm en las dos cepas de SASM y SARM.

Los procedimientos consecutivos del diseño del modelo animal se explican de forma resumida a continuación y se representan de forma esquemática en el Esquema 1.

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Esquema 1. Diseño experimental del modelo de infección de cuerpo extraño por *S. aureus* en rata. Abreviaciones: LC, líquido de las cajas; d, días; tto, tratamiento; CV, coverselips.**

- i. Cirugía: implantación de una caja de teflón en cada flanco del animal (dos).
- ii. Inoculación: tras la recuperación de los animales y la cicatrización de la herida (periodo de 2 a 3 semanas), se extraía muestra del líquido de las cajas por punción percutánea para comprobar la esterilidad de este y que no hubiera presencia de otra bacteria contaminante que pudiera interferir. Seguidamente se realizaba la inoculación con la bacteria de interés.
- iii. Inicio del tratamiento: tras el periodo de infección, se extrajeron muestras del líquido de las cajas para hacer recuentos bacterianos (día 1). Aquellas cajas cuyos recuentos eran  $\geq 5$  log UFC/mL se incluyeron en los estudios terapéuticos, las que no, eran descartadas. Se iniciaba entonces el tratamiento antibiótico.
- iv. Tratamiento antibiótico: se administraron por vía intraperitoneal o subcutánea a los animales. Tuvo una duración de 7 días y los animales fueron incluidos de forma aleatoria en el grupo control o en los diferentes grupos terapéuticos.
- v. Fin del tratamiento: a las 24 h de finalizar el tratamiento (día 8) (para minimizar el efecto de persistencia del antibiótico) se obtuvo líquido de las cajas para realizar el recuento cuantitativo de bacterias. Tres días después (día 11 o periodo post-antibiótico), se volvió a extraer líquido de las cajas, se sacrificaron los animales y se recuperaron las piezas de metacrilato.

- vi. Evaluación de la eficacia terapéutica: se evaluó de la siguiente manera:
- mediante el descenso en los recuentos bacterianos en el LC entre el inicio del tratamiento (día 1) y tras su finalización (día 8 y día 11) ( $\Delta\log$  UFC/ml).
  - mediante la cuantificación de bacterias adheridas en las piezas de metacrilato (día 11).
  - mediante el índice de curación el día 11 en el líquido de las cajas y en las piezas de metacrilato (porcentaje de muestras con recuentos bacterianos por debajo del nivel de detección respecto del total de muestras analizadas).
- vii. Estudio de resistencias: se determinó la aparición de resistencias tanto el día 8 como el día 11 en el líquido de las cajas y en las piezas de metacrilato.

## **8. Modelo de CDC Biofilm Reactor**

### **8.1 Metodología para la estandarización**

Este modelo *in vitro* es un sistema dinámico que permite el estudio de la exposición de un biofilm a diversos antimicrobianos, simulando su farmacocinética en humanos. Utilizamos en el laboratorio el modelo de CDC Biofilm Reactor (BioSurface Technologies Corporation, Montana, USA), un modelo ya utilizado anteriormente por otros grupos, para evaluar la eficacia de diversos antibióticos frente a un biofilm de *S.aureus*. Este modelo consiste en un reactor el cual dispone de un recipiente de cristal con ocho brazos en los cuales hay insertados tres piezas de teflón (cupones) en cada uno.

Este recipiente contiene un imán y tres tubos de entrada, así como de una salida. El biofilm se forma y mantiene dentro del recipiente, uniéndose a los cupones que contienen los brazos. Este diseño permite tanto la entrada como la salida de nutrientes y antibióticos a una velocidad controlada por una bomba de perfusión, la homogenización del contenido del recipiente, así como la realización del experimento durante el tiempo, y la extracción de diversas muestras en cada punto horario (Figura 17)

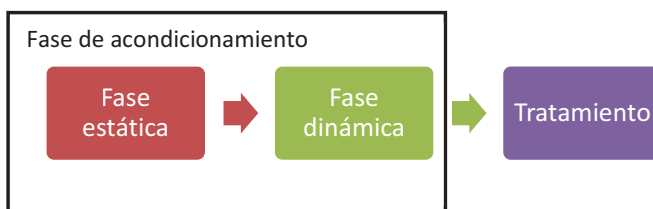
## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 17.** Se muestra el reactor con los brazos, las entradas y la salida (izquierda) y los brazos con los tres cupones cada uno (derecha).

Para poder evaluar la eficacia de los diversos agentes antimicrobianos, así como sus combinaciones, inicialmente realizamos una estandarización del modelo utilizando la cepa de SASM 29213. Debido a las diversas variables que incluía el modelo, realizamos diferentes pruebas para situar el experimento en unas condiciones controladas.

El modelo consiste inicialmente en una fase de acondicionamiento del biofilm: una fase estática y una fase dinámica. Tras la fase de acondicionamiento se inicia el tratamiento antibiótico (ver esquema 2). La temperatura se fijó en 37°C durante todo el experimento.



**Esquema 2.** Fases del experimento utilizando el CDC Biofilm Reactor.

En la fase inicial, llamada fase estática, se dispone el medio de cultivo junto con el inóculo inicial de la bacteria dentro del reactor (350mL). En esta fase la bacteria se adapta al nuevo entorno, inicia su replicación y se adhiere al teflón. El medio de cultivo utilizado para todas las pruebas fue TSB al 100% para asegurar un crecimiento elevado

bacteriano, suplementado con 1% de glucosa, ya que la glucosa es un factor que influye en la adhesión de *S.aureus* [149]. Las variables que se manejaban en esta fase eran por un lado el inóculo inicial y por otro la duración de la fase. Los estudios previamente publicados en la literatura han utilizado tiempos comprendidos entre 12 y 72 horas [114,122].

Tras esta primera fase, se realiza una fase dinámica en la que se suministra medio de cultivo al reactor. En esta fase las bacterias que están en fase exponencial suspendidas en el medio de cultivo son arrastradas al exterior y desechadas, y las bacterias adheridas en el teflón formando el biofilm se mantienen. La literatura existente no es uniforme respecto al medio de cultivo utilizado en esta fase, pues si bien suelen emplearse medios restrictivos desde el 0.3% al 10% [114,121], no lo hicieron así todos los autores [118]. El objetivo principal es que las bacterias del biofilm permanezcan en el reactor, mientras las que están en fase exponencial sean desechadas, de manera que se utiliza una velocidad de entrada y salida del medio, que ha de ser suficientemente elevada para condicionar un tiempo de residencia bacteriano menor que su tiempo de generación. Nosotros elegimos utilizar un medio con restricción de nutrientes, para no saturar el reactor con bacterias en fase planctónica que pudieran interferir la evaluación de la eficacia antibiótica frente al biofilm y facilitar la logística del procedimiento. La duración de esta fase se fijó en 24 horas, tiempo ya utilizado en trabajos anteriores [114,123]. La velocidad de entrada y salida del medio de cultivo durante la fase dinámica depende del tiempo de residencia de la bacteria (tiempo de generación). Se calculó el tiempo de generación de las dos cepas de estudio.

La fase de acondicionamiento del biofilm es importante, ya que depende de ésta en qué estado (madurez) llega el biofilm a la siguiente fase, la fase de evaluación terapéutica.

Después de la fase de acondicionamiento, se inicia el tratamiento antibiótico, mientras continúa el suministro de medio de cultivo al reactor. El tratamiento se administró a partir de bolus al reactor a una concentración equivalente a la concentración máxima en suero humano y en el caso de la cloxacilina a una concentración fija por perfusión continua. Teniendo en cuenta las vidas medias de cada

## MATERIAL Y MÉTODOS

antibiótico, se ajustaron las velocidades de entrada y salida del medio de cultivo (Figura 18). En el caso de los controles, la velocidad de infusión utilizada fue la media entre las velocidades utilizadas para los tratamientos.



**Figura 18.** Sistema CDC Biofilm Reactor con todos sus componentes en funcionamiento. Se observa el medio de cultivo que entra por infusión continua en el reactor por la bomba peristáltica, la bomba de dispensación de antibiótico, la placa termostato con agitación y el reactor.

### **8.2 Obtención y procesamiento de las muestras**

Se extrajeron muestras en la fase pre-dinámica (tras la fase estática), así como después de la fase dinámica (antes de administrar el antibiótico) lo que se llamó hora 0. Durante el tratamiento antibiótico se recogieron muestras a las 8, 24, 32, 48 y 56 horas.

Se extrajeron muestras en cada punto horario tanto del medio que contenía el reactor, como de los cupones (un brazo por punto horario). Se realizaron como mínimo dos réplicas de cada experimento.

Procesamiento de las muestras:

- El medio de cultivo se extrajo del reactor y se realizaron diversas diluciones 1:10 y se cultivaron en placas de TSA con 5% de sangre a 37°C durante 48 horas.
- Se extrajeron 3 cupones de un brazo por cada punto horario. Se realizaron dos lavados de los cupones en tampón fosfato salino (PBS) durante 3 minutos para eliminar

aquellas bacterias que no estuvieran adheridas a los cupones y se colocó cada cupón en 10 mL de PBS. Se recuperó el biofilm adherido de los cupones realizando 3 ciclos alternos de agitación mecánica (vortex) y sonicación de 1 minuto cada uno, tras los cuales se realizaron diluciones 1:10 del PBS que contenía los cupones y se cultivaron en placas de TSA con 5% de sangre a 37°C durante 48 horas.

- Se realizaron así mismo, estudios de resistencia antibiótica.

### 8.3 Diseño experimental-protocolo esquematizado

Antes de realizar los experimentos con el reactor, procedimos a la estandarización del modelo para lograr la producción del biofilm más idóneo, evaluando el papel de las diferentes variables en juego.

<b>Variables</b>	<b>Fase estática</b>	<b>Fase dinámica</b>
<b>Fijas</b>	Medio: TSB al 100% + 1% glucosa	Duración de la Fase: 24 h.
<b>A evaluar</b>	Duración de la fase	% Restricción del medio
	Inóculo inicial	

**Tabla 3. Variables fijas y a evaluar del modelo CDC Biofilm Reactor**

Antes de realizar las diversas pruebas, se realizaron curvas de crecimiento y se calculó el tiempo de generación cada cepa para poder calcular la velocidad de infusión del medio en la fase dinámica.

#### PRUEBA 1: Evaluación variable tiempo durante la fase estática.

Inicialmente realizamos dos pruebas de acondicionamiento del biofilm, una con una duración de la fase estática de 72 horas siguiendo el primer estudio de Goeres et al. [114] y otra de 24 horas siguiendo el protocolo publicado por el grupo de Rybak et al. [118,122]. En la fase dinámica y en la fase terapéutica, como primera aproximación, se utilizó medio restringido al 20%.

Se realizaron recuentos bacterianos tanto del medio de cultivo como de los cupones, éstos últimos por triplicado en cada punto horario. Para evaluar el proceso de formación del biofilm en la fase de acondicionamiento, se determinaron las CMBs para



## MATERIAL Y MÉTODOS

cloxacilina (un antibiótico esencialmente bactericida frente a bacterias en fase exponencial) en muestras del medio y los cupones obtenidas tras la fase estática y tras la fase dinámica (hora 0). La CMB obtenida en estos puntos se comparó con la CMB para cloxacilina de la cepa original.

### PRUEBA 2: Evaluación de la variable inóculo inicial.

Se realizaron experimentos utilizando inóculos de  $10^5$ , de  $10^6$  y de  $10^7$  UFC/mL y se compararon los recuentos respectivos obtenidos tras la fase estática.

### PRUEBA 3: Evaluación del grado de restricción del medio durante la fase dinámica.

Se compararon los efectos producidos sobre el grado de maduración del biofilm con la utilización de un medio restringido al 20% (nuestra opción inicial) o al 10% (utilizada por otros autores). Para ello utilizamos como indicadores indirectos las CMBs para cloxacilina de las muestras obtenidas en los cupones en la hora 0 y el efecto de una perfusión de 8mg/L de cloxacilina.

### PRUEBA 4: Efectividad antibiótica

Una vez fijados el tiempo de la fase estática, el inóculo inicial y la restricción del medio de cultivo durante la fase dinámica, realizamos una prueba de efectividad antibiótica con los antibióticos cloxacilina en perfusión continua a una concentración elevada (32mg/L) y levofloxacino en bolus a una concentración máxima de 9.8mg/L.

## **9. Estudios de farmacocinética**

Los estudios de farmacocinética se realizaron para seleccionar la dosis de antibiótico a utilizar en los animales o en el reactor antes de los estudios terapéuticos. Las dosis seleccionadas fueron aquellas en las que los niveles de antibiótico en el líquido de las cajas o en el reactor eran equivalentes a los niveles en suero humanos.

### **9.1 Metodología**

#### **9.1.1 Modelo *in vivo***

En los estudios de farmacocinética se realizaba la cirugía a los animales y tras el periodo de recuperación se administraba una dosis única de antibiótico de estudio

ajustada al peso del animal (sin infectar). Tras la administración del antibiótico se extraían muestras tanto de sangre (0.3-0.4mL) como del líquido de las cajas (0.3mL) en diferentes puntos horarios, utilizando 3 animales por punto. Tras la extracción, las muestras se centrifugaban y el sobrenadante se almacenaba a -86°C para su posterior análisis.

La selección de la dosis a utilizar estuvo basada en estudios previos publicados en roedores. En otros casos se realizaron diferentes pruebas tanto para escoger la dosis adecuada como la vía de administración. Debido a que el modelo incorporaba un tratamiento prolongado de 7 días, se determinó también la concentración máxima (pico, concentración máxima después de una dosis, C<sub>max</sub>) y mínima (valle, momento previo a la dosis siguiente, C<sub>min</sub>) de antibiótico en sangre y en líquido de las cajas el 4º día de tratamiento.

### **9.1.2 CDC Biofilm Reactor**

El modelo del reactor simula una cinética de eliminación “de primer orden” de un fármaco. Así, se debe tener en cuenta el aclaramiento o *Clearance* (Cl), que es el volumen de plasma, en nuestro caso el medio de cultivo del reactor, que queda libre de fármaco por unidad de tiempo (mL/min). Esta velocidad de aclaramiento es la velocidad de infusión y salida del medio en el reactor. Se calcula siguiendo la fórmula:

$$Cl = V_d \times \ln 2 / t_{1/2}$$

donde V<sub>d</sub> es el volumen de distribución y t<sub>1/2</sub> la vida media del antibiótico.

En nuestro caso el volumen de distribución es un volumen constante (=V<sub>c</sub>) de 350 mL, que corresponde al medio contenido en el reactor.

Las vidas medias para los antibióticos utilizados son [71]:

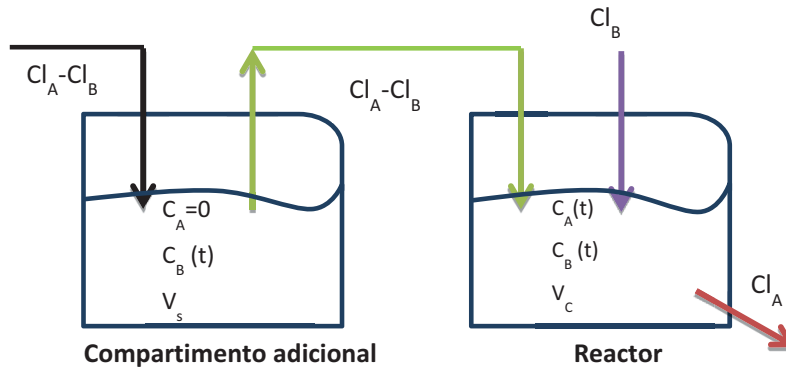
## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Antibiótico</b>	<b>Vida media (horas)</b>
Rifampicina	5
Linezolid	5
Trimetoprim	10
Sulfametoxazol	10
Levofloxacino	7

**Tabla 4. Vidas medias en horas para cada uno de los antibióticos**

Al utilizar combinaciones de antibióticos, se calculó la cinética simulatánea de los dos (uno de ellos rifampicina). Para ello, se siguió la metodología descrita por Blaser et al. [150], que aporta los principios matemáticos y los componentes técnicos necesarios para reproducir la farmacocinética simultánea “de primer orden” de dos antibióticos que tienen diferente vida media. En el caso de la combinación de rifampicina y linezolid, ambos con la misma vida media, se administraba un bolus de los dos antibióticos en el Reactor y se fijaba una velocidad de entrada y salida (velocidad de aclaramiento) del medio que servía para los dos antibióticos.

En el caso de las combinaciones de rifampicina con cotrimoxazol o levofloxacino, los dos antibióticos administrados juntos presentan vidas medias distintas. En estos casos, se necesita el compartimento del Reactor y un compartimento adicional que suplementará uno de los antibióticos. En concreto, el fármaco “B” con una vida media más larga (que, por lo tanto, debería ser eliminado más lentamente) tiene que ser suplementado en el compartimento del Reactor continuamente para reemplazar la “sobre-eliminación” que se produce debido a la mayor eliminación (clearance) que determina el fármaco “A”, con menor vida media. Así, el antibiótico “B” se suplementa mediante la infusión en el compartimento del Reactor de un líquido que aporta una concentración igual a la de este compartimento (y que proviene del compartimento adicional), mediante una velocidad de flujo que viene marcada por la diferencia entre aclaramientos de los dos fármacos. Este funcionamiento se esquematiza a continuación:



**Esquema 3. Simulación de las velocidades de entrada y salida del medio (Clearance; Cl) para el compartimento adicional y el reactor, así como las concentraciones de cada antibiótico (C) dependiendo del tiempo (t) y el volumen para cada compartimento ( $V_c$ , volumen constante;  $V_s$ , volumen del compartimento adicional). El fármaco A se administra exclusivamente en el reactor, por bolus, a la concentración máxima deseada y está ir disminuyendo a medida que pasa el tiempo ( $C_A(t)$ ). El fármaco B, con mayor vida media (menor velocidad de aclaramiento,  $Cl_B$ ), debe ser suministrado simultáneamente en el reactor y en el compartimento adicional, en bolus y a la concentración máxima deseada. Ésta ir disminuyendo con el tiempo ( $C_B(t)$ ). La infusión de la droga B desde el compartimento adicional al reactor ( $Cl_A - Cl_B$ ) permite que se suplemente la cantidad de droga B en el reactor que se va perdiendo debido a la alta velocidad de aclaramiento de la droga A.**

Para calcular el volumen de medio que debe tener el compartimento adicional ( $V_s$ ), y que asegure la misma concentración de antibiótico que en el compartimento del Reactor, se utiliza la siguiente ecuación:

$$V_s = \frac{Cl_A - Cl_B}{Cl_B} \times V_c$$

Los estudios farmacocinéticos de cada antibiótico se realizaron utilizando las mismas velocidades que cuando se evaluó la combinación, para asegurar el buen funcionamiento del experimento. El medio utilizado en este caso fue agua destilada estéril para poder analizar más adelante las muestras. Se recogieron muestras en diferentes puntos horarios, desde la administración del bolus de antibiótico hasta 24 horas después. Se guardaron las muestras a  $-20^\circ \text{C}$  hasta su análisis.

## 9.2 Determinación de los niveles de antibiótico

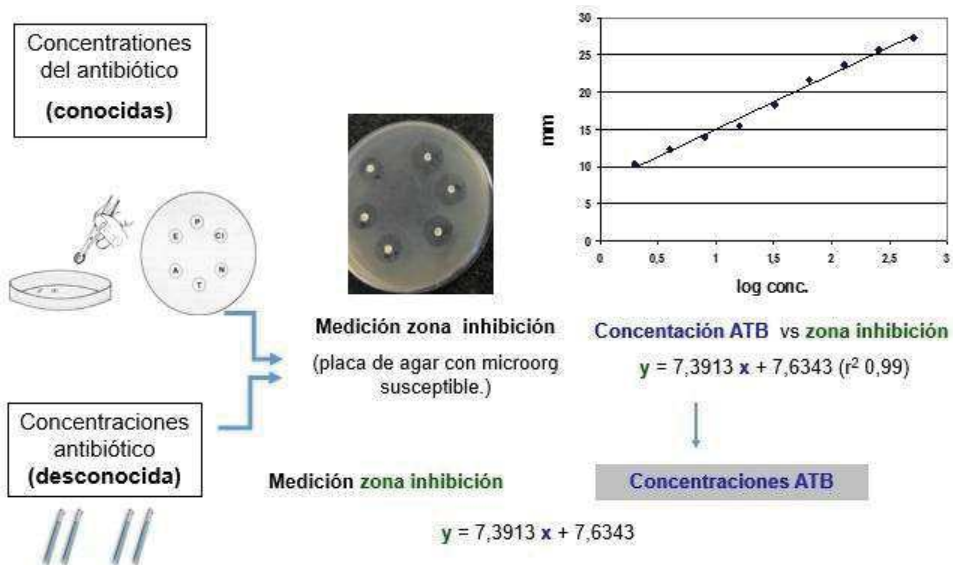
### 9.2.1 Método del bioensayo

## MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación de los niveles de antibiótico se realizó a partir del método de bioensayo por difusión para los antibióticos claritromicina, ácido fusídico, rifampicina, linezolid y levofloxacino.

Las extracciones de las muestras de sangre y líquido de las cajas de los animales se realizaron en tubos Microtainer (Amber Tubes SST™, Becton-Dickinson, New Jersey, USA). Para los estudios con el reactor, la toma de muestra se hizo directamente del recipiente. La extracción se realizó en diferentes puntos horarios desde la administración del antibiótico. Las muestras se centrifugaron a 18 000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C (Sorvall Centrifuge, Thermo Fisher, MA, USA). El plasma se separó (en las muestras de los animales) y se alicuotaron y se guardaron a -86°C hasta el día de la determinación de niveles por bioensayo.

Para realizar los bioensayos se prepararon placas de agar (Antibiotic medium nº 1, Difco, Becton Dickinson, Madrid, España) a las que se añadió una proporción de un microorganismo sensible al antibiótico a analizar [151]. Una vez preparadas las placas con el microorganismo se colocaron discos de celulosa (Oxoid, Hants, Reino Unido) sobre las placas. Unos fueron impregnados (15µL) con una concentración conocida del antibiótico a estudiar y otros con las diferentes muestras recogidas de los animales o el reactor. Se incubaron las placas a 37°C durante un periodo de tiempo (dependiendo del microorganismo sensible al antibiótico que contenían las placas) y se midieron los halos de inhibición. A partir de los halos de inhibición de los discos impregnados con una concentración conocida de antibiótico se realizaba una recta de regresión donde se relacionaba el diámetro del halo de inhibición con la concentración de antibiótico del disco. Los resultados de esta recta de regresión se extrapolaban al diámetro de los halos de inhibición de las muestras recogidas con concentración desconocida de antibiótico (Figura 19).



**Figura 19. Descripción gráfica del método del bioensayo. Se observa la colocación de los discos de celulosa que contenían concentraciones de antibiótico conocidas y desconocidas y la recta de regresión que se obtiene tras la incubación de las muestras conocidas a partir de los halos de inhibición.**

La técnica del bioensayo permite determinar las concentraciones de antibiótico libre, no unido a proteína.

Para cada uno de los antibióticos, los microorganismos utilizados y los límites de detección fueron los siguientes:

- Claritromicina: *Micrococcus Luteus* (ATCC 9341); límite de detección de 0.25 mg/L; linealidad del ensayo  $r^2$  0.99.
- Ácido fusídico: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); límite de detección de 2mg/L; linealidad del ensayo  $r^2$  0.99.
- Rifampicina: *S.epidermidis* (ATCC 27626); límite de detección 0.25mg/L; linealidad del ensayo  $r^2$  0.99.
- Linezolid: *Bacillus subtilis* (ATCC 12432); límite de detección de 2mg/L; linealidad del ensayo  $r^2$  0.99.
- Levofloxacino: *E.coli* (ATCC 25922); límite de detección 1mg/L; linealidad del ensayo  $r^2$  0.99.

### **9.2.2 Cromatografía líquida de alta eficacia**

En el caso de daptomicina, por su alto porcentaje de unión proteica, la determinación de los niveles se hizo mediante cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography (HPLC), en el laboratorio de Farmacología, en el Centro de Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínico-IDIBAPS, Barcelona. La separación cromatográfica se realizó con el sistema Waters Alliance 2695 utilizando una columna analítica Symmetry C18 (4.6 mm x 75 mm, tamaño de la partícula 3.5  $\mu$ m). La fase móvil consistió en una mezcla de 0.2 M de PBS (pH 5.5) y acetonitrilo (70/30 [vol/vol]). El caudal de la bomba fue de 1 ml/min. y la detección se realizó por absorbancia UV a 223 nm. Las muestras, calibradores o los controles de calidad (100 $\mu$ L) fueron mezclados con acetonitrilo (100 $\mu$ L) y centrifugados a 12 000g durante 5 minutos. Se inyectó una alícuota de 25  $\mu$ L de sobrenadante. El método fue validado con éxito, y los resultados fueron lineales, sobre el rango de concentración estudiado (5 a 250  $\mu$ g / mL).

En el caso de cotrimoxazol se determinaron los niveles del antibiótico gracias a la colaboración de la Dra. Nuria Lloberas en el Laboratorio de Nefrología del Departamento de Ciencias Clínicas. Se determinaron los niveles de TMP y SMZ por Cromatografía Líquida de Ultra-alta eficacia o Ultra performance liquid chromatography (UPLC) con detección ultravioleta (UV).

A continuación, se detalla el protocolo realizado por la Dra. Lloberas, siguiendo el protocolo de Ribera et al. [152] con algunas modificaciones:

#### 1. Extracción de muestras

Las extracciones de las muestras de sangre y líquido de las cajas de los animales se realizaron en tubos vacuettes®. Para los estudios con el reactor, la toma de muestra se hizo directamente del recipiente. La extracción se realizó en diferentes puntos horarios desde la administración del antibiótico. Las muestras se centrifugaron a 18 000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C (Sorvall Centrifuge, Thermo Fisher, MA, USA). El plasma se separó (en las muestras de los animales) y se alicuotaron en 2 tubos

ependorf de polipropileno de 1 mL. Las alícuotas se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la determinación de niveles por cromatografía.

## 2. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras, controles y recta de calibrado se realizó mediante una precipitación con una solución de ácido tricloracético (TCA) a una proporción (200: 20, muestra/ TCA, respectivamente). Posteriormente el tubo se centrifugó a una velocidad de 13 000 g durante 10 minutos (Hettich® Benchtop Universal 16R centrifuge, Bäch, Switzerland). Se inyectaron 5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante resultante en el UPLC para la cuantificación simultánea de la concentración de sulfametoxazol y trimetoprim.

## 3. Determinación de niveles por UPLC/UV

La determinación de las concentraciones plasmáticas de sulfametoxazol y trimetoprim en muestras de suero y cajas, así como las muestras del reactor, se realizaron mediante ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) con detección ultravioleta (Acquity®) UPLC®). Para la determinación cromatográfica se utilizó una columna de fase reversa C18 BEH™ (2.1×100mm id, 1.7 $\mu\text{m}$ ). Como eluyente, se utilizó como fase móvil una mezcla de los disolventes acetonitrilo y agua con sal de monofosfato de potasio 10 mM a la siguiente proporción: (ACN:H<sub>2</sub>O - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM) (20:80) a un pH de 7.2.

4. Inyección de la muestra. Se inyectaron 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra y la inyección de las muestras fue en modo de full loop.

Los perfiles farmacocinéticos consistieron en 9 muestras tanto del suero y líquido de las cajas de las ratas como del líquido del reactor. Las extracciones de las muestras se realizaron antes de la primera dosis (concentración pre-dosis) y a lo largo de las 24 horas posteriores a la primera dosis de cotrimoxazol. El muestreo se hizo a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas.

### **9.3 Selección de las dosis de antibiótico: criterios farmacocinéticos y farmacodinámicos**



## MATERIAL Y MÉTODOS

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

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos tanto en el agua destilada para el reactor como en sangre y en el líquido de las cajas de los animales: concentración máxima o pico ( $C_{max}$ ), vida media ( $t_{1/2}$ ), constante de eliminación ( $K$ ), área bajo la curva durante 24 horas ( $AUC_{0-24h}$ , en relación al gráfico concentración-tiempo),  $T > CMI$  (tiempo durante el cual la concentración de antibiótico se mantiene por encima de la CMI),  $C_{max}/CMI$  (relación entre la concentración pico y la CMI) y el cociente  $AUC/CMI$ . En el caso de los niveles de antibiótico en el reactor, al utilizar un modelo *in vitro*, se calcularon aquellos niveles no unidos a proteína para todos los parámetros.

Finalmente, en base a conocimientos previos se seleccionaron aquellas dosis que aseguraran unos parámetros farmacocinéticos similares a los conseguidos en suero de humanos con las dosis habituales [153–155].

En el caso del modelo *in vivo*, la particularidad de nuestro modelo animal residía en el hecho de la existencia de dos compartimentos (suero y líquido de las cajas), y en estos casos es conocida la relación existente entre las concentraciones en suero y en diferentes compartimentos con fluidos extravasculares que se caracteriza por: I/ la concentración pico en suero es mayor respecto al compartimento extravascular; II/ la concentración de antibiótico se elimina más tardíamente en el compartimento extravascular por lo que el  $T > CMI$  es mayor que en suero; y III/ el  $AUC$  de ambos espacios es similar. Por este motivo, se seleccionaron aquellas dosis en animales que aseguraban una  $AUC$  en el líquido de las cajas equivalente a la conseguida en suero de los humanos; este criterio fue aplicado para todos los antibióticos excepto para cloxacilina ya que el parámetro farmacodinámico que mejor se relaciona con su eficacia es el  $T > CMI$  y así los mayores valores de  $T > CMI$  en el líquido de las cajas permitieron una dosificación más espaciada de lo que suele ser habitual en las ratas.

## 9.4 Grupos terapéuticos

### 9.4.1 Modelo animal

A continuación, se muestran todos los grupos terapéuticos estudiados en el modelo animal, así como su equivalencia en humanos. En el caso de cloxacilina, rifampicina y levofloxacino, las dosificaciones se determinaron en estudios farmacocinéticos previos [141].

Grupos terapéuticos en el modelo animal	Dosis equivalente en humanos
Daptomicina 45mg/Kg/día ip.	8-10mg/Kg/día
Cloxacilina 200 mg/kg/12 h ip.	2 g/4h
Rifampicina 25 mg/kg/12 h ip.	900 mg/d
Levofloxacino 100mg/kg/día ip.	750mg/d
Clarithromicina 100mg/Kg/día ip.	500 mg/12 h
TMP-SMZ 120mg/kg/día sc.*	160mg/800mg 8h
Cloxacilina+Rifampicina	
Cloxacilina+Daptomicina	
Levofloxacino+Rifampicina	
Daptomicina+Rifampicina	
Daptomicina+Levofloxacino	
Daptomicina+Clarithromicina	
Daptomicina+Rifampicina+Clarithromicina	
Control (suero fisiológico)	

**Tabla 5. Antibióticos estudiados y su equivalencia en humanos.**

**\*Dosificación para 3 días (ver apartado resultados).**

**Abreviaciones: ip, Intraperitoneal; sc, subcutáneo.**

### 9.4.2 Modelo *in vitro* de CDC Biofilm Reactor

Las dosis utilizadas en el modelo *in vitro* se basaron en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en humanos teniendo en cuenta aquella proporción de antibiótico no unido a proteína (free, f). Se simularon los regímenes:

Antibiótico (dosis equivalente en humanos)	fC <sub>max</sub> (mg/L)	fAUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)	Porcentaje de unión a proteína
Rifampicina (600mg/24h)	6	41	80
Levofloxacino (750mg/24h)	9.8	63-84	30
Linezolid (600mg/12h)	9.6	151.8	31
Trimetoprim (160mg/8h)	1	17.5	50
Sulfametoxazol (800mg/8h)	13.5	225	70

**Tabla 6. Antibióticos estudiados en el modelo *in vitro*. Dosis equivalente en humanos; valores de su concentración máxima (C<sub>max</sub>) y el área bajo la curva (AUC) del antibiótico libre de proteína (f, free), y estimación del porcentaje de unión a proteína para cada antibiótico en humanos.**

#### 9.4.3 Farmacocinética particular de cotrimoxazol

Los estudios de farmacocinética/farmacodinámica de cotrimoxazol plantean una especial dificultad por el hecho de incluir en su composición dos sustancias diferenciadas, el TMP y el SMZ. Su mayor eficacia, basada en la máxima sinergia que proporciona la combinación de TMP con SMZ, se obtiene con una proporción de 1:20 respectivamente. Los niveles deseados del antibiótico en las cajas de teflón fueron los niveles equivalentes en humanos a las dosis de 160mg TMP/800mg SMZ cada 8 horas, lo que suponía unas concentraciones máximas entre 1.5-2mg/L para TMP y entre 45-50mg/L para SMZ y unas áreas bajo la curva de 35 mg.h/L para TMP y de 750mg.h/L de SMZ [156–158]. Esta proporción de TMP:SMZ de 1:20 suele alcanzarse en el suero humano tras la administración de una proporción de 1:5 por la diferencia en el proceso de metabolización del TMP y SMZ.

Se realizaron dos estudios:

Primer estudio:

El primer estudio se realizó siguiendo la metodología de Lares-Asseff et al. para analizar la penetración antibiótica tisular en un modelo de animal en ratas Wistar [159]. Para ello se administró a los animales una concentración de 13 TMP: 65 SMZ mg/kg (proporción 1:5) por vía intraperitoneal y se determinaron los niveles de los dos antibióticos durante 24 horas.

Segundo estudio:

Teniendo en cuenta que la dosis letal de TMP por vía intraperitoneal es 20mg/kg, no existía mucho margen para utilizar dosis superiores a las del primer estudio, utilizando la vía intraperitoneal. La dosis letal tras la administración subcutánea es bastante más elevada, de 300mg/kg de TMP. Por ello en este estudio se administró el antibiótico por vía subcutánea, a dosis más elevadas, 120mg/kg de TMP, con el objetivo de retardar su metabolización. Para compensar los hallazgos de la ratio TMP/SMZ observados en el anterior estudio, se modificó la proporción de estudio a 1:1 (TMP:SMZ).

#### **9.4.4 Problemática del ácido fusídico**

Los datos de farmacocinética de ácido fusídico en humanos se basan en estudios realizados hace unas décadas que mostraron unos niveles pico de 20-30 mg/L al utilizar dosis de 500mg/8h [160,161]. No obstante, se observaron niveles muy variables entre pacientes y una cierta acumulación en el transcurso del tratamiento. Los estudios de farmacocinética en la rata han sido escasos y algunos de ellos han apuntado la dificultad para ser llevados a cabo en roedores [71,162]. En los dos trabajos realizados por Findon y Rowe en la rata [163,164], se utilizó la forma de dietanolamina fusidato, que a dosis de 200mg/kg por vía subcutánea obtenía unos niveles máximos equivalentes a los humanos.

Primer estudio

## MATERIAL Y MÉTODOS

Por este motivo en los primeros estudios farmacocinéticos se utilizó la formulación de dietanolamina fusidato (DEF) por vía subcutánea a las dosis de 200mg/kg y de 250mg/kg.

El antibiótico en su formulación “dietanolamina fusidato” fue suministrado por LEO PHARMA (Dinamarca). Posteriormente, la empresa dejó de suministrar el antibiótico y fue totalmente imposible garantizar la disponibilidad de la droga en esta formulación.

### Segundo estudio

Las dificultades de suministro expuestas condicionaron los estudios posteriores. En un segundo estudio se utilizó la formulación del ácido fusídico como fusidato sódico, suministrada por Sigma-Aldrich. Se evaluaron los resultados farmacocinéticos con concentraciones de 200mg/Lm por vía intraperitoneal en lugar de subcutánea. Se realizaron nuevas pruebas con dosis de 400mg/kg y 300mg/kg, pero en ambos casos los animales no toleraron esta dosificación y tuvieron que suspenderse.

### Tercer estudio

Ante las dificultades encontradas, se planteó la posibilidad de utilizar directamente el antibiótico en su formulación para la administración intravenosa en humanos. Para ello se contactó con la Farmacia Carreras (Barcelona) quien lo suministró al laboratorio. Los datos obtenidos en el primer estudio con dietanolamina fusidato y los trabajos de Fantin en el conejo [165], que mostraban unos niveles superiores con la utilización de la vía subcutánea, hicieron que se optara nuevamente por esta vía de administración. Se utilizó pues en este estudio la preparación humana a la dosis de 300mg/kg por vía subcutánea.

### Cuarto estudio

Se utilizó la formulación preparada para uso humano a la dosis de 250mg/L en primera instancia y de 200mg/L en segunda instancia por vía intraperitoneal.

## **10. Evaluación del desarrollo de resistencia antibiótica durante el tratamiento**

Se realizaron estudios de resistencia para determinar el posible desarrollo de cepas resistentes durante los estudios terapéuticos. Se preparaban placas de agar (MHA) con una concentración de antibiótico equivalente o superior a la CMI de la bacteria y se conservaban en cámara frigorífica (4 °C) como máximo 7 días para preservar la actividad del antibiótico. Las muestras recogidas del reactor, líquido de las cajas y del procesamiento de las piezas de metacrilato (100 µl en ambos casos) se inocularon sobre estas placas con antibiótico y se incubaron a 37° durante 48 h. Los resultados se interpretaron cualitativamente como positivos (cualquier crecimiento macroscópico de colonias de *S. aureus* sobre las placas) o bien como negativos (ausencia de crecimiento macroscópico) (Figura 20).



**Figura 20. Placas de agar con antibiótico (en este caso rifampicina a 1mg/L) con cepas recuperadas de *S.aureus* resistentes al antibiótico.**

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

- Rifampicina, placas con 1 µg/ml
- Daptomicina, placas con 0.5 µg/ml y 1 µg/ml
- Levofloxacino, placas con 1 µg/ml
- Cloxacilina, placas con 1 µg/ml
- Linezolid, placas con 4 µg/ml

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Cotrimoxazol: placas con 4 µg/ml de trimetoprim y 80 µg/ml de sulfametoxazol.
- Ácido fusídico: 1-2 µg/ml.

Tras la incubación, en el caso de que aparecieran cepas en estas placas se transferían a placas de agar sangre sin presencia de antibiótico (para evitar su interferencia) y se procedía posteriormente a la determinación de la CMI para estas cepas por el método de macro y microdilución para ver si ésta había variado respecto a la cepa original.

### **11. Visualización del biofilm al microscopio**

Se realizaron fotografías al microscopio óptico y al microscopio electrónico de los biofilms obtenidos tanto en los animales como en el reactor (se llevaron a cabo en los Servicios Científico-Técnicos del IRB de la Universidad de Lérida con la colaboración del Dr. Ribera).

Para la visualización en el microscopio óptico (MO) se realizaron tinciones con hematoxilina de secciones del biofilm de 10 micras, para teñir los núcleos celulares de azul para SARM BAA-39 y SASM 29213. También se realizaron cortes semifinos (1 micra) en araldita del biofilm de SASM 29213 y se tiñeron con azul de Richarson.

Asimismo, se realizaron fotografías con el microscopio electrónico de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

Para la observación al TEM se fijaron las muestras en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1M durante un máximo de 24 horas. Seguidamente se realizaron tres lavados en tampón fosfato de 0.1M. Se hizo la post-fijación en tetraóxido de Osmio al 1% durante 2 horas. Se lavaron las muestras en acetato sódico 0.1M no tamponado (2 veces durante 2 minutos), seguido de acetato de Uranilo acuoso al 0.5% durante 30 minutos. Se realizó entonces otro lavado con acetato sódico 0.1M no tamponado (2 veces durante 2 minutos). La deshidratación se hizo con acetronilo progresivo (30%, 50%, 70% y al 100%).

A continuación, se hizo la inclusión en resinas EMBED 812 en agitación y a temperatura ambiente como sigue: Resina/acetronilo 1/1 1 hora 30 minutos;

resina/acetonitrilo 2/1 durante toda la noche y resina sola 1 hora 30 minutos. Seguidamente se realizó la polimerización de la resina nueva durante 48 horas a 60°C.

El protocolo utilizado para la preparación de las muestras y su visualización en el SEM fue el siguiente: limpieza de la muestra con tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 durante 1 minuto y fijación con solución de 2.5% de glutaraldehido en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 durante toda la noche a 4°C. Después se realizaron lavados de la muestra en tampón fosfato 0.1M durante 10 minutos dos veces. A continuación, se realizó la deshidratación con acetonitrilo progresivo 30%, 50%, 70%, 100% de 30 minutos cada uno. Se dejaron secar y se colocaron en estufa a 60°C durante la noche. Seguidamente se realizó la pulverización catódica de Carbono (3 segundos) y Oro (3 minutos) en condiciones estándar. Las muestras se observaron a Microscopio electrónico de Rastreo DSM 940<sup>®</sup>, a una distancia de 10mm, y una aceleración de 10kV.

## **12. Estudios estadísticos**

Los resultados fueron analizados utilizando el software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; versión 20.0). En los estudios *in vitro*, el análisis estadístico para evaluar las diferencias entre las tasas de crecimiento se realizó utilizando el test no paramétrico de Regarding Mann–Whitney U. En el caso de los estudios para biofilm los resultados fueron comparados utilizando la  $\chi^2$ . En los estudios los recuentos bacterianos se presentaron como log UFC/mL (medias  $\pm$ desviación estándar). Se comprobó la distribución normal de los datos relativos a los recuentos bacterianos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias en los recuentos bacterianos de los diferentes grupos se evaluaron por análisis de varianza con el post hoc test de Bonferroni. La comparación entre grupos del porcentaje de resistencia antibiótica como las tasas de curación se analizaron por  $\chi^2$ .

Para todos los test, las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con valores de  $P < 0.05$ .

## **13. Ámbito de trabajo y medios disponibles para la realización del proyecto**

Para la realización del proyecto contamos con las instalaciones del Laboratorio de Infección Experimental del Servicio de Enfermedades Infecciosas del HUB, en el seno



## MATERIAL Y MÉTODOS

del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Medicina, Campus de Bellvitge, Universidad de Barcelona. Este Laboratorio cuenta con instalaciones que permiten realizar el procesado de las muestras, tanto los procesos microbiológicos como las determinaciones bioquímicas (congelador, campana de flujo laminar, estufas de cultivo, baño, espectrofotómetro, etc). El modelo con los animales se realiza en un miniquirófano del estabulario de la Universidad de Barcelona, en el mismo Campus de Bellvitge. Este estabulario cuenta con personal entrenado en el cuidado de los animales antes de iniciar el experimento y un veterinario. También se dispone del soporte del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge donde se realiza la preparación del inóculo, así como el apoyo de la Dra. Lloberas del Laboratorio de Nefrología del Departamento de Ciencias Clínicas del Hospital Universitari de Bellvitge donde se han determinado los niveles de cotrimoxazol. Las fotografías realizadas a microscopía se realizaron con el apoyo de Susana Arnedo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge y del Dr. Ribera del Instituto de Investigación Biomédica (IRB) de Lérida. La doctoranda, que trabaja directamente con los animales, ha realizado el Curso de formación de personal investigador usuario de animales de experimentación, requerido para realizar experimentación animal. Asimismo, el proyecto experimental fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, así como el DARP de la Generalitat de Catalunya. La doctoranda se encargó de la ejecución del modelo: anestesia, implantación del cuerpo extraño, inoculación del microorganismo, administración de pautas terapéuticas y toma de muestras y determinación de cultivos cuantitativos y niveles de antibióticos. Así mismo está adscrita al Programa de Doctorado de Medicina de la Universidad de Barcelona. Para la realización y financiación de todos estos estudios se ha dispuesto del soporte de las ayudas FIS 10/01001 y FIS 13/00550.

Nuestro equipo forma parte del Grupo de investigación del IDIBELL “Infecciones de Difícil Tratamiento” y a su vez del Grupo de investigación consolidado y reconocido de la Generalitat de Catalunya “Patología Infecciosa y Sensibilidad Antimicrobiana”. Nuestros estudios quedan enmarcados dentro de la REIPI. Esta red en la que se integra nuestro centro, ha incluido la infección de la prótesis articular entre sus problemas de

salud prioritarios de estudio, “Patogenia y Tratamiento antimicrobiano de la Infección de Prótesis Articular”, línea cuya coordinación la realiza el Dr. Ariza, director del presente proyecto de investigación. El modelo de Infección de cuerpo extraño de nuestro laboratorio forma parte de la plataforma transversal de “Infección Experimental” de la REIPI que transfiere e integra sus resultados con la investigación clínica de la red.



Laboratorio de Infección Experimental de la Facultad de Medicina del Campus de Bellvitge (Universidad de Barcelona).



Estabulario del Campus de Bellvitge (Universidad de Barcelona)



## **RESULTADOS POR OBJETIVOS**



## V. RESULTADOS (por Objetivos)

### Objetivo 1. Estandarización de modelos de infección experimental de cuerpo extraño

#### Objetivo 1a. Modelo de infección de evolución aguda de exigencia variable por SASM en la rata

Como ya se ha comentado en el apartado de Material y Métodos, como primera aproximación se estandarizó el nuevo modelo de infección en la rata para SASM de una infección aguda de exigencia intermedia para comparar tratamientos muy activos frente a biofilm. Se utilizaron para la estandarización dos pautas ilustrativas: cloxacilina, antibiótico de referencia para las infecciones estafilocócicas, pero de escasa eficacia en el modelo de biofilm, y la combinación de rifampicina-daptomicina de notable eficacia en el modelo anterior de infección por SARM. Se utilizaron dosis elevadas de daptomicina (100mg/kg/día), supuestamente simulando la farmacocinética humana del antibiótico en las cajas de teflón de los animales. Se realizaron períodos de infección de 5, 7 y 10 días. Los resultados fueron:

Días de infección	Tratamiento (n)	DIA 1	DIA 8	DIA11	
		LC	LC	LC	CV
		logUFC/mL (±SD)	Δlog UFC/mL (±SD)	Δlog UFC/mL (±SD)	log UFC/mL (±SD)
5 días*	CXA (6)	6.40±0.4	-2.11±0.4	-3.26±0.5	2.34±1.2
	D100+RIF(6)	6.22±0.9	-4.90±0.7	-5.08±0.9	0.94±0.05
	Control(8)	6.39±0.4	0.06±0.7	0.61±0.5	5.7±0.80
7 días*	CXA (6)	5.77±0.3	-1.02±0.9	0.59±1.0	4.59±1.0
	D100+RIF(6)	6.00±0.3	-3.39±1	-4.87±0.5	0.9±0
	Control(6)	6.76±0.6	-0.06±0.6	0.48±0.9	5.28±0.7
10 días	CXA (4)	6.40±0.4	-1.49±0.5	0.40±0.5	5.97±0.3
	D100+RIF(4)	6.22±0.9	-2.66±0.2	-4.18±0.4	1.85±0.90
	Control(4)	6.39±0.4	0.03±0.05	0.50±0.3	5.0±0.50

**Tabla 7. Recuentos bacterianos de SASM 29213 en el líquido de las cajas (LC) el día 1 y en los coverslips (CV) el día 11; así como los descensos bacterianos en el LC el día 8 y el día 11 respecto al día 1 para los diferentes periodos de infección y tratamientos; CXA (cloxacilina); D100 (daptomicina) y RIF (rifampicina).**

\*Diferencias significativas entre periodos de infección para los diferentes tratamientos.

## RESULTADOS

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos con periodos de infección de 5 y 7 días, pero no entre los de 7 y 10 días ( $P < 0.05$ ). Se fijó pues un periodo de infección de 7 días para el modelo animal de SASM 29213.

Posteriormente quisimos evaluar si una infección de 3 días, estandarizado previamente en el proyecto de SARM, podía utilizarse de la misma manera con la cepa SASM, para la evaluación de pautas comparativas con una exigencia menor, como podía ser el caso de la actividad anti-biofilm de claritromicina. En este estudio se pretendía comparar la eficacia de daptomicina y daptomicina-rifampicina en combinación con claritromicina en ambas cepas. Esta reducción del tiempo de infección permitía utilizar ya el modelo estandarizado para SARM y simplificar la logística de los experimentos. La dosis de daptomicina utilizada en estos experimentos fue de 45mg/kg/día, revaluada respecto a las dosis más elevadas empleadas en los estudios previos, y considerada realmente más equivalente a 8-10mg/kg/día en humanos. Esta modificación de la dosis se hizo en base a los resultados obtenidos al determinar los niveles de daptomicina por HPLC.

Tratamiento (n)	DIA 1	DIA 8	DIA11	
	LC	LC	LC	CV
	logUFC/mL ( $\pm$ SD)	$\Delta$ log UFC/mL ( $\pm$ SD)	$\Delta$ log UFC/mL ( $\pm$ SD)	log UFC/mL ( $\pm$ SD)
DAP45 (6)	7.11 $\pm$ 0.3	-1.75 $\pm$ 1.3	-1.44 $\pm$ 1.1*	4.08 $\pm$ 1.5*
DAP45+RIF(6)	6.89 $\pm$ 0.5	-3.47 $\pm$ 1.2	-4.79 $\pm$ 0.5**	1.57 $\pm$ 0.6**
Control(5)	6.59 $\pm$ 0.7	1.04 $\pm$ 0.7	0.82 $\pm$ 0.3	6.34 $\pm$ 0.2

**Tabla 8. Recuentos bacterianos de SASM 29213 del LC del día 1 tras un periodo de infección de 3 días y los resultados de eficacia de los diferentes grupos frente a bacterias del LC (descensos en el recuento bacteriano del día 8 y el día 11 respecto al día 1) y del CV (recuentos bacterianos del día 11).**

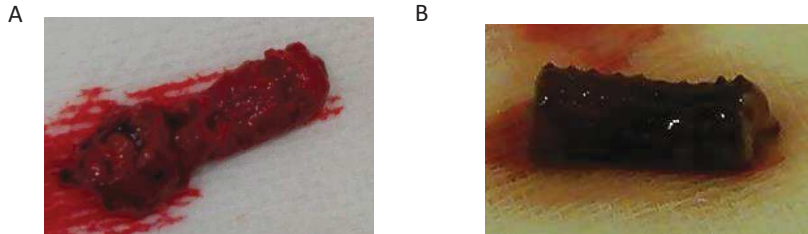
\*diferencias significativas respecto al control  $P < 0.05$ .

\*\*diferencias significativas entre tratamientos  $P < 0.05$ .

Se observó que el modelo de infección de 3 días permitía discernir la eficacia de los tratamientos respecto al control y entre sí. La combinación de daptomicina con rifampicina fue más eficaz que daptomicina en monoterapia y protegió la aparición de

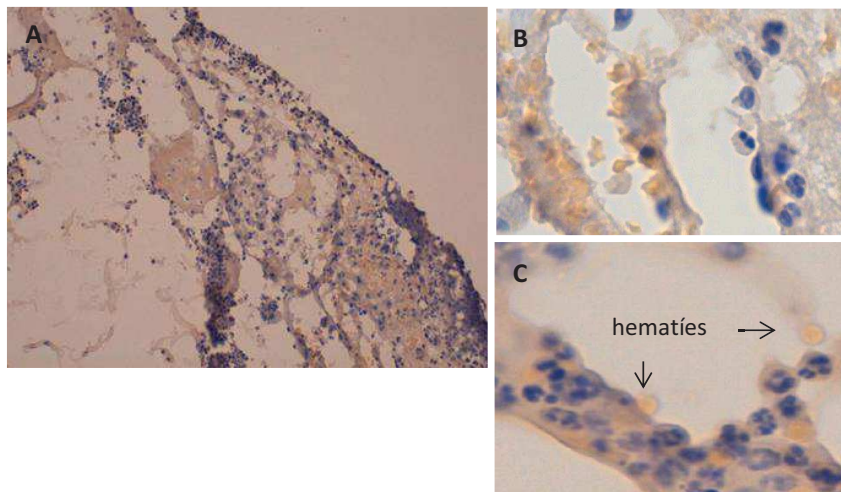
resistencias a ambos antibióticos, mientras que se desarrollaron cepas resistentes en el 50% de casos tratados solo con daptomicina. Por ello, se fijó el periodo de infección de 3 días para los estudios de eficacia anti-biofilm de claritromicina.

La figura 21 ilustra la diferencia macroscópica de tamaño observada en los biofilms obtenidos en los modelos de 3 y 7 días respectivamente, acorde con la distinta exigencia mostrada frente a las diversas pautas antimicrobianas.



**Figura 21. Biofilm de SARM 29213 formado durante un periodo de infección de 3 días (A) y 7 días (B).**

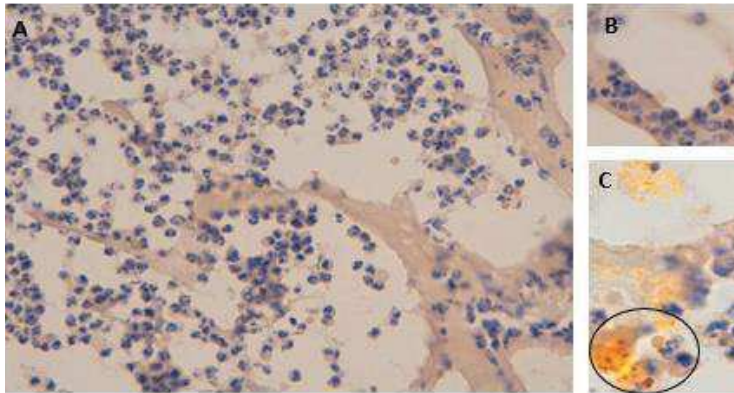
En las fotografías realizadas a microscopía óptica (MO) para las dos cepas (SASM 29213 y SARM BAA-39) observamos que la masa de biofilm recuperada tras el periodo de infección de 3 días contenía una sustancia amorfa, además de un alto contenido en hematíes, leucocitos y células apoptóticas (Figuras 22, 23 y 24).



**Figura 22. Fotografía a MO, tinción con hematoxilina a (A) 200x y (B, C) 400x, del biofilm de SARM BAA-39. Se observan leucocitos en azul y hematíes en amarillo.**

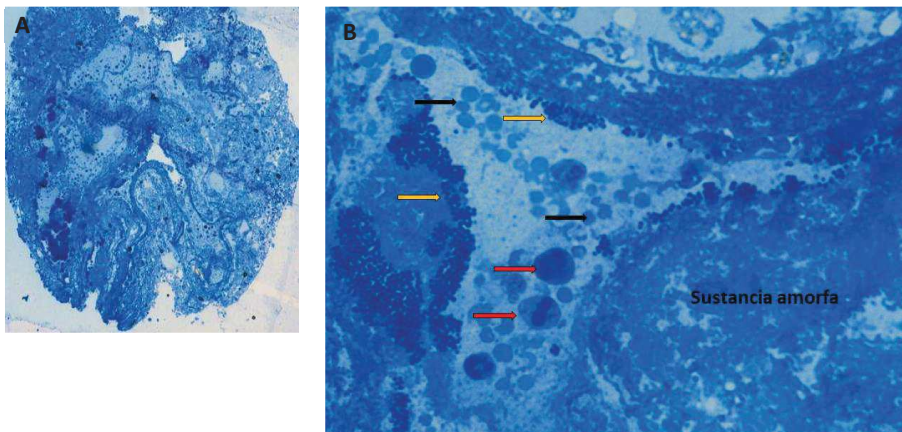


## RESULTADOS



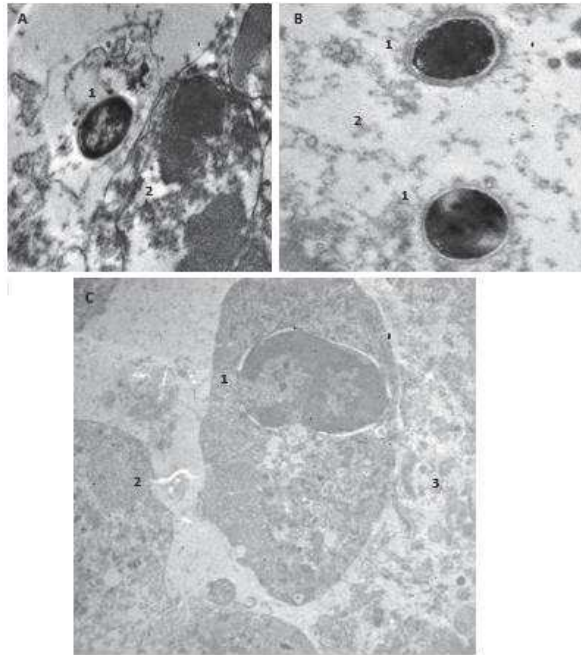
**Figura 23.** Fotografías a MO, tinción con hematoxilina a (A) 200x y (B, C) 400x, del biofilm de SASM 29213.

Se observa claramente los leucocitos (azul), hematíes y la sustancia amorfa (señalizado). Los núcleos de las células se observan en azul.



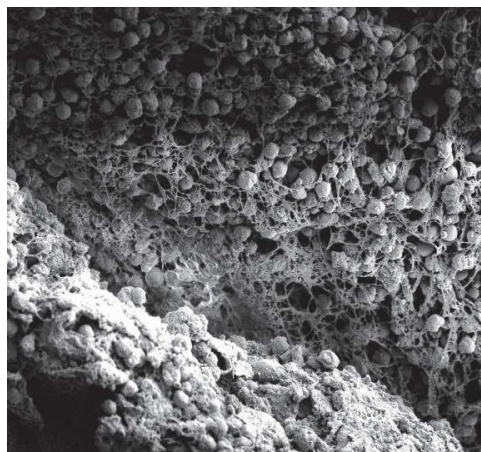
**Figura 24.** Corte de 1 micra en araldita del biofilm de SASM 29213 teñido con azul de Richardson a MO. Se realizaron a (A) 40x y (B) 200x. En la ampliación se observa: eritrocitos (flechas negras), linfocitos (flechas rojas), cocos (amarilla) y la sustancia amorfa.

Así mismo se hicieron fotografías a microscopio electrónico para ambos biofilms. Observamos que la mayoría de leucocitos estaban muertos y lisados (Figura 25).



**Figura 25. Fotografías al TEM del biofilm: SASM 29213: coco (A-1 y B-1) y leucocito (A-2), junto con la sustancia amorfa (B-2). También fotografía a ME de los leucocitos en el biofilm recuperado de SARM BAA-39 (C). Se observan leucocitos: Fase inicial de muerte (C-1); mantiene la forma celular (C-2) y completamente lisados (C-3).**

Se realizaron fotografías con el microscopio electrónico de rastreo (SEM) del biofilm de SASM de 3 días.

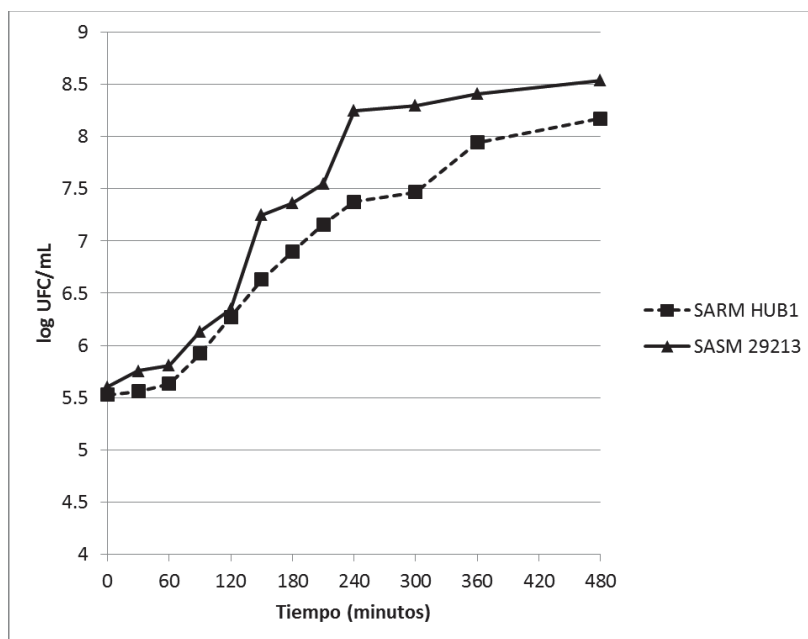


**Figura 26. Imagen a SEM (1200x) del biofilm de SASM 29213. Se observan los cocos y toda la matriz del biofilm.**

## RESULTADOS

### **Objetivo 1b. Modelo de biofilm *in vitro* por SASM y SARM en un sistema CDC Biofilm Reactor**

Las curvas de crecimiento para las cepas utilizadas en los estudios del reactor (SASM 29213 y SARM HUB1) se muestran a continuación:

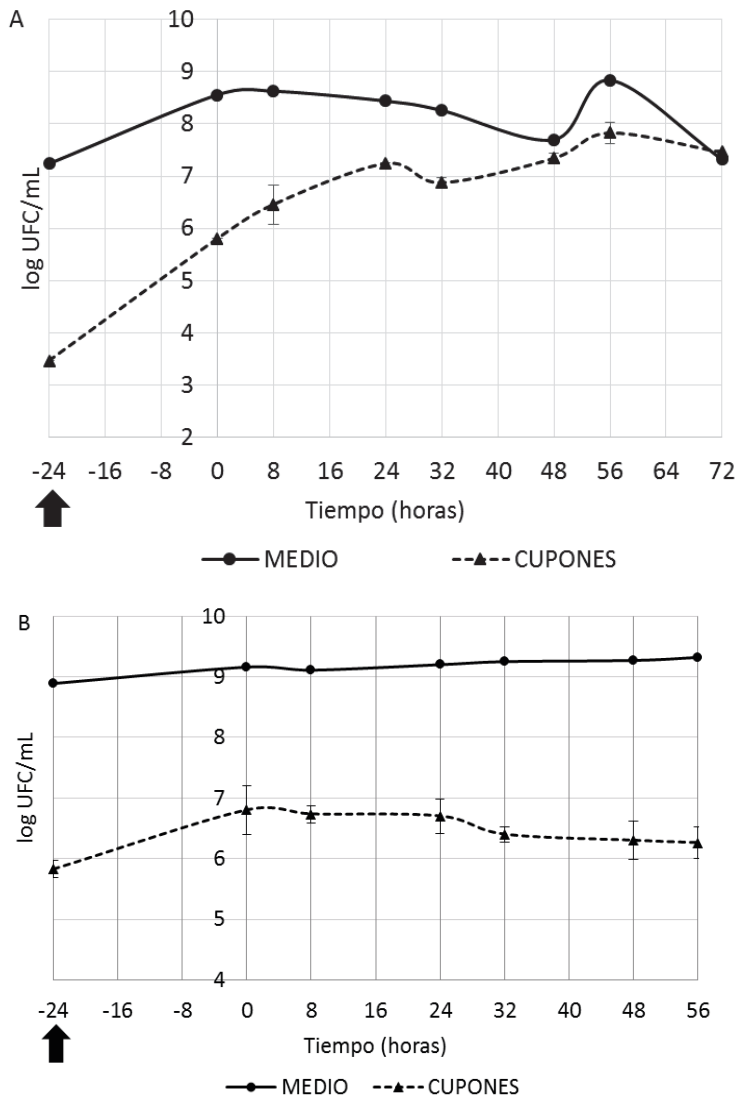


**Figura 27. Curvas de crecimiento para SASM 29213 y SARM HUB1.**

La cinética de crecimiento de la cepa sensible fue más rápida que la cepa resistente, con un tiempo de generación medio de 50 min vs 83 min, respectivamente ( $P=0.03$ ). Se fijó entonces el tiempo de residencia de 30 minutos en el reactor (tiempo menor que el tiempo de generación de las cepas bacterianas) para la fase dinámica. El equivalente a este tiempo de residencia fue la utilización de una velocidad de aclaramiento en el reactor de 11.67mL/min (esto es, el flujo de entrada y salida de medio en el reactor fijado para la bomba de infusión durante la fase dinámica de formación del biofilm).

Prueba 1: Evaluación de la variable tiempo durante la fase estática.

Los experimentos se hicieron con la cepa SASM 29213, comparando una fase estática de 72 horas con otra de 24 horas (-24 horas), ambas seguidas de una fase dinámica de 24 horas (0 horas). Los recuentos bacterianos fueron:

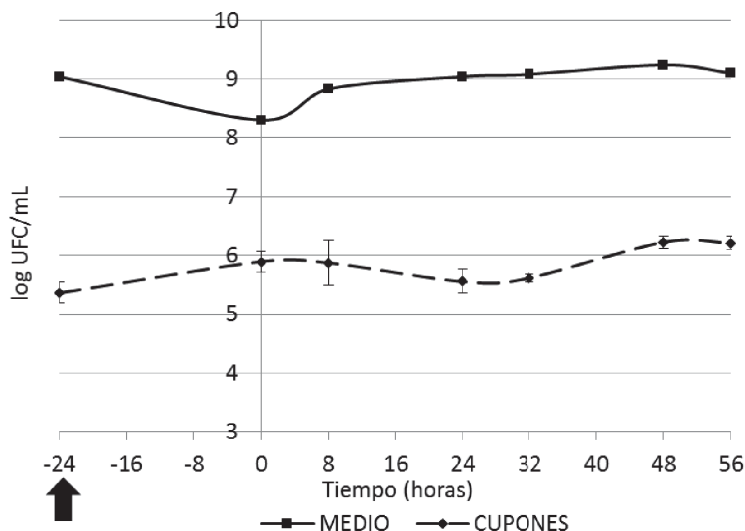


**Figura 28.** Recuentos bacterianos (log UFC/mL) a lo largo del tiempo para la cepa SASM 29213 recuperados del medio y de los cupones (media) tras (A) una fase estática de 72 horas y (B) una fase estática de 24 horas. La finalización de la fase estática (-24h) se indica con la flecha. Eje de abscisas (Tiempo): los valores en negativo indican la fase de formación de biofilm, los valores en positivo la fase destinada al tratamiento (en este caso, controles).

## RESULTADOS

Los experimentos realizados con una fase inicial estática de 72 horas mostraban unos recuentos bajos de bacterias adheridas a los cupones y claramente inferiores a los recuperados tras una fase estática de 24 horas (Figura 28, hora -24), poniendo en duda la entidad del biofilm formado en los cupones con estas condiciones. Por el contrario, utilizando una fase estática de 24 horas se garantizaba no solo unos recuentos bacterianos superiores, sino también una mayor estabilidad a lo largo de todo el experimento, lo que sugería la formación de un biofilm más adecuado para realizar los estudios terapéuticos. Realizamos entonces una prueba con la cepa de SARM HUB1 con estas condiciones, 24 horas de fase estática y 24 horas de fase dinámica, y pudimos confirmar un comportamiento similar de esta cepa bajo las mismas condiciones.

Los resultados fueron los siguientes:



**Figura 29. Recuentos bacterianos (log UFC/mL) a lo largo del tiempo para la cepa SARM HUB1 recuperados del medio y de los cupones (media) tras una fase estática de 24 horas. La finalización de la fase estática (-24h) se indica con la flecha. Eje de abscisas, igual que Figura previa.**

Tras establecer el mejor perfil del modelo con una fase estática de 24 horas, determinamos las CMB para cloxacilina en el medio y en los cupones tras la fase estática y en la hora 0 y la comparamos con la CMB de la cepa original.

Fueron las siguientes:

CMB (mg/L)	Medio	Cupones	Cepa original
fase estática	64	32	1
Hora 0	32	32	1

**Tabla 9. CMBs de SASM para cloxacilina en el medio y cupones recuperados tras la fase estática y en la hora 0 y su comparativa con la CMB de la cepa original.**

PRUEBA 2: Evaluación variable inóculo inicial.

Una vez fijada la duración de la fase estática, realizamos pruebas sobre la concentración del inóculo a utilizar, comparando los recuentos bacterianos tras 24 horas de la fase estática (pre-dinámica) con inóculos iniciales de  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL. Los resultados obtenidos utilizando la cepa SASM 29213 fueron:

	Recuentos bacterianos Log UFC/mL		
	Inicial- $10^5$ (5.53)	Inicial- $10^6$ (6.68)	Inicial- $10^7$ (7.04)
Medio	6.68	7.03	9.04
Cupón A	4.57	4.77	6.01
Cupón B	3.4	4.77	5.68
Cupón C	3.5	4.57	5.73

**Tabla 10. Recuentos bacterianos de la cepa SASM 29213 representados en log UFC/mL tras 24 horas de incubación en fase estática con diferentes inóculos iniciales.**

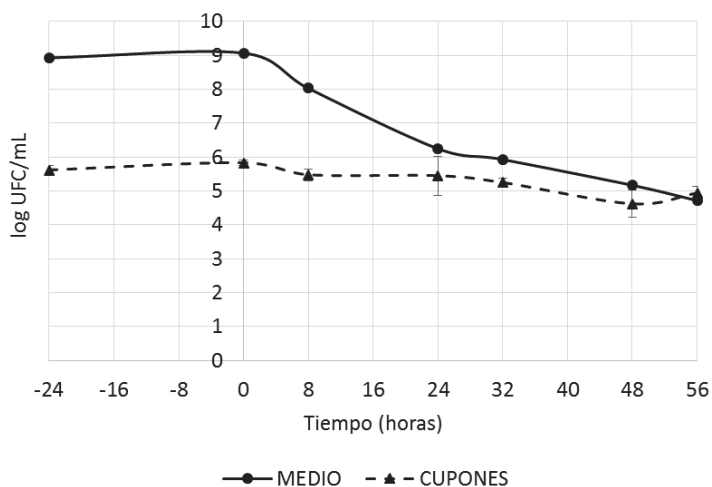
El reactor con un inóculo inicial de 5.53 log UFC/mL fue incubado durante 24 horas más (un total de 48h) para observar el crecimiento bacteriano. Tras este periodo de tiempo no se observaba turbidez en el medio del reactor, ni incremento de los recuentos bacterianos. Por lo contrario, ello sí ocurría aumentando dicho inóculo inicial. Finalmente, se fijó el inóculo inicial en aproximadamente  $10^7$  UFC/mL ya que a esta concentración se obtenían recuentos bacterianos suficientemente elevados ( $\geq 5$  log UFC/mL) en los cupones antes de la fase dinámica.

Este resultado sirvió de referencia para estandarizar también el modelo con la cepa SARM HUB1 con un inóculo de  $10^7$  UFC/mL.

## RESULTADOS

### PRUEBA 3: Evaluación del grado de restricción del medio de cultivo durante la fase dinámica.

Evaluamos la aplicación de una restricción del medio de cultivo al 10% durante la fase dinámica y la fase de tratamiento y evaluamos la eficacia de cloxacilina frente a la infección reproducida en estas condiciones. Los recuentos bacterianos obtenidos de SASM 29213 fueron:



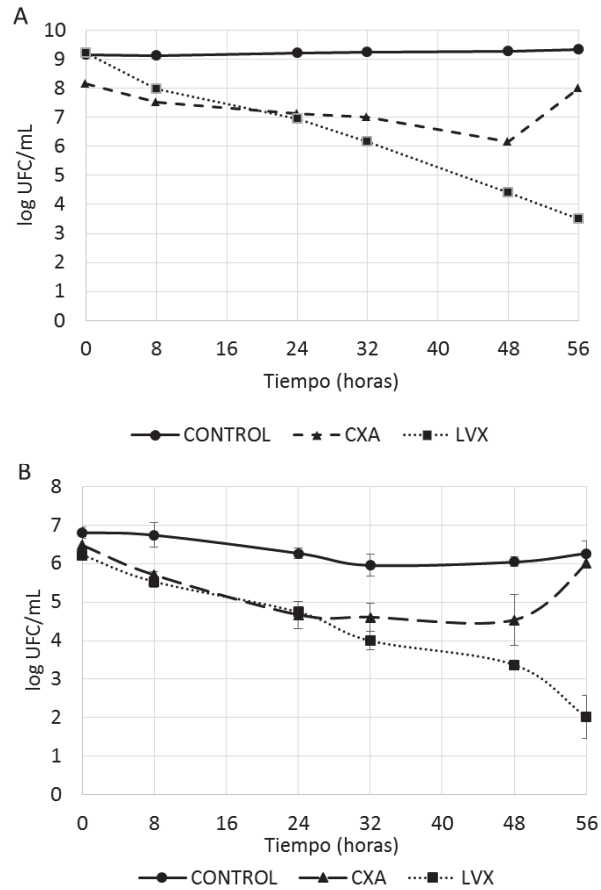
**Figura 30. Recuentos bacterianos (log UFC/mL) de la cepa SASM 29213 recuperados del medio y de los cupones (media) en los diferentes puntos horarios con tratamiento de cloxacilina con perfusión continua de 8 mg/L.**

Si bien el tratamiento con cloxacilina prácticamente no redujo el recuento bacteriano del biofilm, se apreció que la CMB de las muestras obtenidas de los cupones en la hora 0 era únicamente de 4 mg/L, muy inferior a la cifra de 32mg/L detectada en los estudios previos. Con estos datos, se decidió hacer el resto de experimentos con medio de restricción al 20%.

### PRUEBA 4: Efectividad antibiótica

Tras fijar las diferentes variables, se evaluó y comparó la eficacia de cloxacilina a 32mg/L en perfusión continua, levofloxacino (en bolus cada 24 horas) y un control, utilizando la cepa SASM 29213.

Los resultados fueron:



**Figura 31. Recuentos bacterianos (logUFC/mL) de SASM 29213 del medio (A) y de los cupones (B) en los diferentes puntos horarios para el tratamiento con cloxacilina, levofloxacino y el control.**

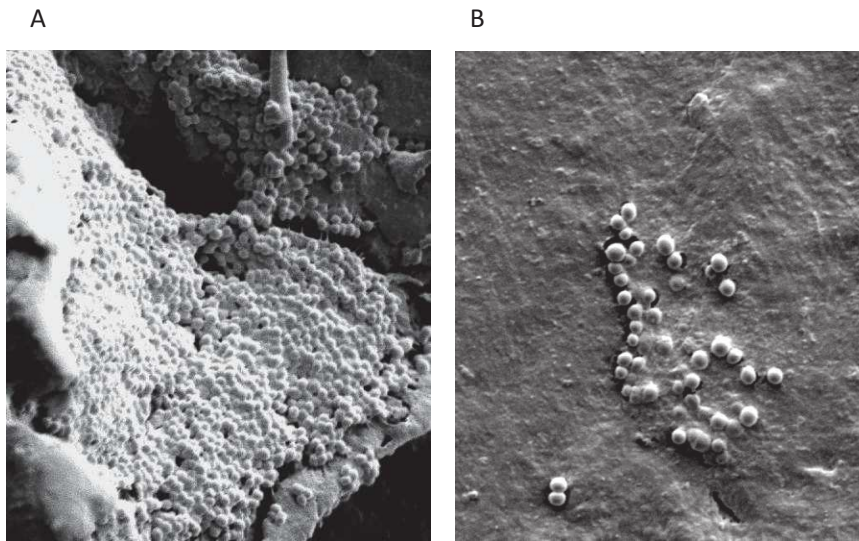
Levofloxacino fue bactericida frente a bacterias del medio, así como del biofilm presente en los cupones. Si bien cloxacilina tuvo una cierta actividad, no fue bactericida y las bacterias presentaron recrecimiento a las 56 horas. Estos resultados nos confirmaban de forma indirecta la presencia de un biofilm lo suficientemente formado como para mostrarse “resistente” al efecto de cloxacilina, un antibiótico con notable actividad bactericida frente a las bacterias en fase exponencial y, por el contrario, “sensible” al efecto de levofloxacino, de conocida actividad frente a las bacterias en fase estacionaria y en el contexto del biofilm bacteriano.



## RESULTADOS

Asumimos, que la cepa de SARM tenía un comportamiento parecido a la de SASM, ya que los recuentos bacterianos eran similares.

Realizamos asimismo fotografías a microscopio electrónico de los cupones tras la fase de acondicionamiento del biofilm de SASM ATCC 29213 (hora 0) y tras un tratamiento (hora 56). Observamos en las fotografías que SASM formaba biofilm en forma de agregados en la superficie del cupón tras la fase de acondicionamiento, y éstos eran prácticamente eliminados tras ser tratado (Figura 32).



**Figura 32. Fotografías al SEM de la cepa SASM 29213 en el reactor de (A) un cupón tras la fase de acondicionamiento (hora 0) donde se observa el biofilm formado (x1000) y (B) un cupón tras ser tratado (hora 56) (x2000).**

De esta manera, el modelo del reactor quedaba estandarizado de la siguiente manera:

- Fase de acondicionamiento: 24 horas en fase estática con TSB al 100% suplementado con 1% de glucosa, seguido de 24 horas en fase dinámica con TSB al 20% y una velocidad de 11.67mL/min.
- Tratamiento antibiótico: 56 horas con TSB al 20%.

## **Objetivo 2. Eficacia de daptomicina y sus combinaciones en el modelo animal por SASM**

### **Objetivo 2a. Eficacia de daptomicina-cloxacilina**

**Artículo 1. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabo J, Ariza J. “Comparative efficacy of Cloxacillin-Daptomycin and the standard Cloxacillin-Rifampin therapies against an experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014; 58:5577-80.**

El tratamiento estándar recomendado en las primeras fases de las infecciones protésicas causadas por SASM se basa en la combinación del betalactámico cloxacilina con rifampicina. No obstante, este tratamiento no se aconseja en los primeros días de la infección, por el efecto antagonista *in vitro* que tiene esta combinación y para minimizar el riesgo de aparición de resistencias a rifampicina. Por otra parte, debe tenerse en cuenta la escasa eficacia de los antibióticos betalactámicos en monoterapia frente a inóculos elevados en infecciones asociadas a cuerpo extraño.

Daptomicina a altas dosis en combinación ha demostrado su eficacia frente a infecciones estafilocócicas de difícil tratamiento y, en particular, su combinación con cloxacilina ha resultado prometedora frente a la bacteriemia persistente causada por SARM. Teniendo en cuenta la actividad inherente de cloxacilina frente a SASM, nos propusimos estudiar la eficacia de esta combinación utilizando un modelo *in vivo* de infección de cuerpo extraño y comparándola con el tratamiento estándar de cloxacilina con rifampicina.

#### Estudios de sensibilidad *in vitro*

Se determinaron las CMI y CMBs para SASM 29213 en fase exponencial y en fase estacionaria para los diferentes antibióticos utilizados.

Los resultados fueron:

## RESULTADOS

Antibiótico	Fase exponencial ( $10^5$ UFC/mL)		Fase exponencial ( $10^8$ UFC/mL)	Fase estacionaria
	CMI(mg/L)	CMB(mg/L)	CMB(mg/L)	CMB(mg/L)
Daptomicina	0.5	1	16	32
Rifampicina	0.015	0.12	>8	>8
Cloxacilina	0.5	1	>32	>32

**Tabla 11. CMI y CMBs para SASM 29213 de los tres antibióticos de estudio en las diferentes fases de crecimiento.**

Daptomicina fue el único antibiótico con actividad bactericida en todas las fases.

En concordancia con estudios anteriores, se observó el efecto antagonista de la combinación de cloxacilina con rifampicina en fase exponencial con inóculos estándar (Tabla 12), mientras que con altos inóculos y en fase estacionaria la combinación se mostró indiferente.

$\Delta \log [\log (\text{UFC}_t) - \log (\text{UFC}_0)]$  para:

Tiempo (h)	CXA (1)	CXA(2)	RIF(0.12)	CXA(1)+RIF(0.12)	CXA(1)+RIF(8)	CXA(2)+RIF(0.12)	CXA(2)+RIF(8)
6	-1.2	-2.5	-1.8	-1.2	-1.3	-1.3	-1.2
24	-3.1	-3.6	-3.3	-1.6	-1.4	-1.8	-1.1

**Tabla 12. Cambios logarítmicos en el recuento de células viables obtenidas con varias concentraciones de cloxacilina (CXA) en solitario y en combinación con rifampicina (RIF) frente a inóculos estándar ( $10^5$ UFC/mL) de SASM 29213. Los números en paréntesis representan concentraciones en mg/L.**

En fase logarítmica con inóculos estándar, la adición de daptomicina (1 xCMI) a cloxacilina tuvo un efecto sinérgico y bactericida, con concentraciones de cloxacilina de  $\frac{1}{4}$  xCMI y  $\frac{1}{2}$  xCMI respectivamente. En fase logarítmica con inóculos elevados se requirió daptomicina a concentraciones de 8 xCMI en combinación con cloxacilina para producir una actividad sinérgica y bactericida. En fase estacionaria sin embargo la combinación no fue sinérgica, y el efecto bactericida de la combinación se obtuvo con concentraciones bactericidas de daptomicina (64 xCMI) (Figura 33).

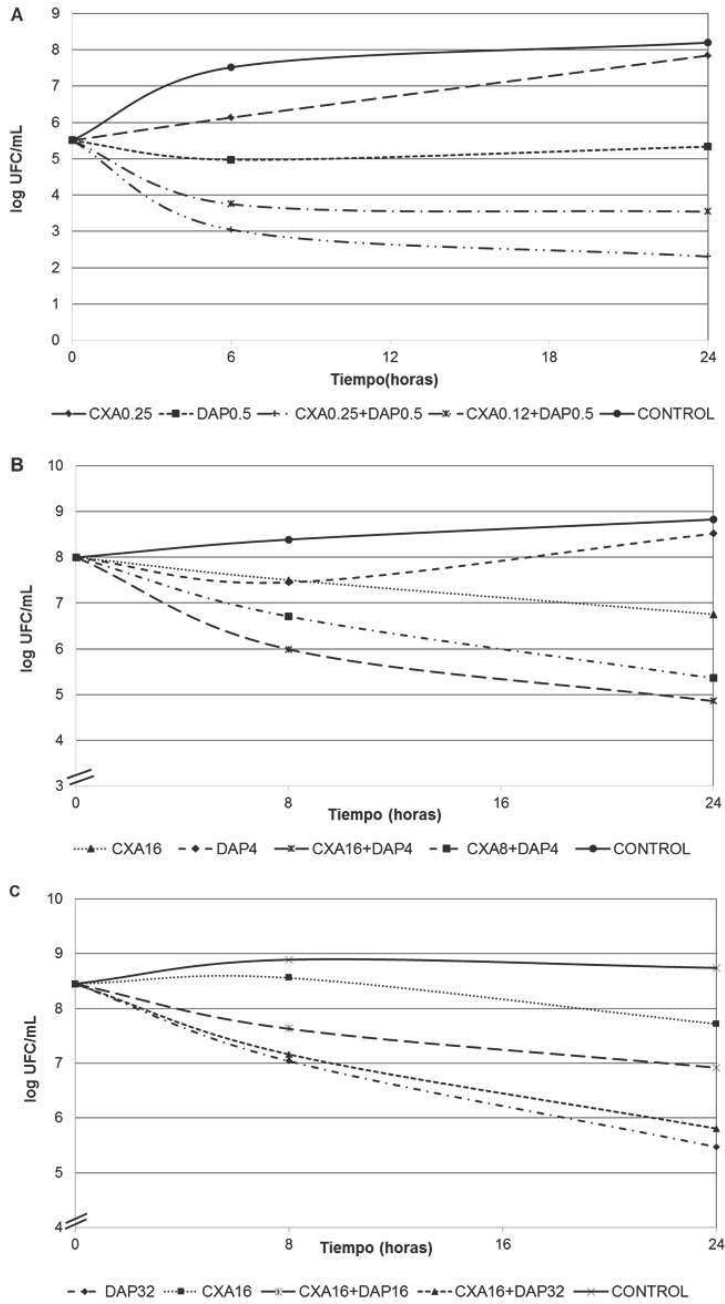


Figura 33. Curvas de letalidad para SASM 29213 en fase logarítmica con inóculos estándar (A) y altos inóculos (B) y en fase estacionaria (C) para cloxacilina (CXA), daptomicina (DAP), su combinación y el control.

## RESULTADOS

### Estudios de farmacocinética

Las dosis utilizadas en las pautas antibióticas y sus principales características farmacocinéticas se muestran en la tabla 13. Para determinarlas se hicieron nuevos estudios farmacocinéticos para daptomicina utilizando el sistema de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), de mayor sensibilidad que el método de bioensayo utilizado en anteriores estudios de nuestro grupo. Los niveles observados en el suero y en el líquido de las cajas de los animales tras administrar una dosis de 45mg/kg/día fueron: concentración máxima de 118mg/L y 41 mg/L, respectivamente; concentración valle de <5mg/L y 17mg/L y áreas bajo la curva de 0 a infinito de 800 mg·h/L y 740 mg·h/L, respectivamente. Estos valores se consideraron equivalentes a los obtenidos en humanos con daptomicina de 8 a 10mg/Kg/día.

Los datos referentes a cloxacilina y rifampicina se obtuvieron de estudios previamente realizados (ver Material y Métodos).

Antibiótico (mg·kg/h)	RATAS						HUMANOS	
	LC				SUERO		SUERO	
	Cmax (mg/L)	Valle (mg/L)	AUC (mg·h/L)	T>CMI (%)	Cmax (mg/L)	AUC (mg·h/L)	Cmax (mg/L)	AUC (mg·h/L)
Cloxacilina (200/12)	43	3.88	ND	100	68.18	ND*	60-80	ND
Daptomicina (45/24)	41	17	740	-	118	800	106-130	773- 1013
Rifampicina (25/12)	6.6	3.8	304	-	24	277.6	8	150-200

**Tabla 13. Principales parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos con las dosis en animales y sus equivalentes en humanos. ND\*: no determinado.**

### Estudios *in vivo*:

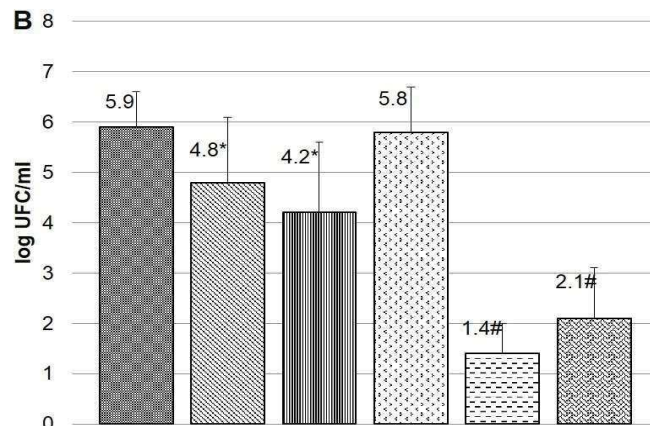
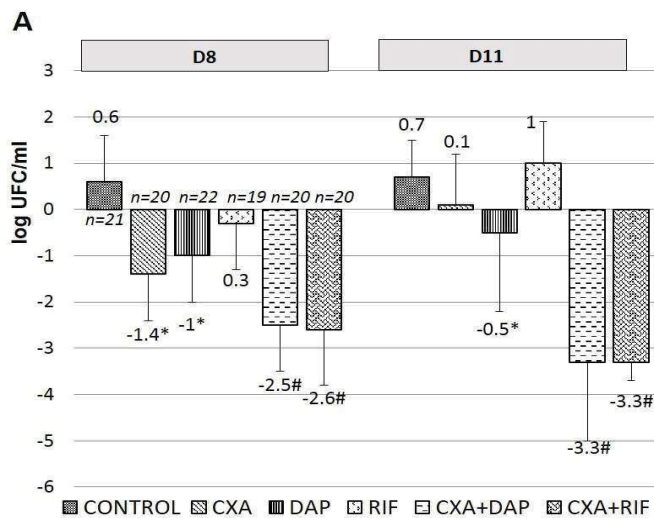
Una vez que determinamos las dosis a administrar de daptomicina, realizamos los estudios *in vivo* en el modelo animal. Los principales resultados fueron (ver Figura 34):

i/ Efectos de las monoterapias

Todas ellas mostraron una eficacia discreta o moderada. El uso de daptomicina y rifampicina se acompañó de la aparición de cepas resistentes, tanto en el líquido de las cajas como en las piezas de metacrilato. Este fenómeno no se observó con cloxacilina.

ii/ Efectos de las combinaciones

Las combinaciones con cloxacilina mostraron mayor eficacia que las monoterapias y el control, y protegieron de la aparición de resistencias a daptomicina y rifampicina. Cloxacilina-daptomicina y cloxacilina-rifampicina tuvieron una eficacia similar y fueron los únicos grupos con tasas de curación el día 11. El estudio de subpoblaciones no detectó poblaciones resistentes a daptomicina ni en la cepa original ni en las cepas recuperadas *ex vivo* de los grupos control ni en el grupo tratado con daptomicina-cloxacilina (Tabla 14).



## RESULTADOS

**FIGURA 34.** Descensos en los recuentos bacterianos de SASM 29213 del líquido de las cajas el día 8 y 11 (A) y el recuento bacteriano recuperado de los CV el día 11 (B). Los recuentos bacterianos están expresados en logaritmo de las UFC/mL ( $\pm$  Desviación Estándar (DE)). \*, grupos terapéuticos que tuvieron mejor eficacia que el control ( $P < 0.05$ ); #, grupos terapéuticos tuvieron mejor eficacia que el control y las monoterapias ( $P < 0.05$ ); n, número de cajas; D8, día 8; D11, día 11; CV, coverslips; CXA, cloxacilina; DAP, daptomicina; RIF, rifampicina.

Grupos terapéuticos (no. de muestras) <sup>a</sup>	No. de muestras con cepas resistentes/no. total de muestras (%) de:		CMI (mg/L) de cepas resistentes aisladas
	LC	CV	
Control (21) <sup>b</sup>	0	0	
CXA (20)	0	0	
DAP (22)	35	35	2-3
RIF (19)	88	88	2-4
CXA+DAP (20) <sup>b</sup>	0	0	
CXA+RIF (20)	0	0	

**Tabla 14.** Estudio de subpoblaciones de las cepas recuperadas *ex vivo* y la cepa original.

<sup>a</sup>CXA, cloxacilina; DAP, daptomicina; RIF, rifampicina.

<sup>b</sup>No se detectaron subpoblaciones a daptomicina con CMIs  $\geq 0.5$  mg/L entre la cepa original (ATCC 29213) o entre las cepas recuperadas *ex vivo* del control o el grupo tratado con daptomicina-cloxacilina.

En resumen, cloxacilina y daptomicina en monoterapia mostraron menor eficacia que las terapias combinadas en la infección de cuerpo extraño causada por SASM, y aparecieron cepas resistentes a daptomicina. La combinación de cloxacilina con daptomicina a altas dosis se mostró igual de efectiva que el tratamiento estándar de referencia de cloxacilina-rifampicina y evitó la aparición de resistencia. Nuestros resultados apoyan la idea de que la combinación de cloxacilina con daptomicina podría ser considerada como una terapia alternativa anti-SASM para la infección de cuerpo extraño, especialmente en la fase inicial del tratamiento de estas infecciones.

## **ANEXO**

**Artículo 1.** El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabo J, Ariza J. “Comparative efficacy of Cloxacillin-Daptomycin and the standard Cloxacillin-Rifampin therapies against an experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014; 58:5577-80.





# Comparative Efficacies of Cloxacillin-Daptomycin and the Standard Cloxacillin-Rifampin Therapies against an Experimental Foreign-Body Infection by Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

Cristina El Haj,<sup>a</sup> Oscar Murillo,<sup>a</sup> Alba Ribera,<sup>a</sup> Mireia Vivas,<sup>a</sup> Dolores Garcia-Somoza,<sup>b</sup> Fe Tubau,<sup>b</sup> Javier Cabo,<sup>c</sup> Javier Ariza<sup>a</sup>

Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service,<sup>a</sup> and Departments of Microbiology<sup>b</sup> and Orthopaedic Surgery,<sup>c</sup> IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga, L'Hospitalet Llobregat, Barcelona, Spain

**We compared the efficacies of daptomycin (doses equivalent to 8 to 10 mg/kg of body weight/day in humans) and cloxacillin alone with those of cloxacillin-rifampin and cloxacillin-daptomycin combinations, using a tissue cage methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) infection model. Monotherapies were less effective than combinations ( $P < 0.05$ ), and daptomycin resistance emerged. Cloxacillin-daptomycin proved as effective as cloxacillin-rifampin and prevented the appearance of resistance; this combination may be an alternative anti-MSSA therapy, which may offer greater benefits in the early treatment of prosthetic joint infections (PJI).**

Current guidelines for the treatment of prosthetic joint infections (PJI) caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) recommend intravenous cloxacillin plus rifampin during the first weeks (1), but the suboptimal efficacy of beta-lactams against high bacterial inocula and the *in vitro* antagonistic effect of the combination are issues of concern (2–5).

The use of daptomycin at high doses (HD; 8 to 10 mg/kg of body weight/day) in combination against difficult-to-treat methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections is encouraged (6). In particular, daptomycin-cloxacillin has proved efficacy in the treatment of persistent bacteremia caused by MRSA (7, 8) but only modest effectiveness against experimental foreign-body infection (FBI) (9). Taking into account the inherent anti-MSSA killing by cloxacillin, we aimed to study the *in vivo* efficacy of the combination cloxacillin-daptomycin at high doses, using a rat tissue cage MSSA infection model, and to compare its efficacy with that of the standard treatment with cloxacillin-rifampin.

MSSA strain ATCC 29213 was used for *in vitro* and *in vivo* studies. The MICs, minimal bactericidal concentrations (MBCs), and time-kill curves were determined in the log phase (inocula of  $10^5$  CFU/ml and  $10^8$  CFU/ml) and in the stationary phase, using the methodology described elsewhere (10–13).

Cloxacillin showed bactericidal activity only in the log phase with standard inocula ( $10^5$  CFU/ml); in accordance with previous findings, the addition of rifampin to bactericidal concentrations of cloxacillin produced an antagonistic effect (Table 1) (2, 4, 14). The addition of daptomycin to cloxacillin finally achieved a bactericidal effect under all study conditions, which required daptomycin concentrations of  $1\times$  and  $8\times$  MIC with the use of standard

inocula (log phase) and high inocula (log phase), respectively, and of  $64\times$  MIC (the MBC of daptomycin) with the use of bacteria in the stationary phase (Fig. 1). The bactericidal and synergistic antistaphylococcal activity of the daptomycin-cloxacillin combination against MRSA strains has been documented (7, 8, 15), but little is known about the anti-MSSA efficacy of this combination.

The rat tissue cage infection model (approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona) had previously been standardized by our group (10, 16). Briefly, the methodology used consisted of subcutaneous implantation in Wistar rats of two Teflon tissue cages with two polymethylmethacrylate coverslips (CV). After 3 weeks, the tissue cage fluid (TCF) was percutaneously infected with  $0.1$  ml of an MSSA preparation ( $0.2 \times 10^6$  to  $2 \times 10^6$  CFU/ml). One week later (designated day 1), TCF was obtained to quantify bacterial counts; therapy was then started and administered intraperitoneally for 7 days. One and 4 days after the end of treatment (days 8 and 11, respectively), TCF was again recovered to count bacteria. On day 11, animals were sacrificed, and CV were removed and processed as described previously (10) to quantify adherent bacteria and the

Received 27 February 2014 Returned for modification 14 April 2014

Accepted 15 June 2014

Published ahead of print 23 June 2014

Address correspondence to Cristina El Haj, celhaj@idibell.cat.

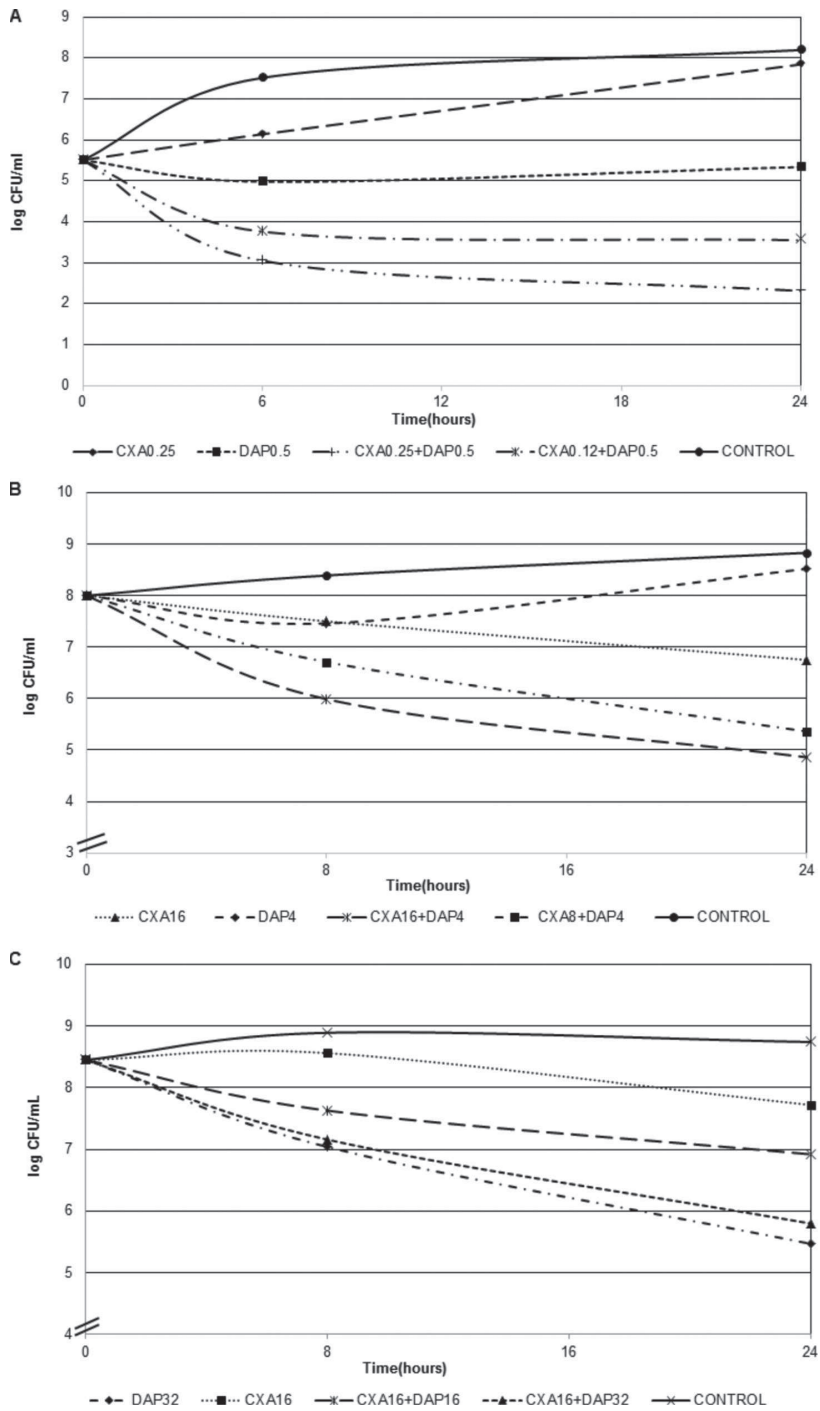
Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02681-14

**TABLE 1** Log changes in viable cell counts obtained with various concentrations of cloxacillin alone and in combination with rifampin against standard inocula ( $10^5$  CFU/ml) of MSSA strain ATCC 29213 in the log phase<sup>a</sup>

Time point (h)	Log change [ $\log(\text{CFU}_t) - \log(\text{CFU}_0)$ ] for:						
	CXA (1)	CXA (2)	RIF (0.12)	CXA (1) + RIF (0.12)	CXA (1) + RIF (8)	CXA (2) + RIF (0.12)	CXA (2) + RIF (8)
6	-1.2	-2.5	-1.8	-1.2	-1.3	-1.3	-1.2
24	-3.1	-3.6	-3.3	-1.6	-1.4	-1.8	-1.1

<sup>a</sup> Experiments were performed with three replicates. CFU<sub>t</sub>, number of CFU at the given time point; CFU<sub>0</sub>, number of CFU at time zero; CXA, cloxacillin (purity, 98.1%; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain); RIF, rifampin (purity, 98%; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Numbers in parentheses represent concentrations in mg/liter.



**FIG 1** Results of time-kill curves in the log phase, with standard (A) and high (B) bacterial inocula, and in the stationary phase (C) for different concentrations of cloxacillin alone and in combination with daptomycin. Concentrations are in mg/liter. CXA, cloxacillin (purity, 98.1%; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain); DAP, daptomycin (purity, 100%; Novartis, Basel, Switzerland).

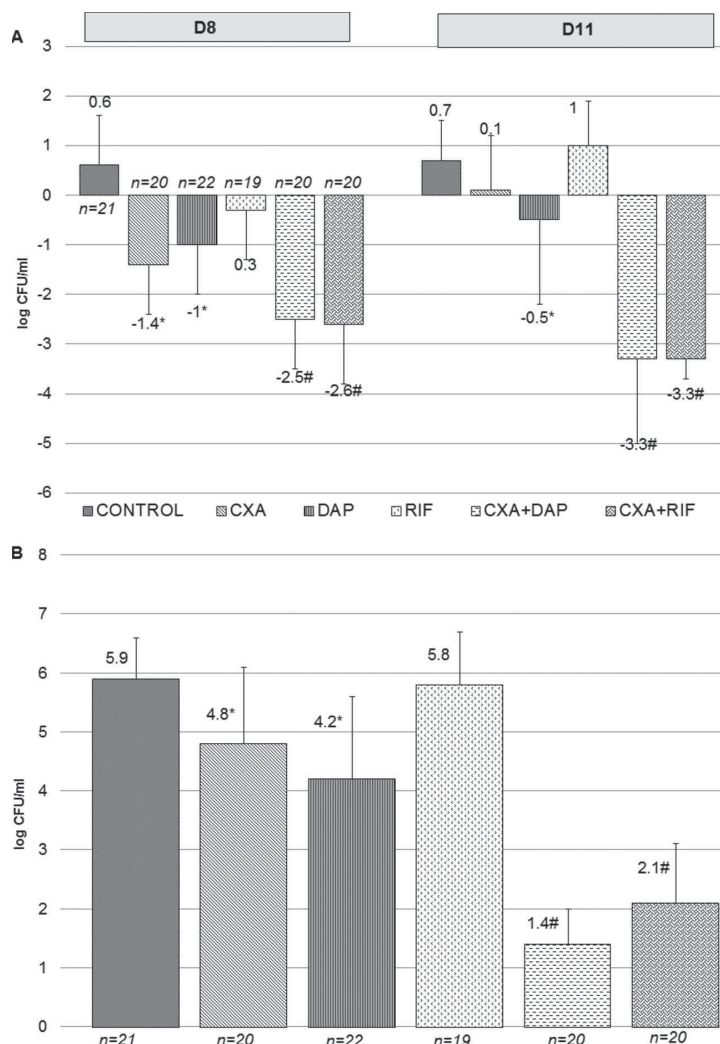


FIG 2 Decreases in counts of bacteria recovered from TCF at day 8 and day 11 (A) and counts of bacteria recovered from CV at day 11 (B). Bacterial counts are expressed in mean log numbers of CFU/ml ( $\pm$  standard deviation [SD]). \*, therapeutic groups achieved higher efficacy than the control ( $P < 0.05$ ); #, therapeutic groups achieved greater efficacy than the control and monotherapies ( $P < 0.05$ ); n, number of tissue cages; D8, day 8; D11, day 11; CV, coverslips; CXA, cloxacillin; DAP, daptomycin; RIF, rifampin.

infection cure rate (the percentage of samples with bacterial counts under the limit of detection with respect to the total number of samples). The methodology for pharmacokinetic (PK) studies and the PK-pharmacodynamic (PD) parameter values for cloxacillin (200 mg/kg/12 h) and rifampin (25 mg/kg/12 h) have been previously described (10). For the particular case of daptomycin, we used a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay (17). Samples, calibrators, or quality controls (100  $\mu$ l) were mixed with acetonitrile (100  $\mu$ l) and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 5 min. The method was successfully validated, and the results were linear, over the concentration range studied (5 to 250  $\mu$ g/ml). The analytical results for the calibration standards fulfilled all of the acceptance criteria. The PK parameter values for a rat dosage of 45 mg/kg/day of daptomycin in sera and TCF were

as follows: peak concentrations, 118 and 41 mg/liter, respectively; through concentrations,  $<5$  and 17 mg/liter, respectively; and areas under the concentration-time curve from 0 h to infinity ( $AUC_{0-\infty}$ ), 800 and 740  $\mu$ g-h/ml, respectively, which were equivalent to the values obtained with high doses of 8 to 10 mg/kg/day in humans.

A total of 65 animals were used (130 tissue cages); as some tissue cages were lost due to spontaneous shedding, 122 cages remained at the beginning of the experiments (day 1), with no significant differences between therapeutic groups. The decreases in the bacterial counts from the TCF (days 8 and 11) and the adherent bacterial counts from the CV are shown in Fig. 2. The cure rates on day 11 for the TCF and CV groups were 10.5% and 36.8%, respectively, for cloxacillin-daptomycin and 10.5% and

**TABLE 2** Results for screening of bacteria recovered from TCF and CV for the presence of resistant strains at the end of therapy (day 11)

Treatment group (no. of samples) <sup>a</sup>	No. of samples with resistant strains/total no. of samples (%) <sup>c</sup> from:		MIC (mg/liter) of resistant strains isolated
	TCF	CV	
Control (21) <sup>b</sup>	0	0	
CXA (20)	0	0	
DAP (22)	35	35	2–3
RIF (19)	88	88	2–4
CXA + DAP (20) <sup>b</sup>	0	0	
CXA + RIF (20)	0	0	

<sup>a</sup> CXA, cloxacillin; DAP, daptomycin; RIF, rifampin.

<sup>b</sup> We did not detect subpopulations of daptomycin with MICs of  $\geq 0.5$  mg/liter among the wild-type strain (ATCC 29213) or among strains recovered *ex vivo* from the control or daptomycin-cloxacillin group.

<sup>c</sup> Screening of resistant strains recovered from TCF and CV was performed using the methodology previously described (10,16), with agar plates containing 1  $\mu$ g/ml cloxacillin, rifampin, or daptomycin. Results were interpreted as positive (some macroscopic growth) or negative (no growth).

26.3%, respectively, for cloxacillin-rifampin (no significant differences). There was no cure rate in any other group.

Resistant strains from TCF and CV were screened with agar plates containing 1  $\mu$ g/ml cloxacillin, rifampin, or daptomycin (supplemented with 50 mg/liter calcium chloride dihydrate), as described previously (10, 16); resistant strains were recovered to determine MICs (11). Heteroresistance to daptomycin was studied by the screening of subpopulations able to grow in the presence of  $\geq 0.5$ , 1, 2, and 4 mg/liter daptomycin in population analysis profiles (PAPs; determined as described previously) (16). There was emergence of daptomycin and rifampin resistance only when these therapies were used alone; combinations with cloxacillin protected against the appearance of resistance (Table 2).

To our knowledge, there are no previous data regarding the efficacy of daptomycin alone and in combination with cloxacillin against FBI caused by MSSA. We confirmed that cloxacillin or daptomycin monotherapies were less active than combinations. The activity of cloxacillin alone against experimental FBI caused by MSSA has previously been reported as moderate (10, 18). In contrast, the little previous information on the anti-MSSA activity of daptomycin is limited to the field of experimental endocarditis, in which daptomycin was reported as highly efficacious, even more so than nafcillin (19, 20). In the present work, we used a rat dosage of daptomycin equivalent to high doses in humans (8 to 10 mg/kg/day), but its efficacy was slight and did not protect against the emergence of resistance. *In vivo* development of daptomycin resistance is currently a matter of concern, which has been widely reported in the setting of MRSA infections, even with no exposition to antibiotics (21), but this result was also found in an experimental model of endocarditis caused by MSSA (20, 22).

The benefits of the cloxacillin-daptomycin combination against MRSA strains have been stressed either in terms of efficacy (7, 8) or in terms of prevention of resistance (23); in fact, oxacillin was the most effective antibiotic in preventing daptomycin resistance over time in a recent *in vitro* study (23). Given the inherent anti-MSSA killing by cloxacillin, this combination could provide even higher efficacy in these infections. Our data showed that cloxacillin-daptomycin therapy was as effective as the cloxacillin-rifampin combination and had a safety profile of protection

against resistance; overall, these data supported the idea that this combination may be considered an intravenous alternative anti-MSSA treatment. Our study has the limitation of having used only one MSSA strain, which was not isolated from a difficult-to-treat infection; thus, the generalization of these findings to routine clinical practice should be made with caution.

In conclusion, cloxacillin and daptomycin alone showed lower efficacy than the combined therapies against FBI caused by MSSA, and daptomycin resistance emerged. The combination cloxacillin-daptomycin at high doses proved as effective as the standard reference of cloxacillin-rifampin treatment and prevented the appearance of resistance. Our results support the idea that the cloxacillin-daptomycin combination can be considered an alternative anti-MSSA therapy for FBI, which may offer greater benefits in the early treatment of these infections.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a research grant from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (FIS 11/013) and grants from the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14 and REIPI RD06/0008).

We thank M. Brunet (Pharmacology Laboratory, Biomedic Diagnosis Center, Hospital Clinic-IDIBAPS, Barcelona, Spain) for her assistance in the HPLC method used.

The standardization of daptomycin HPLC was supported by a medical school grant from Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) to Jose M. Miró from the Infectious Diseases Service (Hospital Clinic-IDIBAPS, Barcelona, Spain).

We have no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR. 2013. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 56:e1–e25. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis803>.
- LaPlante KL, Rybak MJ. 2004. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4665–4672. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.12.4665-4672.2004>.
- Van der Auwera P, Klastersky J, Thys JP, Meunier-Carpentier F, Legrand JC. 1985. Double-blind, placebo-controlled study of oxacillin combined with rifampin in the treatment of staphylococcal infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28:467–472. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.28.4.467>.
- Watanakunakorn C, Tison JC. 1982. Antagonism between nafcillin or oxacillin and rifampin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:920–922. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.22.5.920>.
- Zak O, Scheld WM, Sande MA. 1983. Rifampin in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* in rabbits. *Rev. Infect. Dis.* 5(Suppl 3):S481–S490. [http://dx.doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement\\_3.S481](http://dx.doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement_3.S481).
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, Rybak MJ, Talan DA. 2011. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin. Infect. Dis.* 52:285–292. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir034>.
- Rand KH, Houck HJ. 2004. Synergy of daptomycin with oxacillin and other beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2871–2875. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.8.2871-2875.2004>.
- Dhand A, Bayer AS, Pogliano J, Yang SJ, Bolaris M, Nizet V, Wang G, Sakoulas G. 2011. Use of antistaphylococcal beta-lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clin. Infect. Dis.* 53:158–163. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir340>.

9. Garrigos C, Murillo O, Lora-Tamayo J, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. 2012. Efficacy of daptomycin-cloxacillin combination in experimental foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3806–3811. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00127-12>.
10. Murillo O, Domenech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudiol F, Ariza J. 2006. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:4011–4017. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00523-06>.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 8th ed. M7-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
12. Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. 1994. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33:959–967.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
14. Murillo O, Domenech A, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabo J, Cabellos C, Gudiol F, Ariza J. 2008. Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *J. Infect.* 57:229–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2008.07.003>.
15. Steed ME, Vidailac C, Rybak MJ. 2010. Novel daptomycin combinations against daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of simulated endocardial vegetations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:5187–5192. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00536-10>.
16. Murillo O, Garrigos C, Pachon ME, Euba G, Verdaguer R, Cabellos C, Cabo J, Gudiol F, Ariza J. 2009. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4252–4257. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00208-09>.
17. Miro JM, Garcia-de-la-Maria C, Armero Y, Soy D, Moreno A, Del Rio A, Almela M, Sarasa M, Mestres CA, Gatell JM, Jimenez de Anta MT, Marco F. 2009. Addition of gentamicin or rifampin does not enhance the effectiveness of daptomycin in treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4172–4177. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00051-09>.
18. Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. 1991. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J. Infect. Dis.* 163:1369–1373.
19. Nannini EC, Singh KV, Arias CA, Murray BE. 2013. In vivo effect of cefazolin, daptomycin, and nafcillin in experimental endocarditis with a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain showing an inoculum effect against cefazolin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:4276–4281. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00856-13>.
20. Sakoulas G, Rose W, Rybak MJ, Pillai S, Alder J, Moellering RC, Jr, Eliopoulos GM. 2008. Evaluation of endocarditis caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* developing nonsusceptibility to daptomycin. *J. Clin. Microbiol.* 46:220–224. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00660-07>.
21. Mishra NN, Yang SJ, Chen L, Muller C, Saleh-Mghir A, Kuhn S, Peschel A, Yeaman MR, Nast CC, Kreiswirth BN, Cremieux AC, Bayer AS. 2013. Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and mprF polymorphisms. *PLoS One* 8:e71151. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071151>.
22. Jacqueline C, Amador G, Batard E, Le Mabeccue V, Miegerville AF, Biek D, Caillon J, Potel G. 2011. Comparison of ceftaroline fosamil, daptomycin and tigecycline in an experimental rabbit endocarditis model caused by methicillin-susceptible, methicillin-resistant and glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:863–866. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr019>.
23. Berti AD, Wergin JE, Girdaukas GG, Hetzel SJ, Sakoulas G, Rose WE. 2012. Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5046–5053. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00502-12>.

## ERRATUM

# Erratum for El Haj et al., Comparative Efficacies of Cloxacillin-Daptomycin and the Standard Cloxacillin-Rifampin Therapies against an Experimental Foreign-Body Infection by Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*

Cristina El Haj,<sup>a</sup> Oscar Murillo,<sup>a</sup> Alba Ribera,<sup>a</sup> Mireia Vivas,<sup>a</sup> Dolores Garcia-Somoza,<sup>b</sup> Fe Tubau,<sup>b</sup> Javier Cabo,<sup>c</sup> Javier Ariza<sup>a</sup>

Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service,<sup>a</sup> and Departments of Microbiology<sup>b</sup> and Orthopaedic Surgery,<sup>c</sup> IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga, L'Hospitalet Llobregat, Barcelona, Spain

Volume 58, no. 9, p. 5576–5580, 2014. Page 5579: the first paragraph of the Acknowledgments section should read, “This study was supported by a research grant from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (PI10/01001) and grants from the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14 and REIPI RD06/0008).”

**Objetivo 2b. Eficacia de otras combinaciones de daptomicina**

**Artículo2:** El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. “Daptomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection caused by meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus*”. *Int J Antimicrob Agents*, 2015; 46: 189-95.

Mientras que levofloxacino en combinación con rifampicina es considerado el tratamiento óptimo en las infecciones protésicas causadas por SASM, no se han evaluado suficientemente sus alternativas terapéuticas. Basándonos en la alta eficacia que tuvo la combinación de daptomicina a altas dosis (equivalente a 8-10mg/kg/día en humanos) con rifampicina frente a SARM en este ámbito, quisimos evaluar la eficacia de esta combinación y de daptomicina-levofloxacino y compararlas con la terapia estándar en la infección de cuerpo extraño causado por SASM. Realizamos curvas de letalidad en fase exponencial con inóculos estándar y en fase estacionaria. Utilizamos además un modelo de infección de cuerpo extraño en ratas Wistar las cuales fueron tratadas durante 7 días con levofloxacino (100mg/kg/24h), daptomicina (45mg/kg/24h), rifampicina (25mg/kg/12h) o las combinaciones de levofloxacino con rifampicina, daptomicina con rifampicina o daptomicina con levofloxacino.

Se utilizó la misma cepa SASM utilizada en el objetivo 2a. Se determinó la CMI y CMBs para levofloxacino, que fueron:

Antibiótico	Fase exponencial ( $10^5$ UFC/mL)		Fase estacionaria
	CMI(mg/L)	CMB(mg/L)	CMB(mg/L)
<b>Levofloxacino</b>	0.5	1	4

**Tabla 15. CMI y CMB de SASM 29213 para levofloxacino en fase exponencial y estacionaria.**

Las CMIs y CMBs para los otros antibióticos se determinaron con anterioridad en el objetivo 2a.



## RESULTADOS

Los resultados más representativos de los estudios en las curvas de letalidad se muestran en las figuras 35 y 36. La adición de rifampicina a daptomicina en fase logarítmica con inóculos estándar disminuyó (sin llegar a antagonizar) la actividad de daptomicina. En fase estacionaria a concentraciones de rifampicina de 8mg/L tuvo un efecto bactericida cuando se combinó con daptomicina a concentraciones de 8mg/L (16 xCMI).

La adición de levofloxacin (1 xCMI) a daptomicina (0.25 xCMI) resultó en actividad sinérgica y bactericida en fase logarítmica. En fase estacionaria, el efecto fue estrictamente indiferente. Los resultados de las curvas de 24 horas de levofloxacin solo y en combinación con rifampicina frente a la cepa SASM 29213 fueron publicados anteriormente por nuestro grupo.

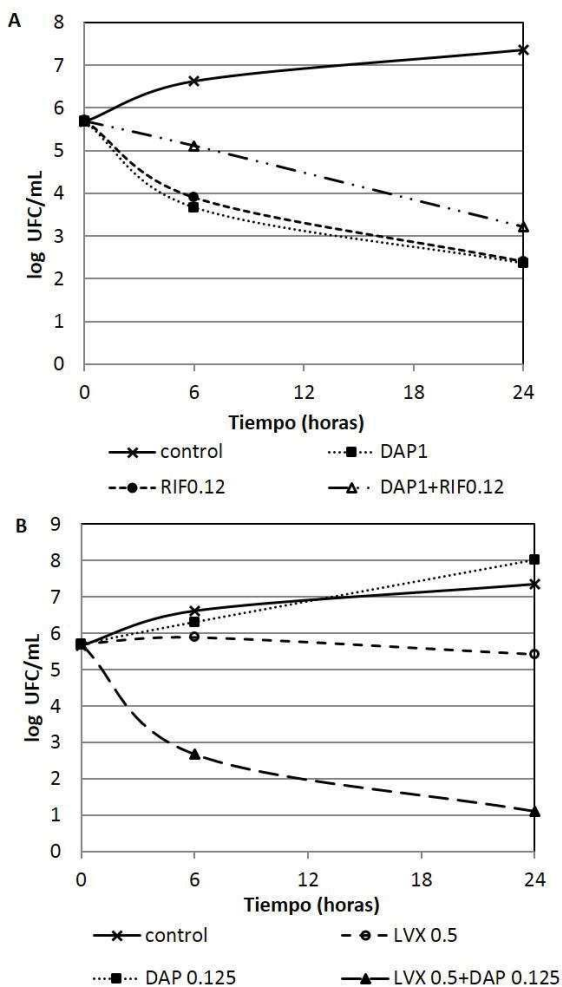


Figura 35. Curvas de letalidad en fase logarítmica con inóculos estándar ( $10^5$ UFC/mL) para SASM 29213. Actividad de (A) daptomicina (DAP), rifampicina (RIF), sus combinaciones y el control y (B) levofloxacino (LVX), DAP, sus combinaciones y el control. Las concentraciones están expresadas en mg/L.

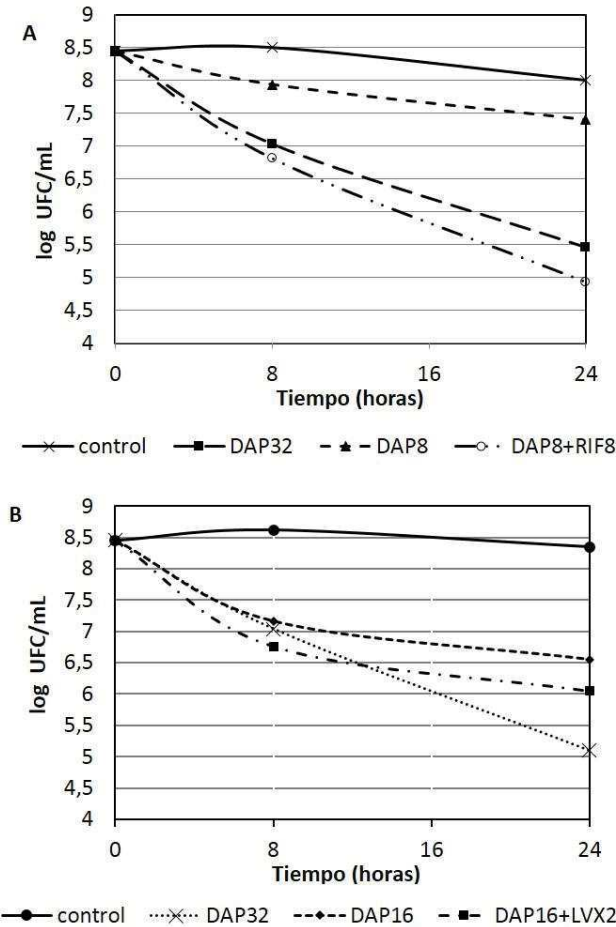


Figura 36. Curvas de letalidad de SASM 29213 en fase estacionaria para (A) daptomicina (DAP), su combinación con rifampicina (RIF) y el control y (B) DAP, su combinación con levofloxacino (LVX) y control.

En los estudios *in vivo* en el modelo animal no se observaron diferencias significativas entre los recuentos de los diferentes grupos terapéuticos el día 1 antes de iniciar los correspondientes tratamientos (Tabla 16).

## RESULTADOS

DÍA 1	DAP	LVX	RIF	DAP+RIF	DAP+LVX	LVX+RIF	CONTROL
logUFC/mL ±DE (n)	6.21±0.43 (n=25)	6.37±0.62 (n=21)	6.29±0.5 (n=22)	6.5±0.75 (n=26)	5.94±0.52 (n=20)	6.43±0.88 (n=21)	6.31±0.72 (n=26)

**Tabla 16. Recuentos bacterianos (log UFC/mL) ± Desviación Estándar (DE) en el líquido de las cajas para SASM el día 1. Abreviaciones: n, número de cajas; DAP, daptomicina, LVX, levofloxacino; RIF, rifampicina.**

Los descensos en los recuentos bacterianos del LC el día 8 y el día 11 y los resultados de la eficacia antimicrobiana frente a las bacterias adherentes del CV se presentan en la figura 37. El día 8, todas las terapias se mostraron más efectivas que el control, excepto rifampicina ( $P < 0.05$ ). Todas las monoterapias fueron menos efectivas que las terapias combinadas en el descenso del recuento de bacterias del líquido de las cajas (el día 8 y el día 11) y en la erradicación de las bacterias adherentes del CV. Entre las monoterapias, levofloxacino fue el tratamiento más eficaz ( $P < 0.05$ ) y no aparecieron cepas resistentes. Entre las terapias combinadas, DAP+RIF fue la más eficaz (descenso en el recuento bacteriano en el LC,  $-4.9$  log UFC/mL), y no hubo diferencias significativas entre la combinación de LVX+RIF ( $-3.4$  log UFC/mL) y DAP+LVX ( $-3.3$  log UFC/mL).

Las combinaciones con LVX no mostraron diferencias significativas en el recuento de bacterias adherentes del CV, aunque la combinación de DAP+LVX mostró el menor recuento en bacterias adherentes en estas combinaciones. DAP+RIF tuvo mejores resultados que con las otras terapias, mostrando recuentos bacterianos en el CV por debajo del límite de detección. El día 8 se observaron tasas de curación aceptables en el líquido de las cajas solo en el grupo tratado con DAP+RIF (32%), mientras que el día 11 fue de 44% para DAP+RIF ( $P < 0.05$  versus el resto de grupos), 6% para LVX+RIF y 6% para DAP+LVX.

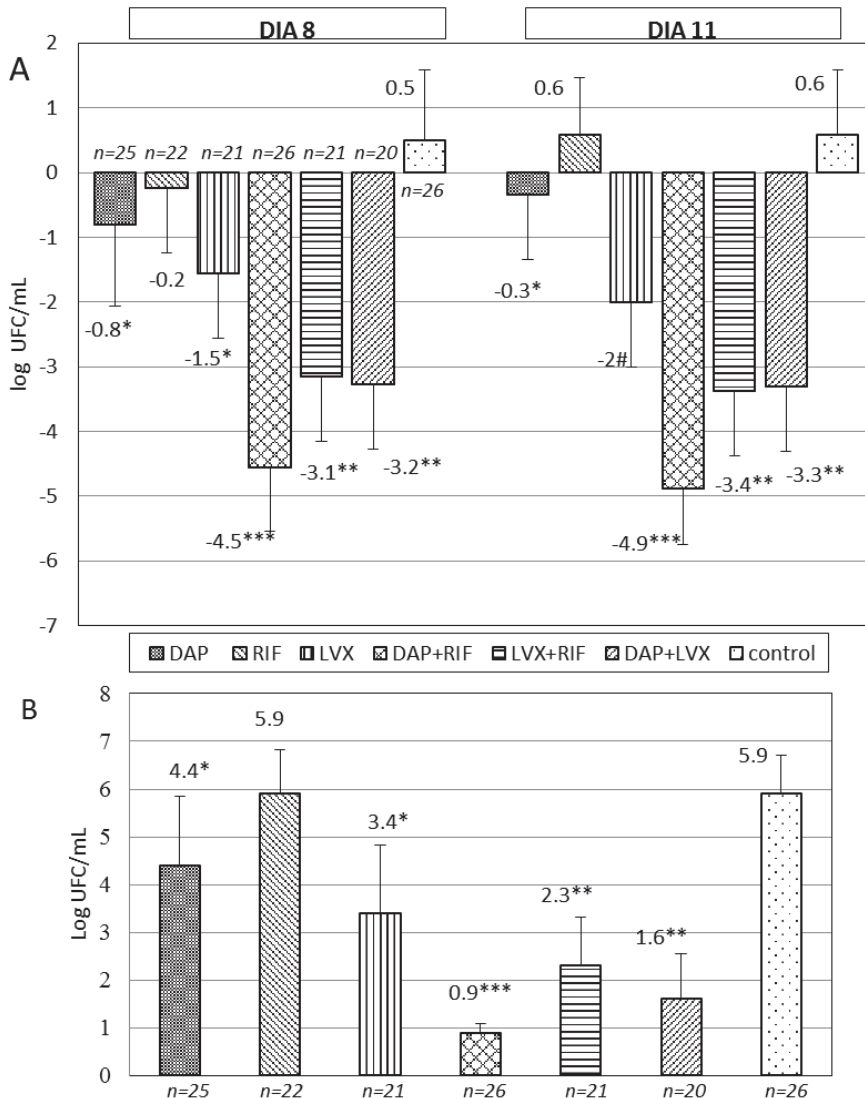


Figura 37. (A) Descensos en el recuento bacteriano de LC los días 8 y 11 expresados en  $\Delta \log \text{UFC/mL}$  y (B) Recuentos bacterianos recuperados del CV el día 11 expresados en  $\log \text{UFC/mL}$ .

\*Grupos terapéuticos que fueron significativamente mejor que el control y el grupo de rifampicina en el líquido de las cajas el día 8, el día 11 y en los CVs ( $P < 0.05$ ).

\*\*Grupos terapéuticos que fueron mejor que el control y las monoterapias ( $P < 0.05$ ); no se apreciaron diferencias entre las combinaciones de DAP+LVX y LVX+RIF.

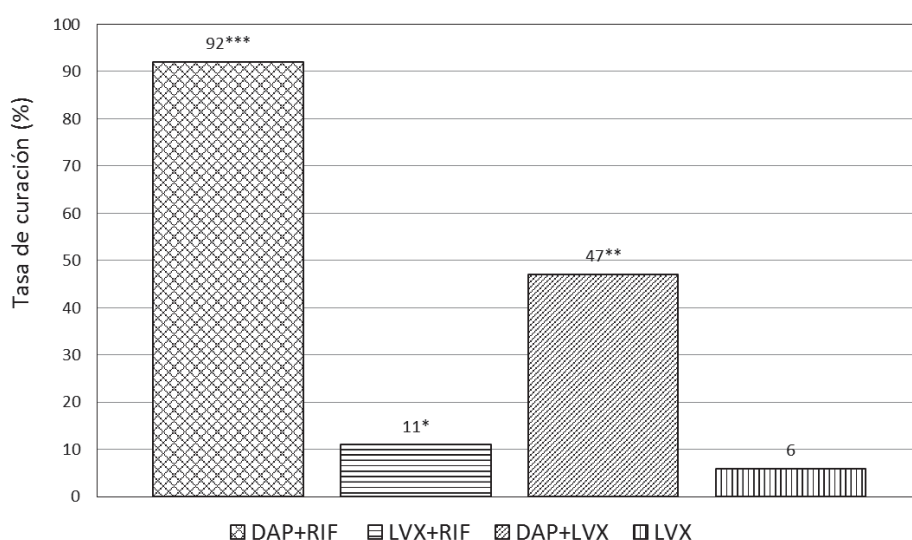
\*\*\*La combinación de DAP+RIF fue la más efectiva de todas las terapias ( $P < 0.05$ ).

# Entre las monoterapias, LVX fue la más eficaz ( $P < 0.05$ ).

Abreviaciones: n, número de cajas; DAP, daptomicina; LVX, levofloxacino; RIF, rifampicina.

## RESULTADOS

La tasa de curación, evaluada el día 11 sobre la infección del CV, se representa en la Figura 38. En este caso DAP+RIF fue el tratamiento más efectivo (tasa de curación de 92%), seguido de DAP+LVX (47%), LVX+RIF (11%) y LVX (6%) ( $P < 0.05$ ). No hubo tasas de curación en ningún otro grupo. Aparecieron cepas resistentes cuando se trató en monoterapia con DAP (35%), RIF (88%), pero no con LVX. Sin embargo, las terapias combinadas protegieron de la aparición de resistencias tanto a DAP como a RIF. Las cepas resistentes a DAP tuvieron CMI de 2–3 mg/L y las de RIF mostraron CMI de 2–4 mg/L.



**Figura 38. Tasa de curación de las terapias combinadas y LVX del CV.**

**\*Las terapias combinadas fueron mejores que el grupo de tratado con LVX ( $P < 0.05$ ).**

**\*\*Las combinaciones con daptomicina fueron mejores que el grupo de LVX y LVX+RIF ( $P < 0.05$ ).**

**\*\*\*La combinación de DAP+RIF fue el tratamiento más eficaz en la erradicación de bacterias adherentes del CV ( $P < 0.05$ ).**

**DAP, daptomicina; LVX, levofloxacino; RIF, rifampicina.**

La utilización de una sola cepa de SASM supone una limitación del presente estudio, sin embargo, la validez de sus resultados viene reforzada por su similitud con los ya observados en nuestros anteriores experimentos con SARM.

En resumen, las combinaciones de DAP+RIF y DAP+LVX mostraron buena eficacia *in vitro* e *in vivo* y evitaron la aparición de resistencias a rifampicina y daptomicina en el

modelo de infección de cuerpo extraño por SASM. Ambas combinaciones representan unas alternativas potenciales en el tratamiento de la infección de prótesis causada por SASM. La combinación de DAP+RIF fue la más efectiva, mostrando una eficacia mayor que la combinación de LVX+RIF. Si estos resultados se confirmaran en otros estudios experimentales y clínicos, el papel de la combinación de DAP+RIF en las infecciones de prótesis causadas por SASM debería ser redefinido. La eficacia mostrada por la combinación de DAP+LVX la sitúa como una alternativa a la combinación LVX+RIF, cuando no se puede utilizar rifampicina.



## **ANEXO**

**Artículo2: El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. “Daptomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection caused by meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus*”. Int J Antimicrob Agents, 2015; 46: 189-95.**







## Daptomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection caused by meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

Cristina El Haj<sup>a,\*</sup>, Oscar Murillo<sup>a</sup>, Alba Ribera<sup>a</sup>, Mireia Vivas<sup>a</sup>, Dolors Garcia-Somoza<sup>b</sup>, Fe Tubau<sup>c</sup>, Carmen Cabellos<sup>a</sup>, Javier Cabo<sup>d</sup>, Javier Ariza<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Department of Microbiology, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Microbiology, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge and CIBERES ISCIII, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Department of Orthopaedic Surgery, IDIBELL, Hospital Universitari de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 February 2015

Accepted 11 April 2015

#### Keywords:

Foreign-body infection

Combination therapy

MSSA

Daptomycin

### ABSTRACT

Whilst levofloxacin (LVX) in combination with rifampicin (RIF) is considered the optimal treatment for prosthetic joint infection (PJI) caused by meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), no therapeutic alternatives have been accurately evaluated. Based on the high effectiveness of the combination of daptomycin (DAP) plus RIF against meticillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in this setting, in this study the efficacy of DAP+RIF and DAP+LVX combinations was tested as alternative therapies for foreign-body infections (FBIs) caused by MSSA. A tissue-cage infection model was performed using an MSSA strain. Male Wistar rats were treated for 7 days with LVX, DAP, RIF or the combinations LVX+RIF, DAP+RIF and DAP+LVX. Antibiotic efficacy was evaluated by bacterial counts from tissue cage fluid (TCF) and the cure rate was determined from adhered bacteria. Resistance was screened. Monotherapies were less effective than combinations ( $P < 0.05$ ), and resistance to DAP and RIF emerged. DAP+RIF (decrease in bacterial counts in TCF,  $-4.9 \log \text{CFU/mL}$ ; cure rate, 92%) was the most effective therapy ( $P < 0.05$ ). There were no differences between LVX+RIF ( $-3.4 \log \text{CFU/mL}$ ; 11%) and DAP+LVX ( $-3.3 \log \text{CFU/mL}$ ; 47%). No resistant strains appeared with combined therapies. In conclusion, the combinations DAP+RIF and DAP+LVX showed good efficacy and prevented resistance. DAP+RIF provided higher efficacy than LVX+RIF. These DAP combinations were efficacious alternatives therapies for MSSA FBI. Further studies should confirm whether DAP+RIF may be useful as a first-line therapy in the setting of PJI caused by MSSA.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

The combination of levofloxacin (LVX) plus rifampicin (RIF) is considered the standard reference for oral treatment of acute prosthetic joint infection (PJI) caused by meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) and managed with debridement and implant retention or with one-stage exchange [1,2]. The benefits of early RIF administration in this setting are well documented, and the fluoroquinolones have high synergistic efficacy and protect against the development of resistant strains [3–6]. However,

despite optimal therapeutic management, some clinical and microbiological failures occur, especially when implant retention is attempted [2,4]. Moreover, occasions arise when these drugs often cannot be administered owing to intolerance or allergy, and no adequately evaluated alternatives exist [7].

Daptomycin (DAP) has bactericidal activity against growing and non-growing *S. aureus* and may be suitable against bacteria embedded within a biofilm [8,9]. In difficult-to-treat infections in humans, current recommendations encourage the use of DAP at high doses (8–10 mg/kg/day) in combination with other antibiotics [10]. However, the efficacy of such combined therapies has mainly been studied against meticillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains but has not fully explored in MSSA infection. This is the case for DAP+RIF combination, which has been proposed as one of the most effective

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 5805; fax: +34 93 260 7637.  
E-mail address: celhaj@idibell.cat (C. El Haj).

anti-MRSA treatments for PJI based on results obtained in experimental models [11–13]. To date, DAP as anti-MSSA therapy can only be expected to have similar efficacy to that for MRSA, but this has not been confirmed or evaluated in comparison with other anti-MSSA alternative therapies. With this in mind, our group recently evaluated the efficacy of a DAP plus cloxacillin (CLOX) combination using a rat tissue-cage infection model and found that it was as effective as CLOX+RIF, which is the most common intravenous treatment used in the first weeks of PJI [14] caused by MSSA.

The rat tissue-cage infection model is a validated method that can provide relevant information about the pathogenesis and treatment of foreign-body infections (FBIs) [15,16]. For the present study, this model was used with MSSA infection to test the efficacy of DAP+RIF and DAP+LVX combinations as alternative therapeutic options when the reference LVX+RIF cannot be used.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Micro-organism

MSSA strain ATCC 29213 was used for all in vitro and in vivo studies.

### 2.2. Antimicrobial agents

For in vitro experiments, purified antibiotic powder was re-suspended according to laboratory recommendations. Antibiotics were purchased from the following laboratories: DAP (Novartis, Barcelona, Spain); RIF (Sanofi-Aventis, Madrid, Spain); and LVX (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). For in vivo experiments, the commercial product was diluted to achieve a final volume suitable for administration to rats.

### 2.3. In vitro studies

The medium broth was supplemented with 50 mg/L calcium chloride dihydrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for all in vitro experiments with DAP.

#### 2.3.1. Preparation of inocula

Bacteria from overnight cultures on 5% blood agar plates (Becton Dickinson, Madrid, Spain) were grown for 3 h in Muller–Hinton broth (MHB) (Becton Dickinson). They were then centrifuged and re-suspended to use in the MHB macrodilution method with a final inoculum of  $10^5$  CFU/mL under exponential growth conditions.

For experiments in stationary phase, bacteria recovered from an overnight culture in MHB were centrifuged and re-suspended in a nutrient-restricted medium [phosphate-buffered saline (PBS), 1% glucose (VWR Chemicals, Leuven, Belgium) and 4% MHB], thus ensuring that bacteria remained stable for up to 24 h under these conditions. A macrodilution method with a high inoculum of  $10^8$  CFU/mL was used [15].

#### 2.3.2. Minimum inhibitory and minimal bactericidal concentrations

For bacteria in log phase, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using standard recommendations [17]. MBCs for bacteria in stationary phase were determined using methodology described elsewhere [15,18]. In log phase, the respective MICs and MBCs were 0.5 mg/L and 1 mg/L for DAP, 0.5 mg/L and 1 mg/L for LVX, and 0.015 mg/L and 0.12 mg/L for RIF. The corresponding MBCs of these antibiotics in stationary phase were 32, 4 and >8 mg/L.

#### 2.3.3. 24-h kill curves

For the novel DAP+RIF and DAP+LVX combinations, kill curves in log phase (using standard methodology) [19] and in stationary phase (following previously reported methodology) [15] were performed. The concentrations of antibiotics selected for kill curves in log phase were pre-fixed at subinhibitory and clinically achievable levels that were above the MIC. Owing to bacterial tolerance to antibiotics expressed in stationary phase, drug concentrations tested were higher than in log phase.

For all experiments, bactericidal activity was defined as a  $\geq 3 \log_{10}$  decrease in CFU/mL of the initial inoculum by 24 h. The results of combination therapy were compared with the most active single drug; synergy, indifference and antagonism were then defined as a  $\geq 2 \log$  increase in killing, a  $< 2 \log$  change (increase or decrease) in killing, and a  $\geq 2 \log$  decrease in killing, respectively. To avoid carry-over antimicrobial agent interference, the sample was placed on the plate in a single streak down the centre and was allowed to be absorbed into the agar until the plate surface appeared dry; the inoculum was then spread over the plate. As described in detail elsewhere [20], this methodology was checked by comparing the results obtained with the centrifugation and re-suspension of the fluid from tubes of killing curves.

### 2.4. Animal studies

#### 2.4.1. Animal model

The experimental protocol complied with European (Directive 2010/63/EU) and Spanish (RD 53/2013) legislation on animal experimentation, and the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Barcelona (Barcelona, Spain) approved the animal model that had previously been standardised by our group [14,15]. Male Wistar rats weighing 220–250 g at the beginning of the experiments were used. Rats were given food and water ad libitum. Two tissue cages with two polymethylmethacrylate coverslips (CVs) (Mecanizados del Besós, Badalona, Spain) were subcutaneously implanted in rats that were previously anaesthetised with an intraperitoneal injection of ketamine (Centauro Servicios Veterinarios, Barcelona, Spain) plus xylazine (Laboratorios Calier S.A., Barcelona, Spain). After 3 weeks of surgery, tissue cage fluid (TCF) was checked for sterility and was then percutaneously infected with 0.1 mL of an MSSA preparation ( $0.2\text{--}2 \times 10^6$  CFU/mL). One week after inoculation, TCF was obtained by percutaneous puncture to quantify bacterial counts (Day 1). Therapy was then administered intraperitoneally for 7 days. At 24 h and 4 days after the end of treatment (Days 8 and 11, respectively), TCF was again recovered to perform bacterial counts. To obtain samples during the experiment, rats were anaesthetised with isoflurane (Abbvie Farmaceutica S.L.U., Madrid, Spain). All animal subjects were sacrificed on Day 11 by cardiac puncture of thiopental. CVs were then removed and processed to quantify adherent bacteria and the infection cure rate [15].

In fact, the tissue-cage infection model mimics a biofilm infection and allows analysis of the bacterial population attached to the CV and those released from the biofilm, which are located in the TCF and are also tolerant to antibiotics [21].

The criterion for efficacy was defined as a decreased bacterial count in TCF from the beginning to the end of the treatment; the criterion was evaluated twice, on Days 8 and 11. Antibiotic efficacy against adherent bacteria from the CV removed on Day 11 was also evaluated by determining bacterial counts. Finally, the infection cure rate was calculated from the TCF and CV on Day 11 and was defined as the percentage of samples with bacterial counts under the limit of detection with respect to the total samples. For all cases, the lower limit of detection of bacterial counts was 10 CFU/mL.

#### 2.4.2. Processing tissue cage fluid and coverslips

All of these schedules were performed according to previous reports, being harmless to bacteria [15,21].

TCF samples were sonicated (150 W for 1 min) to disrupt bacterial clumps. A sample of 100  $\mu$ L of sonicated fluid and their 10-fold dilutions was plated on a trypticase soy agar plate with 5% sheep blood (Becton Dickinson) for 48 h at 37 °C to record bacterial counts as log CFU/mL. CVs from each tissue cage were removed and rinsed three times in 1 mL of PBS. Bacteria were then removed from CVs by sonication in PBS and incubation in trypsin for 20 min at 37 °C. Finally, the remaining PBS was sonicated to recover adherent bacteria, with the final fluid being used to quantify bacterial counts and to screen resistant strains [15].

#### 2.5. Pharmacokinetic studies and therapeutic groups

The methodology used for the pharmacokinetic studies has been described in detail elsewhere [15]. Based on previous reports, the antibiotic dose that achieved pharmacodynamic parameters in TCF comparable with those in human serum was used [22].

A bioassay method was used to determine LVX and RIF concentrations [23], with *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 27626 as the respective assay organisms. For DAP, a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay was used [14].

The main pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of the selected antibiotic dosages in rats were previously reported (LVX 100 mg/kg/24 h, RIF 25 mg/kg/12 h and DAP 45 mg/kg/day) [14,15,24]. In brief, the maximum concentration ( $C_{max}$ ) of drugs in serum and TCF were as follows: 38.7 mg/L and 12.2 mg/L, respectively, for LVX; 24 mg/L and 6.6 mg/L for RIF; and 118 mg/L and 41 mg/L for DAP. The  $AUC_{0-24h}$  (area under the concentration–time curve over 24 h) values for the drugs in serum and TCF were as follows: 106 mg h/L and 117.36 mg h/L for LVX; 277.6 mg h/L and 304 mg h/L for RIF; and 800 mg h/L and 740 mg h/L for DAP.

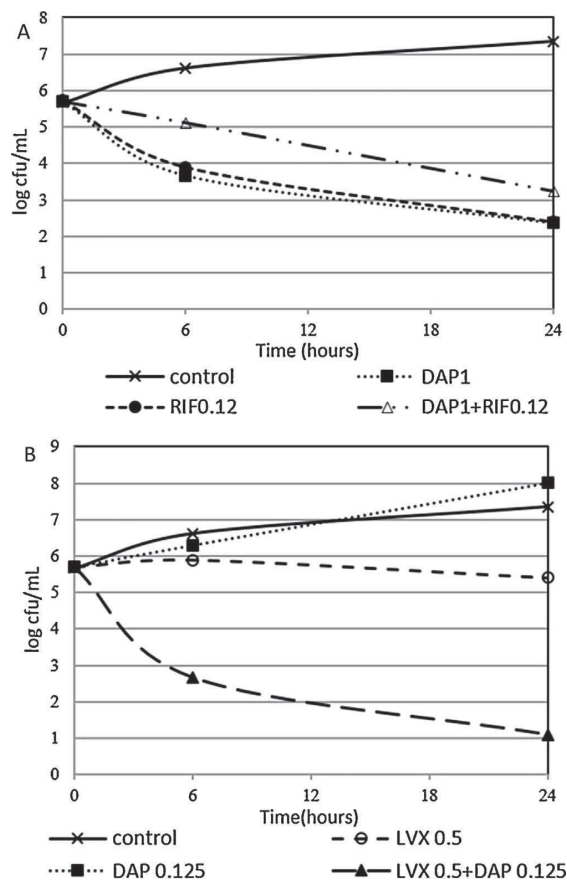
All antibiotics were administered intraperitoneally, and the rats were divided into therapeutic groups as follows: LVX, equivalent to 750–1000 mg/day in humans; DAP, equivalent to 8–10 mg/kg/day; RIF, equivalent to 600–900 mg/day; LVX+RIF combination; DAP+RIF combination; and DAP+LVX combination. Controls received saline solution.

#### 2.6. Resistance studies

Resistant strains from the TCF at Days 8 and 11, and from the CV at Day 11, were screened with agar plates containing 1 mg/L of either LVX, RIF or DAP. Plates containing DAP were supplemented with 50 mg/L calcium. In all cases, a 100  $\mu$ L sample of TCF or CV fluid was inoculated onto the agar plates and the plates were incubated at 37 °C for 48 h. Results were interpreted as positive (some macroscopic growth) or negative (no growth). Resistant strains obtained from screening agar plates were recovered to determine their MICs using methodology described elsewhere [17].

#### 2.7. Statistical analysis

All bacterial counts are presented as log CFU/mL [mean  $\pm$  standard deviation (S.D.)]. Differences in bacterial counts between treated and untreated animals were evaluated for statistical significance by analysis of variance (ANOVA). An unpaired Student's *t*-test with Bonferroni correction was used to determine statistical significance. For all tests, differences were considered statistically significant when *P*-values were <0.05.



**Fig. 1.** Time–kill curves in log phase with standard inocula ( $10^5$  CFU/mL). Activity of (A) daptomycin (DAP), rifampicin (RIF), their combination and a control; and (B) levofloxacin (LVX), DAP, their combination and a control. Concentrations are in mg/L.

### 3. Results

#### 3.1. 24-h kill curves of daptomycin combinations

Most representative results in log and stationary phase for the kill curves are shown in Figs. 1 and 2, respectively. Addition of RIF to DAP in log phase with standard inocula delayed (but did not antagonise) killing by DAP. In stationary phase, 8 mg/L RIF had a bactericidal effect when combined with DAP at 8 mg/L ( $16\times$  MIC). In log phase with standard inocula, addition of LVX ( $1\times$  MIC) to DAP ( $0.25\times$  MIC) resulted in synergism and bactericidal killing. In stationary phase, a slight improvement of DAP activity was observed with DAP+LVX combination, but the effect was strictly indifferent.

Results of 24-h kill curves for LVX alone and in combination with RIF against MSSA ATCC 29213 strain have been previously published by our group [24].

#### 3.2. Animal studies

In total, 85 animals (170 tissue cages) were used; however, some tissue cages were lost due to spontaneous shedding, leaving 161 cages for experimentation. There were no significant differences between the groups on Day 1 (beginning of treatment). Mean  $\pm$  S.D. bacterial counts were as follows:  $6.21 \pm 0.43$  log CFU/mL for DAP ( $n=25$  tissue cages);  $6.37 \pm 0.62$  log CFU/mL for LVX ( $n=21$ );

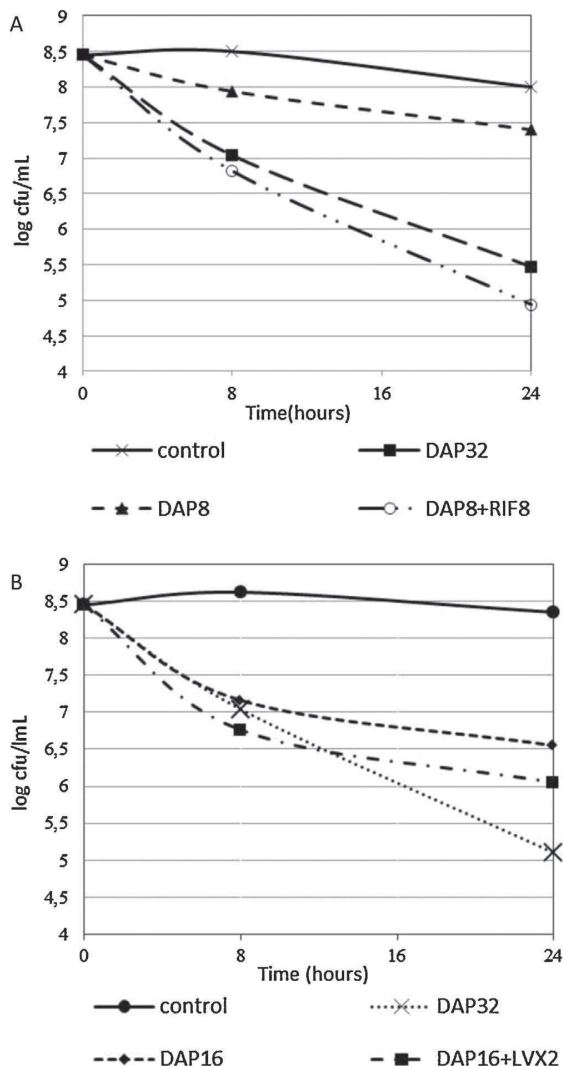


Fig. 2. Time-kill curves in stationary phase with daptomycin (DAP) alone and in combination with rifampicin (RIF) and levofloxacin (LVX). Activities of (A) DAP at 32 mg/L and 8 mg/L, and DAP 8 mg/L+RIF 8 mg/L; and (B) DAP at 32 mg/L and 16 mg/L, and DAP 16 mg/L+LVX 2 mg/L.

$6.29 \pm 0.5$  log CFU/mL for RIF ( $n=22$ );  $6.5 \pm 0.75$  log CFU/mL for DAP+RIF ( $n=26$ );  $5.94 \pm 0.52$  log CFU/mL for DAP+LVX ( $n=20$ );  $6.43 \pm 0.88$  log CFU/mL for LVX+RIF ( $n=21$ ); and  $6.31 \pm 0.72$  log CFU/mL for controls ( $n=26$ ).

Decreases in bacterial counts from TCF at Days 8 and 11 and the results of antimicrobial efficacy against bacteria obtained from the CVs are presented in Fig. 3. At Day 8, all therapies proved more effective than the control, except RIF ( $P < 0.05$ ). All monotherapies were less effective than combined therapies in decreasing TCF bacterial counts (at Days 8 and 11) and in eradicating adherent bacteria from the CV. Among the monotherapies, LVX achieved the highest efficacy ( $P < 0.05$ ) and no resistant strains appeared. Regarding combined therapies, DAP+RIF was most effective ( $P < 0.05$ ) (decrease in bacterial counts in TCF,  $-4.9$  log CFU/mL), and there were no significant differences between LVX+RIF ( $-3.4$  log CFU/mL) and DAP+LVX ( $-3.3$  log CFU/mL) combinations.

Combinations with LVX did not show significant differences in the adherent bacterial counts from the CV, although the DAP+LVX combination showed the lowest adherent bacterial counts of those combinations. DAP+RIF performed better than all other therapies, showing CV bacterial counts that were below the limit of detection.

At Day 8, acceptable TCF cure rates were only observed for the DAP+RIF group (32%), whereas at Day 11 they were 44% for DAP+RIF ( $P < 0.05$  versus the remaining groups), 6% for LVX+RIF and 6% for DAP+LVX. The CV cure rates at Day 11 are presented in Fig. 4. In this case, DAP+RIF was the most effective treatment (cure rate, 92%), followed by DAP+LVX (47%), LVX+RIF (11%) and LVX (6%) ( $P < 0.05$ ). There was no cure rate in any other group.

Resistant strains emerged when using DAP (35%) and RIF (88%), but not with LVX. However, combination therapies protected against the appearance of either DAP or RIF resistance. DAP-resistant strains had MICs of 2–3 mg/L and RIF-resistant strains showed MICs of 2–4 mg/L.

#### 4. Discussion

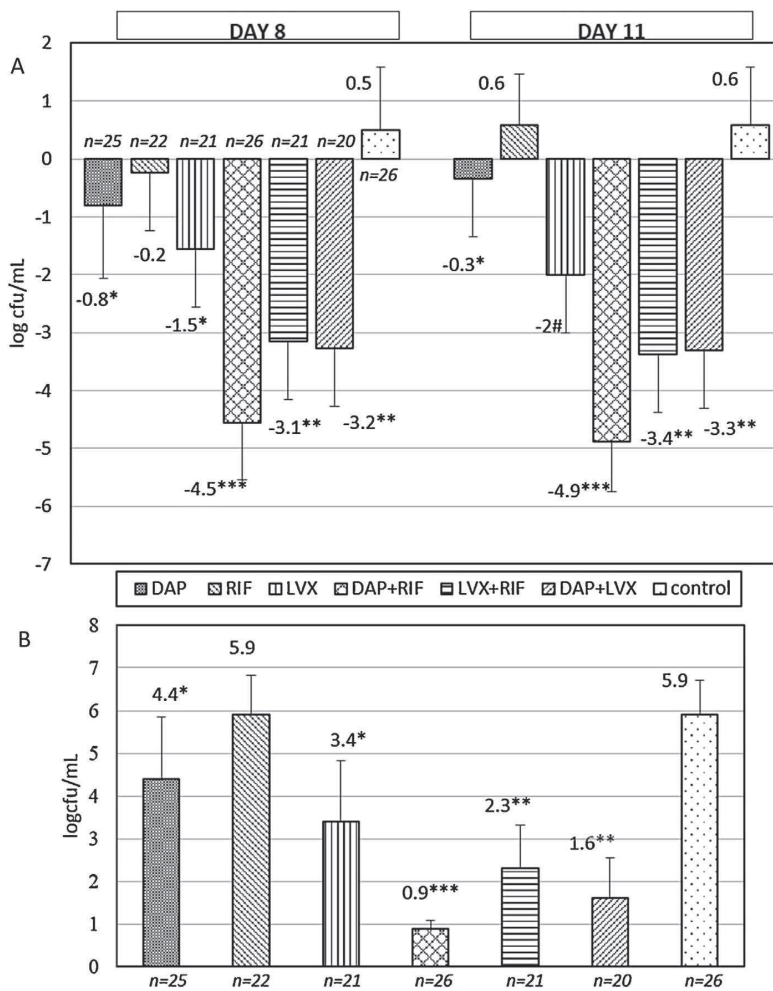
The present experimental work demonstrates that DAP+RIF and DAP+LVX combinations have efficacy as potential alternatives in the treatment of MSSA FBI.

LVX (at high doses of 750–1000 mg/day) plus RIF is currently considered the optimal treatment for acute MSSA PJI; its efficacy has been previously described by our own and other groups against experimental staphylococcal FBI [13,15,24–26]. However, alternative therapies have insufficient evidence to support their use in cases where clinical failure occurs or these drugs cannot be administered due to intolerance, allergy or pharmacokinetic interactions [1,2,4]. Previous works studying DAP had proven experimental and clinical efficacy in the setting of MRSA FBI and, thus, the DAP+RIF combination is postulated to be one of the most effective treatments of PJI caused by MRSA [1,9,11–13]. Whilst it has been hypothesised that similar effectiveness may be assumed for MSSA infections, to our knowledge this has not been widely explored or compared with other anti-MSSA therapies.

These in vitro results showed that addition of RIF to DAP delayed, but did not antagonise, the bactericidal activity of DAP in log phase. In contrast, this addition improved the efficacy of DAP alone in stationary phase. These results are comparable with those observed with MRSA [12,13,27] and suggest similar benefits of this combination also against MSSA strains, in particular against non-growing bacteria.

In the present work using an MSSA strain, high-dose DAP (equivalent to 8–10 mg/kg/day in humans) with RIF achieved significantly higher efficacy in eradicating bacteria than the recommended anti-MSSA treatment of LVX+RIF. These results were surprising but are consistent with previous reports of high-dose DAP used against MRSA FBI and also with their in vitro results in stationary phase, which are reported to correlate better with in vivo efficacy against FBI [11–13,15]. Overall, the results of the current study support the benefits of this combination therapy against staphylococcal FBI, independent of meticillin susceptibility, and should encourage further animal and clinical studies to confirm these results.

The efficacies of RIF combinations with LVX or DAP (equivalent to 6 mg/kg/day in humans,  $AUC_{0-24h} = 548$  mg/h/L) have been previously compared exclusively in the work by John et al., which used a tissue-cage infection model caused by a single MRSA strain [13]. In their work, the authors showed that both therapies were effective, with a slight but non-significantly higher efficacy of DAP+RIF against adherent bacteria (cure rate 67% for DAP+RIF vs. 58% for LVX+RIF). These results might suggest an improvement of the efficacy of DAP combination based on its concentration-dependent activity and thus the authors highlighted the need to



**Fig. 3.** (A) Decrease in bacterial counts from tissue cage fluid (TCF) at Days 8 and 11 and (B) bacterial counts recovered from coverslips (CVs) at Day 11. Bacterial counts are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation log CFU/mL. \*Therapeutic groups performed significantly better than controls and the RIF group in TCF at Days 8 and day 11 and from the CVs ( $P < 0.05$ ). \*\*Therapeutic groups were better than controls and monotherapies ( $P < 0.05$ ); there were no differences between DAP+LVX and LVX+RIF combinations. \*\*\*The DAP+RIF combination was the most effective of all the therapies tested ( $P < 0.05$ ). #Among the monotherapies, LVX achieved the highest efficacy ( $P < 0.05$ ). n, number of tissue cages; DAP, daptomycin; LVX, levofloxacin; RIF, rifampicin.

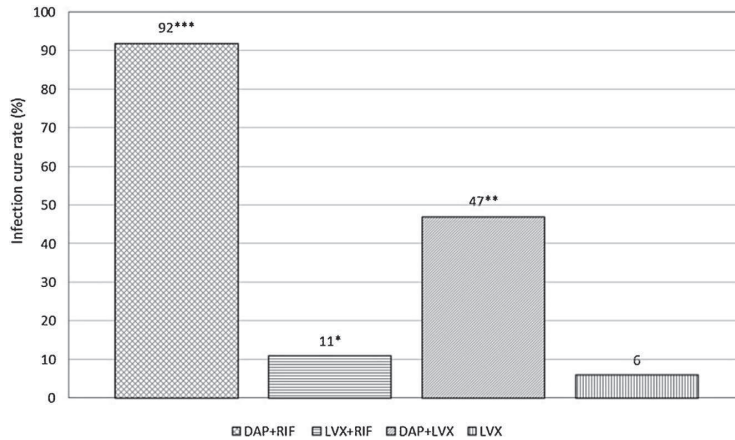
study higher dosages of DAP [1,10]. Interestingly, the results of the current study using DAP at a human dosage equivalent of 8–10 mg/kg/day ( $AUC_{0-24h} = 800$  mg h/L) showed that the DAP+RIF combination was the most effective anti-MSSA treatment and that it protected against the emergence of resistance. By contrast, high doses of DAP alone showed little effect and did not protect against resistance. These results are in line with the risk for emergence of DAP-resistant strains when using it alone even at high doses [28]. In fact, the present results support the current recommendations for using DAP in combination against severe staphylococcal infections, which should include those caused by MSSA strains [10,29,30].

Indeed, the antistaphylococcal activity of the DAP+LVX combination has not been studied previously. The current in vitro results showed that the combination achieved synergistic and bactericidal effects in log phase and a trend to improve slightly the DAP activity in stationary phase. In vivo, this combination was as effective as the reference LVX+RIF therapy, improved the efficacy of LVX alone, and prevented the emergence of DAP resistance. Of

interest, this combination allows the use of antibiotics with proven efficacy against biofilms and it may be suitable for scenarios when RIF cannot be used.

This study is limited by the use of one MSSA strain; thus, caution must be used when generalising these findings to routine clinical practice. However, the agreement of these results with those obtained by our group and others regarding the efficacy against experimental MRSA FBI strengthen its validity.

In conclusion, the DAP+RIF and DAP+LVX combinations showed good in vitro and in vivo efficacy and prevented the emergence of resistance to RIF and DAP in a tissue-cage model with MSSA infection. Both combinations represent potential alternatives for the treatment of PJI caused by MSSA. DAP+RIF was the most effective combination, providing higher efficacy than LVX+RIF. If these results are confirmed in further experimental and clinical studies, the DAP+RIF combination may be useful as a first-line therapy against MSSA PJI. Furthermore, the DAP+LVX combination showed similar efficacy to LVX+RIF and could be an effective alternative when RIF is unsuitable.



**Fig. 4.** Infection cure rate for therapeutic combinations and LVX from the coverslip (CV) at Day 11. \*Combined therapies were better than the LVX group ( $P < 0.05$ ). \*\*DAP combinations were better than LVX and LVX+RIF ( $P < 0.05$ ). \*\*\*The DAP+RIF combination was the most effective treatment in eradicating adherent bacteria from the CV of all therapies ( $P < 0.05$ ). DAP, daptomycin; LVX, levofloxacin; RIF, rifampicin.

**Funding:** This work was supported by a research grant from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III [PI10/01001] and by grants from the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases [REIPI C03/14 and REIPI RD06/0008].

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** The experimental protocol complied with European (Directive 2010/63/EU) and Spanish (RD 53/2013) legislation on animal experimentation. The Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Barcelona (Barcelona, Spain) approved the animal model [reference no. CEEA 334/13].

## References

- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56:e1–25.
- Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645–54.
- Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *J Am Med Assoc* 1998;279:1537–41.
- Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraja-Etxaburu JM, et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis* 2013;56:182–94.
- Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis* 1992;14:1251–3.
- Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990;162:96–102.
- Grosset J, Leventis S. Adverse effects of rifampin. *Rev Infect Dis* 1983;5(Suppl 3):S440–50.
- Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3505–7.
- Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:283–8.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin Infect Dis* 2011;52:285–92.
- Garrigos C, Murillo O, Euba G, Verdaguier R, Tubau F, Cabellos C, et al. Efficacy of usual and high doses of daptomycin in combination with rifampin versus alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5251–6.
- Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Crémieux AC. Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4589–93.
- John AK, Baldoni D, Haschke M, Rentsch K, Schaerli P, Zimmerli W, et al. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of combination with rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2719–24.
- El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, et al. Comparative efficacy of cloxacillin–daptomycin and the standard cloxacillin–rifampin therapies against an experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:5576–80.
- Murillo O, Domenech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudiol F, et al. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4011–7.
- Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982;146:487–97.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—eighth edition. Document M7-A8. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:959–67.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved standard. Document M26-A. Wayne, PA: CLSI; 1999.
- Garrigos C, Murillo O, Lora-Tamayo J, Verdaguier R, Tubau F, Cabellos C, et al. Efficacy of daptomycin–cloxacillin combination in experimental foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3806–11.
- Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA, et al. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis* 1991;163:1369–73.
- Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1–10 [quiz 11–2].
- Chapin-Robertson K, Edberg SC. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. New York, NY: Williams & Wilkins Co; 1991. p. 295–366.
- Murillo O, Pachon ME, Euba G, Verdaguier R, Tubau F, Cabellos C, et al. Antagonistic effect of rifampin on the efficacy of high-dose levofloxacin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3681–6.
- Bahl D, Miller DA, Leviton I, Gialanella P, Wolin MJ, Liu W, et al. In vitro activities of ciprofloxacin and rifampin alone and in combination against growing and nongrowing strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1293–7.
- Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:2611–6.
- [27] Rose WE, Berti AD, Hatch JB, Maki DG. Relationship of in vitro synergy and treatment outcome with daptomycin plus rifampin in patients with invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:3450–2.
- [28] Berti AD, Wergin JE, Girdaukas GG, Hetzel SJ, Sakoulas G, Rose WE. Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:5046–53.
- [29] Skiest DJ. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. J Clin Microbiol 2006;44:655–6.
- [30] Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, et al. Emergence of resistance to daptomycin in a cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistent bacteraemia treated with daptomycin. J Antimicrob Chemother 2014;69:568–71.





**Objetivo 3. Eficacia anti-biofilm de claritromicina en el modelo animal por SASM y SARM**

**Artículo 3: El Haj C, Murillo O, Ribera A, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. "The anti-biofilm effect of macrolides in a rat model of *S. aureus* foreign-body infection: Might it be of clinical relevance?". Med Microbiol Immunol. 2017; 206:31-39**

En el presente trabajo se quiso evaluar el posible efecto anti-biofilm de los macrólidos y en concreto de claritromicina, en un modelo de infección de cuerpo extraño por SASM y SARM de 3 días de evolución. Se analizó la influencia de este efecto en la eficacia de daptomicina y en la combinación de daptomicina con rifampicina.

Se utilizaron 4 cepas de *S. aureus*; dos cepas de SARM, una de colección (BAA-39) y una de origen clínico de una infección osteoarticular (HUB1) y 2 cepas de SASM, ambas de origen clínico de dos casos de infección osteoarticular bacteriémica (HUB2 y HUB3). Se buscaron cepas resistentes a claritromicina para poder evaluar el efecto anti-biofilm del antibiótico, sin la interferencia de su posible actividad antimicrobiana.

Se realizaron curvas de crecimiento de las 4 cepas bacterianas para conocer su cinética de crecimiento y determinar cuál era el tiempo de generación (g) de cada una. Tal y como muestra la Figura 39, el tiempo de generación fue significativamente más elevado para las cepas de SARM, superando los 60 minutos (g=69.3 y 77 min. para BAA-39 y HUB1, respectivamente); mientras que las cepas de SASM tuvieron tiempos de generación que no superaron los 45 minutos (g=43.3 y 28.9 minutos para HUB2 y HUB3, respectivamente).

## RESULTADOS

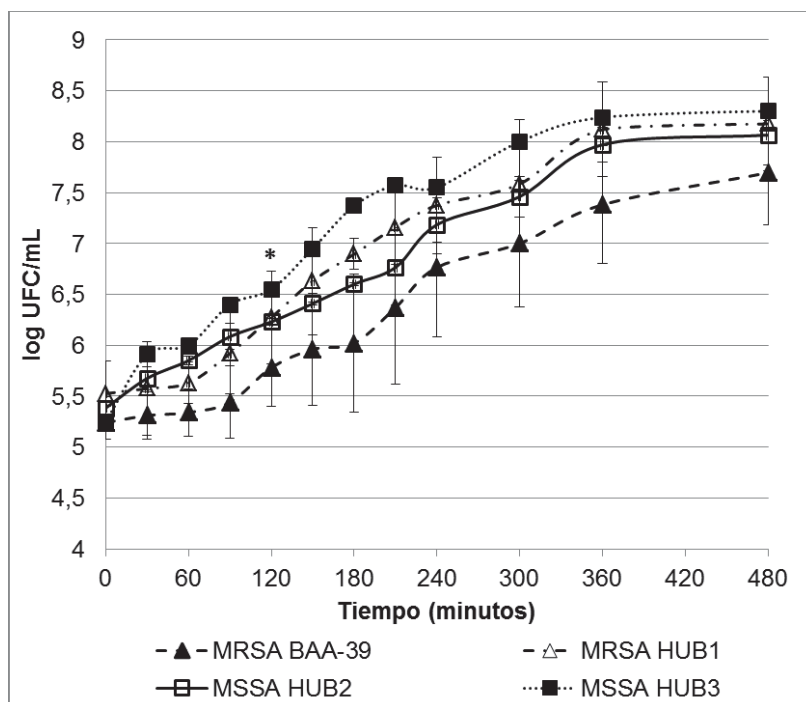


Figura 39. Curvas de crecimiento para las cepas SARM y SASM durante los primeros 480 minutos, con un inóculo inicial de  $10^5$  UFC/mL.

\*Diferencias significativas entre los tiempos de generación de las cepas SARM y SASM ( $P < 0.05$ ).

### Estudios de sensibilidad antimicrobiana *in vitro*

Las CMI de las diversas cepas se muestran en la tabla 17.

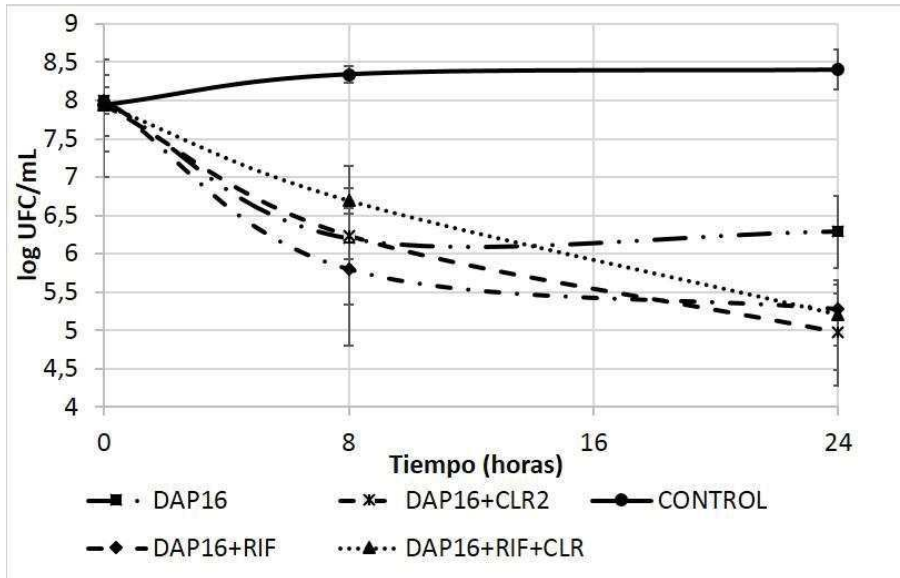
Cepa	CMI (mg/L)		
	Daptomicina	Rifampicina	Claritromicina
BAA-39	1	0.03	>256
HUB1	1	0.012	>256
HUB2	0.5	0.015	>256
HUB3	0.25	0.03	>256

Tabla 17. CMIs de los tres antibióticos para las cuatro cepas de *S. aureus*.

Se realizaron curvas de letalidad de 24 horas, utilizando concentraciones de claritromicina equivalentes a la concentración máxima del antibiótico alcanzado en el suero humano y en el líquido de las cajas de los animales, que fue de 2mg/L [166].

En la cepa de SARM BAA-39 se observó que la adición de claritromicina mejoró la actividad de daptomicina en todas las fases. En la fase logarítmica con inóculos

estándar ( $10^5$  UFC/mL) y altos inóculos ( $10^8$  UFC/mL), daptomicina presentó actividad bactericida a concentraciones de 2x y 16 xCMI, respectivamente. En fase estacionaria (Figura 40) la combinación fue bactericida a concentraciones de 16 xCMI.



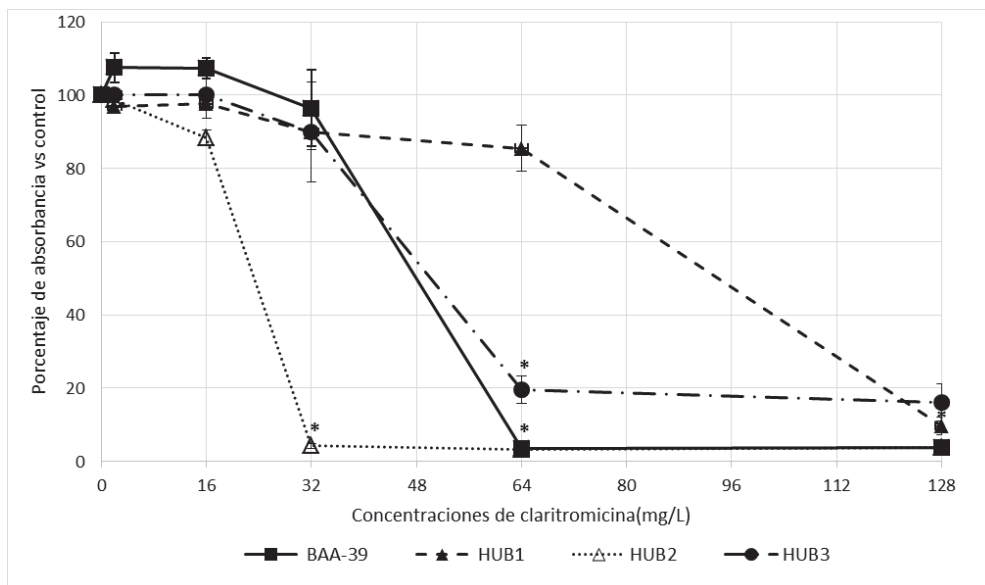
**Figura 40. Curvas de letalidad de 24 horas en fase estacionaria para SARM BAA-39. Abreviaciones: DAP, daptomicina; RIF, rifampicina; CLR, claritromicina.**

En la cepa clínica de SARM (HUB1) y en las cepas de SASM el efecto de la adición de claritromicina en la actividad de daptomicina o la combinación de daptomicina con rifampicina fue indiferente en todas las fases.

#### Estudios de la eficacia anti-biofilm de claritromicina *in vitro*

Se realizaron también estudios de exposición a claritromicina de biofilms en formación y ya maduros de 24 horas. Claritromicina evitó la formación de biofilm para las cepas de SASM (cepas HUB2 y HUB3) a concentraciones de 32 y 64mg/L, ( $P < 0.05$  vs. control), y en el caso de las cepas de SARM (BAA-39 y HUB1) a concentraciones de 64 y 128 mg/L, respectivamente ( $P < 0.05$  vs. control). Concentraciones más bajas de claritromicina tuvieron poco efecto o ninguno (Figura 41).

## RESULTADOS



**Figura 41. Efecto de claritromicina frente la formación de biofilm. Los efectos en la masa de biofilm (porcentaje del valor de absorbanza con respecto al del control, considerado como 100%, para las cepas de SARM y SASM) tras 24h de incubación con concentraciones crecientes de claritromicina. Media  $\pm$  desviación estándar de los experimentos realizados por cuadruplicado.**

**\*P < 0.05 versus los controles**

La actividad de claritromicina frente a biofilms maduros de 24 horas fue muy limitada, solo las altas concentraciones de claritromicina (128 mg/L) fueron capaces de producir un ligero decrecimiento en los biofilms de SARM y SASM (menos del 10 % con respecto a los controles,  $P \geq 0.1$ ).

### Estudios de subpoblaciones resistente a daptomicina *in vitro*

Se realizaron estudios *in vitro* adicionales con las cepas utilizadas *in vivo* para evaluar los perfiles poblacionales y la aparición de cepas resistentes a daptomicina.

Se utilizaron la cepa de SARM BAA-39 y SASM HUB2, y no se encontraron heterorresistencias a daptomicina en ningún caso. Las cepas susceptibles a daptomicina fueron expuestas a concentraciones crecientes de daptomicina durante 7 días. Observamos cambios en los valores iniciales de CMI y estos aparecieron antes en las cepas de SASM que en las de SARM (con exposiciones de  $\frac{1}{2}$  xCMI y 1 xCMI, respectivamente). Sin embargo, aparecieron cepas resistentes (CMI>1mg/L) en ambos

casos con exposición a daptomicina a una concentración de 1 xCMI. La adición de claritromicina a daptomicina no modificó ni la aparición de cambios en la CMI ni la de cepas resistentes a daptomicina. Las cepas resistentes a daptomicina no presentaron cambios en sus valores de CMI para claritromicina.

#### Estudios *in vivo*

En un modelo de infección de 3 días con las cepas de SARM BAA-39 y SASM HUB2, los grupos terapéuticos estudiados fueron: daptomicina (45mg/kg/día), daptomicina en combinación con claritromicina (100mg/kg/día), daptomicina en combinación con rifampicina (25mg/kg/12h) y la combinación de los tres antibióticos. El recuento bacteriano del día 1 (media± desviación estándar) fue significativamente mayor en los grupos de SASM que en los de SARM ( $6.58 \pm 0.6$  vs.  $6.15 \pm 0.8$ ;  $P < 0.05$ ), pero no se observaron diferencias entre los grupos terapéuticos de la misma cepa. Por ello, el análisis de eficacia antibiótica no se comparó entre las cepas de SASM y de SARM.

En todos los casos el grupo control y el grupo tratado con claritromicina fueron inefectivos. Frente a SARM, no encontramos diferencias entre los tratamientos de daptomicina y la combinación de daptomicina con claritromicina en los descensos de los recuentos bacterianos del LC y en la erradicación de las bacterias adherentes del CV (Figura 42). Sin embargo, aparecieron cepas resistentes a daptomicina en los casos tratados sólo con daptomicina, mientras que la combinación con claritromicina evitó la aparición de resistencias (Figura 43).

## RESULTADOS

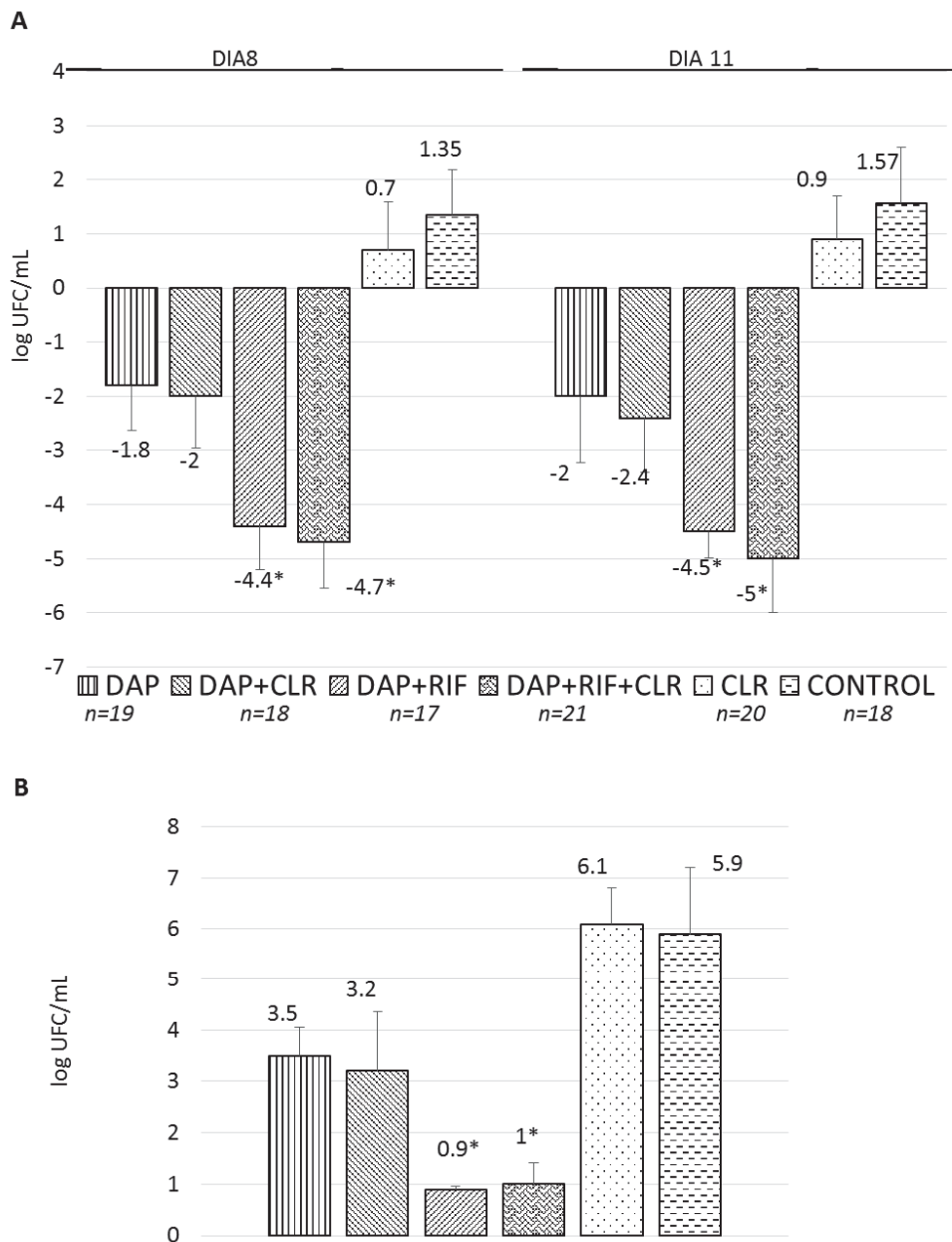
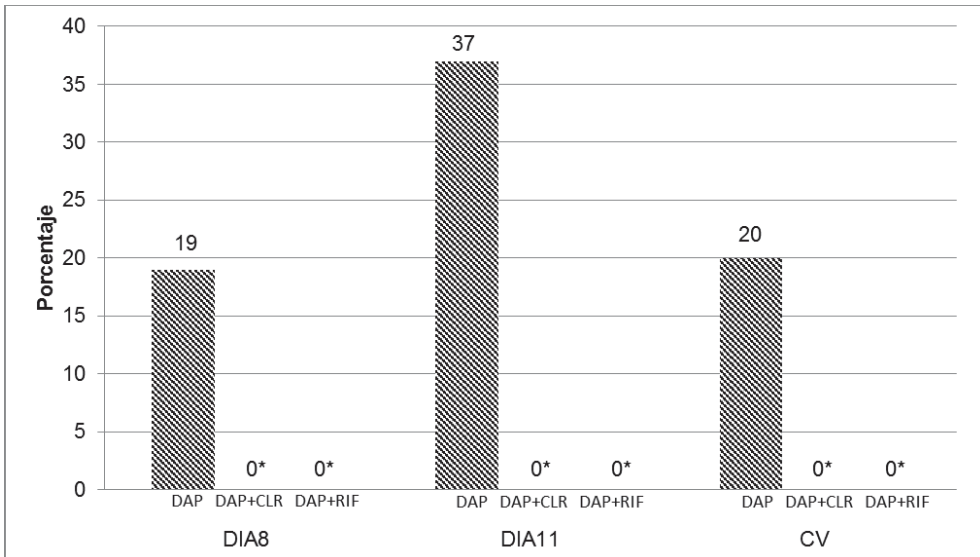


Figura 42. (A) Descensos bacterianos en el LC para SARM el día 8 y el día 11 respecto al día 1, expresados en  $\Delta\log$  UFC/mL y (B) recuentos bacterianos del CV el día 11, expresados en log UFC/mL.

\*P < 0.05 versus todas las terapias.

Abreviaciones: DAP, daptomicina; RIF, rifampicina; CLR, claritromicina; n, número de cajas.



**Figura 43. Porcentaje de resistencias *in vivo* a daptomicina en el LC el día 8 y el día 11 y en los CV para SARM en los grupos tratados con daptomicina, daptomicina+claritromicina y daptomicina+rifampicina**

**\*P < 0.05 versus daptomicina.**

La combinación de DAP + RIF y DAP + RIF + CLR fueron las más efectivas frente a bacterias del LC y bacterias adherentes del CV, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. La tasa de curación el día 11 fue de 71 y 83 % para DAP + RIF y DAP + RIF + CLR, respectivamente, y 5 y 0 % para DAP + CLR y DAP en solitario ( $P < 0.05$ ).

En el caso de SASM, daptomicina en solitario y en combinación con claritromicina tuvieron una eficacia similar frente a las bacterias del LC y las bacterias adherentes del CV (Figura 44). La adición de claritromicina a daptomicina protegió de la aparición de bacterias resistentes a daptomicina el día 8 pero no el día 11 (Figura 45). La combinación DAP + RIF y DAP + RIF + CLR fueron de nuevo los tratamientos más efectivos, sin diferencias significativas entre ellos. La tasa de curación en los CV fue del 24% para DAP + RIF y del 22 % para DAP + RIF + CLR.



## RESULTADOS

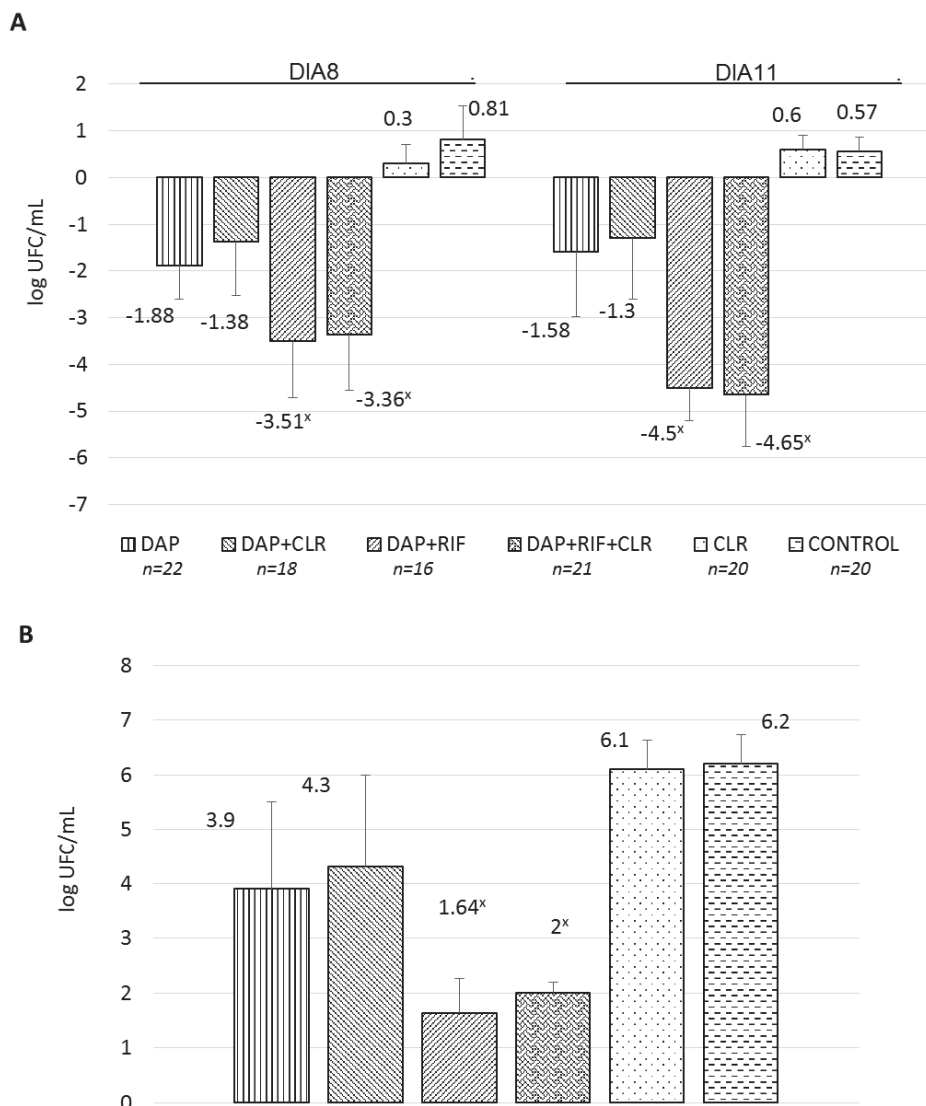
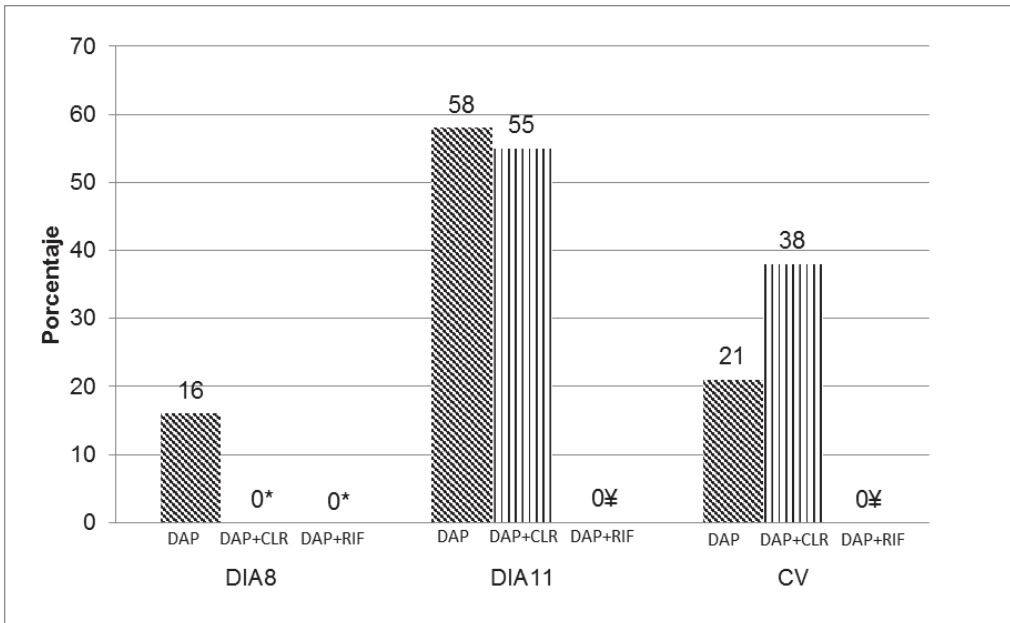


Figura 44. (A) Descensos bacterianos en el LC para SASM del día 8 y el día 11 respecto al día 1, expresados en  $\Delta$ log UFC/mL y (B) recuentos bacterianos del CV del día 11, expresados en log UFC/mL.

\* $p < 0.05$  versus todas las terapias.

Abreviaciones: DAP, daptomicina; RIF, rifampicina; CLR, claritromicina; n, número de cajas.



**Figura 45. Porcentajes de resistencias *in vivo* a daptomicina en el LC el día 8 y el día 11 y en los CV para SASM en los grupos tratados con daptomicina, daptomicina+claritromicina y daptomicina+rifampicina**

**\*P < 0.05 versus daptomicina.**

**†, P < 0.05 versus todas las terapias.**

El pequeño efecto adicional de claritromicina a daptomicina en nuestros estudios *in vitro* e *in vivo* no refuerza la hipótesis de un papel relevante de los macrólidos en la terapia de las infecciones estafilocócicas de implantes osteoarticulares, basado en su actividad anti-biofilm.



## **ANEXO**

**Artículo 3 : El Haj C, Murillo O, Ribera A, Garcia-Somoza D, Tubau F, Cabellos C, Cabo J, Ariza J. “The anti-biofilm effect of macrolides in a rat model of *S. aureus* foreign-body infection: Might it be of clinical relevance?”. Med Microbiol Immunol. 2017; 206:31-39**



# The anti-biofilm effect of macrolides in a rat model of *S. aureus* foreign-body infection: Might it be of clinical relevance?

Cristina El Haj<sup>1</sup> · Oscar Murillo<sup>1,2</sup> · Alba Ribera<sup>1</sup> · Dolors Garcia-Somoza<sup>3</sup> · Fe Tubau<sup>3,4</sup> · Carmen Cabellos<sup>1,2</sup> · Javier Cabo<sup>5</sup> · Javier Ariza<sup>1,2</sup>

Received: 8 March 2016 / Accepted: 10 September 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Using a tissue cage infection rat model, we test the anti-biofilm effect of clarithromycin on the efficacy of daptomycin and a daptomycin + rifampicin combination against methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In vitro: kill curves, daptomycin exposure studies and clarithromycin activity against biofilm were studied. In vivo: the efficacies of clarithromycin, daptomycin or daptomycin + clarithromycin, daptomycin + rifampicin and daptomycin + rifampicin + clarithromycin combinations were evaluated. In vitro: the addition of clarithromycin to daptomycin improved its activity only against one MRSA strain. Changes in daptomycin MIC values appeared more quickly in MSSA than in MRSA strain, and this was not modified by clarithromycin. Clarithromycin prevented biofilm formation but did not eradicate it. In vivo: the daptomycin + rifampicin combination was the most effective treatment and was not improved by the addition of clarithromycin. Daptomycin

and daptomycin + clarithromycin had similar effectiveness; the combination protected against the appearance of daptomycin resistance only in one MRSA strain. Using a staphylococcal foreign-body infection model, we observed a slight effect with the addition of clarithromycin to daptomycin, which resulted in protection against the appearance of daptomycin-resistant strains. However, efficacy was not improved. Overall, our findings do not support a relevant clinical role for macrolides in treating device-related staphylococcal infections based on their anti-biofilm effect.

**Keywords** Foreign-body infection · *S. aureus* · Clarithromycin · Biofilm

## Introduction

The management of prosthetic joint infections (PJI) is hindered by the presence of bacteria in stationary phase and biofilms, where they may evade the immune response and withstand antimicrobial therapy [1]. In acute PJIs, a clinical cure can be achieved in many cases with antibiotic therapy, surgical debridement and implant retention, but ensuring complete bacterial eradication remains a real challenge for clinicians. *Staphylococcus aureus* is one of the main micro-organisms causing acute PJI, and the clinical failure rate can be high, despite the optimization of antimicrobial therapies using antibiotics with high activity against adherent and biofilm-embedded bacteria [2, 3].

In response to these difficulties, other therapeutic approaches to bacterial biofilms are being investigated [4, 5], often in combination with antimicrobial therapy. Among these options, the effects of macrolides (beyond their

✉ Cristina El Haj  
celhaj@idibell.cat

<sup>1</sup> Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service, IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPIRD12/0015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Department of Microbiology, IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Department of Microbiology, CIBERES ISCIII, Madrid, Spain

<sup>5</sup> Orthopaedic Surgery Service, IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Barcelona, Spain

antibacterial activity) have been evaluated, and an anti-biofilm effect of these agents has been postulated, in particular against Gram-negative bacilli such as *Pseudomonas aeruginosa* [6–9]. It is not clear whether they have a similar anti-biofilm activity against Gram-positive infections. An anti-biofilm effect of clarithromycin (CLR) against *S. aureus* has been observed in some experimental studies, but these results have not always been replicated in other studies and they remain controversial [10–12].

The tissue cage infection model is a validated method that has provided relevant information on the pathogenesis and treatment of foreign-body infection. It mimics the characteristics of PJI particularly well [13–15]. In the present study, we used this model to test the anti-biofilm effect of CLR against methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections, using clarithromycin-resistant strains so as to avoid the antibacterial activity of the antibiotic and to search for possible additional effects. We aimed to determine the possible additional contribution of this effect to the antimicrobial efficacy provided by daptomycin (DAP) and a DAP plus rifampicin (RIF) combination, which in previous work by our group were found to be the most effective anti-staphylococcal biofilm therapies [16, 17].

## Materials and methods

### Micro-organisms and MIC values

Two MRSA (BAA-39, from the referral collection ATCC and HUB1, a clinical isolate from osteoarticular infection) and two MSSA (HUB2 and HUB3 from two cases of bacteremic osteoarticular infections) strains were used for in vitro studies. Two of these strains (MRSA BAA-39 and HUB2) were selected for in vivo studies. The MIC values of DAP, RIF and CLR for MSSA and MRSA strains were determined following the standard recommendations [18, 19]. The MICs for MSSA strains were 0.5, 0.015 and >256 mg/l (HUB2) and 0.25, 0.007 and >256 mg/l (HUB3). For MRSA strains the MICs were 1, 0.03 and >256 mg/l (BAA-39) and 1, 0.012 and >256 mg/l (HUB1).

### Antimicrobial agents

For the in vitro experiments, the purified powder of the antibiotic was resuspended according to laboratory recommendations. For the in vivo experiments, the commercial products were diluted to achieve a final volume suitable for administration. Antibiotics were purchased from the manufacturers' laboratories: DAP from Novartis (Barcelona, Spain), RIF from Sanofi–Aventis (Madrid, Spain) and CLR from Abbott Laboratories (Madrid, Spain),

### In vitro studies

In all experiments with DAP, the medium was supplemented with 50 mg/L of calcium chloride dihydrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

#### Growth rate and generation time

To compare the growth of strains, a standard inoculum containing  $10^5$  CFU/ml was incubated in Mueller–Hinton Broth (MHB) and agitated on a gyratory shaker at 37 °C for 24 h. Samples were recovered at several time points to calculate bacterial counts.

The generation time ( $g$ ) was calculated according to the following equation:

$$g = \text{Ln } 2 / \mu$$

where  $\mu$  is the growth rate.

$$\mu = \text{Ln } N - \text{Ln } N_0 / t - t_0$$

where  $N$  is the number of bacteria at time  $t$ , and  $N_0$  is the number of bacteria at time  $t_0$ .

#### 24-h kill curves

We used the standard method for kill curves in the log phase [20], and in the stationary phase we used a method which was previously reported in detail and has proved suitable for correlating the efficacies of antibiotics in the tissue cage infection model [13, 14]. Due to the bacterial tolerance to antibiotics expressed in the stationary phase, the drug concentrations tested were higher than in the log phase. In the case of CLR, the concentration used was 2 mg/L, which is equivalent to peak levels achieved in human serum and in the tissue cage fluid (TCF) [21]. In all the experiments, bactericidal activity was defined as a  $\geq 3$  log<sub>10</sub> decrease in the initial inoculum in CFU/ml at 24 h. The results of the drug combination were compared with the most active single drug; synergy, indifference and antagonism were then defined as a  $\geq 2$  log increase in killing,  $< 2$  log change (increase or decrease) in killing and  $\geq 2$  log decrease in killing, respectively.

#### Assessment of the effect of clarithromycin against biofilms

Biofilm culture conditions mainly followed the methodology previously described [22]. In brief, biofilms were obtained after 24 h of incubation at 37 °C in MHB supplemented with 0.25 % glucose in 24-well plates (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) with a total volume of 400  $\mu$ l of medium per well and a starting inoculum of  $10^7$  CFU/ml (optical density at 620 nm [OD<sub>620</sub>] of 0.01). Biofilm production was evaluated

by measuring the absorbance of crystal violet. At the end of the incubation period, the medium was removed and wells were washed twice; then, biofilms were fixed with methanol. Next, the methanol was removed, wells were air-dried for 30 min–1 h and stained for 15 min with a 0.2 % (wt/vol) crystal violet solution prepared in 20 % ethanol. Then, the excess of crystal violet was removed with water and the biofilm was resolubilized by the addition of glacial acetic acid (33 %, vol/vol) and incubated at room temperature for 1 h. Crystal violet absorbance was measured at 570 nm using a microplate spectrophotometer.

To assess the effect of clarithromycin on biofilm formation, several concentrations of clarithromycin were added at the beginning of the process and maintained for 24 h.

The anti-biofilm activity of clarithromycin was also evaluated against 24-h mature biofilms. At the end of incubation period, the growth medium was removed and replaced by fresh MHB supplemented with 0.25 % glucose containing increasing concentrations of clarithromycin (2, 16, 32, 64 and 128 mg/l) and reincubated for 24 h at 37 °C.

#### Additional in vitro studies of the strains used in vivo

Two of the four strains were selected for in vivo studies: MRSA BAA-39 and MSSA HUB2. Additional in vitro studies were performed to evaluate the population profiles and the emergence of DAP resistance in the two strains.

#### Population analysis profiles

Heteroresistance to DAP in the initial strains was studied by the screening of subpopulations able to grow in the presence of  $\geq 0.5$ , 1, 2, and 4 mg/l of DAP, applying the method previously reported [23, 24].

#### DAP exposure experiments

These experiments followed a methodology previously described in detail [25]. In brief, original DAP-susceptible strains (at  $10^8$  CFU/ml) were grown in triplicate and exposed to increasing DAP concentrations for 7 days. Bacteria were resuspended in MHB containing  $\frac{1}{4} \times$  MIC of DAP and incubated overnight. Cultures with visual growth at 24 h were collected and diluted 1:100 in MHB containing a twofold incremented concentration of DAP (from  $\frac{1}{4} \times$  MIC to  $4 \times$  MIC). The strains recovered from each passage were screened for MIC values of DAP. These experiments were also performed with the media containing a consistent concentration of CLR (50 mg/l; 20 % of MIC value) in combination with DAP.

#### Animal studies

The experimental protocol complied with European (Directive 2010/63/EU) and Spanish (Real Decreto 53/2013) legislation on animal experimentation and was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the University of Barcelona. The method used for both MSSA and MRSA infections was described in our earlier studies [13, 16, 17]. Briefly, two Teflon tissue cages, each with two polymethylmethacrylate coverslips inside (CV), were subcutaneously implanted in Wistar rats. After 3 weeks, the tissue cage fluid (TCF) was checked for sterility and was infected with 0.1 ml of an MRSA or MSSA preparation ( $0.2\text{--}2 \times 10^6$  CFU/ml). Three days later, on designated day 1, TCF was obtained in order to quantify bacterial counts. Therapy was then started and administered intraperitoneally for 7 days. One and four days after the end of treatment (days 8 and 11, respectively), TCF was again recovered in order to quantify bacterial counts. Animals were sacrificed on day 11 and CV were removed and processed, as described previously [13], in order to quantify adherent bacteria.

The criterion of efficacy was defined as a decrease in bacterial counts in the TCF between the beginning and end of the treatment, evaluated on days 8 and 11, and in the adherent bacterial counts from the CV. Finally, the cure rate of infection from the CV was calculated on day 11; it was defined as the percentage of samples with bacterial counts below the limit of detection compared to the total samples. In all cases, the lower limit of detection of bacterial counts was 10 CFU/ml.

#### Pharmacokinetic studies and therapeutic groups

All the methodology used has been described in detail elsewhere [13]. We used the dose of antibiotic that achieved pharmacodynamic parameters in the TCF close to those in human serum [26]. The main pharmacokinetic–pharmacodynamic parameters of the selected antibiotic dosages in rats have been reported elsewhere: DAP, 45 mg/kg/day and RIF, 25 mg/kg/12 h (equivalent to doses of 8–10 mg/kg/day and 600–900 mg/day in humans, respectively) [17].

In the case of CLR, pharmacokinetic studies were performed with two different concentrations (100 and 150 mg/kg/day) to select the one that was equivalent to the human dose of 500 mg/12 h ( $AUC_{0-24}$ : 37.8 mg h/l). As the 150 mg/kg/day dose was not well tolerated by animals (which presented prostration and less reactivity); the 100 mg/kg/day was used. The main pharmacokinetic parameters in serum and TCF were: peak concentration 17.26 and 2.38 mg/l, respectively; and  $AUC_{0-24}$  84.41 and 33.53 mg h/l, respectively.

Therapeutic groups were DAP, RIF, CLR, DAP + RIF, DAP + CLR, and DAP + RIF + CLR.



## Resistance studies

Resistant strains from the TCF at day 8 and day 11 and from CV at day 11 were screened using agar plates containing 1 mg/l of DAP and RIF. The plates containing DAP were supplemented with calcium (50 mg/l). The results were interpreted as positive (some macroscopic growth) or negative (no growth). Resistant strains obtained from screening agar plates were recovered to determine MICs [18]. In addition, heteroresistance to DAP from bacteria recovered in vivo was studied following the methodology described above.

## Statistical methods

Data were analysed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software (version 20.0). Regarding in vitro studies, statistical analyses to evaluate differences between growth rates were performed using the non-parametric Mann–Whitney  $U$  test. The activity of clarithromycin against biofilms was compared using the  $\chi^2$  test.

In animal studies: all bacteria counts are presented as log CFU/ml (mean  $\pm$  standard deviation [SD]). Differences in bacterial counts between groups were evaluated by analysis of variance with Bonferroni's post hoc test. Comparisons between groups for percentages of antibiotic resistance and cure rates were performed by  $\chi^2$ .

For all tests, differences were considered to be statistically significant when  $P$  values were  $<0.05$ .

## Results

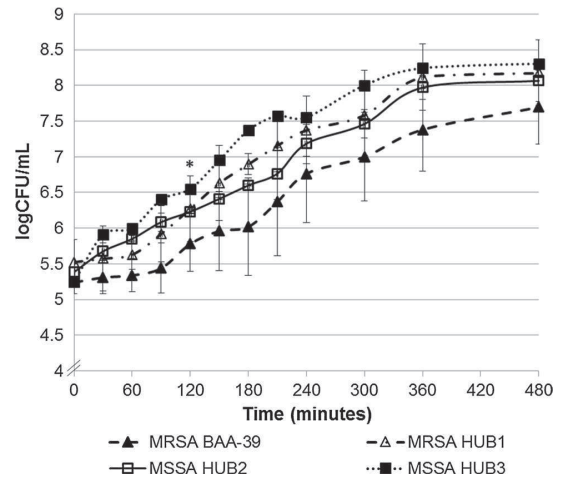
### In vitro studies

#### Bacterial growth, DAP population analysis and DAP exposure studies

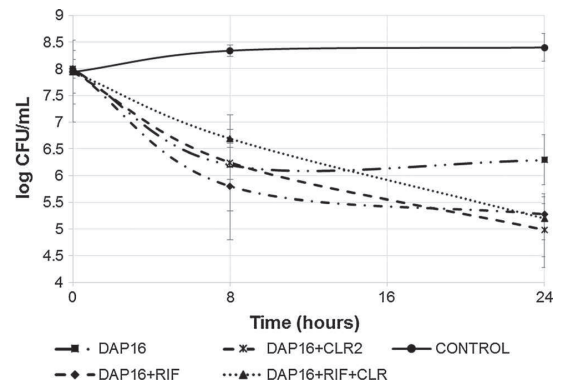
The MSSA strains grew faster than the MRSA strains, especially during the first 120 min. Therefore, generation times were significantly lower in MSSA strains ( $g = 43.3$  and 28.9 min for HUB2 and HUB3, respectively) than in MRSA strains (69.3 and 77 min for BAA-39 and HUB1, respectively) ( $P = 0.03$ , Fig. 1).

#### 24-h kill curves

- MRSA strains: in the BAA-39 strain the addition of CLR (at 2 mg/l) to DAP improved its activity in all phases. In the log phase with standard and high inocula, DAP achieved bactericidal activity at concentrations of 2 $\times$  and 16  $\times$  MIC in combination with CLR, respec-



**Fig. 1** Growth curves of MRSA and MSSA during the first 480 min with initial inocula of  $10^5$  cfu/ml. The means and standard deviations of experiments performed in triplicates of the MRSA strains (triangles) and the MSSA strains (squares) are presented. CFU colony forming unit. \*Significant differences in generation times between MRSA and MSSA strains ( $P < 0.05$ )

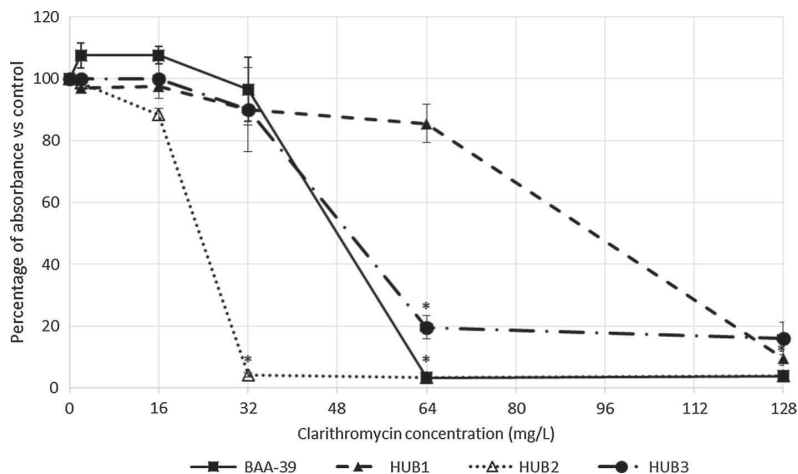


**Fig. 2** 24-h kill curve in stationary phase of MRSA. Activities of daptomycin (filled squares), daptomycin plus clarithromycin (cross), daptomycin plus rifampicin (filled rhombus), daptomycin plus rifampicin plus clarithromycin (filled triangle) and control (filled circle). The means and standard deviations of determinations in triplicates are shown. CFU colony forming unit, DAP daptomycin, CLR clarithromycin, RIF rifampicin

tively. In the stationary phase (Fig. 2), the combination was bactericidal at a DAP concentration of 16 $\times$ MIC. The addition of CLR to the DAP + RIF combination did not provide additional effects in any phase.

- In the clinical MRSA isolate (HUB1) CLR did not improve DAP or DAP + RIF activity in any phase.

**Fig. 3** Effect of clarithromycin against biofilm formation. Effects on biofilm mass (percentage of absorbance value with respect to that of control percentage = 100 % – for MRSA and MSSA strains) after 24-h incubation with increasing concentrations of clarithromycin. The means  $\pm$  standard deviations of experiments performed in quadruplicates. \* $P < 0.05$  versus controls



- MSSA strains: the effect of CLR was indifferent in the DAP + CLR and in the DAP + RIF + CLR combination in all phases.

#### Effect of clarithromycin against biofilms

Clarithromycin prevented biofilm formation of MSSA (HUB2 and HUB3 strains) at concentrations of 32 and 64 mg/l, respectively ( $P < 0.05$  vs. control), whereas in MRSA (BAA-39 and HUB1 strains), biofilm formation was prevented at CLR concentrations of 64 and 128 mg/l, respectively ( $P < 0.05$  vs. control). Lower concentrations produced less relevant effects or were ineffective (Fig. 3). The activity of CLR against 24-h mature biofilm was very limited; only high concentrations of CLR (128 mg/l) were able to produce a slight decrease in the MSSA and MRSA biofilms (less than 10 % with respect to controls,  $P \geq 0.1$ ).

#### Additional in vitro studies of the strains used in vivo

No DAP-heteroresistance among MSSA (HUB2) and MRSA (BAA-39) strains was identified.

The DAP-susceptible strains were exposed to increasing concentrations of DAP over 7 days. We observed that changes in MIC values appeared faster in MSSA than in MRSA (with exposure to  $\frac{1}{2} \times$  MIC and  $1 \times$  MIC, respectively), but resistant strains emerged in both cases with exposure to  $1 \times$  MIC. The addition of CLR to DAP did not modify either the appearance of MIC changes or DAP-resistant strains. The DAP-resistant strains presented no changes in MICs values of CLR.

#### Animal studies

Bacterial counts (mean of log CFU/ml  $\pm$  SD) at the beginning of treatment (day 1) were significantly higher in MSSA than in MRSA groups ( $6.58 \pm 0.6$  vs.  $6.15 \pm 0.8$ ;  $P < 0.05$ ), but there were no differences between therapeutic groups among the same strain (Table 1). Thus, the analysis of antibiotic efficacy was not compared between MSSA and MRSA.

In all cases, the control group and CLR therapy were ineffective. Decreases in bacterial counts from TCF and in adherent bacterial counts from CV are presented in Table 1.

Against the MRSA strain, we found no differences between the DAP and DAP + CLR combination in decreasing bacterial counts from TCF and in eradicating adherent bacteria from CV. Interestingly, DAP-resistant strains appeared in all cases with DAP alone, but the combination DAP + CLR prevented their emergence (Fig. 4a). The DAP + RIF and the DAP + RIF + CLR combinations were the most effective treatment against bacteria from TCF and bacteria adherent to CV, with no differences between them. The CV cure rate at day 11 was 71 and 83 % for DAP + RIF and DAP + RIF + CLR, respectively, and 5 and 0 % for DAP + CLR and DAP alone ( $P < 0.05$ ).

In the case of the MSSA strain, DAP alone and the DAP + CLR combination had a similar efficacy against bacteria from TCF and those adherent to CV. The addition of CLR to DAP protected against the emergence of DAP resistance at day 8 but not at day 11 (Fig. 4b). The DAP + RIF and DAP + RIF + CLR were again the most effective treatments, with no significant differences between them. The CV cure rates were only 24 % for the DAP + RIF and 22 % for DAP + RIF + CLR combination.

**Table 1** Bacterial counts from TCF at day 1 and results of the efficacy of therapeutic groups against bacteria from TCF (decreases in bacterial counts at day 8 and day 11) and from CV (bacterial counts at day 11)

Strain	Therapeutic groups ( <i>n</i> )	Day 1	Day 8	Day 11	
		TCF	TCF	TCF	CV
		log CFU/ml ( $\pm$ SD)	$\Delta$ log CFU/ml ( $\pm$ SD)	$\Delta$ log CFU/ml ( $\pm$ SD)	log CFU/ml ( $\pm$ SD)
MRSA	DAP (19)	6.47 $\pm$ 0.5	-1.8 $\pm$ 1	-2 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 0.5
	DAP + CLR (18)	6.37 $\pm$ 0.7	-2 $\pm$ 0.9	-2.4 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 1.1
	DAP + RIF (17)	5.65 $\pm$ 0.6	-4.4 $\pm$ 0.8*	-4.5 $\pm$ 0.4*	0.9 $\pm$ 0.1*
	DAP + RIF + CLR (21)	6.08 $\pm$ 0.8	-4.7 $\pm$ 0.84*	-5 $\pm$ 1*	1 $\pm$ 0.4*
	CLR (20)	6.39 $\pm$ 1	0.7 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.7
	Control (18)	5.75 $\pm$ 0.9	1.35 $\pm$ 0.8	1.57 $\pm$ 1	5.9 $\pm$ 1.3
MSSA	DAP (22)	6.72 $\pm$ 0.3	-1.88 $\pm$ 1.1	-1.58 $\pm$ 1.4	3.9 $\pm$ 1.6
	DAP + CLR (18)	6.5 $\pm$ 0.6	-1.38 $\pm$ 0.8	-1.3 $\pm$ 1.3	4.3 $\pm$ 1.7
	DAP + RIF (16)	6.57 $\pm$ 0.5	-3.51 $\pm$ 1.2 $\times$	-4.5 $\pm$ 0.7 $\times$	1.64 $\pm$ 0.6 $\times$
	DAP + RIF + CLR (21)	6.5 $\pm$ 0.7	-3.36 $\pm$ 1.4 $\times$	-4.65 $\pm$ 1.1 $\times$	2 $\pm$ 0.2 $\times$
	CLR (20)	7 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.5
	Control (20)	6.25 $\pm$ 0.7	0.81 $\pm$ 0.7	0.57 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 0.3

*n* number of tissue cages, *TCF* tissue cage fluid, *CV* coverslips, *CFU* colony forming unit,  $\Delta$ log CFU/ml decrease in log CFU/ml with respect to day 1, *DAP* daptomycin, *CLR* clarithromycin, *RIF* rifampicin

MRSA results: \* $P < 0.05$  versus all therapies. MSSA results:  $\times P < 0.05$  versus all therapies

## Discussion

The present study focuses on the potential anti-biofilm effect of CLR against foreign-body infection caused by *S. aureus* in an experimental rat model. This model mimics reasonably well the conditions of human PJIs.

There were two main motivations for the study. First, it is extremely difficult to ensure complete eradication of foreign-body infection in the presence of medical devices (i.e. acute PJI), even when the most effective antibiotic combination against biofilm-related infections is used [2, 3]. Second, it is essential to search for other anti-biofilm therapies that would improve the antimicrobial effect of antibiotics [5]. In this context, macrolides have demonstrated an anti-biofilm effect which is independent of their antimicrobial activity, and which has been investigated mostly in Gram-negative bacilli infections [6, 7]. Therefore, in the present study we used two CLR-resistant *S. aureus* strains (one MSSA and one MRSA), so as to avoid the drug's antibacterial activity and also to look for additional effects.

Regarding the results of the in vitro kill curves, the addition of CLR exerted some unexpected microbiological effects. Specifically, the presence of CLR effected a slight increase in bactericidal activity of DAP against one MRSA strain in the logarithmic and stationary phases. In contrast, this effect was not shown against the MSSA strains or the other MRSA strain. In a previous study using a CLR-resistant MRSA strain, Berti et al. [25] demonstrated a

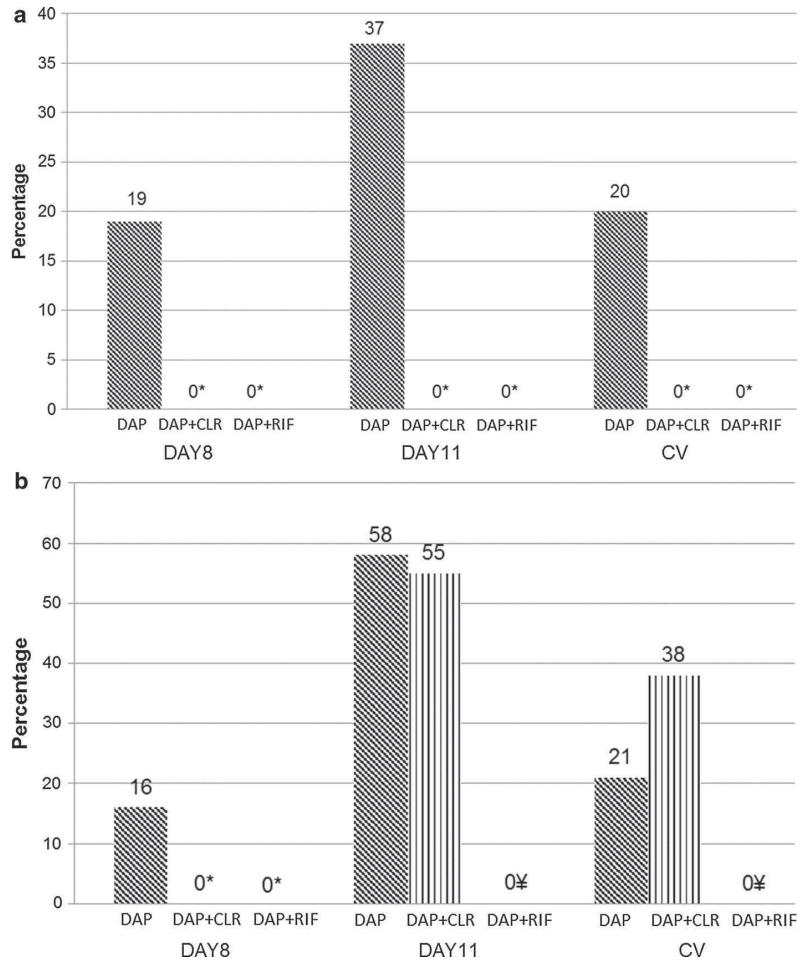
microbiological effect by observing that the addition of CLR at  $1/2 \times$  MIC concentrations led to culture sterilization.

Specific evaluation of the in vitro anti-biofilm activity of CLR indicated moderate effects. Thus, CLR was able to prevent the biofilm formation only at high concentrations that are not clinically achievable in human serum ( $\geq 64$  and  $\geq 32$  mg/l for MRSA and MSSA strains, respectively). Moreover, our results showed that CLR did not produce any relevant activity against an established biofilm at 24 h.

Our results using the animal foreign-body infection model confirmed the results of previous studies on the activity of DAP and the DAP + RIF combination [16, 27]. In fact, while the efficacy of DAP alone at high doses was hindered by the emergence of resistant strains, the DAP + RIF combination showed high synergistic efficacy and protected against the appearance of DAP- and RIF-resistance. These results coincide, to some extent, with the clinical data available from the treatment of PJI cases [28, 29]. Thus, the efficacy of DAP against difficult-to-treat infections involving high inocula and bacterial biofilms is limited by the emergence of resistant strains [30–32], and its use at high doses (8–10 mg/kg/day) in combination with RIF has been recommended as one of the most effective anti-staphylococcal treatments in this setting [29].

The addition of clarithromycin to DAP showed some in vivo effects. While the efficacy of DAP and DAP + CLR was similar, the combination protected against the emergence of DAP-resistant strains during all experiments of

**Fig. 4** In vivo resistances to daptomycin in tissue cage fluid at day 8 and day 11 and in coverslips at day 11 for MRSA (a) and MSSA (b). The percentages of in vivo resistance to daptomycin for daptomycin, daptomycin + clarithromycin and daptomycin + rifampicin groups in tissue cage fluid at day 8 and 11 and in coverslips at day 11 are shown. Daptomycin (*diagonally striped bars*) and daptomycin plus clarithromycin (*parallel striped bars*). \* $P < 0.05$  versus daptomycin; ¥,  $P < 0.05$  versus all therapies. CV coverslip, DAP daptomycin, CLR clarithromycin, RIF rifampicin



MRSA infection but only partially against MSSA infection. In contrast, CLR did not improve the high efficacy achieved by the DAP + RIF combination, nor did it offer more protection against the appearance of resistance. Overall, it is difficult to establish whether an antibacterial effect or anti-biofilm effect is responsible for this moderate in vivo effect.

In contrast to the reports of the beneficial activity of macrolides against biofilm formation in *P. aeruginosa* [10], studies of the anti-biofilm effect of macrolides against *S. aureus* are scarce and to some extent, their results are controversial. It seems that, although the ability of macrolides to inhibit polysaccharide synthesis in *P. aeruginosa* is well established, little is known about their interaction with *S. aureus* glycocalyx [33]. Indeed, several types of materials and methods for studying biofilms have been used and these procedural differences may have affected the results. The first study in this setting showed that the activity of

CLR against biofilms was dose-dependent and based on the interaction with the quantity of hexose among the staphylococcal glycocalyx [34]. Similar results were reported by Sano et al. who observed a reduction in bacterial counts within a MRSA biofilm when using high concentrations of CLR (184 mg/l) simulating human urinary concentrations in combination with vancomycin [33]. To an extent, these initial results were confirmed in other studies performed by Fujimura's group [35–37]; in those studies the authors proved the efficacy of CLR in combination with antibiotics against in vitro and in vivo *S. aureus* biofilms produced in titanium devices, but even CLR concentrations as low as 1 mg/l achieved a notable effect. While all these reports agree that CLR has some anti-biofilm effect, the discrepancies regarding the CLR concentration needed to produce such effects raise doubts about whether this activity can be expected at clinically achievable concentrations. In contrast, Rybak et al's. group reported contradictory

results using the same in vitro reactor model of staphylococcal biofilm in two different studies. First, they showed that CLR improved the in vitro bacterial killing effect of DAP against one MSSA strain [11]. Later, evaluating the efficacy of this combination against two MRSA strains and one coagulase-negative staphylococcus strain using different types of materials, they did not observe any enhancement of DAP activity by the addition of CLR [12]. Overall, their information does not provide clear conclusions.

Finally, using a well-validated foreign-body infection model [13–15], our results do not support a relevant anti-biofilm effect for CLR. We evaluated a CLR peak concentration of 2 mg/l in TCF, which is in accordance with human serum levels available at the usual dosage of CLR. We did not assess the possibility that higher concentrations might be more beneficial against *S. aureus* biofilm, in part due to the animals' limited tolerance of higher doses. Despite the particular pharmacokinetic properties of CLR (which may present higher concentrations in some tissues than in serum), it is hard to imagine that they could achieve clinically relevant levels able to provide this anti-biofilm effect.

In view of the differences in behaviour of MSSA and MRSA in vivo infections, we performed additional in vitro studies to investigate the bacterial growth and the risk of developing DAP resistance in both kinds of strain. In agreement with previous reports [38], we observed that the MSSA strains grew faster than the MRSA strains. Similarly, we found that changes in DAP MIC values and DAP resistance appeared more quickly in the MSSA strain; moreover, these trends were not modified by the addition of CLR. Little is known about the DAP + CLR combination. Recently, Berti et al. showed that CLR was able to reduce but not to prevent the emergence of DAP resistance in MRSA strains, and they noted a see-saw effect between DAP and CLR in these DAP-resistant strains which resembled the effect observed between DAP and beta-lactams [25]. Later, examining the genetic mutations occurring in these MRSA strains, the same authors concluded that CLR may prevent mutations that are less crucial for the emergence of DAP resistance than beta-lactams [39]. We might speculate whether these mechanical or genotypic explanations could account for the differences in DAP-CLR activity observed between MSSA and MRSA strains. A fuller examination of the mechanisms exerted by CLR in staphylococcus strains is beyond the scope of the present study and is a task that should be addressed in future research.

Overall, our results from in vitro and in vivo studies seem to be concordant. Initial inocula of MSSA infection were significantly higher than those of MRSA (in accordance with its higher generation time), which suggests a greater risk of the appearance of DAP resistance in the MSSA strain and less efficacious treatment. In the in vitro studies, the protective effect of CLR against the development of in vivo

DAP resistance was mainly observed with the MRSA BAA-39 strain. Finally, the moderate in vitro anti-biofilm effect of CLR seems to corroborate the in vivo results, in which the efficacy of DAP against an established foreign-body infection was not improved by a potential anti-biofilm effect at clinically achievable CLR concentrations.

In conclusion, our finding of slight in vitro and in vivo effects with the addition of CLR to DAP does not support a relevant clinical role for macrolides in the therapy of staphylococcal PJIs based on their anti-biofilm activity.

**Acknowledgments** We thank JM Sierra for his support in the in vitro biofilm studies. This study was supported by a research grant from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (PI13/00550), and grants from the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015)—co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF. It was presented in part at the 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark 25–28 April 2015 (ePoster session EP-155).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors have no conflict of interest to declare.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. The experimental protocol complied with European (Directive 2010/63/EU) and Spanish (RD 53/2013) legislation on animal experimentation and the University of Barcelona's Ethics Committee for Animal Experiments approved the animal model. Reference number: CEEA 446/15.

#### References

1. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135–138
2. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM et al (2013) A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis* 56:182–194
3. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM et al (2013) Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 56:e1–e25
4. Costerton JW (2005) Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* 437:7–11
5. Hansen EN, Zmistowski B, Parvizi J (2012) Periprosthetic joint infection: what is on the horizon? *Int J Artif Organs* 35:935–950
6. Schultz MJ (2004) Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 54:21–28
7. Cai Y, Chai D, Wang R, Bai N, Liang BB, Liu Y (2011) Effectiveness and safety of macrolides in cystic fibrosis patients: a meta-analysis and systematic review. *J Antimicrob Chemother* 66:968–978
8. Kandemir O, Oztuna V, Milcan A, Bayramoğlu A, Celik HH, Bayarslan C et al (2005) Clarithromycin destroys biofilms and

- enhances bactericidal agents in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res 430:171–175
9. Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Kawada H, Yokota T (1993) Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother 37:1749–1755
  10. Parra-Ruiz J, Vidaillac C, Rybak MJ (2012) Macrolides and staphylococcal biofilms. Rev Esp Quimioter 25:10–16
  11. Parra-Ruiz J, Vidaillac C, Rose WE, Rybak MJ (2010) Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob Agents Chemother 54:4329–4334
  12. Hall Snyder AD, Vidaillac C, Rose W, McRoberts JP, Rybak MJ (2014) Evaluation of high-dose daptomycin versus vancomycin alone or combined with clarithromycin or rifampin against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* in a novel in vitro PK/PD model of bacterial biofilm. Infect Dis Ther 4:51–65
  13. Murillo O, Doménech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudiol F et al (2006) Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 50:4011–4017
  14. Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA et al (1991) Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. J Infect Dis 163:1369–1373
  15. Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE (1982) Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. J Infect Dis 146:487–497
  16. Garrigós C, Murillo O, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C et al (2010) Efficacy of usual and high doses of daptomycin in combination with rifampin versus alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 54:5251–5256
  17. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F et al (2015) Daptomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 46:189–195
  18. Cockerill FR, Wiker MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ et al. (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute
  19. Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z (1994) Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 33:959–967
  20. Clinical and Laboratory Standards Institute (1999) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline M26-A. vol. 19
  21. Alder JD, Ewing PJ, Nilius AM, Mitten M, Tovcimak A, Oleksijew A et al (1998) Dynamics of clarithromycin and azithromycin efficacies against experimental *Haemophilus influenzae* pulmonary infection. Antimicrob Agents Chemother 42:2385–2390
  22. Bauer J, Siala W, Tulkens PM, Van Bambeke F (2013) A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 57:2726–2737
  23. El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F et al (2014) Comparative efficacies of cloxacillin-daptomycin and the standard cloxacillin-rifampin therapies against an experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 58:5576–5580
  24. Berger-Bächli B, Strässle A, Kayser FH (1986) Characterization of an isogenic set of methicillin-resistant and susceptible mutants of *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol 5:697–701
  25. Berti AD, Wergin JE, Girdaukas GG, Hetzel SJ, Sakoulas G, Rose WE (2012) Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 56:5046–5053
  26. Craig WA (1998) Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis 26:1–10 (quiz 11–2)
  27. John AK, Baldoni D, Haschke M, Rentsch K, Schaerli P, Zimmerli W et al (2009) Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of combination with rifampin. Antimicrob Agents Chemother 53:2719–2724
  28. Lora-Tamayo J, Parra-Ruiz J, Rodríguez-Pardo D, Barberán J, Ribera A, Tornero E et al (2014) High doses of daptomycin (10 mg/kg/d) plus rifampin for the treatment of staphylococcal prosthetic joint infection managed with implant retention: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis 80:66–71
  29. Jugun K, Vaudaux P, Garbino J, Pagani L, Hoffmeyer P, Lew D et al (2013) The safety and efficacy of high-dose daptomycin combined with rifampicin for the treatment of Gram-positive osteoarticular infections. Int Orthop 37:1375–1380
  30. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ et al (2011) Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis 52:e18–e55
  31. Skiest DJ (2006) Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. J Clin Microbiol 44:655–656
  32. Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B et al (2014) Emergence of resistance to daptomycin in a cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistent bacteraemia treated with daptomycin. J Antimicrob Chemother 69:568–571
  33. Sano M, Hirose T, Nishimura M, Takahashi S, Matsukawa M, Tsukamoto T (1999) Inhibitory action of clarithromycin on glycoalkal produced by MRSA. J Infect Chemother 5:10–15
  34. Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Yokota T (1994) Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 38:138–141
  35. Fujimura S, Sato T, Mikami T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A (2008) Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. Int J Antimicrob Agents 32:481–484
  36. Fujimura S, Sato T, Hayakawa S, Kawamura M, Furukawa E, Watanabe A (2015) Antimicrobial efficacy of combined clarithromycin plus daptomycin against biofilms-formed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on titanium medical devices. J Infect Chemother 21:756–759
  37. Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Zaini J, Gomi K, Watanabe A (2009) Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. J Orthop Sci 14:658–661
  38. Mizobuchi S, Minami J, Jin F, Matsushita O, Okabe A (1994) Comparison of the virulence of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 38:599–605
  39. Berti AD, Baines SL, Howden BP, Sakoulas G, Nizet V, Proctor RA et al (2015) Heterogeneity of genetic pathways toward daptomycin nonsusceptibility in *Staphylococcus aureus* determined by adjunctive antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 59:2799–2806



**Objetivo 4. Alternativas terapéuticas orales a la pauta clásica de rifampicina-levofloxacin o rifampicina-linezolid en la infección por SASM y por SARM.**

Nos planteamos abordar el estudio de otras alternativas terapéuticas a las pautas de referencia orales en las infecciones de prótesis estafilocócicas cuando éstas no pueden utilizarse por razones de resistencia antibiótica, intolerancia, interacciones farmacocinéticas u otras. Esta circunstancia se plantea con una cierta frecuencia en la práctica clínica (alrededor de un 20% de los casos). Por ello nos propusimos disponer de información rigurosa de antibióticos antiguos, como cotrimoxazol (TMP-SMZ) y ácido fusídico, utilizados a menudo de forma no contrastada.

Ambos antibióticos se pusieron a disposición clínica hace varias décadas, sin incorporar los estudios microbiológicos y de farmacocinética, que acompañan el proceso de los antibióticos más recientes y que actualmente se consideran indispensables. Existe muy escasa literatura respecto a su forma de utilización experimental, la dosificación y su vía de administración más idónea, así como el tipo de sustancia química más adecuado. Además, dado el escaso interés comercial al respecto por parte de la industria farmacéutica, resulta complicado garantizar el suministro fluido de la sustancia requerida.

**Objetivo 4a. Eficacia de cotrimoxazol y ácido fusídico en monoterapia en el modelo animal.**

**Estudios para cotrimoxazol:**

**Los resultados de este estudio se recogieron en el artículo 4:**

**Artículo 4. El Haj C, Ribera A, Lloberas N, Tubau F, Ariza J, Murillo O. “Drawbacks of the use of cotrimoxazole in foreign-body infections”. Enviado para publicación.**

La combinación de trimetoprim (TMP) con sulfametoxazol (SMZ), conocida como cotrimoxazol (TMP-SMZ), es sinérgica y bactericida frente a *S.aureus* [167,168] y se ha sugerido como una alternativa terapéutica sola o en combinación con rifampicina en el tratamiento de infecciones estafilocócicas osteoarticulares. La observación de fallos terapéuticos se ha asociado en parte al posible efecto inhibitorio de la timidina, presente en el pus y tejidos desvitalizados, sobre el cotrimoxazol [169]. El papel de las



## RESULTADOS

combinaciones de rifampicina con linezolid, clindamicina, cotrimoxazol o ácido fusídico frente al tratamiento estándar (rifampicina-fluoroquinolonas) en las infecciones protésicas estafilocócicas tratadas con DAIR (desbridamiento, antibióticos, irrigación y retención), no ha sido bien establecido. [66,68].

En el presente proyecto se quiso evaluar la eficacia del cotrimoxazol y el posible efecto inhibitorio de la timidina en la infección de cuerpo extraño por SASM de 3 días de evolución en la rata, animales que se caracterizan por su elevado contenido de timidina.

### Estudios farmacocinéticos

Tras la administración de 13mg/kg TMP-65mg/kg SMZ (proporción 1:5) por vía intraperitoneal a las ratas, los parámetros determinados fueron:

	TMP 13mg/kg		SMZ 65mg/Kg	
	Cmax (mg/L)	AUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)	Cmax (mg/L)	AUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)
<b>Suero</b>	0.32	0.55	153	1263
<b>LC</b>	0.39	0.72	134	943

**Tabla 18. Concentraciones máximas (Cmax) y áreas bajo la curva (AUC) para TMP y SMZ a dosis 13mg/kg TMP-65mg/kg SMZ en suero y en líquido de las cajas (LC).**

La metabolización muy acelerada del TMP respecto al SMZ en el animal condicionó unos niveles muy bajos de TMP y elevados de SMZ con una ratio de 1:340, muy superior a la inicialmente deseable de 1:20. La dificultad para incrementar la dosis de TMP utilizada por vía intraperitoneal, cercana a la dosis letal (20mg/kg), motivó la utilización de la vía subcutánea con el objetivo de retardar su metabolización (dosis letal 300mg/kg). La dosis utilizada fue 120mg/kg de TMP, con una ratio TMP:SMZ de 1:1.

Los resultados obtenidos fueron:

	TMP 120mg/kg		SMZ 120mg/kg	
	Cmax (mg/L)	AUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)	Cmax (mg/L)	AUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)
Suero	16.16	45.26	205.62	2297.72
LC	3.74	45.83	84	1569

**Tabla 19. Concentraciones máximas (Cmax) y áreas bajo la curva (AUC) para TMP y SMZ en el suero y en el líquido de las cajas (LC) para dosis 120mg/Kg de TMP-SMZ (proporción 1:1).**

Si bien el área bajo la curva para SMZ fue muy elevada, los niveles obtenidos se consideraron aceptables para iniciar los estudios *in vivo*.

#### Eficacia de cotrimoxazol *in vivo*

La duración de la pauta terapéutica se redujo a 4 días respecto a la previsión de 7 días, ya que los animales no toleraron bien el antibiótico (ver apartado siguiente). Tras haber finalizado el tratamiento, se obtuvieron muestras del líquido de las cajas y se extrajeron los coverslips (CV). Se realizaron recuentos bacterianos del líquido de las cajas y recuentos de las bacterias adherentes de los CV. La eficacia se evaluó a partir de la diferencia entre los recuentos bacterianos del líquido de las cajas entre el día 4 y el día 1 (inicio del tratamiento) y el recuento bacteriano de los CV el día 4. Así mismo se analizó la aparición de cepas resistentes. Los resultados se exponen a continuación:

Grupos terapéuticos (n)	Día 1	Día 4	
	LC	LC	CV
	log UFC/ml(±SD)	Δlog UFC/ml (±SD)	log UFC/ml(±SD)
TMP-SMZ (10)	6.74±0.3	+0.33±0.8	6.70±0.5
CONTROL (10)	6.50±0.1	+0.68±0.4	6.50±0.4

**Tabla 20. Recuentos bacterianos para SASM 29213 del líquido de las cajas (LC) el día 1 y el día 4 para los CV (log UFC/ml) y descensos bacterianos en el líquido de las cajas (Δlog UFC/ml) el día 4 respecto al día 1 con las desviaciones estándar (±SD).**

El grupo tratado con cotrimoxazol no mostró diferencias significativas respecto al grupo control ( $P>0.05$ ) y no se encontraron cepas resistentes.

#### Efecto adverso de cotrimoxazol en las ratas

Durante el tratamiento con cotrimoxazol los animales mostraron disminución de la reactividad y poliuria. Esta intolerancia no pudo atribuirse a una afectación renal

## RESULTADOS

secundaria a los elevados niveles de SMZ, ya que las cifras de creatinina no mostraron diferencias significativas entre las ratas tratadas con cotrimoxazol (0.48mg/L) y las ratas control (0.42 mg/L) (Estudios realizados por el Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona).

### Afectación de la timidina sobre la actividad de cotrimoxazol

La falta de eficacia observada en el modelo no se acompañó de la detección de cepas resistentes, por lo que se relacionó con el posible efecto inhibitorio de la timidina. Ello se confirmó en parte al observar un incremento de 4-8 veces en el valor de la CMI para TMP-SMZ (inicial de 0.064mg/L) al utilizar las muestras de líquido de las cajas obtenidas en los estudios de la farmacocinética en los animales para realizar la determinación de CMI.

Los resultados obtenidos nos hicieron desistir de proseguir con los estudios de eficacia del cotrimoxazol en nuestro modelo animal.

### Estudios para ácido fusídico:

**Presentación oral:** Cristina El Haj, Oscar Murillo, Alba Ribera, Corinne Ruppen, Joan Gómez, Fe Tubau, Carmen Cabellos, Javier Ariza. “Estudio de la actividad *in vitro* de Ácido Fusídico en solitario y en combinación frente *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a meticilina”. (Nº comunicación 057). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC XX). –Barcelona 26-28 de mayo 2016.

Antes de proceder al estudio de eficacia del ácido fusídico (AF) en el modelo animal, pusimos en marcha los estudios de actividad microbiológica *in vitro*, así como la correspondiente evaluación farmacocinética.

### Estudios de actividad microbiológica *in vitro*

Se determinaron las CMI para AF en dos cepas, la cepa SARM (BAA-39) y la SASM (ATCC 29213), ambas de colección, ya utilizadas con anterioridad. Los resultados fueron:

CEPA	CMI (mg/L)		
	AF	RIF	DAP
SARM BAA-39	0.25	0.03	1
SASM 29213	0.25	0.015	0.5

**Tabla 21. Concentraciones mínimas inhibitorias para ambas cepas de ácido fusídico (AF), rifampicina (RIF) y daptomicina (DAP) con inóculos estándar de  $10^5$ UFC/mL.**

Se determinaron las CMB y se realizaron curvas de letalidad en fase exponencial con inóculos estándar y en fase estacionaria para AF en solitario y en combinación con DAP y RIF.

Las CMBs fueron:

	CMB (mg/L)			
	SARM		SASM	
	FEX	FST	FEX	FST
AF	>32	>32	>32	>32
RIF	0.5	>32	0.12	>32
DAP	4	24	1	32

**Tabla 22. CMBs para los antibióticos ácido fusídico (AF), rifampicina (RIF) y daptomicina (DAP) en fase exponencial con inóculos estándar (FEX) y en fase estacionaria con altos inóculos (FST).**

En las curvas de letalidad en fase exponencial, en ambas cepas, AF en solitario no mostró actividad bactericida con concentraciones clínicamente relevantes y aparecieron cepas resistentes ( $CMI \geq 3$ mg/L para SARM y  $CMI \geq 2$ mg/L para SASM). Aparecieron también resistencias a rifampicina al utilizarla en solitario ( $CMI \geq 32$ mg/L). La combinación de AF con RIF protegió la aparición de cepas resistentes en ambos antibióticos, mejorando ligeramente la actividad de RIF (Figura 46).

## RESULTADOS

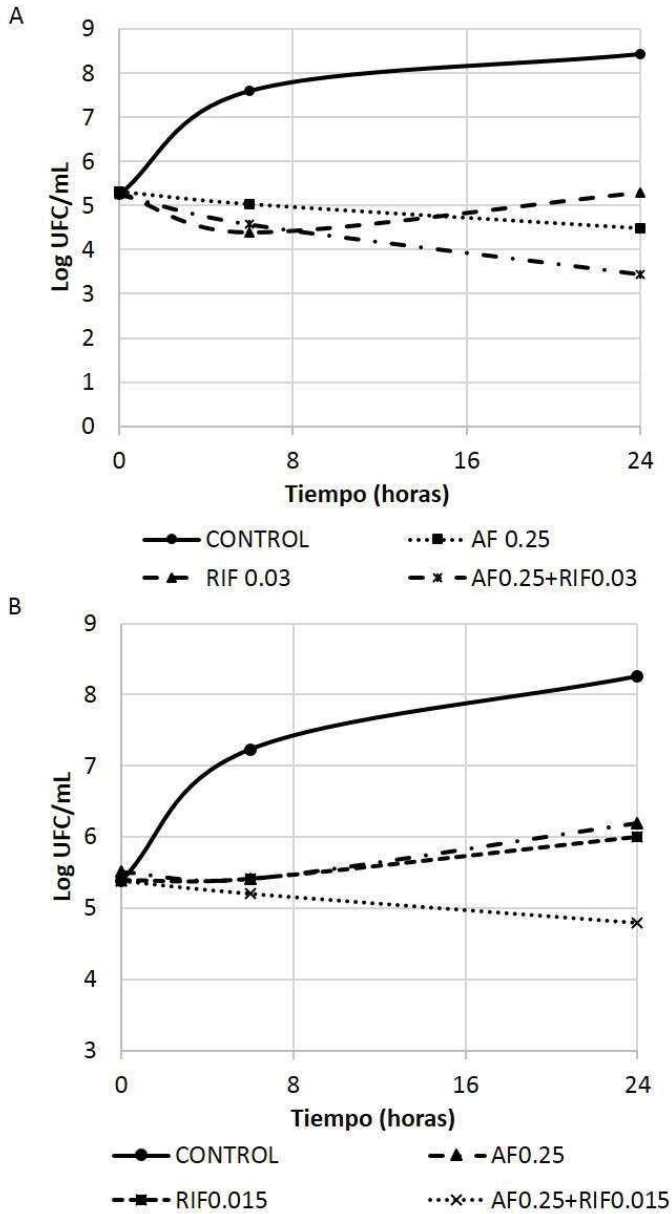
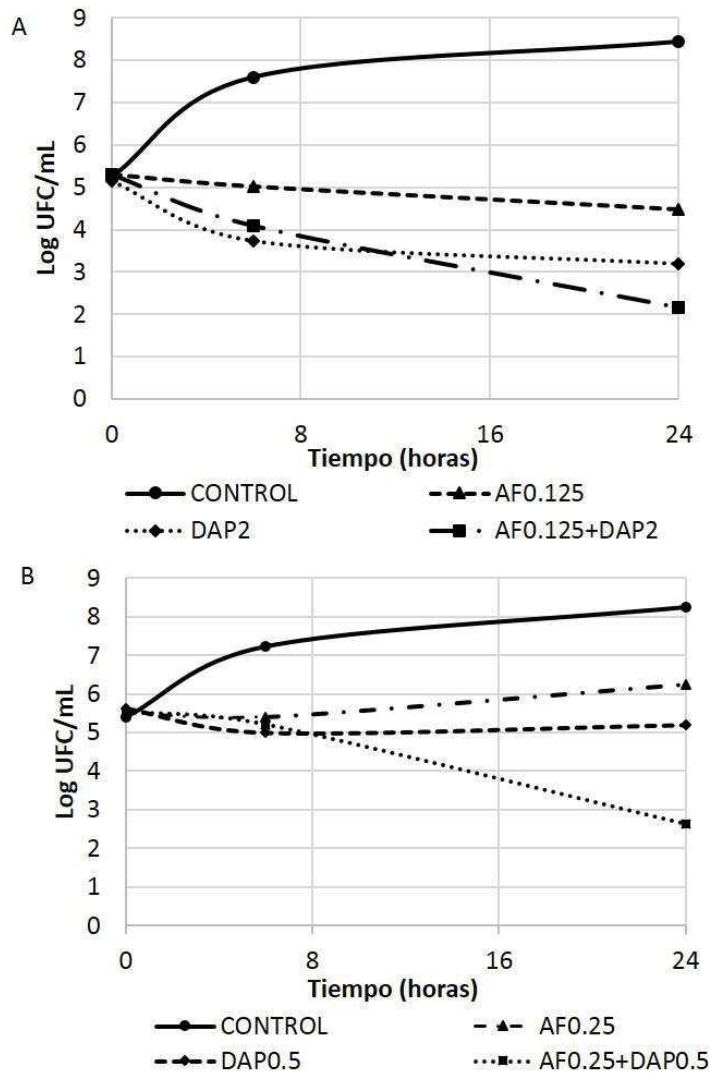


Figura 46. Curva de letalidad en fase logarítmica con inóculos de  $10^5$  UFC/mL de ácido fusídico (AF), rifampicina (RIF) y su combinación para SARM (A) y SASM(B).

La combinación de AF a altas concentraciones con DAP antagonizó su actividad, pero a bajas concentraciones ( $1 - \frac{1}{2}$  xCMI) la aumentó y la combinación resultó

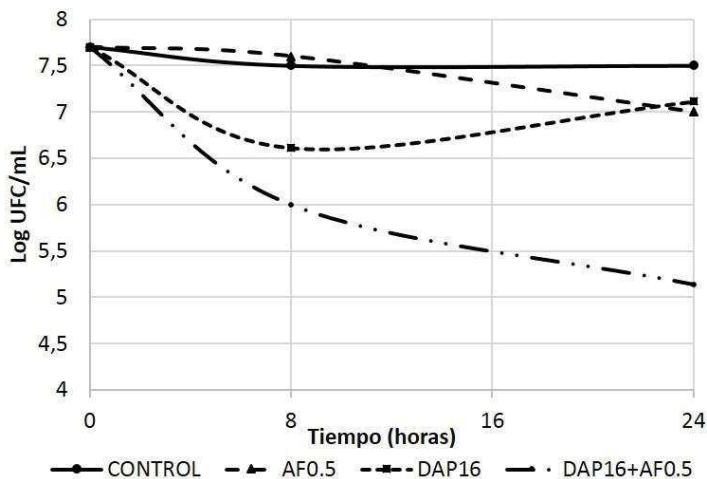
bactericida con DAP (SARM: 2 xCMI, SASM: 1 xCMI). No se encontraron cepas resistentes a AF en esta combinación (Figura 47).



**Figura 47. Curva de letalidad en fase logarítmica con inóculos de  $10^5$  UFC/mL de ácido fusídico (AF), daptomicina (DAP) y su combinación para SARM (A) y SASM(B).**

En fase estacionaria, AF en solitario no mostró actividad bactericida y aparecieron cepas resistentes con SASM ( $CMI \geq 2$  ml/L). La combinación de AF con RIF fue indiferente y protegió frente la aparición de cepas resistentes a AF y parcialmente a RIF. La combinación AF con DAP fue sinérgica frente a SARM (Figura 48) e indiferente frente a SASM y no se acompañó de la aparición de resistencias.

## RESULTADOS



**Figura 48. Actividad de ácido fusídico (AF), daptomicina (DAP) y su combinación en fase estacionaria para SARM.**

### Estudios de farmacocinética/farmacodinámica

Hicimos un primer estudio con la formulación de presentación “dietanolamina fusidato”, suministrada por LEO PHARMA (Dinamarca), administrando 200mg/kg y 250mg/kg por vía subcutánea con resultados satisfactorios (ver tabla 23). No obstante, la empresa no tuvo continuidad en el suministro del antibiótico y fue totalmente imposible proseguir los estudios con esta formulación.

DEF	200mg/kg		250mg/kg	
	Cmax (mg/L)	AUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)	Cmax (mg/L)	AUC <sub>0-24h</sub> (mg.h/L)
Suero	8.68	21.65	6.99	39.81
LC	26.3	36.71	39.81	221.12

**Tabla 23. Concentraciones máximas (Cmax) y áreas bajo la curva (AUC) para dietanolamina fusidato (DEF) en el suero y líquido de las cajas (LC). Los niveles alcanzados se consideraron relativamente equivalentes a los humanos.**

Evaluamos entonces la administración de fusidato sódico por vía intraperitoneal, suministrada por Sigma-Aldrich. La dosis de 200mg/kg no permitió alcanzar niveles

suficientes (ver tabla 24) y las pruebas con 300 y 400mg/kg no fueron toleradas por los animales.

<b>FUSIDATO SODICO</b>		
<b>200mg/kg</b>		
	<b>Cmax (mg/L)</b>	<b>AUC<sub>0-24h</sub> (mg.h/L)</b>
<b>Suero</b>	84.69	151.03
<b>LC</b>	2.45	34.43

**Tabla 24. Concentraciones máximas (Cmax) y áreas bajo la curva (AUC) en el suero y líquido de las cajas (LC) para fusidato sódico por vía intraperitoneal.**

Ante las dificultades encontradas, se planteó la posibilidad de utilizar el antibiótico en su formulación para el uso intravenoso en humanos, que fue suministrado por la Farmacia Carreras. Se evaluó la vía subcutánea a la dosis de 300mg/kg [165]. Las concentraciones máximas alcanzadas en el suero y el líquido de las cajas respectivamente fueron: 10.78mg/L y 1.34 mg/L, y las áreas bajo la curva de: 38.13 mg.h/L y 15.89 mg.h/L, respectivamente. También se estudiaron las concentraciones en el líquido de las cajas al 4º día de tratamiento para evaluar un posible efecto acumulativo, obteniendo una concentración máxima del antibiótico ese día de 2.98mg/L y una concentración mínima de 1.42mg/L. Globalmente los niveles obtenidos fueron muy bajos. La posibilidad de incrementar la dosis por vía subcutánea para lograr niveles más adecuados se descartó, al considerar inasumible la inyección a los animales de la gran cantidad de volumen requerido para ello.

Así se hizo un intento de administrar la formulación humana por vía intraperitoneal, pero los animales no toleraron ni la dosis de 250mg/L ni la de 200mg/L.

#### Reacciones adversas de los animales a la administración del antibiótico

Durante la administración del antibiótico en sus diversas formulaciones se observó inflamación en la zona de punción.



## RESULTADOS

Con toda la experiencia acumulada se decidió desistir de los estudios con ácido fusídico en el modelo animal ante la imposibilidad de garantizar una vía de administración antibiótica razonablemente tolerada y cuya dosificación emulara en un cierto gado la farmacocinética humana.

## **ANEXO**

**Artículo 4. El Haj C, Ribera A, Lloberas N, Tubau F, Ariza J, Murillo O. “Drawbacks of the use of cotrimoxazole in foreign-body infections”. Enviado para publicación.**



1 **Drawbacks of the use of cotrimoxazole in foreign-body infections**

2 Cristina El Haj<sup>a#</sup>, Alba Ribera<sup>a</sup>, Nuria Lloberas<sup>b</sup>, Fe Tubau<sup>c,d</sup>, Pere Fontova<sup>b</sup>, Javier Ariza<sup>a,e</sup>,  
3 Oscar Murillo<sup>a,e</sup>

4 <sup>a</sup>Laboratory of Experimental Infection, Infectious Diseases Service. IDIBELL-Hospital  
5 Universitari Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

6 <sup>b</sup>Nephrology Service and Laboratory of Experimental Nephrology, University of Barcelona,  
7 Campus Bellvitge, Pavelló de Govern, Feixa Llarga, s/n, L'Hospitalet de Llobregat, 08907,  
8 Barcelona, Spain.

9 <sup>c</sup>Department of Microbiology, IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge; and <sup>d</sup>Department of  
10 Microbiology, CIBERES ISCIII

11 <sup>e</sup>Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPIRD12/0015), Instituto de Salud  
12 Carlos III, Madrid, Spain.

13

14 **Running title:** Cotrimoxazole against foreign-body infections

15 # Corresponding author:

16 Cristina El Haj Hidalgo

17 Infectious Diseases Service.

18 Hospital Universitari Bellvitge.

19 Feixa Llarga s/n, 08907. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

20 Phone no. 34.93.403 5805 / Fax no. 34.93.260 7637

21 e-mail: [celhaj@idibell.cat](mailto:celhaj@idibell.cat)

22 **Abstract**

23 Cotrimoxazole efficacy may be affected by high amounts of thymidine observed in infections  
24 with pus and damage tissue. Using a staphylococcal foreign-body infection (FBI) rat model,  
25 which provides great quantities of thymidine, we corroborated the ineffectiveness of  
26 cotrimoxazole. Caution should be taken using this drug in acute phases of FBIs.

27 Keywords: Cotrimoxazole, foreign-body infection, *S.aureus*, thymidine.

## 28 INTRODUCTION

29 High failure rates have been demonstrated in the treatment of serious *Staphylococcus aureus*  
30 infections with sulfonamides. Its combination with trimethoprim is synergic, and unlike treatment  
31 with sulfonamides alone, is bactericidal. For this reason, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-  
32 SMZ, cotrimoxazole) has been suggested as an alternative for the treatment of *S. aureus*  
33 infections. With regard to its anti-staphylococcal efficacy, previous studies have reported  
34 contradictory results, with variable failure rates in certain serious infections[1]. Thus,  
35 comparisons of the efficacy of TMP-SMZ, vancomycin and beta-lactams for the treatment of  
36 staphylococcal bacteremia and endocarditis found TMP-SMZ to be the least effective[2]. In the  
37 setting of osteoarticular infections, some studies have reported good results using TMP-SMZ  
38 alone or in combination with rifampicin, whereas other studies have noticed failure rates above  
39 40% and emergence of resistant strains even when using TMP-SMZ at high doses for the  
40 treatment of prosthetic joint infections (PJI)[3,4].

41 A recent review of the use of TMP-SMZ against staphylococcal infections emphasized the  
42 importance of the presence of thymidine as a cause of the high failure rates observed in those  
43 infections in which large amounts of pus, damaged tissue and bacterial burden are prevalent[1].  
44 In the present study, we aimed to test the *in vivo* efficacy of TMP-SMZ against foreign-body  
45 infection by methicillin-susceptible *S.aureus* (MSSA), and to evaluate the extent to which it is  
46 affected by the presence of high amounts of thymidine. For the aims of the present study, we  
47 used a rat model of infection, since these animals provide high quantities of thymidine.

## 48 MATERIAL AND METHODS

### 49 Microorganism and antibiotics

50 A MSSA strain (ATCC29213) was used for all *in vitro* and *in vivo* studies. Trimethoprim and  
51 sulfamethoxazole, were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid) and Laboratorios Almfarma  
52 (Barcelona), respectively.

### 53 *In vivo* studies

54 The experimental protocol complied with European (Directive 2010/63/EU) and Spanish (RD  
55 53/2013) legislation on animal experimentation, and the University of Barcelona's Ethics  
56 Committee for Animal Experiments approved the animal model which had previously been  
57 standardized by our group[5]. Briefly, the methodology consisted of subcutaneous implantation  
58 in rats of two Teflon tissue-cages with two polymethylmethacrylate coverslips (CV). After three  
59 weeks, the tissue cage fluid (TCF) was infected with MSSA. Three days later, TCF was  
60 obtained in order to quantify bacterial counts; therapy was then started and administered  
61 subcutaneously for seven days. After the end of treatment, TCF was recovered in order to count  
62 bacteria and animals were sacrificed. CVs were removed and processed as previously  
63 described[5]. The criterion of efficacy was defined as a decrease in TCF bacterial counts  
64 between the beginning and end of the treatment, and as the adherent bacteria counts on the  
65 CV. The appearance of resistant strains at the end of therapy was screened.

### 66 Pharmacokinetic studies

67 We performed pharmacokinetic studies to select the equivalent human dose of 160mg  
68 TMP/800mg SMZ every 8 hours, which provide the ideal synergistic *in vivo* TMP:SMZ ratio of  
69 1:20 found in human serum. Bearing in mind the features of the tissue-cage infection model, we  
70 looked for the appropriate dosage of TMP-SMZ that could guarantee this 1:20 ratio in TCF.

71 Briefly, several dosages of TMP-SMZ were administered to animals. Then, blood and TCF  
72 samples were collected at several time-points. Samples were centrifuged and the serum was  
73 transferred into aliquots and stored at -20 °C up to the time of analysis. For the precipitation of  
74 serum or TCF protein, trichloroacetic acid solution (50%,20 µL) was added to 200 µL of serum

75 or TCF samples (calibration and rats) and centrifuged at 18000 g for 10 min. The supernatants  
76 were collected and 5  $\mu$ L was injected to measure the drug concentration.

77 The concentrations of TMP and SMZ were analyzed using an Ultra Performance Liquid  
78 Chromatography technique (UHPLC)[6]. Chromatography was performed using a Waters  
79 Acquity®TM UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA) with an ultraviolet detector. The  
80 separation was carried out on an Acquity C18 BEH™ (2.1×100mm id,1.7 $\mu$ m, Waters, Milford,  
81 MA,USA). Elution was performed with a mobile phase solution that was di-potassium hydrogen  
82 phosphate water solution (pH 7.2; 10mM) containing acetonitril (20:80). The retention times of  
83 TMP and SMZ were 1.4 and 2.7 min respectively. TMP was detected at 270 nm, and SMZ at  
84 254 nm.

#### 85 ***In vitro* studies: assessment in the presence of thymidine**

86 Following the standard procedures, we determined the MIC value of TMP-SMZ (ratio 1:20)  
87 using Mueller Hinton Broth (MHB) and microdilution method.

88 To assess the effect of thymidine on TMP-SMZ activity, we used TCF samples recovered from  
89 pharmacokinetic studies (see above), which contained known concentrations of TMP-SMZ and  
90 inherent thymidine from rat. Following the microdilution methodology, we determined the MIC  
91 value using a mixture of MHB and this TCF sample (ratio 1:1).



## 92 RESULTS AND DISCUSSION

93 The treatment with TMP-SMZ had to be suspended on the fourth day, due to animals presented  
94 intolerance to the antibiotic. This therapy did not show significant differences with respect to the  
95 control group in terms of efficacy (Table 1). No resistant strains to TMP-SMZ were detected.  
96 During the treatment with TMP-SMZ the animals showed less reactivity and polyuria. Our  
97 hypothesis that this was due to renal impairment associated with high levels of SMZ was not  
98 confirmed, since serum creatinine levels in treated and control rats did not differ (0.48mg/L and  
99 0.42mg/L, respectively).

100 On the basis of pharmacokinetic studies, we finally selected a dose of 120mg/Kg/day of TMP-  
101 SMZ (proportion 1:1) that provide the ideal ratio TMP-SMZ of 1:20 in TCF. Concentrations of  
102 TMP and SMZ in TCF were similar to those achieved in human:  $C_{max}$ (mg/L) and  $AUC_{0-}$   
103  $_{24h}$ (mg·h/L): 3.74 and 45.83; 84 and 1569 respectively.

104 The ineffectiveness of TMP-SMZ in our animal model was due in part to its inactivation by  
105 thymidine. We observed that the *in vitro* MIC of TMP-SMZ in the absence of thymidine was  
106 0.064mg/L, but in the presence of TCF (with a high amount of thymidine) the MICs were 4-8 fold  
107 higher. The inability to increase the TMP-SMZ dosage or to use longer treatments due to the  
108 rats' intolerance meant that we were unable to carry out further studies with these animals  
109 which might have increased the final efficacy. However, based on previous experiences using  
110 the tissue-cage model infection, which have usually evaluated the antimicrobial efficacy of  
111 therapies over 3 to 7 days, we would not expect a significant improvement in TMP-SMZ efficacy  
112 [5].

113 Our findings were in agreement with previous reports conducted in murine models. The  
114 presence of a considerable amount of thymidine in murine serum and urine (160 and 410-728  
115 ng/ml, respectively) may interfere with the *in vivo* activity of TMP-SMZ. We wondered how  
116 relevant these observations might be for humans, in whom thymidine levels are low or absent in  
117 serum but may be higher in particular situations or tissues[7]. Proctor et al. stressed the high  
118 TMP-SMZ failure rates observed in those MRSA infections in which large amounts of pus,  
119 damage tissue and bacterial burden are prevalent, presumably due to the presence of  
120 thymidine[1]. Also, in a recent study by Zander et al., a median of 530 µg/L of thymidine was

121 detected in sputa of ten cystic fibrosis patients. These authors demonstrated that the activity of  
122 cotrimoxazole, as well as its synergy with rifampicin, was inhibited with 2 mg/L of  
123 thymidine[8]. Also, Stokes et al. reported that the required concentration of thymidine to inhibit  
124 the *in vitro* activity of cotrimoxazole was as low as 0.05mg/L[9].

125 In this regard, the efficacy of cotrimoxazole seems to depend on the balance between the drug  
126 and thymidine levels found at the site of the infection. Additionally, its particular pharmacokinetic  
127 could be detrimental to TMP-SMZ efficacy in specific settings because the synergistic activity is  
128 based on attaining a ratio of 1:20, respectively. While this proportion is usually found in serum  
129 and interstitial human fluids, the final scenario may be different in osteoarticular and biofilm-  
130 related infections, where this ratio may not be warranted in bone or the intracellular milieu[10].

131 In the setting of staphylococcal device-related osteoarticular infections, the pharmacokinetic  
132 interactions between cotrimoxazole and rifampicin are of particular concern and they may affect  
133 cotrimoxazole's final efficacy. Rifampicin is usually required due to its main role in these  
134 infections but it leads to decrease the levels of TMP-SMZ[6], and the clinical consequences of  
135 these interactions in the management of PJI have not been well evaluated.

136 In conclusion, TMP-SMZ treatment was not effective against foreign-body infection by MSSA.  
137 Our findings are in agreement with previous reports of clinical failure with TMP-SMZ in device-  
138 related infections, and they illustrate to some extent the impact of the presence of thymidine on  
139 the efficacy of cotrimoxazole. Caution should be taken when TMP-SMZ is used in suppurating  
140 infections, due to its apparent inhibition by thymidine. In the specific case of staphylococcal PJI  
141 managed with implant retention, the rifampicin-cotrimoxazole combination should be avoided  
142 during the acute phase of the infection and should be reserved as an alternative treatment at a  
143 later point when the infection is more controlled.

144 **ACKNOWLEDGMENTS**

145 This study was supported by a research grant from the Ministerio de Sanidad y Consumo, ISCIII  
146 (PI13/00550), and by Plan Nacional de I+D+i and ISCIII, Subdirección General de Redes y  
147 Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish  
148 Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) - co-financed by European  
149 Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF.

150

151 **COMPETING INTERESTS**

152 The authors have no conflict of interest.

153

154 TABLE 1. Bacterial counts from tissue-cage fluid (TCF) at day 1, and results of the efficacy of  
 155 therapeutics groups against bacteria from TCF (decreases of bacterial counts at day 4) and  
 156 from cover-slips (CV; bacterial counts at day 4).

Therapeutic groups (n)	Day 1	Day 4	
	TCF log CFU/ml( $\pm$ SD)	TCF $\Delta$ log CFU/ml ( $\pm$ SD)	CV <sup>157</sup> log CFU/ml( $\pm$ SD)
<b>TMP-SMZ (10)</b>	6.74 $\pm$ 0.3	0.33 $\pm$ 0.8	6.70 $\pm$ 0.5
<b>CONTROL (10)</b>	6.50 $\pm$ 0.1	0.68 $\pm$ 0.4	6.50 $\pm$ 0.458

159 There were not significant differences between control and TMP-SMZ group.  
 160 Abbreviations: n, number of tissue cages; CFU, colony forming unit;  $\Delta$ log CFU/ml, decrease in  
 161 log CFU/ml with respect to day 1.

162 **References**

- 163 [1] Proctor RA. Role of folate antagonists in the treatment of methicillin-resistant  
164 *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008;46:584–93. doi:10.1086/525536.
- 165 [2] Markowitz N, Quinn EL, Saravolatz LD. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with  
166 vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Ann Intern Med*  
167 1992;117:390–8.
- 168 [3] Stein A, Bataille JF, Drancourt M, Curvale G, Argenson JN, Groulier P, et al. Ambulatory  
169 treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus*-infected orthopedic implants with high-  
170 dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole). *Antimicrob Agents*  
171 *Chemother* 1998;42:3086–91.
- 172 [4] Nguyen S, Pasquet A, Legout L, Beltrand E, Dubreuil L, Migaud H, et al. Efficacy and  
173 tolerance of rifampicin–linezolid compared with rifampicin–cotrimoxazole combinations in  
174 prolonged oral therapy for bone and joint infections. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1163–  
175 9.
- 176 [5] Murillo O, Doménech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudiol F, et al. Efficacy of high  
177 doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible  
178 *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4011–7.
- 179 [6] Ribera E, Pou L, Fernandez-Sola A, Campos F, Lopez RM, Ocana I, et al. Rifampin  
180 Reduces Concentrations of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Serum in Human  
181 Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3238–  
182 41.
- 183 [7] Nottebrock H, Then R. Thymidine concentrations in serum and urine of different animal  
184 species and man. *Biochem Pharmacol* 1977;26:2175–9.
- 185 [8] Zander J, Besier S, Faetke S, Saum SH, Müller V, Wichelhaus TA. Antimicrobial  
186 activities of trimethoprim/sulfamethoxazole, 5-iodo-2'-deoxyuridine and rifampicin against  
187 *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:562–5.
- 188 [9] Stokes A, Lacey RW. Effect of thymidine on activity of trimethoprim and

189 sulphamethoxazole. J Clin Pathol 1978;31:165–71.

190 [10] Saux MC, Le Rebeller A, Leng B, Mintrosse J. [Bone diffusion of trimethoprim and  
191 sulfamethoxazole high pressure liquid chromatography (HPLC) (author's transl)]. Pathol  
192 Biol (Paris) 1982;30:385–8.

193



#### Objetivo 4b. Eficacia de cotrimoxazol y su combinación con rifampicina en el modelo de biofilm *in vitro* CDC Biofilm Reactor

Las dificultades encontradas en los experimentos con cotrimoxazol y con ácido fusídico en el modelo de infección de cuerpo extraño en rata, debido a la particular metabolización de los antibióticos en los roedores y su intolerancia a dosis superiores de dichos antibióticos, nos hicieron desistir en estos estudios *in vivo*.

Dado el interés de poder dar algún tipo de respuesta a la problemática clínica de la utilidad de cotrimoxazol en la infección de prótesis articular humana, nos planteamos una modificación metodológica alternativa: la utilización de un modelo *in vitro* de biofilm (CDC Biofilm Reactor). Comparamos las combinaciones de rifampicina con levofloxacin, cotrimoxazol y linezolid en la cepa SASM 29213 y la de rifampicina con linezolid y cotrimoxazol en la cepa SARM HUB1.

Se determinaron las CMI y las CMEB para las cepas de estudio. Fueron las siguientes:

	SASM 29213		SARM HUB1	
	CMI	CMEB	CMI	CMEB
TMP-SMZ	0.064	64	0.064	64
LZD	4	>256	4	>256
RIF	0.015	16	0.012	64
LVX	0.5	64	-	-

Tabla 25. CMI y CMEBs de las cepas SASM y SARM para TMP-SMZ, cotrimoxazol; LZD, linezolid; RIF, rifampicina y LVX, levofloxacin en mg/L.

Los estudios farmacocinéticos mostraron los siguientes valores para cada antibiótico:

Antibiótico	fCmax (mg/L)	t ½ (horas)	fAUC <sub>0-24h</sub> (mg·h/L)
Rifampicina	5.73	5	45.92
Linezolid	9.62	5	134.8 <sup>a</sup>
Levofloxacin	9.83	7	98.69
TMP	0.71	10	22.2 <sup>b</sup>
SMZ	13	10	217.5 <sup>b</sup>

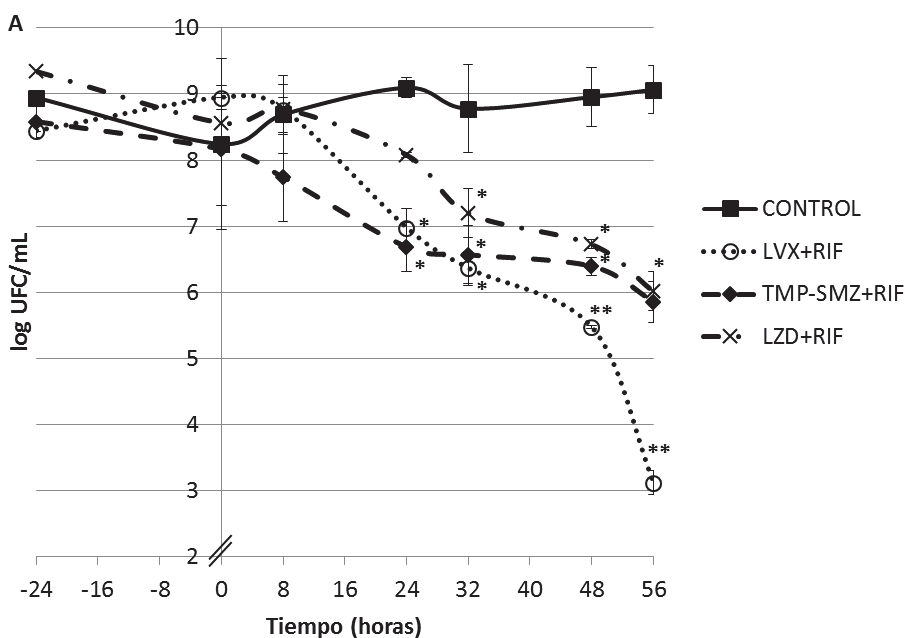
Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos para los antibióticos utilizados en el CDC Biofilm Reactor. Las concentraciones corresponden a la porción de antibiótico no unida a proteína (free, f). Abreviaciones: Cmax, concentración máxima; t ½, vida media; AUC<sub>0-24h</sub>, área bajo la curva de 0 a 24 horas. <sup>a</sup>El área bajo la curva está determinada con dos dosificaciones al día; <sup>b</sup> con tres.

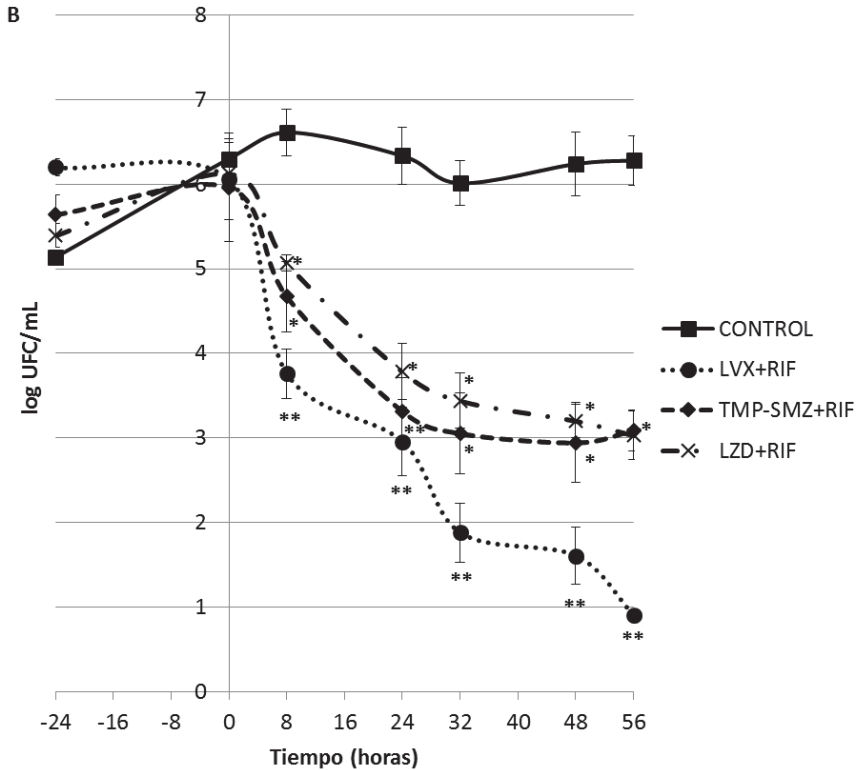


## RESULTADOS

En los experimentos *in vitro* utilizando el modelo CDC Biofilm Reactor se realizaron como mínimo dos réplicas por experimento/pauta terapéutica, obteniendo dos o más réplicas del medio y de 9 a 12 réplicas de los cupones por punto horario.

Los recuentos bacterianos obtenidos de la cepa SASM 29213 en el reactor en el medio y los cupones para cada pauta terapéutica se encuentran en la Figura 49. Todos los tratamientos fueron mejores que el control ( $P < 0.05$ ). La combinación de referencia de rifampicina con levofloxacinó fue el tratamiento más eficaz respecto a las otras combinaciones con rifampicina ( $P < 0.001$ ) y protegió frente a la aparición de cepas resistentes tanto en el medio como en el biofilm de los cupones. Las combinaciones de rifampicina con linezolid y rifampicina con cotrimoxazol mostraron una eficacia similar, pero con una importante diferencia: en las muestras obtenidas bajo tratamiento con rifampicina-cotrimoxazol se desarrollaron sistemáticamente cepas resistentes a rifampicina (CMI a rifampicina  $> 32 \text{ mg/L}$ ). A las 8 horas de tratamiento, se encontraron cepas resistentes a rifampicina en el 67% de muestras recogidas del medio y en el 55% de los cupones. Tras 24 horas de tratamiento y hasta su finalización, se encontraron cepas resistentes en todas las muestras recogidas.





**Figura 49. Recuentos bacterianos (log UFC/mL) para SASM 29213 en el medio (A) y en los cupones (B) para las diferentes pautas terapéuticas y el control. Abreviaciones: LVX, levofloxacino; RIF, rifampicina; TMP-SMZ, cotrimoxazol, LZD, linezolid.**

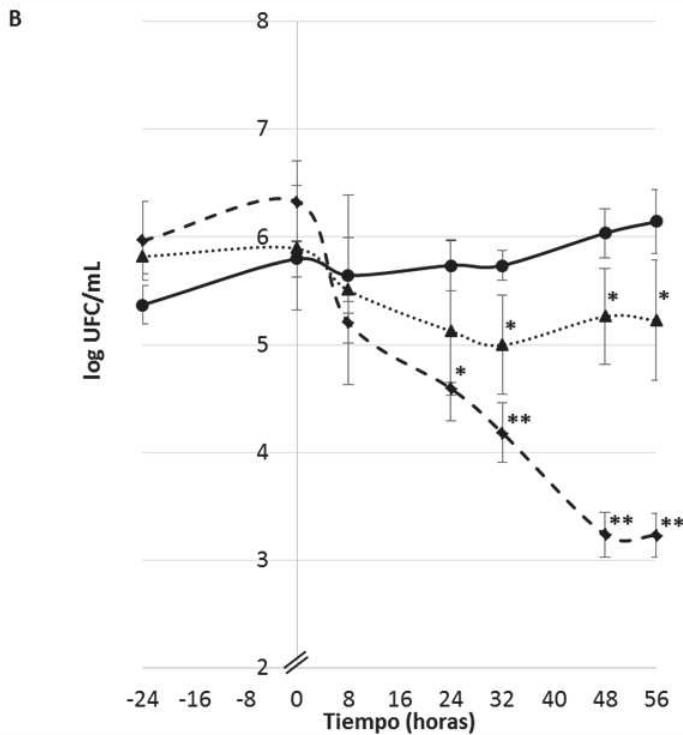
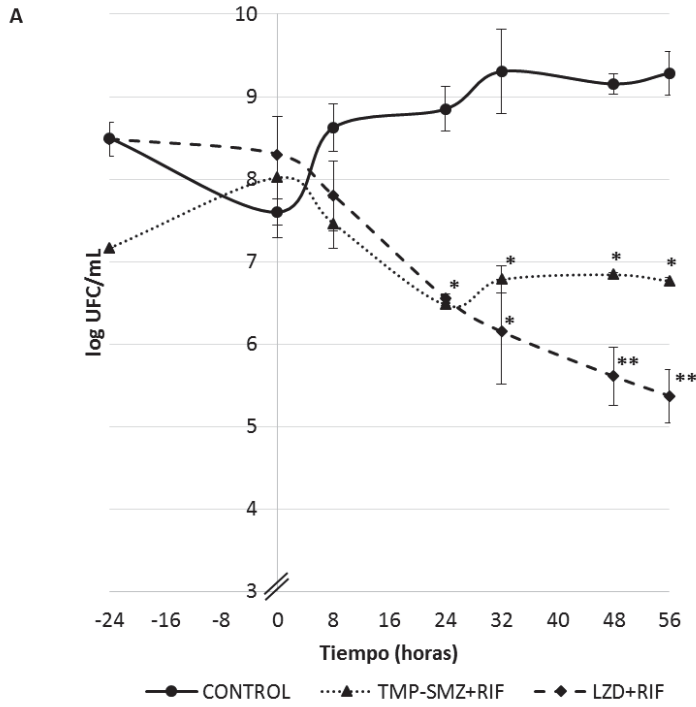
**\*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0.05$ )**

**\*\*Diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).**

En el caso de SARM observamos que el tratamiento de linezolid en combinación con rifampicina fue el mejor tratamiento respecto al control y a la pauta terapéutica cotrimoxazol-rifampicina ( $P < 0.05$ ), con descensos tanto en el medio como en los cupones de alrededor de 3 log UFC/mL y protección frente a la aparición de resistencias a rifampicina (Figura 50). Sin embargo, la combinación de cotrimoxazol con rifampicina tuvo poca actividad, mostrando descensos de alrededor de 1 log UFC/mL en el medio y en el biofilm de los cupones; de nuevo esta combinación no evitó la aparición de cepas resistentes a rifampicina, que se observó sistemáticamente tanto en las muestras recogidas del medio (100% de las muestras) como de los cupones (83% de las muestras)

## RESULTADOS

a las 8 horas de tratamiento, con CMI>32 mg/L. Tras 24 horas de tratamiento, se detectaron cepas resistentes a rifampicina en todas las muestras recogidas.



**Figura 50. Recuentos bacterianos (log UFC/mL) para SARM HUB1 en el medio (A) y en los cupones (B) para las diferentes pautas terapéuticas y el control. Abreviaciones: RIF, rifampicina; TMP-SMZ, cotrimoxazol, LZD, linezolid.**

**\*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0.05$ ).**

**\*\*Diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).**



## **DISCUSIÓN**



## **VI. DISCUSIÓN**

### **1. Estandarización de modelos de infección experimental de cuerpo extraño**

#### **1a. Modelo de infección de evolución aguda de exigencia variable por SASM en la rata.**

Los modelos de infección experimental *in vivo* han contribuido de forma significativa a la comprensión de la patogenia y al progreso en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Dependiendo del objetivo y el microorganismo de estudio, se han utilizado diversos modelos de infección de cuerpo extraño [126,127,135,170,171]. En concreto, el modelo experimental de cuerpo extraño en caja (tissue-cage), descrito en 1982, reproduce en gran medida la problemática de las infecciones de prótesis articular y ha sido ampliamente aceptado. El modelo inicial descrito por Zimmerli et al. en el que se utilizaban cobayas sirvió para el estudio de la patogénesis de la infección de cuerpo extraño y los mecanismos de defensa del huésped, así como de la profilaxis antimicrobiana y estudios terapéuticos. Sin embargo, este modelo no permite el estudio de tratamientos prolongados ni el uso de antibióticos beta-lactámicos, no tolerados en estos los animales [172]. El modelo de Lucet et al. de cuerpo extraño en rata permite el estudio de una infección de exigencia variable y la evaluación de la eficacia antibiótica de forma prolongada [139].

Nuestro grupo tiene una amplia experiencia clínica en el estudio de la antibioterapia de las infecciones de prótesis articulares utilizando como referencia los resultados obtenidos en el modelo de infección de cuerpo extraño con cajas de teflón en rata. Este modelo, basado en el de Lucet et al. [139], fue estandarizado por nuestro grupo hace una década [141] para el estudio de una infección de 3 semanas de evolución por SASM, que reproducía una infección de prótesis articular cronificada [140,142,173]. En una segunda etapa se abordó la infección por SARM, utilizando un período de infección de 72 horas, un modelo de biofilm menos evolucionado, más próximo a la infección aguda de prótesis articular, que favorecía la comparación de la eficacia entre las diferentes pautas antimicrobianas [92,97,99].



## DISCUSIÓN

En el presente proyecto de tesis, retomamos nuevamente el estudio de la infección por SASM, para evaluar también en esta infección el papel de daptomicina y ponerlo en perspectiva respecto a los tratamientos considerados de referencia con rifampicina y levofloxacino. Para ello estandarizamos un modelo de corta evolución de la infección por SASM, con un biofilm más sensible a los antibióticos, similar al desarrollado previamente para SARM. No obstante, estudiamos en más profundidad, la importancia de los primeros días en el grado de desarrollo del biofilm. Mientras un periodo de infección de 3 días podría ser adecuado para discernir la diferente eficacia antimicrobiana en muchas pautas antibióticas, podría no proporcionar suficiente especificidad para objetivar diferencias entre pautas con gran actividad. De esta manera prolongamos el período de infección a 5, 7 y 10 días y analizamos la respuesta antimicrobiana. Comprobamos que el modelo de infección de 5 días se acercaba al de 3 días y por el contrario el de 7 días aumentaba la resistencia del biofilm y proporcionaba una exigencia intermedia, similar al de 10 días. Con estos resultados y las ventajas logísticas de simplicidad de los modelos más cortos, establecimos 2 puntos preferentes en el contexto de la infección aguda: un modelo de infección de 3 días con un biofilm más sensible a los antibióticos para el estudio comparativo de la mayoría de pautas antibióticas con un grado variable de actividad y un modelo de infección de 7 días con un biofilm de exigencia intermedia, especialmente adecuado para la comparación de pautas con una gran eficacia antimicrobiana. El modelo de 3 días fue utilizado por su simplicidad para los estudios de eficacia anti-biofilm de claritromicina y el de 7 días para comparar las pautas con la mayor eficacia :cloxacilina, daptomicina o levofloxacino con rifampicina.

Estos estudios de estandarización del modelo se acompañaron de los correspondientes experimentos de susceptibilidad antimicrobiana mediante curvas de letalidad. Pudimos confirmar nuevamente la correlación existente entre los resultados de eficacia antimicrobiana obtenidos en el modelo *in vivo* y los resultados de las curvas de letalidad *in vitro* en condiciones bacterianas en fase estacionaria. Esta correlación ya había sido descrita anteriormente en los trabajos de Zimmerli et al.[56,144] en los que se objetivó la escasa relación existente entre la eficacia mostrada por los antibióticos en el modelo *in vivo* y las curvas de letalidad con bacterias en fase replicativa. También

realizamos curvas de letalidad con inóculos elevados en algunos casos para conocer mejor la eficacia y la dificultad que representaba una alta concentración bacteriana (efecto inóculo) en la actividad de los antibióticos. En nuestro modelo la correlación descrita fue observada en las diferentes pautas antibióticas y sus combinaciones.

En conjunto, este modelo de infección aguda por SASM en la rata se muestra útil para el estudio de la eficacia antimicrobiana en la infección de cuerpo extraño y sin una gran complejidad. Entre sus limitaciones debe considerarse la amplitud de la desviación estándar a menudo observada en los experimentos terapéuticos, hecho ya constatado en nuestros estudios previos [99,141].

#### **1b. Modelo dinámico de biofilm *in vitro* por SASM y SARM en un sistema CDC Biofilm Reactor**

El modelo de CDC Biofilm Reactor fue descrito hace más de una década y se ha mostrado útil para el estudio de la eficacia de diversos antimicrobianos frente a biofilms *in vitro* [114,122,123]. Su aportación fundamental respecto a otros modelos *in vitro* es la introducción de una fase dinámica en la que los antibióticos se incorporan simulando la farmacocinética humana. El modelo fue descrito específicamente en referencia a los bacilos gram negativos y en especial a *Pseudomonas aeruginosa* [114], pero ha sido también aplicado a la infección por *S.aureus* por el grupo de Rybak et al. con buenos resultados [118,122,174]. Aunque el modelo está bien estandarizado, la utilización de las diferentes variables que entran en juego muestra cierta diversidad según los autores. En nuestros estudios quisimos evaluar la incidencia de cada una de ellas en el estadio de madurez final del biofilm y por tanto en su capacidad para poner en evidencia las diferencias de eficacia entre unas pautas antimicrobianas y otras.

La primera variable planteada fue la duración de la fase inicial estática, ya que si bien en algunos de los estudios de Goeres et al [114], se prolongó hasta 72 horas, la mayoría de autores la establecieron en 24 horas [118,121,123,175]. En esta fase el medio utilizado debe proporcionar los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda replicarse y adherirse a los cupones para formar el biofilm. Así se utilizó, TSB al 100% suplementado con glucosa, factor que incrementa la expresión del polisacárido de

## DISCUSIÓN

adhesión intracelular de *S.aureus* [149]. Nosotros obtuvimos mejores resultados utilizando la fase de 24 horas, con unos recuentos similares con la cepa SASM y la cepa SARM, de alrededor de  $10^6$  UFC/mL en los cupones y  $10^9$  UFC/mL en el medio. También valoramos la importancia del inóculo inicial en el resultado de la formación del biofilm en esta fase. Los inóculos de  $10^5$  UFC/mL, a menudo fueron insuficientes y con ellos las bacterias no fueron capaces de replicarse de forma exponencial, probablemente debido al gran volumen de medio utilizado. Así se seleccionó un inóculo de  $10^7$  UFC/mL como el más idóneo para producir sistemáticamente el biofilm.

En la fase posterior, una fase dinámica de 24 horas, se establece un recambio continuado del medio con el objetivo de favorecer por un lado la maduración del biofilm, pero simultáneamente aclarar en lo posible las bacterias presentes en el medio. La velocidad de recambio aconsejada se establece para lograr que el tiempo de residencia bacteriano en el reactor sea inferior al tiempo de replicación bacteriana. En nuestro caso, el tiempo de residencia se fijó en 30 minutos, menor que el tiempo de generación de nuestras cepas (50 minutos para SASM y 83 minutos para SARM), con lo que la velocidad establecida fue de 11.67mL/min, de acuerdo a lo reportado por otros [114,121], pero inferior a la referida por Rybak et al [118,122,174]. La mayoría de autores utilizan en esta fase un medio restrictivo para favorecer el protagonismo del biofilm de los cupones respecto a las bacterias del medio. No obstante, el grado de restricción referido en la literatura ha oscilado entre 0.3 y el 10% [114,121,175], y en los trabajos de Rybak incluso se prescindió de esta medida y siguió utilizándose un medio enriquecido [118,122,174]. Nosotros comprobamos un biofilm más estable y maduro empleando un medio restrictivo al 20% que al 10%: con el primero, la CMB de SASM en los cupones para cloxacilina fue de 32mg/L, mientras que con el segundo esta CMB era solo de 4mg/L. Así, al final de la fase global de acondicionamiento (fase estática + fase dinámica), en estas condiciones de fase estática inicial de 24 horas con medio enriquecido y utilizando un inóculo de  $10^7$ UFC/mL seguido de una fase dinámica de 24 horas con medio restrictivo al 20%, con velocidad de recambio de 11.67mL/min conseguimos un biofilm constatable en el microscopio electrónico, con recuentos cercanos a  $10^{6-7}$  UFC/mL en los cupones y recuentos en el medio de alrededor de  $10^{8-9}$  UFC/mL. Estos recuentos fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en el trabajo de

Rybak et al., realizado sin restricción del medio en la fase dinámica [118], pero nos permitieron iniciar los estudios terapéuticos con éxito y discernir la diferente eficacia de las diversas pautas antimicrobianas.

Utilizamos una prueba de eficacia antimicrobiana para confirmar la idoneidad del modelo en su capacidad de diferenciación de la eficacia antimicrobiana entre diversas pautas antibióticas. Nos valimos de cloxacilina, un antibiótico de referencia en su actividad frente a bacterias planctónicas, y de levofloxacino, con conocida actividad frente a bacterias en fase estacionaria. Los resultados de los recuentos obtenidos tras estos tratamientos confirmaron la hipótesis propuesta: cloxacilina no tenía actividad bactericida frente a biofilm y sí la tenía levofloxacino.

Globalmente, el modelo mostraba una buena reproducibilidad y capacidad de diferenciación de eficacia antimicrobiana, con una complejidad moderada. Su utilización se vio dificultada, ocasionalmente, por la aparición de microorganismos contaminantes, en relación a la manipulación requerida de grandes cantidades de medio de cultivo. Una vez estandarizado el modelo, empezamos la evaluación de la eficacia de los diferentes grupos terapéuticos a estudio.

## **2. Eficacia de daptomicina y sus combinaciones en el modelo animal por SASM**

### **2a. Eficacia de daptomicina-cloxacilina**

El tratamiento de elección en las infecciones de prótesis articulares causadas por SASM es cloxacilina en combinación con rifampicina durante las primeras semanas [29]. La actividad de cloxacilina frente a bacterias en fase planctónica está bien establecida, si bien exhibe una eficacia subóptima frente a inóculos elevados [176]. La adición precoz de rifampicina en este tipo de infecciones es requerida para proporcionar una buena actividad frente al biofilm bacteriano. No obstante, esta adición precoz puede comportar un efecto clínico negativo en situaciones de sepsis, reflejo del antagonismo observado de la combinación *in vitro* [73,74,177]. Además, en estas fases iniciales el elevado inóculo existente puede facilitar el desarrollo de resistencias a rifampicina.

## DISCUSIÓN

Daptomicina tiene actividad bactericida frente a bacterias en fase planctónica y estacionaria [82,83]. Su utilización en monoterapia en las infecciones por SARM mostró una tasa elevada de fracasos terapéuticos y la aparición frecuente de cepas resistentes; este fenómeno se observó incluso sin la exposición previa al antibiótico [178]. Por ello se asumió que su empleo en las infecciones graves por SARM debía realizarse a dosis elevadas (8-10mg/kg/día) y preferiblemente en combinación, con lo cual los resultados eran prometedores [179]. Una de las combinaciones que se ha mostrado más beneficiosa en estas infecciones por SARM es su asociación con betalactámicos, a pesar de la inactividad de estos antibióticos frente a este microorganismo cuando se administran en monoterapia. La combinación daptomicina-cloxacilina ha presentado buenos resultados en términos de eficacia en el contexto de bacteriemia y endocarditis [180,181], y también en términos de prevención de aparición de resistencias [96]. Su eficacia en un modelo de infección de cuerpo extraño por SARM fue moderada [97].

La experiencia sobre su actividad anti-SASM se limita a la endocarditis experimental, donde se mostró muy eficaz, inclusive más que nafcilina [182,183]. No obstante, también en los modelos experimentales de endocarditis por SASM se observó la aparición de cepas resistentes [183,184]. Por lo que sabemos, no existen referencias a la eficacia de daptomicina sola y en combinación con cloxacilina frente a la infección de cuerpo extraño causada por SASM. Se ha visto que la actividad de cloxacilina en monoterapia frente a infección de cuerpo extraño por SASM es moderada [61,141].

Con todos los datos mencionados, nuestra hipótesis fue que la combinación de cloxacilina con daptomicina podría proporcionar una gran eficacia en estas infecciones. Nuestros resultados muestran un efecto sinérgico y bactericida con inóculos estándar y con inóculos elevados *in vitro*. En el modelo experimental se confirmó la problemática de la aparición de resistencias a daptomicina cuando se utilizó en monoterapia a dosis elevadas y la escasa eficacia de cloxacilina. Sin embargo, la eficacia de la combinación fue tan notable como la de cloxacilina-rifampicina, considerada de referencia, y tuvo un perfil seguro de protección frente a la aparición de cepas resistentes. Observamos que la combinación cloxacilina-daptomicina aumentaba la actividad subóptima de cloxacilina, en el contexto de inóculos elevados y al mismo tiempo ofrecía una buena

actividad precoz anti-biofilm. Estos resultados sugieren que la combinación de cloxacilina con daptomicina podría utilizarse como alternativa terapéutica al tratamiento estándar cloxacilina-rifampicina en la fase precoz de las infecciones de prótesis causadas por SASM, cuando el inóculo es particularmente elevado y la administración de rifampicina desaconsejada.

Los resultados de nuestro estudio podrían ser cuestionados al estar basados en la experiencia con una única cepa de SASM. Sin embargo, la concordancia de estos hallazgos con los observados en nuestros anteriores estudios en la infección por SARM fortalece su fiabilidad.

## **2b. Eficacia de otras combinaciones de daptomicina**

Levofloxacino a altas dosis de 750mg/día en combinación con rifampicina es actualmente la terapia considerada de referencia en el tratamiento de infección de prótesis aguda por SASM y manejada con DAIR o con recambio en un tiempo [29,30]. Los beneficios de una administración precoz de rifampicina están bien documentados, y las fluoroquinolonas tienen una alta eficacia sinérgica y protegen frente a la aparición de cepas resistentes [59,62,66]. Sin embargo, a pesar del manejo terapéutico óptimo, ocurren fallos clínicos y microbiológicos, especialmente cuando se intenta retener el implante [30,66]. Además, cuando estos antibióticos no pueden utilizarse debido a intolerancia o alergia, no existen alternativas adecuadamente evaluadas [185].

Como se ha comentado en el apartado anterior, el posible empleo de daptomicina a altas dosis en combinación en las infecciones de difícil tratamiento se ha considerado dada su actividad frente a bacterias del biofilm. Sin embargo, su eficacia se ha estudiado principalmente frente a SARM. Este es el caso de la combinación daptomicina-rifampicina, la cual ha sido propuesta como uno de los tratamientos anti-SARM más eficaces para las infecciones de prótesis articulares en base a los resultados en modelos experimentales [63,98,99]. La experiencia clínica ha confirmado parcialmente estos resultados [101]. La hipótesis de que la eficacia mostrada por esta combinación en la infección por SARM puede trasladarse a la infección por SASM tiene

## DISCUSIÓN

todo el sentido, pero no ha sido contrastada previamente ni en estudios experimentales ni en la práctica clínica. Los resultados del presente estudio muestran que la combinación de daptomicina (a dosis elevadas) con rifampicina fue más eficaz que el tratamiento con levofloxacino-rifampicina, considerado de referencia en la infección de cuerpo extraño por SASM. Estos resultados, que podrían considerarse en cierto modo llamativos, se alinean con los resultados observados por John et al. en un modelo experimental por SARM, en el que la eficacia de daptomicina, utilizada a dosis bajas, equivalentes a 6mg/kg, en combinación con rifampicina fue similar a la de levofloxacino-rifampicina [98]. Las dosis más elevadas utilizadas en nuestro estudio podrían explicar la mayor eficacia observada en el mismo. La confirmación de estos resultados en posteriores estudios podría hacer reconsiderar el tratamiento de elección de la infección de prótesis articular en las primeras semanas de enfermedad.

También fue relevante la eficacia mostrada por la combinación de daptomicina-levofloxacino que resultó similar a la de la combinación levofloxacino-rifampicina de referencia. No hemos podido contrastar la eficacia de esta pauta con ninguna experiencia previa reportada en la literatura. Si este hallazgo se confirmara en posteriores estudios, esta pauta de daptomicina-levofloxacino podría plantearse como una alternativa terapéutica de elección cuando no puede administrarse rifampicina.

La fortaleza de estos resultados se ve cuestionada al estar basados en una única experiencia con una cepa de SASM, si bien la parte coincidente con los hallazgos ya observados previamente en nuestros estudios con la infección de SARM refuerzan su valor.

### **3. Eficacia anti-biofilm de claritromicina en el modelo animal por SASM y SARM**

En demanda a las dificultades en el tratamiento de infecciones de prótesis por *S.aureus* que se han comentado anteriormente, se están investigando otras modalidades de terapia contra los biofilms bacterianos. Entre estas opciones, se han evaluado los efectos inmunomoduladores de los macrólidos (azitromicina, claritromicina), para los que se ha postulado un efecto anti-biofilm más allá de su

actividad antibacteriana, principalmente contra bacilos gram-negativos [186,187] y en concreto su actividad beneficiosa frente a la formación de biofilm por *P.aeruginosa*. Sin embargo, poco se sabe respecto a esta actividad frente a los biofilms estafilocócicos y la información existente es en cierto modo contradictoria. Se ha descrito su capacidad para inhibir la síntesis de polisacáridos [188] y su interacción con el glicocálix de *S.aureus* [189]. No obstante, los resultados disponibles son poco homogéneos, basados en una gran diversidad de materiales y procedimientos.

Las primeras aportaciones en este ámbito sugirieron que la actividad de claritromicina frente al biofilm era dosis-dependiente y se basaba en el grado de interacción con las hexosas en el glicocalix estafilocócico [190]. Sano et al. mostraron resultados similares, observando una reducción en los recuentos bacterianos de un biofilm de SARM cuando utilizaban altas concentraciones de claritromicina (184mg/L) [189]. Hasta cierto punto, estos resultados iniciales fueron confirmados por otros estudios realizados por el grupo de Fujimura [191–193]. Estos autores estudiaron la eficacia de claritromicina en combinación con otros antibióticos frente a biofilm de *S.aureus* tanto *in vitro* como *in vivo* producidos en dispositivos de titanio, pero reportaron un efecto notable con concentraciones tan bajas como 1mg/L. Si bien todos estos trabajos coinciden en destacar un cierto efecto anti-biofilm de claritromicina, plantean una gran discrepancia sobre las concentraciones de claritromicina necesarias para producirlo y por tanto la duda de hasta que punto este efecto pueda ser significativo a concentraciones alcanzables clínicamente. Por otra parte, el grupo de Rybak et al. observó resultados contradictorios en dos estudios sucesivos, utilizando el mismo modelo de reactor *in vitro*, que empleamos en el presente proyecto de tesis doctoral, para un biofilm estafilocócico. En el primero mostraron que claritromicina mejoraba el efecto anti-bacteriano *in vitro* de daptomicina frente a una cepa de SARM [118]. Posteriormente, al evaluar la eficacia de esta combinación frente a dos cepas de SARM y una cepa de *Staphylococcus coagulasa* negativa, con diferentes tipos de materiales, no observaron ninguna mejora de la actividad de daptomicina tras la adición de claritromicina [122].



## DISCUSIÓN

En nuestros estudios utilizamos 4 cepas de *S.aureus* (dos SARM y dos SASM) resistentes a macrólidos para poder evaluar el posible efecto anti-biofilm. Con todo, observamos un cierto efecto microbiológico aditivo en los resultados de las curvas de letalidad *in vitro* en fase logarítmica y en fase estacionaria frente a una cepa de SARM al añadir claritromicina a daptomicina. Este efecto, no evidenciado en el caso de las otras cepas de estudio, ya había sido destacado por Berti et al. con una cepa de SARM, con la que la adición de claritromicina a  $\frac{1}{2}$  xCMI condujo a la esterilización del cultivo [96].

En la evaluación específica de la actividad anti-biofilm *in vitro* de claritromicina nosotros constatamos un efecto más bien discreto, capaz de prevenir la formación de biofilm sólo a altas concentraciones, no alcanzables en suero humano ( $\geq 64$  y  $\geq 32$  mg/L para las cepas de SARM and SASM, respectivamente). Por otra parte, no detectamos ninguna actividad relevante frente un biofilm bien establecido de 24 horas.

Nuestros resultados del modelo de infección de cuerpo extraño animal confirmaron nuestras experiencias anteriores de eficacia de daptomicina y daptomicina-rifampicina. Al margen de ello, la adición de claritromicina a daptomicina mostró algunos efectos *in vivo*. Mientras que en términos de eficacia daptomicina y daptomicina-claritromicina fueron similares, la combinación protegió frente a la aparición de cepas resistentes a daptomicina durante todos los experimentos en la infección por SARM y parcialmente en la infección por SASM. Por contra, claritromicina no mejoró la alta eficacia alcanzada por la combinación daptomicina-rifampicina, ni ofreció más protección frente a la aparición de cepas resistentes. Resulta difícil establecer si este discreto efecto aditivo detectado en el modelo *in vivo* podría traducir un auténtico efecto anti-biofilm de claritromicina o simplemente reflejar el discreto efecto antibacteriano que ya observamos en los estudios *in vitro* de las curvas de letalidad.

Las diferencias apreciadas en el comportamiento de las cepas de SASM y SARM en lo que se refiere al efecto protector de claritromicina sobre el desarrollo de cepas resistentes a daptomicina, podrían tener relación con los resultados de la cinética de crecimiento de dichas cepas. El tiempo menor de generación en las cepas de SASM

podría condicionar un mayor riesgo relativo de desarrollar resistencias y por ende, una menor eficacia del tratamiento.

El discreto efecto aditivo de claritromicina a nuestro estudio *in vivo* estuvo acorde con nuestros resultados *in vitro* y globalmente nuestras observaciones no sugieren un papel clínico relevante de los macrólidos por su efecto anti-biofilm en el tratamiento de la infección de prótesis articular por *S.aureus*.

#### **4. Alternativas terapéuticas orales a la pauta clásica de rifampicina- levofloxacino o rifampicina-linezolid en la infección por SASM y por SARM**

##### **4a. Eficacia de cotrimoxazol y ácido fusídico en monoterapia en el modelo animal**

Tanto cotrimoxazol como ácido fusídico son antibióticos anti-estafilocócicos disponibles hace muchos años y actualmente todavía en uso. Sin embargo, muchos de los estudios microbiológicos y farmacocinéticos, habituales en los antibióticos de más reciente aparición, no se realizaron en su momento cuando salieron al mercado ni tampoco posteriormente. Por ello, propusimos realizar estudios sobre su actividad en el modelo animal de cuerpo extraño.

##### **Cotrimoxazol:**

Cotrimoxazol se ha considerado una posible alternativa para el tratamiento de las infecciones causadas por *S.aureus* debido a la susceptibilidad de la mayoría de cepas estafilocócicas a este fármaco y la acción sinérgica y bactericida que proporcionan sus dos componentes, el trimetoprim y el sulfametoxazol [167,168]. Sin embargo, el tratamiento con cotrimoxazol ha presentado tasas de fallos similares a las reportadas previamente con sulfamidas [169]. En el tratamiento de bacteriemia y endocarditis estafilocócica, se ha demostrado que la pauta terapéutica con cotrimoxazol tiene una menor eficacia que vancomicina, y que los beta-lactámicos son más efectivos que vancomicina [75,194,195]. En contraste, algunos trabajos en el campo de la osteomielitis evaluaron la actividad de cotrimoxazol solo y en combinación con rifampicina, manejado

## DISCUSIÓN

conjuntamente con un desbridamiento quirúrgico, y presentaron una alta eficacia clínica [196,197].

En nuestro modelo animal observamos que TMP-SMZ no tuvo actividad. La presencia de considerables cantidades de timidina en el suero y orina murinos (163 a 166 y de 410 a 728ng/mL, respectivamente) podría haber interferido en la actividad *in vivo* de cotrimoxazol. Si bien en los humanos los niveles de timidina en el suero son bajos o inexistentes [198], éstos pueden ser claramente más elevados en algunos tejidos o situaciones clínicas particulares. En este sentido, la revisión de Proctor et al. sobre el uso de cotrimoxazol frente a SARM comunitario, enfatiza las altas tasas de fallo observadas en aquellas infecciones con altas cantidades de pus, tejido dañado y carga bacteriana, presumiblemente debido a la presencia de timidina [169]. En esta línea, en el reciente estudio de Zander et al. se detectó una media de 530 µg/L de timidina en el esputo de diez pacientes con fibrosis quística. Ellos demostraron que la actividad de cotrimoxazol, así como su sinergia con rifampicina, era inhibida con 2mg/L de timidina [199]. En otro estudio *in vitro*, Stokes et al. cuantificaron que la concentración requerida de timidina para inhibir la actividad de cotrimoxazol era tan baja como 0.05mg/L [200].

Con estas consideraciones, la hipotética eficacia de cotrimoxazol depende del balance entre la droga y los niveles de timidina encontrados en el lugar de infección. Además, su particular farmacocinética trabaja en contra de su cuestionada eficacia en las infecciones donde hay presencia de biofilm, como las infecciones osteoarticulares relacionadas con implantes. Mientras que la actividad sinérgica de trimetoprim y sulfametoxazol está basada en alcanzar una proporción de 1:20 respectivamente, normalmente encontrada en el suero y en fluidos intersticiales en los humanos, ello no parece ser el caso de las concentraciones óseas y por tanto, el escenario final en las infecciones osteoarticulares puede ser distinto [201]. Nuestros resultados de la ineficacia de cotrimoxazol en el modelo animal confirman estudios experimentales previos [202–204], y están en concordancia con los fallos clínicos descritos tras su administración en infecciones purulentas [169]. La imposibilidad de incrementar la dosis de TMP-SMZ o utilizar un tratamiento más prolongado debido principalmente a la intolerancia de los animales no nos permitió proseguir con nuestros experimentos *in*

*vivo*. Sin embargo, nuestra experiencia previa con el modelo de cuerpo extraño, no nos lleva a suponer un incremento significativo de su actividad en otras condiciones [141,205].

Nuestros resultados cuestionan el uso de cotrimoxazol en infecciones con un componente supurativo importante, debido a la presumible inhibición de su actividad por parte de la timidina.

### Ácido fusídico:

Este antibiótico anti-estafilocócico no ha llegado a ser comercializado en nuestro país, pero ha sido utilizado, con cierta frecuencia, en los países anglosajones desde hace más de 40 años en el contexto de las infecciones de prótesis articular. Se presentan diversas vías de administración: oral, intravenosa y tópica, en diversas formulaciones y su farmacocinética se caracteriza por encontrar altas concentraciones del fármaco en suero, hueso y líquido sinovial y presentar una alta penetración y acumulación celular. Sin embargo, los niveles del antibiótico son muy variables entre pacientes y se observa una cierta acumulación en el transcurso del tratamiento [161]. Se considera principalmente bacteriostático, aunque puede llegar a tener actividad bactericida a altas concentraciones y es activo frente a SARM [206]. Los estudios realizados demuestran que afecta a la patogenicidad de *S.aureus* e interacciona con las defensas del huésped [207]. Debido a la aparición de resistencias y a la existencia de subpoblaciones de *S.aureus* con CMIs aumentadas [208,209], se utiliza en combinación con otro agente antimicrobiano. Los estudios realizados en la clínica han demostrado que su combinación con rifampicina podría ser una opción como alternativa terapéutica en las infecciones de prótesis estafilocócicas manejadas con DAIR [68,69]. Es por ello, que nos propusimos estudiar su eficacia frente a la infección de cuerpo extraño por *S.aureus*.

En nuestros estudios *in vitro* su comportamiento en solitario fue bacteriostático frente a todas las cepas estudiadas y se confirmó la aparición sistemática de cepas resistentes. Su adición a daptomicina mostró un efecto concentración dependiente, su combinación a bajas concentraciones mejoraba la actividad de daptomicina, llegando a

## DISCUSIÓN

ser bactericida con SARM y SASM en fase replicativa y con la cepa SARM en fase estacionaria. Su combinación con rifampicina mejoró ligeramente su actividad en fase exponencial y fue indiferente en fase estacionaria. Lo más relevante fue que las combinaciones protegieron frente a la aparición de resistencias total o parcialmente. Estos resultados se consideraron de cierto interés, dada la escasa información disponible sobre estas combinaciones en la literatura.

Nuestros estudios en el modelo *in vivo* se vieron determinados por las dificultades encontradas para disponer de la formulación idónea del antibiótico para ser utilizado en los animales y la imposibilidad de realizar los estudios de farmacocinética necesarios. La literatura disponible sobre estudios de farmacocinética de ácido fusídico en la rata es escasa y algunos de ellos han apuntado la dificultad para ser llevados a cabo en roedores [162]. En los dos trabajos realizados por Findon y Rowe en la rata se utilizó la forma de dietanolamina fusidato, que a dosis de 200mg/kg por vía subcutánea obtenía unos niveles máximos equivalentes a los humanos [163,164]. Nosotros no pudimos disponer de esta formulación de manera continuada y todos los experimentos con otras formulaciones toparon con la intolerancia de los animales a las dosis requeridas para alcanzar niveles adecuados del antibiótico. Finalmente, tuvimos que suspender estos estudios *in vivo*.

### **4b. Eficacia de cotrimoxazol y su combinación con rifampicina en el modelo de biofilm *in vitro* CDC Biofilm Reactor**

Como ya ha sido repetido a lo largo de la presente memoria de tesis, la combinación de rifampicina con fluoroquinolonas se considera el tratamiento de elección en las infecciones de prótesis articulares causadas por SASM [13,210]. También se ha comentado previamente que las alternativas terapéuticas, cuando no pueden administrarse las fluoroquinolonas, no están bien establecidas. Las combinaciones con rifampicina de cotrimoxazol y linezolid son con frecuencia utilizadas en su formulación oral de forma prolongada en estas circunstancias, pero no se ha evaluado con rigurosidad su eficacia comparativa. Nuestro grupo y otros observamos globalmente una buena eficacia, utilizando cotrimoxazol combinado con rifampicina en la

osteomielitis crónica estafilocócica [197,211] y en un estudio, Nguyen et al sugirieron que la eficacia de un tratamiento oral prolongado con cotrimoxazol-rifampicina era similar a la de linezolid-rifampicina en pacientes con infecciones osteoarticulares producidas por cocos gram positivos resistentes, incluyendo pacientes con infecciones de prótesis [212].

En nuestros estudios realizados *in vitro* utilizando el sistema CDC Biofilm Reactor para una cepa de SASM, levofloxacino-rifampicina resultó ser el tratamiento más efectivo de forma muy significativa, presentando descensos bacterianos mucho mayores que las otras pautas estudiadas en el medio de cultivo e incluso erradicando el biofilm en algunos cupones. Estas observaciones concuerdan con los trabajos realizados anteriormente, en los que altas dosis de levofloxacino en combinación con rifampicina presentaban una gran eficacia [141,213–215].

Respecto a los resultados comparativos de las pautas rifampicina-linezolid y rifampicina-cotrimoxazol tanto con la cepa de SASM como con la SARM, debe resaltarse como muy relevante, que cotrimoxazol no fue capaz de proteger frente a la aparición de resistencias a rifampicina, como sí lo hizo linezolid. El desarrollo de cepas resistentes a rifampicina se observó de forma sistemática en las diferentes muestras estudiadas bajo tratamiento con rifampicina-cotrimoxazol, si bien el fenómeno fue más intenso y precoz en la infección por SARM. En esta infección el predominio de cepas resistentes a rifampicina ya a las 8 horas del experimento condicionó una eficacia prácticamente nula de esta pauta antibiótica al final del mismo. En el caso de la infección por SASM este desarrollo fue algo más tardío y condicionó menos la eficacia observada al final del experimento. Sin embargo, con toda probabilidad, el resultado final de ineficacia hubiera sido similar al de SARM, al tomar relevancia progresiva las cepas resistentes a rifampicina, si se hubiera prolongado el tiempo de duración del experimento.

Los resultados obtenidos con linezolid-rifampicina pueden considerarse acordes con los resultados obtenidos en trabajos experimentales previos[205] y la experiencia clínica acumulada en el tratamiento de la infección de prótesis articular [216,217].

## DISCUSIÓN

Respecto a los resultados observados con cotrimoxazol-rifampicina debemos hacer algunas consideraciones. Por una parte, nuestra experiencia en el tratamientos de la osteomielitis crónica focalizó el riesgo de fallo terapéutico en la presencia de cuerpo extraño [211]. También, en referencia a las infecciones de prótesis articular, Stein et al encontraron fallos alrededor del 40% en pacientes tratados con cotrimoxazol a altas dosis, en algunos casos con aparición de cepas resistentes [218]. Este modelo de biofilm *in vitro* se ha mostrado válido para evaluar esta problemática, simulando la farmacocinética/farmacodinámica de los diferentes antibióticos. Nosotros confirmamos en la farmacocinética del modelo unos niveles de cotrimoxazol equivalentes a los esperados en la terapéutica humana. Estos niveles podrían no proporcionar la actividad suficiente para evitar el desarrollo de resistencias a rifampicina en unas condiciones de particular exigencia como se dan en el modelo y en la situación clínica de presencia de cuerpo extraño. La información clínica sobre este fenómeno de falta de protección es escasa, pero una circunstancia similar fue descrita también en un estudio de descolonización nasal por SARM en pacientes bajo tratamiento con cotrimoxazol-rifampicina en los que se constató la aparición de cepas resistentes a rifampicina con cierta frecuencia [219].

Debe resaltarse que nuestro modelo no contempla la problemática adicional de las interacciones farmacocinéticas de la rifampicina. En los últimos años se ha incidido en la posible importancia de las interacciones de rifampicina con otros antibióticos, particularmente en las combinaciones de antibióticos orales para el tratamiento de infecciones de implantes ortopédicos. Mientras que los niveles de levofloxacino se mantienen inalterados en presencia de rifampicina [220], este fármaco disminuye los niveles de trimetoprim y sulfametoxazol [152] y los de linezolid, clindamicina y ácido fusídico [221–223] alrededor de un 30%. En el caso de cotrimoxazol debe tenerse en cuenta su particular farmacocinética, que requiere de la adecuada proporción de sus dos componentes, el trimetoprim y el sulfametoxazol, y de que su actividad depende en gran medida de los niveles de TMP-SMZ alcanzados en el lugar de la infección y su posible inhibición por la timidina como se reseñó en el apartado anterior de la presente memoria[71]. Las consecuencias clínicas de todas estas interacciones farmacocinéticas

no están bien definidas, pero podrían tener especial relevancia para aquellos antibióticos que tienen niveles más erráticos, como cotrimoxazol y ácido fusídico.

Globalmente, los resultados de nuestro modelo refuerzan el concepto de la eficacia superior de la combinación de levofloxacino-rifampicina y ponen un punto de alerta importante sobre el riesgo de desarrollo de resistencias a rifampicina al utilizar la combinación cotrimoxazol-rifampicina en este tipo de infecciones. A esto debe añadirse las consideraciones planteadas en el apartado anterior al respecto de su farmacocinética y el efecto inhibitorio de la timidina.

Todo ello aconseja en el caso específico de las infecciones osteoarticulares relacionadas con implantes y manejadas con DAIR, evitar la administración de la combinación de rifampicina con cotrimoxazol durante la fase aguda y en todo caso reservarla como una terapia alternativa en una fase posterior, cuando la infección está bajo un cierto control.





## **CONCLUSIONES**



## VII. CONCLUSIONES

1. Respecto a la estandarización de modelos de infección experimental de cuerpo extraño
  - 1a. Modelo de infección de evolución aguda de exigencia variable por SASM en la rata.
    - 1a.1 El modelo es reproducible y proporciona las características de una infección de cuerpo extraño: formación de biofilm, persistencia de la infección en el tiempo y tolerancia bacteriana a los antibióticos.
    - 1a.2 El modelo emula razonablemente la infección aguda de prótesis articular y permite el estudio de la eficacia comparativa de las pautas antimicrobianas con diferentes grados de actividad
  - 1b. Modelo dinámico de biofilm *in vitro* por SASM y SARM en un sistema CDC Biofilm Reactor
    - 1b.1 El modelo es reproducible y adecuado para el estudio *in vitro* de las infecciones por *S.aureus* asociadas a biofilm
    - 1b.2 En las condiciones de una fase estática inicial de 24 horas con un medio enriquecido y un inóculo de  $10^7$ UFC/mL, una fase dinámica posterior de 24 horas con medio restrictivo al 20% y velocidad de recambio de 11.67mL/min se produjo un biofilm con recuentos de  $10^7$ UFC/mL, capaz de discernir la diferente eficacia antimicrobiana de las diversas pautas antibióticas.
2. Respecto a la eficacia de daptomicina y sus combinaciones en el modelo animal por SASM
  - 2a. Eficacia de daptomicina-cloxacilina

## CONCLUSIONES

2a.1 Las monoterapias con cloxacilina y daptomicina mostraron una eficacia discreta y aparecieron cepas resistentes a daptomicina.

2a.2 La combinación daptomicina con cloxacilina se mostró sinérgica, protegió frente a la aparición de cepas resistentes a daptomicina y tuvo una eficacia similar a la de cloxacilina-rifampicina.

2a.3 Daptomicina-cloxacilina debería considerarse como alternativa terapéutica anti-SASM para las infecciones de cuerpo extraño, especialmente en las fases iniciales del tratamiento.

### 2b. Eficacia de otras combinaciones de daptomicina

2b.1 La combinación daptomicina-rifampicina protegió del desarrollo de cepas resistentes a daptomicina y mostró una eficacia significativamente mayor que la de la pauta de referencia levofloxacino-rifampicina.

2b.2 La combinación daptomicina-rifampicina podría ser una alternativa de elección en las primeras semanas de tratamiento cuando no puede utilizarse levofloxacino

2b.3 La combinación daptomicina-levofloxacino protegió del desarrollo de cepas resistentes a daptomicina y mostró una eficacia similar a la de la pauta de referencia levofloxacino-rifampicina

2b.4 La combinación daptomicina-levofloxacino podría ser una alternativa terapéutica inicial de primera elección cuando no puede utilizarse rifampicina.

### 3. Respecto a la eficacia anti-biofilm de claritromicina en el modelo animal por SASM y SARM

3a. Claritromicina mostró un efecto anti-biofilm *in vitro* únicamente discreto, interfiriendo la formación de biofilm solo a concentraciones elevadas, no alcanzables clínicamente, sin ninguna acción frente al biofilm ya maduro.

- 3b. La adición de claritromicina a daptomicina en el modelo *in vivo* no incrementó su eficacia antimicrobiana, pero protegió del desarrollo de cepas resistentes a daptomicina frente a SARM. Este efecto se relacionó probablemente con un cierto efecto microbiológico observado *in vitro*, más bien que con un efecto propiamente anti-biofilm.
- 3c. Los resultados observados no sugieren un papel clínico significativo para claritromicina en el tratamiento de las infecciones de cuerpo extraño y en concreto de prótesis articular por *S.aureus*, en base a su efecto anti-biofilm
- 4. Respecto a las alternativas terapéuticas orales a la pauta clásica de rifampicina-levofloxacino o rifampicina-linezolid en la infección por SASM y por SARM.
  - 4a. Eficacia de cotrimoxazol y ácido fusídico en monoterapia en el modelo animal
    - 4a.1 La presencia de timidina aumentó la CMI de la cepa de SASM (ATCC 29213) para cotrimoxazol 4-8 veces y determinó con toda probabilidad la falta de eficacia de este antibiótico en el modelo *in vivo*
    - 4a.2 El ácido fusídico en solitario mostró solo una actividad *in vitro* bacteriostática frente a las cepas de SARM y SASM y se acompañó del desarrollo de cepas resistentes. Sin embargo, su combinación con daptomicina o rifampicina comportó un efecto sinérgico o indiferente y protegió de la aparición de cepas resistentes total o parcialmente.
    - 4a.3 No se pudieron realizar los estudios previstos en el modelo *in vivo* con ácido fusídico por la falta de tolerancia de los animales a las dosis requeridas para su tratamiento.
  - 4b. Eficacia de cotrimoxazol y su combinación con rifampicina en el modelo de biofilm *in vitro* CDC Biofilm Reactor

## CONCLUSIONES

4b.1 Frente a SASM, levofloxacino-rifampicina se mostró como una pauta superior a las otras estudiadas, llegando a erradicar el biofilm en los cupones.

4b.2 La combinación de linezolid-rifampicina mostró una eficacia moderada tanto en la infección por SASM como por SARM y protegió de la aparición de cepas resistentes a rifampicina.

4b.3 La eficacia de cotrimoxazol-rifampicina se vió totalmente condicionada por la aparición precoz y sistemática de cepas resistentes a rifampicina tanto en la infección por SASM como por SARM.

4b.4 En este modelo exigente de infección de cuerpo extraño cotrimoxazol no fue capaz de evitar el desarrollo sistemático de cepas resistentes a rifampicina, fenómeno de especial intensidad en la infección por SARM.

4b.5 Estos resultados juntamente con los reflejados en el objetivo 4a.1 sobre el efecto inhibitorio de la timidina, ponen en cuestión el uso de la combinación rifampicina-cotrimoxazol en la fase aguda supurativa de las infecciones de prótesis articular, que debería reservarse en todo caso como una terapia alternativa secuencial, cuando la infección está bajo control.







## **BIBLIOGRAFÍA**



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, Becker K. Infections Associated with Medical Devices Pathogenesis, Management and Prophylaxis. *Drugs* 2005;65:179–214.
- [2] Herrmann M, Lew DP. Foreign Body Infections: From Intravenous Catheters to Hip Prosthesis, Springer, Berlin, Heidelberg; 1990, p. 53–9.
- [3] Marenco JL, Corzo J. [Infection in Joint Prosthesis. When Should it Be Suspected?]. *Reumatol Clin* 2008;4 Suppl 2:7–12.
- [4] Jover Sáenz A, Barcenilla Gaité F, Torres Puig Gros J, Mas Atance J, Garrido Calvo S, Porcel Pérez JM. Infección de prótesis total de rodilla y cadera. Epidemiología descriptiva, terapéutica y evolución en un hospital de segundo nivel durante 10 años. *An Med Interna* 2007;24:19–23.
- [5] Azanza JR. [What is the cost of a prosthesis infection?]. *Enfermedades Infecc Y Microbiol Clínica* 2001;19:44–5.
- [6] Jose L. Del Pozo and Robin Patel. Infection Associated with Prosthetic Joints — *NEJM*. *N Engl J Med* 2009;361; 787-794.
- [7] Ariza J, Euba G, Murillo O. [Orthopedic device-related infections]. *Enfermedades Infecc Y Microbiol Clínica* 2008;26:380–90.
- [8] Cataldo MA, Petrosillo N, Cipriani M, Cauda R, Tacconelli E. Prosthetic joint infection: recent developments in diagnosis and management. *J Infect* 2010;61:443–8.
- [9] Zimmerli W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:1045–63.
- [10] Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78:512–23.
- [11] Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:1434–45.
- [12] Zimmerli W, Ochsner PE. Management of Infection Associated with Prosthetic Joints. *Infection* 2003;31:99–108.
- [13] Ariza J, Cobo J, Baraia-Etxaburu J, de Benito N, Bori G, Cabo J, et al. Executive

- summary of management of prosthetic joint infections. Clinical practice guidelines by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017;35:189–95.
- [14] Tande AJ, Patel R. Prosthetic Joint Infection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:302–45.
- [15] Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623–33.
- [16] Vila J, Soriano A MJ. [Molecular basis of microbial adherence to prosthetic materials. Role of biofilms in prosthesis-associated infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26: 48-54: quiz 55.
- [17] Getzlaf MA, Lewallen EA, Kremers HM, Jones DL, Bonin CA, Dudakovic A, et al. Multi-disciplinary antimicrobial strategies for improving orthopaedic implants to prevent prosthetic joint infections in hip and knee. *J Orthop Res* 2016;34:177–86.
- [18] Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2006;254:1–11.
- [19] Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop* 2015;86:147–58.
- [20] Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11:217-21-9.
- [21] Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2014;69 Suppl 1:i37-40.
- [22] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:322–32.
- [23] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–8.
- [24] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:114–22.
- [25] Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:199–210.
- [26] Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: Update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 2005;135:243–51.
- [27] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- [28] Rodríguez-Martínez JM, Pascual A. [Activity of antimicrobial agents on bacterial

- biofilms]. *Enfermedades Infecc Y Microbiol Clínica* 2008;26:107–14.
- [29] Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56:e1–25.
- [30] Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351:1645–54.
- [31] Benito N, Franco M, Ribera A, Soriano A, Rodríguez-Pardo D, Sorlí L, et al. Time trends in the aetiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:732.E1-8.
- [32] Pahissa Berga A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Marge Médica Books. 2009.
- [33] Lowy FD. infecciones estafilocócicas. *Infecc Estafilococicas; Harrison Principios Med Interna*; 18º Edición 2012:capítulo 135.
- [34] Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2:445–59.
- [35] Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5:751–62.
- [36] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:505–20.
- [37] Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 2001;9:605–10.
- [38] Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998;6:484–8.
- [39] Lin Y-C, Peterson ML. New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2010;3:753–67.
- [40] Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:295–305.

- [41] Neut D, van der Mei HC, Bulstra SK, Busscher HJ. The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthop* 2007;78:299–308.
- [42] Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:948–58.
- [43] Harraghy N, Hussain M, Hagggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, et al. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* 2003;149:2701–7.
- [44] Barberán J, Menéndez Martínez MA, del Valle Navarro MC. Infecciones por estafilococo. Clasificación. Factores predisponentes. Aspectos patogénicos de relevancia clínica o diagnóstica. Manifestaciones clínicas. Formas de comienzo. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado* 2010;10:3346–51.
- [45] Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1988;170:4365–72.
- [46] Giraudo AT, Raspanti CG, Calzolari A, Nagel R. Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can J Microbiol* 1994;40:677–81.
- [47] Ziebandt A-K, Becher D, Ohlsen K, Hacker J, Hecker M, Engelmann S. The influence of *agr* and  $\sigma^B$  in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* 2004;4:3034–47.
- [48] Tamber S, Cheung AL. SarZ Promotes the Expression of Virulence Factors and Represses Biofilm Formation by Modulating SarA and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2009;77:419–28.
- [49] Rogasch K, Rühmling V, Pané-Farré J, Höper D, Weinberg C, Fuchs S, et al. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 2006;188:7742–58.
- [50] Boles BR, Horswill AR. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000052.
- [51] Kong K-F, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 2006;296:133–9. doi:10.1016/j.ijmm.2006.01.042.
- [52] Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus*

- Limits Biofilm Formation. *Infect Immun* 2003;71:4206–11.
- [53] Touhami A, Jericho MH, Beveridge TJ. Atomic force microscopy of cell growth and division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004;186:3286–95.
- [54] Brock TD, Madigan MT. *Biology of microorganisms*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall; 1988.
- [55] Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* 2005;7–11.
- [56] Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990;162:96–102.
- [57] Wu H, Moser C, Wang H-Z, Høiby N, Song Z-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci* 2014;7:1–7.
- [58] Aboltins C, Daffy J, Choong P, Stanley P. Current concepts in the management of prosthetic joint infection. *Intern Med J* 2014;44:834–40.
- [59] Widmer AF, Gaechter A, Ochsner PE, Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. *Clin Infect Dis* 1992;14:1251–3.
- [60] Kadurugamuwa JL, Sin L V, Yu J, Francis KP, Purchio TF, Contag PR. Noninvasive optical imaging method to evaluate postantibiotic effects on biofilm infection in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2283–7.
- [61] Chuard C, Lucet JC, Rohner P, Herrmann M, Auckenthaler R, Waldvogel FA, et al. Resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis* 1991;163:1369–73.
- [62] Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *JAMA* 1998;279:1537–41.
- [63] Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Crémieux A-C. Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4589–93. doi:10.1128/AAC.00675-11.
- [64] Chuard C, Herrmann M, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Successful therapy of



- experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2611–6.
- [65] Jørgensen NP, Skovdal SM, Meyer RL, Dagnæs-Hansen F, Fuursted K, Petersen E. Rifampicin-containing combinations are superior to combinations of vancomycin, linezolid and daptomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm infection in vivo and in vitro. *Pathog Dis* 2016;74.
- [66] Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sánchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis* 2013;56:182–94.
- [67] Puhto A-P, Puhto T, Niinimäki T, Ohtonen P, Leppilahti J, Syrjälä H. Predictors of treatment outcome in prosthetic joint infections treated with prosthesis retention. *Int Orthop* 2015;39:1785–91.
- [68] Peel TN, Buising KL, Dowsey MM, Aboltins CA, Daffy JR, Stanley PA, et al. Outcome of debridement and retention in prosthetic joint infections by methicillin-resistant staphylococci, with special reference to rifampin and fusidic acid combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:350–5.
- [69] Aboltins CA, Page MA, Buising KL, Jenney AWJ, Daffy JR, Choong PFM, et al. Treatment of staphylococcal prosthetic joint infections with debridement, prosthesis retention and oral rifampicin and fusidic acid. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:586–91.
- [70] Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27:116–29.
- [71] Grayson ML, Crowe SM, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Norrby SR, et al. *Kucers' The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs.* sixth edit. 2011.
- [72] Cunha BA. Vancomycin Revisited: A Reappraisal of Clinical Use. *Crit Care Clin* 2008;24:393–420.
- [73] Van der Auwera P, Klastersky J, Thys JP, Meunier-Carpentier F, Legrand JC. Double-blind, placebo-controlled study of oxacillin combined with rifampin in the treatment of staphylococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother*

- 1985;28:467–72.
- [74] Watanakunakorn C, Tisone JC. Antagonism Between Nafcillin or Oxacillin and Rifampin Against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;22:920–2.
- [75] González C, Rubio M, Romero-Vivas J, González M, Picazo JJ. Bacteremic pneumonia due to *Staphylococcus aureus*: A comparison of disease caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible organisms. *Clin Infect Dis* 1999;29:1171–7.
- [76] Bradbury T, Fehring TK, Taunton M, Hanssen A, Azzam K, Parvizi J, et al. The fate of acute methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic knee infections treated by open debridement and retention of components. *J Arthroplasty* 2009;24:101–4.
- [77] Sakoulas G, Moellering RC, Eliopoulos GM. Adaptation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the face of vancomycin therapy. *Clin Infect Dis* 2006;42 Suppl 1:S40-50.
- [78] Williams I, Paul F, Lloyd D, Jepras R, Critchley I, Newman M, et al. Flow cytometry and other techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology* 1999;145:1325–33.
- [79] Reipert A, Ehlert K, Kast T, Bierbaum G. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:568–76.
- [80] Taylor SD, Palmer M. The action mechanism of daptomycin. *Bioorg Med Chem* 2016.
- [81] Rybak MJ, Segreti J, Diekema D, Pfaller M, Schmitz F, al. et, et al. The efficacy and safety of daptomycin: first in a new class of antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:24–32.
- [82] Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3505–7.
- [83] Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob*

- Chemother 2005;55:283–8.
- [84] Mascio CTM, Alder JD, Silverman JA. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4255–60.
- [85] Cervera C, Castañeda X, Pericas JM, del Río A, de la Maria CG, Mestres C, et al. Clinical utility of daptomycin in infective endocarditis caused by Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:365–70.
- [86] Malizos K, Sarma J, Seaton RA, Militz M, Menichetti F, Riccio G, et al. Daptomycin for the treatment of osteomyelitis and orthopaedic device infections: real-world clinical experience from a European registry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:111–8.
- [87] Gonzalez-Ruiz A, Seaton RA, Hamed K. Daptomycin: an evidence-based review of its role in the treatment of Gram-positive infections. *Infect Drug Resist* 2016;9:47–58.
- [88] Skiest DJ. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* 2006;44:655–6.
- [89] Gasch O, Camoez M, Domínguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, et al. Emergence of resistance to daptomycin in a cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistent bacteraemia treated with daptomycin. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:568–71.
- [90] Fowler VG, Boucher HW, Corey GR, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2006;355:653–65.
- [91] Byren I, Rege S, Campanaro E, Yankelev S, Anastasiou D, Kuropatkin G, et al. Randomized controlled trial of the safety and efficacy of daptomycin versus standard-of-care therapy for management of patients with osteomyelitis associated with prosthetic devices undergoing two-stage revision arthroplasty. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5626–32.
- [92] Murillo O, Garrigós C, Pachón ME, Euba G, Verdaguer R, Cabellos C, et al. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4252–7.

- [93] Moore CL, Osaki-Kiyan P, Haque NZ, Perri MB, Donabedian S, Zervos MJ. Daptomycin versus vancomycin for bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a high vancomycin minimum inhibitory concentration: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2012;54:51–8.
- [94] Mehta S, Singh C, Plata KB, Chanda PK, Paul A, Riosa S, et al. -Lactams Increase the Antibacterial Activity of Daptomycin against Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains and Prevent Selection of Daptomycin-Resistant Derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:6192–200.
- [95] Nadrah K, Strle F. Antibiotic Combinations with Daptomycin for Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *Chemother Res Pract* 2011;2011:619321.
- [96] Berti AD, Wergin JE, Girdaukas GG, Hetzel SJ, Sakoulas G, Rose WE. Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5046–53.
- [97] Garrigós C, Murillo O, Lora-Tamayo J, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, et al. Efficacy of daptomycin-cloxacillin combination in experimental foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3806–11.
- [98] John AK, Baldoni D, Haschke M, Rentsch K, Schaerli P, Zimmerli W, et al. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Importance of combination with rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2719–24.
- [99] Garrigós C, Murillo O, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, et al. Efficacy of usual and high doses of daptomycin in combination with rifampin versus alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5251–6.
- [100] Jugun K, Vaudaux P, Garbino J, Pagani L, Hoffmeyer P, Lew D, et al. The safety and efficacy of high-dose daptomycin combined with rifampicin for the treatment of Gram-positive osteoarticular infections. *Int Orthop* 2013;37:1375–80.
- [101] Lora-Tamayo J, Parra-Ruiz J, Rodríguez-Pardo D, Barberán J, Ribera A, Tornero E, et al. High doses of daptomycin (10 mg/kg/d) plus rifampin for the treatment of staphylococcal prosthetic joint infection managed with implant retention: a

- comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;80:66–71.
- [102] Rose WE, Berti AD, Hatch JB, Maki DG. Relationship of in vitro synergy and treatment outcome with daptomycin plus rifampin in patients with invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3450–2.
- [103] McBain AJ. Chapter 4 In Vitro Biofilm Models: An Overview. *Adv Appl Microbiol* 2009;69:99–132.
- [104] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996–1006.
- [105] Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771–6.
- [106] Heersink, J., Goeres D. The Biofilm Laboratory: Step-by-step Protocols for Experimental Design, Analysis, and Data Interpretation. In: Hamilton M, Heersink J, Buckingham-Meyer K, Goeres D, editors. *React. Des. considerations*. Cytergy Pu, 2003, p. 13–15.
- [107] Nava-Ortiz CAB, Burillo G, Concheiro A, Bucio E, Matthijs N, Nelis H, et al. Cyclodextrin-functionalized biomaterials loaded with miconazole prevent *Candida albicans* biofilm formation in vitro. *Acta Biomater* 2010;6:1398–404.
- [108] Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ. Use of the modified Robbins device to study the *in vitro* biofilm removal efficacy of NitrAdine™, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *J Appl Microbiol* 2008;105:733–40.
- [109] Leunisse C, van Weissenbruch R, Busscher HJ, van der Mei HC, Albers FW. The artificial throat: a new method for standardization of in vitro experiments with tracheo-oesophageal voice prostheses. *Acta Otolaryngol* 1999;119:604–8.
- [110] Schwandt LQ, van Weissenbruch R, van der Mei HC, Busscher HJ, Albers FWJ. Effect of dairy products on the lifetime of Provox2 voice prostheses in vitro and in vivo. *Head Neck* 2005;27:471–7.
- [111] Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm

- formation. *J Microbiol Methods* 2010;83:89–105.
- [112] Donlan R, Murga R, Carpenter J, Brown E, Besser R, Fields B. Monochloramine Disinfection of Biofilm-Associated *Legionella pneumophila* in a Potable Water Model System. In: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, Cianciotto N, Fields B, Frosch M, Hacker J LP, editor. *Legionella*. ASM Press, Washington, DC: 2002, p. 406–10.
- [113] Donlan RM, Priede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P, et al. Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4980–8.
- [114] Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* 2005;151:757–62.
- [115] Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods* 2005;63:287–95.
- [116] Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring ALS1 and ALS3 Gene Expression During In Vitro *Candida albicans* Biofilm Formation Under Continuous Flow Conditions. *Mycopathologia* 2009;167:9–17.
- [117] Hadi R, Vickery K, Deva A, Charlton T. Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. *J Hosp Infect* 2010;74:160–7.
- [118] Parra-Ruiz J, Vidailiac C, Rose WE, Rybak MJ. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4329–34.
- [119] Agostinho A, James G, Wazni O, Citron M, Wilkoff BD. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilms by a Novel Antibacterial Envelope for Use with Implantable Cardiac Devices. *Clin Transl Sci* 2009;2:193–8.
- [120] Gilmore BF, Hamill TM, Jones DS, Gorman SP. Validation of the CDC biofilm reactor as a dynamic model for assessment of encrustation formation on urological device materials. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2010;93:128-40.
- [121] Lora-Tamayo J, Murillo O, Bergen PJ, Nation RL, Poudyal A, Luo X, et al. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against

- multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2434–42.
- [122] Hall Snyder AD, Vidailiac C, Rose W, McRoberts JP, Rybak MJ. Evaluation of High-Dose Daptomycin Versus Vancomycin Alone or Combined with Clarithromycin or Rifampin Against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* in a Novel In Vitro PK/PD Model of Bacterial Biofilm. *Infect Dis Ther* 2014;4:51–65.
- [123] Williams DL, Bloebaum RD. Observing the Biofilm Matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 Grown Using the CDC Biofilm Reactor. *Microsc Microanal* 2010;16:143–52.
- [124] Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathog (Basel, Switzerland)* 2013;2:288–356.
- [125] Rumbaugh KP, Carty NL. In Vivo Models of Biofilm Infection. *Biofilm Infect.*, New York, NY: Springer New York; 2011, p. 267–90.
- [126] Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 1982;146:487–97.
- [127] Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Experimental foreign body infections in mice challenged with slime-producing *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1983;40:407–10.
- [128] Nickel JC, Grant SK, Costerton JW. Catheter-associated bacteriuria. An experimental study. *Urology* 1985;26:369–75.
- [129] Rodet A. Physiologie pathologique – étude expérimentale sur l’ostéomyélite infectieuse. *C R Acad Sci* 1885;99:569–571.
- [130] Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67:1236–44.
- [131] Sanzén L, Linder L. Infection adjacent to titanium and bone cement implants: an experimental study in rabbits. *Biomaterials* 1995;16:1273–7. doi:10.1016/0142-9612(95)98136-3.
- [132] Rupp ME, Fey PD. In vivo models to evaluate adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Enzymol* 2001;336:206–15.
- [133] Nair PNR, Brundin M, Sundqvist G, Sjögren U, Nair PNR, Schroeder HE, et al.

- Building biofilms in vital host tissues: a survival strategy of *Actinomyces radicans*. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2008;106:595–603.
- [134] John A-K, Schmalzer M, Khanna N, Landmann R. Reversible daptomycin tolerance of adherent staphylococci in an implant infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3510–6.
- [135] Voermans M, van Soest JM, van Duijkeren E, Ensink JM. Clinical efficacy of intravenous administration of marbofloxacin in a *Staphylococcus aureus* infection in tissue cages in ponies. *J Vet Pharmacol Ther* 2006;29:555–60.
- [136] Widmer AF, Wiestner A, Frei R, Zimmerli W. Killing of nongrowing and adherent *Escherichia coli* determines drug efficacy in device-related infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:741–6.
- [137] Francois P, Tu Quoc PH, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, et al. Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35:135–40.
- [138] Maiolo EM, Oliva A, Furustrand T, Tafin U, Perrotet N, Borens O, Trampuz A. Antifungal activity against planktonic and biofilm *Candida albicans* in an experimental model of foreign-body infection. *J Infect* 2016;72:386–92.
- [139] Lucet JC, Herrmann M, Rohner P, Auckenthaler R, Waldvogel FA, Lew DP. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2312–7.
- [140] Murillo O, Pachón ME, Euba G, Verdaguer R, Carreras M, Cabellos C, et al. Intracellular antimicrobial activity appearing as a relevant factor in antibiotic efficacy against an experimental foreign-body infection caused by *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:1062–6.
- [141] Murillo O, Doménech A, Garcia A, Tubau F, Cabellos C, Gudíol F, et al. Efficacy of high doses of levofloxacin in experimental foreign-body infection by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4011–7.
- [142] Murillo O, Pachón ME, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, et al. Antagonistic effect of rifampin on the efficacy of high-dose levofloxacin in



- staphylococcal experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3681–6.
- [143] Patel, JR., Cockerill, FR., Bradford, PA., Eliopoulos, GM., Hindler, JA., Jenkins, SG., Lewis, JS., Limbargo, B., Miller, LA., Nicolau, DP., Powell, M., Swenson, JM., Traczewski, MM., Turnidge, JD., Weinstein, MP., Zimmer B. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition M07-A10 2015;35.
- [144] Zimmerli W, Frei R, Widmer AF, Rajacic Z. Microbiological tests to predict treatment outcome in experimental device-related infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:959–67.
- [145] Balouri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016;6:71–9.
- [146] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline M26-A. vol. 19. 1999.
- [147] Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc* 2010;5:1236–54.
- [148] Bauer J, Siala W, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2726–37.
- [149] Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367–78.
- [150] Blaser J. In-vitro model for simultaneous simulation of the serum kinetics of two drugs with different half-lives. *J Antimicrob Chemother* 1985;15 Suppl A:125–30.
- [151] Chapin-Robertson K. Measurements of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. In: Williams & Williams Co, editor. *Antibiot. Lab. Med.* In:Lorian, New York, NY: 1991, p. 295–366.
- [152] Ribera E, Pou L, Fernandez-Sola A, Campos F, Lopez RM, Ocana I, et al. Rifampin Reduces Concentrations of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Serum in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3238–41.
- [153] Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for

- antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-10-2.
- [154] Trampuz A, Wenk M, Rajacic Z, Zimmerli W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1352–5.
- [155] Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA. Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *J Infect Dis* 1988;158:831–47.
- [156] Watson ID, Cohen HN, Stewart MJ, McIntosh SJ, Shenkin A, Thomson JA. Comparative pharmacokinetics of co-trifamole and co-trimoxazole to “steady state” in normal subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1982;14:437–43.
- [157] Varoquaux O, Lajoie D, Gobert C, Cordonnier P, Ducreuzet C, Pays M, et al. Pharmacokinetics of the trimethoprim-sulphamethoxazole combination in the elderly. *Br J Clin Pharmacol* 1985;20:575–81.
- [158] Vouloumanou EK, Karageorgopoulos DE, Rafailidis PI, Michalopoulos A, Falagas ME. Trimethoprim/sulfamethoxazole: evaluation of the available clinical and pharmacokinetic/pharmacodynamic evidence. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:197–216.
- [159] Lares-Asseff I, Pérez MG, Camacho GA, Toledo AR, del Carmen López M, Guillé AJ, et al. Effect of severe protein-calorie malnutrition on the penetration kinetics of trimethoprim and sulfamethoxazole to the deep tissues of Wistar rats. *J Pharm Pharmacol* 2003;55:469–77.
- [160] Wise R, Pippard M, Mitchard M. The disposition of sodium fusidate in man. *Br J Clin Pharmacol* 1977;4:615–9.
- [161] Turnidge J. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents* 1999;12 Suppl 2:S23-34.
- [162] Payne AJ, Neal LM, Knoll LJ. Fusidic acid is an effective treatment against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in vitro, but not in mice. *Parasitol Res* 2013;112:3859–63.
- [163] Findon G, Miller TE, Rowe LC. Pharmacokinetics of fusidic acid in laboratory animals. *Lab Anim Sci* 1991;41:462–5.
- [164] Rowe L, Findon G, Miller TE. An experimental evaluation of the pharmacokinetics

- of fusidic acid in peritoneal dialysis. *J Med Microbiol* 1992;36:71–7.
- [165] Fantin B, Leclercq R, Duval J, Carbon C. Fusidic acid alone or in combination with vancomycin for therapy of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2466–9.
- [166] Alder JD, Ewing PJ, Nilius AM, Mitten M, Tovcimak A, Oleksijew A, et al. Dynamics of clarithromycin and azithromycin efficacies against experimental *Haemophilus influenzae* pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2385–90.
- [167] Darrell JH, Garrod LP, Waterworth PM. Trimethoprim: laboratory and clinical studies. *J Clin Path* 1968;21:202–9.
- [168] Bushby SRM, Hitchings GH. TRIMETHOPRIM, A SULPHONAMIDE POTENTIATOR. *Br J Pharmac Chemother* 1968;33:72–90.
- [169] Proctor RA. Role of folate antagonists in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008;46:584–93.
- [170] Chang CC, Merritt K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. *J Orthop Res* 1994;12:526–31.
- [171] Rediske AM, Roeder BL, Brown MK, Nelson JL, Robison RL, Draper DO, et al. Ultrasonic enhancement of antibiotic action on *Escherichia coli* biofilms: an in vivo model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1211–4.
- [172] Sande MA, Zak O. *Handbook of Animal Models of Infection : Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy*. 1st ed. Academic Press; 1999.
- [173] Murillo O, Domenech A, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabo J, et al. Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *J Infect* 2008;57:229–35.
- [174] Barber KE, Smith JR, Ireland CE, Boles BR, Rose WE, Rybak MJ. Evaluation of Ceftaroline Alone and in Combination against Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Daptomycin and Vancomycin in an In Vitro Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4497–503.
- [175] Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *J Microbiol Methods* 2007;70:236–44.
- [176] LaPlante KL, Rybak MJ. Impact of High-Inoculum *Staphylococcus aureus* on the Activities of Nafcillin, Vancomycin, Linezolid, and Daptomycin, Alone and in

- Combination with Gentamicin, in an In Vitro Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4665–72.
- [177] Zak O, Scheld WM, Sande MA. Rifampin in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* in rabbits. *Rev Infect Dis* n.d.;5 Suppl 3:S481-90.
- [178] Mishra NN, Yang S-J, Chen L, Muller C, Saleh-Mghir A, Kuhn S, et al. Emergence of Daptomycin Resistance in Daptomycin-Naïve Rabbits with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infection Is Associated with Resistance to Host Defense Cationic Peptides and *mprF* Polymorphisms. *PLoS One* 2013;8:e71151.
- [179] Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin Infect Dis* 2011;52:e18-55.
- [180] Rand KH, Houck HJ. Synergy of daptomycin with oxacillin and other beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2871–5.
- [181] Dhand A, Bayer AS, Pogliano J, Yang S-J, Bolaris M, Nizet V, et al. Use of antistaphylococcal beta-lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clin Infect Dis* 2011;53:158–63.
- [182] Nannini EC, Singh K V, Arias CA, Murray BE. In vivo effect of cefazolin, daptomycin, and nafcillin in experimental endocarditis with a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain showing an inoculum effect against cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4276–81.
- [183] Sakoulas G, Rose W, Rybak MJ, Pillai S, Alder J, Moellering RC, et al. Evaluation of endocarditis caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* developing nonsusceptibility to daptomycin. *J Clin Microbiol* 2008;46:220–4.
- [184] Jacqueline C, Amador G, Batard E, Le Mabecque V, Miegerville A-F, Biek D, et al. Comparison of ceftaroline fosamil, daptomycin and tigecycline in an experimental rabbit endocarditis model caused by methicillin-susceptible, methicillin-resistant and glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:863–6.

- [185] Grosset J, Leventis S. Adverse effects of rifampin. *Rev Infect Dis* n.d.;5 Suppl 3:S440-50.
- [186] Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:21–8.
- [187] Cai Y, Chai D, Wang R, Bai N, Liang BB, Liu Y. Effectiveness and safety of macrolides in cystic fibrosis patients: A meta-analysis and systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:968–78.
- [188] Parra-Ruiz J, Vidailiac C, Rybak MJ. Macrolides and staphylococcal biofilms. *Rev Esp Quimioter* 2012;25:10–6.
- [189] Sano M, Hirose T, Nishimura M, Takahashi S, Matsukawa M, Tsukamoto T. Inhibitory action of clarithromycin on glycocalyx produced by MRSA. *J Infect Chemother* 1999;5:10–5.
- [190] Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Yokota T. Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:138–41.
- [191] Fujimura S, Sato T, Mikami T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:481–4.
- [192] Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Zaini J, Gomi K, Watanabe A. Efficacy of clarithromycin plus vancomycin in mice with implant-related infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Sci* 2009;14:658–61.
- [193] Fujimura S, Sato T, Hayakawa S, Kawamura M, Furukawa E, Watanabe A. Antimicrobial efficacy of combined clarithromycin plus daptomycin against biofilms-formed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on titanium medical devices. *J Infect Chemother* 2015.
- [194] Markowitz N, Quinn EL, Saravolatz LD. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infection. *Ann Intern Med* 1992;117:390–8.
- [195] Eguia JM, Chambers HF. Methicillin-Resistant Staphylococci and Their Treatment in the Intensive Care Unit. *Semin Respir Crit Care Med* 2003;24:037–48.

- [196] Yeldandi V, Strodtman R, Lentino JR. In-vitro and in-vivo studies of trimethoprim-sulphamethoxazole against multiple resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:873–80.
- [197] Sánchez C, Matamala A, Salavert M, Cuchí E, Pons M, Anglés F, et al. [Cotrimoxazole plus rifampicin in the treatment of staphylococcal osteoarticular infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15:10–3.
- [198] Nottebrock H, Then R. Thymidine concentrations in serum and urine of different animal species and man. *Biochem Pharmacol* 1977;26:2175–9.
- [199] Zander J, Besier S, Ackermann H, Wichelhaus TA. Synergistic Antimicrobial Activities of Folic Acid Antagonists and Nucleoside Analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1226–31.
- [200] Stokes A, Lacey RW. Effect of thymidine on activity of trimethoprim and sulphamethoxazole. *J Clin Pathol* 1978;31:165–71.
- [201] Saux MC, Le Rebeller A, Leng B, Mintrosse J. [Bone diffusion of trimethoprim and sulfamethoxazole high pressure liquid chromatography (HPLC) (author's transl)]. *Pathol Biol (Paris)* 1982;30:385–8.
- [202] Tokunaga T, Oka K, Takemoto A, Ohtsubo Y, Gotoh N, Nishino T. Efficacy of trimethoprim in murine experimental infection with a thymidine kinase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1042–5.
- [203] LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vi. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2156–62.
- [204] Grayson ML, Thauvin-Eliopoulos C, Eliopoulos GM, Yao JD, DeAngelis D V, Walton L, et al. Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1792–4.
- [205] Baldoni D, Haschke M, Rajacic Z, Zimmerli W, Trampuz A. Linezolid alone or combined with rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in experimental foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1142–8.
- [206] Verbist L. The antimicrobial activity of fusidic acid. *J Antimicrob Chemother*

1990;25 Suppl B:1–5.

- [207] Gemmell CG, O’Dowd A. Regulation of protein A biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by certain antibiotics: its effect on phagocytosis by leukocytes. *J Antimicrob Chemother* 1983;12:587–97.
- [208] Jensen KA, Kler I. Fucidin. A study on problems of resistance I. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1964;60:271–84.
- [209] Howden BP, Grayson ML. Dumb and Dumber--The Potential Waste of a Useful Antistaphylococcal Agent: Emerging Fusidic Acid Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2006;42:394–400.
- [210] Minassian AM, Osmon DR, Berendt AR. Clinical guidelines in the management of prosthetic joint infection. *J Antimicrob Chemother* 2014;69 Suppl 1:i29-35.
- [211] Euba G, Murillo O, Fernandez-Sabe N, Mascaro J, Cabo J, Perez A, et al. Long-Term Follow-Up Trial of Oral Rifampin-Cotrimoxazole Combination versus Intravenous Cloxacillin in Treatment of Chronic Staphylococcal Osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2672–6.
- [212] Nguyen S, Pasquet A, Legout L, Beltrand E, Dubreuil L, Migaud H, et al. Efficacy and tolerance of rifampicin–linezolid compared with rifampicin–cotrimoxazole combinations in prolonged oral therapy for bone and joint infections. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1163–9.
- [213] El Haj C, Murillo O, Ribera A, Vivas M, Garcia-Somoza D, Tubau F, et al. Daptomycin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:189–95.
- [214] Bahl D, Miller DA, Leviton I, Gialanella P, Wolin MJ, Liu W, et al. In vitro activities of ciprofloxacin and rifampin alone and in combination against growing and nongrowing strains of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1293–7.
- [215] Lora-Tamayo J, Euba G, Cobo J, Horcajada JP, Soriano A, Sandoval E, et al. Short-versus long-duration levofloxacin plus rifampicin for acute staphylococcal prosthetic joint infection managed with implant retention: a randomised clinical trial. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:310–6.
- [216] Morata L, Senneville E, Bernard L, Nguyen S, Buzel  R, Druon J, et al. A

Retrospective Review of the Clinical Experience of Linezolid with or Without Rifampicin in Prosthetic Joint Infections Treated with Debridement and Implant Retention. *Infect Dis Ther* 2014;3:235–43.

- [217] Gomez J, Canovas E, Banos V, Martinez L, Garcia E, Hernandez-Torres A, et al. Linezolid plus Rifampin as a Salvage Therapy in Prosthetic Joint Infections Treated without Removing the Implant. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4308–10.
- [218] Stein A, Bataille JF, Drancourt M, Curvale G, Argenson JN, Groulier P, et al. Ambulatory treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus*-infected orthopedic implants with high-dose oral co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole). *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3086–91.
- [219] Walsh TJ, Standiford HC, Reboli AC, John JF, Mulligan ME, Ribner BS, et al. Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1334–42.
- [220] Tornero E, Morata L, Martínez-Pastor JC, Angulo S, Combalia A, Bori G, et al. Importance of selection and duration of antibiotic regimen in prosthetic joint infections treated with debridement and implant retention. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1395–401.
- [221] Gebhart BC, Barker BC, Markewitz BA. Decreased Serum Linezolid Levels in a Critically Ill Patient Receiving Concomitant Linezolid and Rifampin. *Pharmacotherapy* 2007;27:476–9.
- [222] Zeller V, Dzeing-Ella A, Kitzis M-D, Ziza J-M, Mamoudy P, Desplaces N. Continuous clindamycin infusion, an innovative approach to treating bone and joint infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:88–92.
- [223] Marsot A, Ménard A, Dupouey J, Muziotti C, Guilhaumou R, Blin O. Population pharmacokinetics of rifampicin in adult patients with osteoarticular infections: interaction with fusidic acid. *Br J Clin Pharmacol* 2016.