

ANTIBACTERIANOS; CERTEZAS E HIPÓTESIS ACERCA DE LA RELACIÓN FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA (PK-PD) DE LOS MISMOS

Picco E, Stiefel S, Cerra M, Michel A, Rubio M, Formentini E.¹

Introducción

La era de los antibióticos comienza a mediados del siglo pasado, cuando en el año 1928 en el laboratorio del St. Mary's Hospital, Alexander Fleming observó que un hongo contaminante de sus cultivos de *Staphylococcus aureus* producía lisis bacteriana a su alrededor. Dado que el hongo pertenecía al género *Penicillium*, Fleming llamó penicilina a la nueva sustancia. Si bien hoy consideramos a su descubrimiento como un hito histórico en la lucha contra las enfermedades bacterianas, en su momento este hecho solo tuvo interés académico.

La necesidad de tratar la enorme cantidad de infecciones en los soldados heridos en el campo de batalla durante la segunda guerra mundial hizo que los gobiernos británico y americano aunaran esfuerzos y aceleraran las investigaciones acerca de la nueva sustancia con actividad antibacteriana.

Desde ese momento muchos investigadores reportaron hallazgos relacionados con su actividad antibacteriana que fueron pasados por alto por considerárselos sin impacto clínico alguno.

Debieron pasar muchos años, más precisamente hasta los años 80 para que volviera a considerarse y revalorarse el impacto clínico de fenómenos tales como la actividad de la penicilina a concentraciones subinhibitorias, reportado por Gardner en 1940, el efecto post-antibiótico (PAE) de la penicilina sobre el *Staphylococcus aureus*, reportado por primera vez por Eagle y Musselman en 1949. El efecto paradójico de los betalactámicos ya había sido reportado por Eagle en 1950 y la contribución del hospedador en la respuesta de la terapéutica antibiótica también había sido sugerida por éste en el mismo año.

Sin embargo, hoy desde otra perspectiva podríamos preguntarnos ¿Cómo es posible que se hayan dejado pasar por alto semejantes evidencias y no se hubieran aprovechado oportunamente para optimizar la lucha contra las enfermedades bacterianas? Para responder a esta pregunta debemos situarnos en el contexto histórico de los años 40.

En el año 1945, los aliados habían ganado la segunda guerra y al poderío bélico de los éstos le seguiría el exultante poderío de la industria, y la industria farmacéutica no fue la excepción. La producción de penicilina en cantidades industriales a partir del año 1950 y la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana fueron la causa de una verdadera revolución en la lucha contra las enfermedades infecciosas bacterianas.

Considerando las fechas en las que se descubren las primeras moléculas de los diferentes grupos de antimicrobianos (Tabla 1), se puede apreciar que de disponer solo de sulfamidas como única arma quimioterápica para luchar contra las bacterias, en pocos años el arsenal antibacteriano se incrementó significativamente.

¹ Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. eforment@fcv.unl.edu.ar

Tabla 1. Año de descubrimiento de los agentes antibacterianos más importantes, su empleo clínico y de reporte de existencia de cepas resistentes a los mismos.

Antibiótico	Año de descubrimiento	Año empleo clínico	Año reporte de resistencia
Penicilina	1928	1941	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1948	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1987
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Las nuevas moléculas, los diferentes mecanismos de acción, los espectros ampliados, los espectros dirigidos y un primer y significativo retroceso en la morbilidad y mortalidad producidas por las enfermedades infecciosas bacterianas, hizo pensar en el futuro promisorio e invencible de la terapéutica antibiótica.

La segunda guerra mundial se había ganado en el campo de batalla gracias a una producción industrial formidable de material bélico, y la guerra contra las bacterias se iba a ganar de la misma manera, el descubrimiento de “la molécula antibacteriana invencible” era solo cuestión de tiempo y la guerra contra las bacterias acabaría por ganarse tarde o temprano.

Durante mucho tiempo se preconizó el uso de los antibióticos en base a criterios tácticos muy simplistas que sin embargo, debido a su eficacia, se aplicaron durante décadas tales como; administración de dosis que garantizaran elevadas y sostenidas concentraciones plasmáticas durante el mayor tiempo posible a fin de lograr la erradicación de las bacterias patógenas del paciente. Estas reglas empíricas se aplicaron a todos los antibacterianos sin excepción y dieron en su momento resultados satisfactorios.

Sin embargo, luego de una primera etapa de retirada, las bacterias irrumpieron nuevamente en el campo de batalla y esta vez haciéndose refractarias a los antibióticos. La resistencia bacteriana constituyó desde ese momento el contraataque formidable de las mismas. Mientras que el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antibacteriana, su purificación, sus ensayos de eficacia clínica e inocuidad y su producción industrial consumían más de diez años y varios millones de dólares, la aparición de cepas resistentes a estas nuevas moléculas podían reportarse al año siguiente de su uso (Tabla 1). Inclusive se hallaron bacterias que eran refractarias a la acción de las nuevas moléculas antibacterianas sin haber estado en contacto jamás con ella.

Evolución del concepto de terapéutica antibiótica

En el año 1941 Florey, Chain y un equipo de investigadores, demuestran la eficacia de la penicilina como agente antibacteriano en un ensayo clínico humano, y puede considerarse a ese hecho como el inicio de la era de la terapéutica antibiótica. Nadie puede dudar que el período comprendido entre los años 1940 y 1970 ha sido indudablemente, el más fructífero en lo que respecta al descubrimiento de nuevas moléculas de antibióticos. Sin embargo, en la actualidad, nos encontramos con que el número de nuevos antibióticos disminuye año a año (Figura 1).

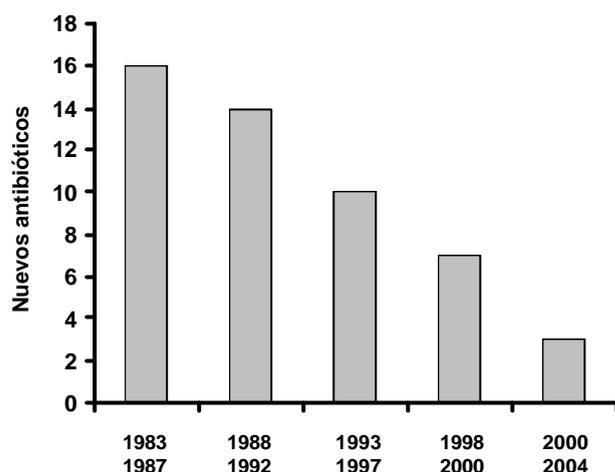


Figura 1. Disminución de la cantidad de nuevos antibióticos disponibles en el mercado en el período comprendido entre el año 1983 y 2004.

Algunos autores sugieren que al presente, la terapéutica antimicrobiana ha llegado a una especie de meseta o techo, dado a que cada vez es más difícil desarrollar antibióticos que sean más eficaces y menos tóxicos que los ya existentes. Al respecto, cabe considerar que las nuevas moléculas que en los últimos años han pasado a integrar las filas del arsenal terapéutico antibacteriano, se caracterizan por su espectro dirigido a bacterias específicas, o ser activas sobre bacterias resistentes moléculas más viejas. Sin embargo, estas nuevas moléculas no son más que nuevas integrantes de las viejas familias de antibióticos que todos conocemos. En ese sentido, no se reportan avances relacionados a nuevas estructuras químicas, nuevos mecanismos de acción o nuevas propiedades farmacocinéticas, y se estima que si eso fuera posible no lo sería en un futuro inmediato, tan solo recientemente se está trabajando en los mecanismos de acción antisentido, y los posibles futuros antibióticos están en fase de prueba.

Entre los años 1948 y 1955, varios grupos de trabajo reportaron que los antibióticos presentaban actividad antibacteriana que persistía aún luego de que las concentraciones de los mismos cayeran por debajo de los niveles letales; que las bacterias disminuían su velocidad de crecimiento luego de haber estado en contacto con concentraciones letales, y que la participación de las defensas del hospedador podrían desempeñar un importante papel en la cura de una enfermedad. Sin embargo, el entusiasmo y las perspectivas estaban puestos en el descubrimiento de nuevas moléculas, lo que hizo que no se prestara la debida importancia a estos hallazgos, los que en su mayoría quedaron en el olvido como meras “curiosidades” de laboratorio.

La terapéutica antibiótica se basó en sus orígenes en principios básicos que tenían como fundamento un solo parámetro farmacodinámico; la concentración inhibitoria mínima (MIC). El principio básico y fundamental en el que se basaba un esquema posológico antibiótico, se sustentaba en observaciones de ensayos *in vitro*, donde un inóculo bacteriano era enfrentado a diferentes concentraciones de antibióticos durante un período de tiempo y luego se observaba la evolución temporal de la población bacteriana. Se observaba entonces que cuanto mayor fuera la concentración del antibiótico y mayor fuera el tiempo de contacto de las bacterias con éste, mayor era la eficacia antibacteriana que se traducía en ausencia de bacterias viables. Estas observaciones dieron lugar a la lógica consideración que si en un organismo viviente se garantizaba una relación concentración-tiempo de antibiótico similar a lo observado *in vitro*, entonces se garantizaría la cura bacteriológica. Como consecuencia, toda la

terapéutica antibacteriana se resumía en un esquema posológico que debía garantizar concentraciones plasmáticas del antimicrobiano por encima de la MIC durante el mayor tiempo posible (Figura 2).

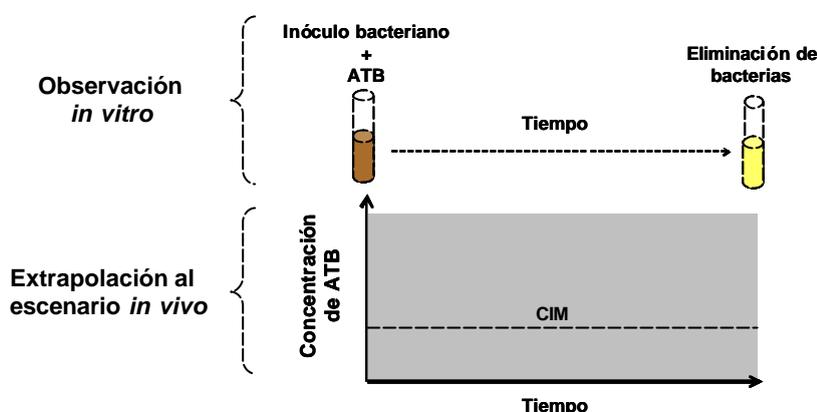


Figura 2 Principio básico y fundamental en el que se basaron los primeros esquemas terapéuticos antibióticos. La erradicación de las bacterias se obtenía en función de elevadas concentraciones de antibiótico que se mantenían por un tiempo prolongado.

Este principio básico para el diseño de esquemas terapéuticos antimicrobianos se mantuvo con pocas modificaciones hasta finales de la década de los 70. El hecho que desencadena el inicio de un período “revisionista” acerca de farmacodinamia de los antibióticos y la optimización de su empleo no lo constituyó el creciente incremento en el número de cepas bacterianas resistentes sino todo lo contrario; una enfermedad viral; el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (HIV) cuya aparición puso de manifiesto que poco se podía hacer para combatir enfermedades bacterianas si la respuesta inmune del hospedador está debilitada o ausente.

En vista de los acontecimientos ocurridos en los últimos 30 años, el concepto de terapia antibiótica ha evolucionado, y al presente en la séptima década de la era antibiótica, se asume que los esquemas terapéuticos (dosis, frecuencia de administración y duración del tratamiento) en los cuales tanto la muerte directa de las bacterias (acción bactericida), o la actividad limitante del crecimiento (acción bacteriostática) ocasionada por los diversos agentes antibacterianos, están diseñados para curar o mitigar las condiciones que permitieron sobrepasar la línea de defensa inmunitaria del hospedador dando lugar a una infección clínicamente significativa. La falta de nuevas moléculas de antimicrobianos, impulsó a considerar los viejos hallazgos reportados en los inicios de la era antibiótica, a fin de conocer mejor la actividad de las moléculas existentes y optimizar el uso de las mismas. Se inicia entonces una etapa de “revisionismo” de la terapéutica antibiótica, y se toma real conciencia de que ésta debe ser diseñada a los efectos de actuar en forma paralela a las defensas del hospedador para que éste controle la infección.

El enfoque actual de la terapéutica antibiótica evolucionó desde un concepto empírico-descriptivo a explicativo, basándose ya no en la relación causa efecto, sino en el conocimiento preciso de la farmacocinética del agente antibacteriano, su farmacodinamia a nivel molecular, la biología de la bacteria sensible al mismo y la relación entre la farmacocinética, la farmacodinamia y la eficacia antibiótica, que ha derivado en los índices farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK-PD) en los cuales se basa la construcción de esquemas terapéuticos.

Consideraciones farmacocinéticas y farmacodinámicas

La farmacología de la terapéutica antimicrobiana descansa sobre dos componentes; la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibióticos. La farmacocinética comprende los procesos de absorción, distribución y eliminación, los cuales en un determinado esquema terapéutico, dan como resultado la evolución temporal de las concentraciones de los antibióticos en plasma y tejidos y por consiguiente el tiempo de permanencia de éstos en el organismo. Dado que es fácil determinar y cuantificar estas moléculas en plasma y tejidos, es por lo que durante mucho tiempo los regímenes posológicos se basaron en las concentraciones plasmáticas y titulares de un antibiótico y en la MIC del mismo. Para tener una idea del fundamento de este principio terapéutico, debemos conocer el significado de la MIC; que es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento visible de bacterias cuando un inóculo de estas, normalmente 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) es expuesta a concentraciones fijas de diluciones aritméticas de antibiótico a 36-37°C durante 18-20 horas.

Este parámetro proporciona información de la eficacia acumulativa de una concentración constante de antibiótico que actúa sobre un inóculo cuya densidad bacteriana está preestablecida. Durante mucho tiempo la MIC fue el único parámetro farmacodinámico en el que se basaron los diseños de esquemas terapéuticos. En los albores de la era antibiótica, se llegó a proponer que tanto las penicilinas como las sulfonamidas debían mantener concentraciones séricas y titulares por encima de la MIC durante todo el tiempo que durase el tratamiento, a fin de eliminar las bacterias tal y como ocurría *in vitro*, asumiendo que concentraciones menores a la MIC no podían ser consideradas eficaces, dando a este parámetro un significado de todo o nada.

Sin embargo, la situación que se presenta en el escenario *in vivo* es completamente diferente, ya que en primer lugar, las concentraciones de antibiótico en plasma y tejidos fluctúan en función del tiempo, logrando un pico de concentraciones durante la fase de absorción y disminuyendo paulatinamente hasta su total eliminación. En segundo lugar, en el hospedador la carga bacteriana no es constante y ésta fluctúa también en función de las concentraciones del antibiótico en el sitio en donde éstas se hallan. Basándose en lo expresado, a diferencia de lo que ocurre en los ensayos *in vitro*, en el escenario *in vivo* la relación antibiótico-bacteria es dinámica y el éxito terapéutico depende entonces no sólo de las concentraciones séricas y/o tisulares del antibiótico, sino que se introduce el concepto de tiempo de exposición, es decir, el tiempo durante el cual las bacterias están expuestas tanto a concentraciones suprainhedoras ($>MIC$) como subinhibitorias ($<MIC$) y al intervalo entre exposiciones (intervalo entre dosis).

Relación entre concentración y actividad antimicrobiana

La necesidad de alcanzar una determinada concentración de antibiótico para obtener la disminución en el tamaño de una población bacteriana, se corresponde con el concepto farmacodinámico de nivel umbral, el cual es la mínima concentración de un antibiótico actuando sobre las bacterias sensibles que permite obtener una mínima respuesta clínica. Se podría pensar que la actividad de un antibiótico podría aumentar en forma proporcional a su concentración, pero esto no es así para todos ellos, los cuales pueden ser ubicados en dos grupos; aquellos cuya magnitud de actividad bactericida es dependiente de su concentración y aquellos cuya actividad bactericida está poco determinada por la misma (Tabla 2), ya que la máxima eficacia de éstos se alcanza a

concentraciones bajas (normalmente 2-4 x MIC), y que paradójicamente un incremento en las mismas no solo no aumenta la velocidad bactericida sino que la disminuye.

Tabla 2. Efecto del aumento de concentraciones de antibiótico sobre la intensidad la actividad antibacteriana expresada como reducción del tamaño de un inóculo bacteriano luego de un tiempo de exposición determinado.

Actividad importante	Actividad escasa
Aminoglucósidos Fluoroquinolonas Metronidazol	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenems, Vancomicina, Macrólidos, Clindamicina Tetraciclinas

El grupo conformado por aminoglucósidos, fluoroquinolonas y metronidazol recibe la denominación de antibióticos con actividad concentración dependiente, en los cuales la actividad antibacteriana expresada como velocidad con la cual el número de bacterias viables disminuye se incrementa en función de la concentración alcanzada en el sitio de acción. Estos antibióticos logran una rápida reducción de la carga bacteriana y los esquemas terapéuticos con los mismos se optimizan garantizando una dosis que logre un elevado pico de concentraciones plasmáticas.

Relación entre velocidad de actividad antibacteriana y tiempo de exposición

De manera contrapuesta, para muchos antibióticos, la velocidad con la cual éstos logran reducir la población bacteriana viable es lenta y esta relacionada con el tiempo de exposición de las bacterias al antibiótico, con lo cual se hablará entonces de antibióticos con actividad tiempo dependiente, y dentro de este grupo encontramos moléculas con actividad bactericida y bacteriostática (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos de acción de antibióticos con actividad tiempo dependiente.

Acción antibacteriana	Grupo	Ejemplos
Bacteriostática	Fenicoles Macrólidos (*) Lincosaminas Tetraciclinas	Florfenicol, Cloranfenicol Eritromicina, Tilmicosina Clindamicina Oxitetraciclina, Doxiciclina
Bactericida	Penicilinas Cefalosporinas	Bencilpenicilina, Amoxicilina, Carbenicilina Cefalexina, Ceftiofur, Cefapirina

(*) a elevadas concentraciones se comporta como bactericida

En una primera instancia se pensó que para este grupo de antibióticos, el esquema posológico ideal podría ser aquel que garantizara concentraciones eficaces y sostenidas (2-4 x MIC) durante todo el tiempo que durase el tratamiento. Sin embargo, este principio es contradictorio respecto de los betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), ya que para que éstos puedan actuar, las bacterias deben hallarse en fase de crecimiento. Esto significa que cuando la actividad de estos se manifiesta es justamente el momento en el que ésta comienza a disminuir, y justifica la necesidad de disponer

entre administraciones de un período de concentraciones subinhibitorias que permitan a las bacterias reiniciar su fase de crecimiento y de esa manera, ser susceptibles a la segunda dosis y así sucesivamente hasta disminuir la carga bacteriana.

Índices farmacocinéticos-farmacodinámicos (PK-PD)

De acuerdo al comportamiento farmacodinámico de cada grupo de antibióticos, se establecieron ciertos índices que derivan del empleo de las concentraciones plasmáticas (farmacocinética o PK) y la MIC (farmacodinamia o PD). Estos índices PK-PD son; la relación entre el pico de concentración plasmática y la MIC (C_{max}/MIC), el tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas son superiores a la MIC ($t > MIC$) y la relación entre el área bajo la curva de concentración plasmática obtenida en 24 horas y la MIC (AUC/MIC) (Figura 3)

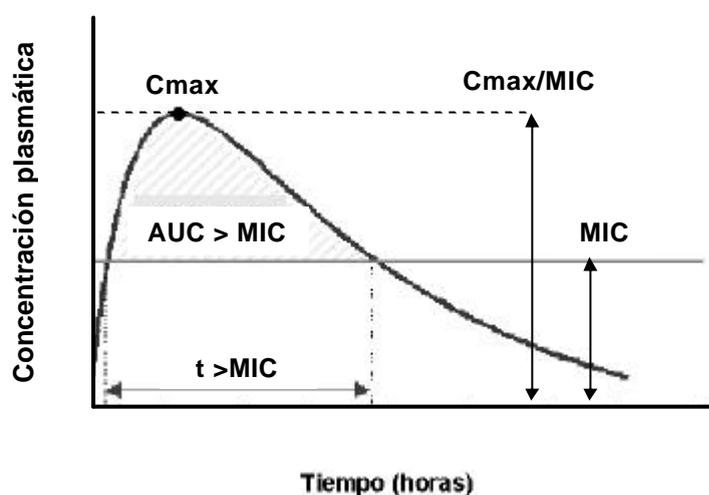


Figura 3. Relación entre parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que determinan los índices PK-PD que se emplean como predictores de la eficacia de los esquemas posológicos (dosis e intervalo entre dosis).

Otro índice semejante al último, es la relación entre el AUC parcial por el período de tiempo en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la MIC y la MIC (AUC_{0-t} / MIC). Según el tipo de actividad del antibiótico (concentración o tiempo dependiente) será el índice que se utilice para diseñar un esquema posológico adecuado y garantizar el éxito terapéutico (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de los antibióticos según su modo de acción, los índices PK-PD empleados para evaluar su actividad antibacteriana y los correspondientes criterios de eficacia. En el caso de grupos de antibióticos con diferentes índices PK-PD, se indica en negrita el índice PK-PD de elección.

Antibiótico	Actividad	Semivida (horas)	Índice PK-PD	Criterio de eficacia
Betalactámicos - Penicilinas - Cefalosporinas - Carbapenems	Tiempo dependiente	1,5 - 2 1 - 1,5 0,9 - 1	$t > MIC$	> 50% óptimo 80%
Aminoglucósidos - Gentamicina	Concentración dependiente	1,5 - 2	C_{max}/MIC AUC/MIC	\pm 8-10
Fluoroquinolonas - Ciprofloxacina	Tiempo dependiente	4 - 5	C_{max}/MIC AUC/MIC	= 125
Macrólidos	Tiempo			

- Eritromicina - Azitromicina			AUC/MIC	
Glicopéptidos - Vancomicina	Tiempo dependiente	5 - 6	AUC/MIC	No establecido
Tetraciclinas - Doxiciclina - Minociclina	Tiempo dependiente	16 - 18	AUC/MIC	No establecido

El índice C_{max}/MIC se emplea para predecir la eficacia de antibióticos bactericidas con actividad concentración dependiente tales como los aminoglucósidos, para los cuales, se necesita lograr picos de concentración plasmática que garanticen una relación C_{max}/MIC de 8-10, la cual se considera adecuada para garantizar el éxito terapéutico. Sin embargo, recientes estudios indican que el índice AUC/MIC sería más adecuado en medicina veterinaria. Esto se explicaría por los efectos de persistencia que están relacionados a la farmacodinamia de este grupo de antibióticos.

En el caso de las fluoroquinolonas, si bien su actividad es concentración dependiente, su prolongada semivida hace que el mejor índice PK-PD sea el AUC/MIC o el AUIC, el cual tiene que ser ≈ 125 horas.

El índice $t > MIC$ se emplea para los antibióticos bactericidas con actividad tiempo dependiente que se caracterizan por su corta semivida de eliminación (1-2 horas), en este caso $t > MIC$ se expresa como el % del tiempo entre administraciones en que las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima de la MIC. En el caso de penicilinas y cefalosporinas, se considera adecuado que $t > MIC$ sea $> 50\%$, siendo óptimo el 80% del intervalo entre dosis. Existen sin embargo grupos de antibióticos con actividad tiempo dependiente como florfenicol, macrólidos, lincosaminas y tetraciclinas que presentan prolongadas semividas de eliminación y por lo tanto, los índices más adecuados para diseñar los esquemas posológicos son el AUC/MIC o el AUIC.

Las tetraciclinas representan el único caso de antibióticos cuya eficacia se garantiza según el viejo esquema terapéutico de concentraciones suprainhedoras ($> MIC$) sostenidas en el tiempo y se explica porque su mecanismo de acción es únicamente bacteriostático.

Efecto subinhibitorio de los antibióticos (sub-MIC)

Los efectos de los antibióticos a concentraciones inferiores a su MIC (sub-MIC) se expresan como una disminución en la velocidad de proliferación de las bacterias, así como también en la pérdida de viabilidad de las mismas. Las bacterias que han estado expuestas a concentraciones sub-MIC, presentan alteraciones morfológicas que son consecuencia de perturbaciones metabólicas. Estas alteraciones en la morfología son las responsables en la mayoría de los casos de la disminución de su capacidad de adherencia y patogenicidad y a su vez, hacen que éstas sean más susceptibles a los mecanismos de defensa del hospedador.

Este tipo de observaciones acerca de la actividad de los antibióticos a concentraciones sub-MIC no son nuevas. Ya en el año 1940, se observó que bajas concentraciones de penicilina producían elongación y filamentos en bacterias Gram negativas. En observaciones más recientes, se constató que bacterias aisladas en orina, líquido cefalorraquídeo y cultivos hemáticos de pacientes tratados con bajas dosis de antibióticos, presentaban filamentos y morfologías aberrantes y que bajas

concentraciones de penicilina, producían una inhibición temporal del crecimiento de Espiroquetas y Estreptococos. Al respecto, se ha reportado que concentraciones sub-MIC de ciprofloxacina, ceftazidima y ampicilina inducen cambios morfológicos sobre cepas de *Escherichia coli*.

Concentraciones sub-MIC de macrólidos suprimen la expresión de factores de virulencia de diferentes cepas de bacterias Gram negativas. Aunque *Pseudomonas aeruginosa* normalmente es altamente resistente a este grupo, se ha demostrado que cuando es expuesta a concentraciones sub-MIC de eritromicina, ésta suprime la producción de exotoxina A y proteasas, disminuye la síntesis proteica, aumentando la sensibilidad de esta bacteria en suero y suprimiendo la formación de biofilms por inhibición del ácido algínico. También hay evidencia de que concentraciones sub-MIC de integrantes de este grupo producen inhibición de la expresión de flagelina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, la cual es uno de los factores de virulencia de estas especies bacterianas y que juegan un importante papel en la formación de biofilms. *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* enfrentadas a concentraciones sub-MIC de azitromicina, muestran una marcada disminución de su motilidad a razón de la ausencia de flagelos. También los macrólidos (con excepción de claritromicina y roxitromicina), pueden afectar ciertos componentes estructurales asociados con la virulencia del *Streptococcus pneumoniae*, la cual está relacionada con un polisacárido capsular con función antifagocítica.

La adhesión de *Escherichia coli* a la superficie de células eucariotas es mediada por estructuras proteicas asociadas a la membrana bacteriana. Las concentraciones sub-MIC de ciprofloxacina, ceftazidima, ampicilina, gentamicina y cotrimoxazol inhiben la síntesis y la expresión de adhesinas sobre la superficie de esta especie bacteriana, dando lugar a la formación de adhesinas afuncionales o al desprendimiento de las mismas desde la superficie de la pared celular, interfiriendo de esa manera en la capacidad de los microorganismos de acoplarse a los receptores de la superficie de la membrana de las células del hospedador.

El efecto posantibiótico (PAE)

Este fenómeno *in vitro* fue descrito en los años siguientes al descubrimiento de la penicilina y consiste en una supresión temporal del crecimiento bacteriano que persiste luego de que las bacterias han sido expuestas a un antibiótico y este ha sido removido del medio (Figura 4).

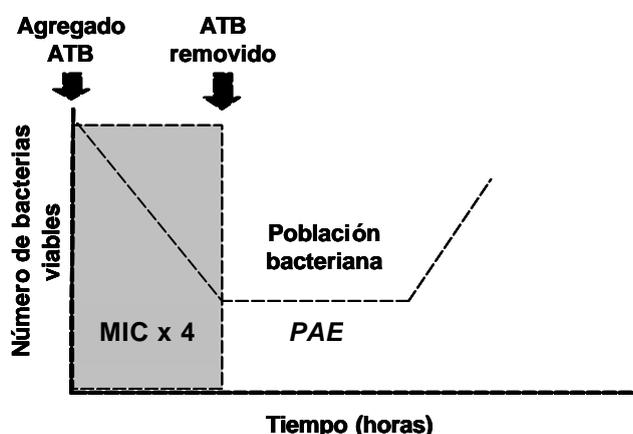


Figura 4. Representación esquemática del efecto post-antibiótico (PAE). Un inóculo bacteriano es expuesto a una concentración supra-inhibitoria de un antibiótico y luego de que éste es removido del medio, las bacterias que sobrevivieron a la exposición del antibiótico se mantienen en estado de quiescencia por un período variable hasta que reinician su crecimiento.

El PAE tiene la dimensión de tiempo (horas) y la duración del mismo depende de varios factores tales como; la concentración del antibiótico, el tiempo durante el cual las bacterias son expuestas al mismo, la especie bacteriana (y eventualmente la cepa) y el agente antibiótico.

Se ha demostrado que el PAE es una propiedad de todos los antibióticos, quienes lo inducen en mayor o menor grado. Todos los antibióticos parecen ser capaces de inducir PAE en cocos Gram positivos, pero los betalactámicos inducen un PAE corto o insignificante sobre bacilos Gram negativos con excepción de carbapenems sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Los PAE de mayor duración son inducidos sobre bacterias Gram negativas por aminoglucósidos, fluoroquinolonas y por antibióticos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica.

El modo por el cual los antibióticos inducen el PAE, no está aun claramente dilucidado, no obstante se presume que son varios los procesos involucrados. Un primer mecanismo propuesto es el enlentecimiento del eflujo de los antibióticos desde el citoplasma bacteriano. Esta hipótesis estaría corroborada por el hecho de que los betalactámicos: cefalosporinas y monobactams, tienen un PAE muy corto o nulo sobre bacterias Gram negativas. La explicación a este comportamiento es que estos agentes pueden ejercer su acción sin necesidad de penetrar dentro del citoplasma bacteriano.

Otro modo propuesto, es que inducirían daños no letales a la bacteria por persistir en los sitios específicos de fijación, los cuales difieren según el mecanismo de acción del antibiótico. En el caso de los betalactámicos que actúan sobre la pared bacteriana, éstos se unen de forma covalente a varias proteínas específicas (penicillin-binding proteins; PBP), muchas de las cuales son enzimas que intervienen en la síntesis de la pared bacteriana. En este sentido, el PAE representa el tiempo que la bacteria necesita para sintetizar nuevas enzimas (PBP).

En el caso de los aminoglucósidos, se considera que éstos se unen de forma irreversible en concentraciones sub-letales a los ribosomas, dando lugar a una interrupción en el proceso de síntesis proteica. En este caso, el PAE representa el tiempo que la bacteria necesita para sintetizar nuevas proteínas ribosomales. En un estudio realizado sobre el PAE inducido por eritromicina y claritomicina, se halló que luego que las bacterias estuvieron en contacto con estos antibióticos, se produjo una reducción en el número de la subunidad ribosomal 50S, y la síntesis proteica se redujo durante 3-4 horas luego de la remoción de los macrólidos. En este caso el PAE se interpreta como el tiempo necesario para la síntesis de nuevas subunidades 50S y la lenta liberación de los antibióticos desde los ribosomas de las bacterias inhibidas.

El PAE, originalmente observado *in vitro* también ha sido demostrado en diferentes modelos animales y en general, el PAE observado *in vivo* es siempre mayor que el observado *in vitro*.

El efecto posantibiótico a concentraciones subinhibidoras (PAE sub-MIC)

El PAE, ha sido una de las principales explicaciones del éxito de los regímenes posológicos discontinuos (Ej: una dosis cada 8, 12 o 24 horas). Sin embargo, el tiempo agregado en el que las concentraciones de antibióticos se hallan por debajo de la MIC y el PAE a menudo no alcanzan para explicar la actividad antibacteriana durante todo el intervalo entre dosis. En el caso del PAE, cuando este es determinado *in vitro*, las bacterias son expuestas por un período de tiempo variable (1-2 horas) a una

concentración constante de antibiótico, con la posterior remoción del mismo por lavado del inóculo. En el escenario *in vivo*, esta situación no existe, ya que en un régimen terapéutico, luego de administrada una dosis, las bacterias están expuestas a concentraciones que fluctúan desde las suprainhítorias seguidas invariablemente de concentraciones subinhítorias.

El PAE sub-MIC, es la acción sinérgica del PAE y el efecto sub-MIC, lo cual en definitiva es un efecto farmacodinámico que se aproxima mucho más a la situación *in vivo* donde las bacterias se enfrentan a concentraciones suprainhítorias seguidas de concentraciones subinhítorias (Figura 5).

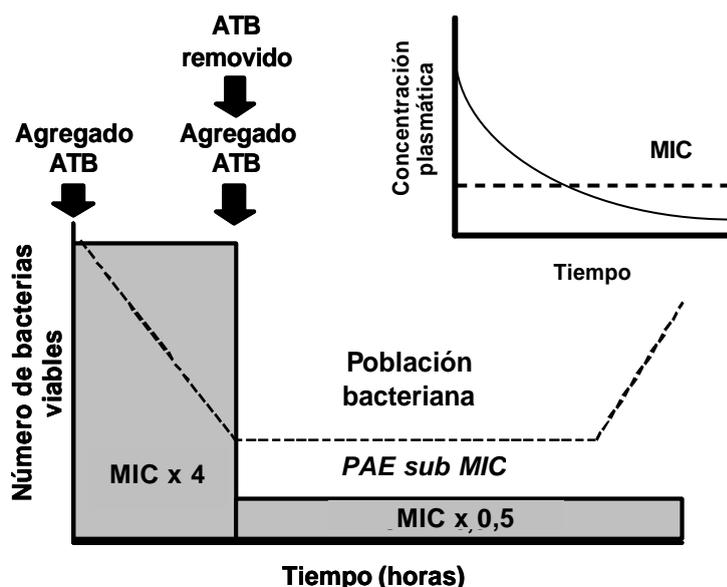


Figura 5. Representación esquemática del efecto post-antibiótico sub-CIM (EPA sub-CIM). Un inóculo bacteriano es expuesto a una concentración suprainhítorica de un antibiótico y luego que éste es removido del medio, las bacterias que sobrevivieron a la exposición del antibiótico son expuestas a concentraciones sub-inhítorias ($< MIC$). La población bacteriana que sobrevive se mantiene en estado de quiescencia por un período de tiempo mayor al observado en el EPA. El EPA sub-CIM es el resultado de una exposición de las bacterias a concentraciones de antibiótico similares a las que se observan en el

escenario *in vivo*.

Los mecanismos involucrados en el PAE sub-MIC son similares a los propuestos para los efectos sub-MIC. En el caso de los betalactámicos, son necesarias pequeñas concentraciones de éstos para que se unan de manera covalente a las escasas proteínas fijadoras de penicilina que una célula bacteriana dañada puede sintetizar luego de ser expuesta a concentraciones suprainhítorias. Un mecanismo similar se ha propuesto para antibióticos que se unen a la enzima DNA-girasa o al RNA.

Efecto de la respuesta del hospedador; sensibilización a leucocitos

Las bacterias que presentan alteraciones metabólicas y morfológicas no letales a causa de haber estado expuestas a concentraciones sub-MIC, muestran mayor susceptibilidad a ser fagocitadas por leucocitos. Se ha demostrado que este fenómeno es claramente inducido por antibióticos que inhiben la síntesis proteica, dando como resultado alteraciones en la estructura de la superficie de las bacterias. Las bacterias así fagocitadas podrían ser más sensibles a la lisis dentro del fagosoma.

Este efecto de "sensibilización" se mantiene durante varias horas luego de haber finalizado la exposición a los antibióticos y para ser revertido, las bacterias necesitan sintetizar nuevas proteínas estructurales. Este efecto de sensibilización se adjunta al PAE, al de las concentraciones sub-MIC y al PAE sub-MIC, prolongando la actividad antibacteriana aún en presencia de muy bajas concentraciones de antibiótico o en ausencia de los mismos.

Efecto bactericida global

La actividad bactericida de un antibacteriano observada a concentraciones suprainhibitorias, tanto de los antibióticos con actividad concentración dependiente (8-10 x MIC) o tiempo dependiente (2-4 x MIC, $t > MIC$ 50-80%), los efectos a concentraciones sub-MIC, el PAE, el PAE sub-MIC y la sensibilización a leucocitos, constituyen un grupo de efectos que actuando en conjunto y de manera dinámica proporcionan una idea de la interrelación de factores farmacocinéticos (absorción, distribución y eliminación), farmacodinámicos (relación entre la concentración de un antibiótico y su efecto bactericida) y la respuesta inmune del hospedador que conllevan al éxito de la terapéutica antibiótica.

La aditividad de todos estos fenómenos es perfectamente observable en el animal tratado. El conjunto de todos estos fenómenos explica el porqué del retraso del crecimiento bacteriano observado *in vivo* luego que la concentración de un antibiótico cae muy por debajo de la MIC.

La respuesta del organismo hospedador es entonces de fundamental importancia para el éxito terapéutico y al mismo tiempo, representa un factor difícil de controlar, ya que el grado de la respuesta inmune puede variar de un individuo a otro o puede estar disminuida o ausente ya sea en individuos de riesgo (cachorros, seniles), inmunocomprometidos o bien cuando la localización del foco infeccioso está a resguardo de la respuesta inmune, tal es el caso de endocarditis o sitios en los que se han formado biofilms.

Efectos indeseables:

Selección de cepas resistentes

Las bacterias tienen una capacidad de replicación muy eficiente. Dependiendo de las condiciones y el medio, estas pueden llegar a duplicar el tamaño de su población en 20 minutos. En los procesos infecciosos, las bacterias se encuentran en fase de crecimiento continuo y pueden llegar a contabilizarse hasta 10^9 UFC/mL. Estas dos condiciones hacen que en fase de crecimiento se encuentren en el mejor escenario para que los mecanismos de variación genética operen eficientemente.

La emergencia de cepas resistentes a los antimicrobianos está ligada al empleo de este tipo de agentes. Sin embargo, la utilización de antibióticos no genera resistencia sino que acelera la aparición de la misma al ejercer presión de selección sobre la población bacteriana, eliminando a las bacterias sensibles al antimicrobiano y permitiendo el desarrollo de las bacterias resistentes al mismo.

Muchos factores actúan a modo de aceleradores de la aparición de resistencias y estos serían: el uso de los antibacterianos cuando no son necesarios, las concentraciones bajas de antibióticos por tiempo prolongado, el empleo de dosis insuficientes, los intervalos entre dosis incorrectos o que no se respetan, el tratamiento durante un período insuficiente ej.; tener por objetivo la cura clínica y no la cura bacteriológica, y el empleo de formas farmacéuticas de mala calidad.

Efecto paradójico o de Eagle

En el año 1948, Eagle y Muselman observaron que cuando inóculos de *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus aureus* eran expuestos a concentraciones letales de penicilina, la

actividad bactericida disminuía en lugar de mantenerse en su techo máximo, es decir que el número de bacterias sobrevivientes se incrementaba en lugar de mantenerse a niveles bajos y estables.

A partir de ese momento, este fenómeno se observó para diferentes antibióticos actuando sobre diferentes bacterias; ampicilina y *Streptococcus faecalis*, carbenicilina y *Proteus mirabilis*, cefotaxime y *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, aminoglucósidos sobre bacilos Gram negativos, cefmenoxime y *Proteus vulgaris*.

Las elevadas concentraciones de penicilina también condicionaron la presencia de un “techo” para la duración del PAE, ya que cuando una cepa de *Streptococcus faecalis* fue expuesta a elevadas concentraciones de penicilina durante un breve período, ésta necesitó menos tiempo para reiniciar su crecimiento que cuando fue expuesta a bajas concentraciones de penicilina durante igual período de tiempo.

El efecto es conocido como “efecto paradójico o efecto de Eagle” en honor a su descubridor, y aunque ha sido reportado para varios grupos de antibióticos es una respuesta que no se manifiesta en todas las especies bacterianas.

Los mecanismos por medio de los cuales ciertos antibióticos inducen a la selección de bacterias resistentes a elevadas concentraciones aún no están dilucidados. Sin embargo la ausencia de una explicación científica no niega la existencia del hecho en si. Quizá mucho más que el conocimiento de las causas que determinan el efecto “Eagle” sea el posible impacto que éste pudiese tener sobre la terapéutica antimicrobiana.

Al respecto, el efecto “Eagle” observado *in vitro* es representado *in vivo* por un tipo de efecto indeseable que sería el retraso en la obtención de la cura bacteriológica. Un estudio realizado en ratones infectados con Grupo B de *Streptococcus betaemolyticum* obtuvieron la cura bacteriológica más rápido cuando fueron tratados con 3 mg/kg de penicilina que cuando se les administró 300 mg/kg.

El concepto de respuesta antibiótica máxima que se obtiene a elevadas concentraciones de antibiótico y la posibilidad de un efecto paradójico, remarcan la importancia de evitar la sobredosificación, ya que las elevadas e innecesarias concentraciones de éstos, aún de aquellos que presentan baja toxicidad o elevado índice terapéutico, no solo no proporcionan un beneficio adicional en términos de eficacia antibiótica, sino que por el contrario, pueden retrasar innecesariamente la cura bacteriológica del paciente tratado.

Resistencia adaptativa

La actividad antibacteriana de ciertos antibióticos tales como los aminoglucósidos, es dependiente de la concentración que alcancen éstos en el sitio de localización de las bacterias. Un fenómeno de este grupo de antibióticos observado *in vitro* es que la actividad bactericida tanto para *Pseudomonas aeruginosa* como para otros bacilos aerobios Gram negativos es bifásica. En una primera fase, la velocidad bactericida es proporcional a la concentración inicial del antibiótico, mientras que en una segunda fase, la velocidad bactericida se presenta disminuida o anulada a causa del insuficiente ingreso del aminoglucósido al interior de la bacteria, siendo este fenómeno independiente de la concentración inicial o persistente del antibiótico. El mecanismo molecular de esta “resistencia adaptativa” sería la deficiente actividad por parte de los mecanismos dependientes de energía de captación de los aminoglucósidos. Las bacterias que sobreviven a la primera exposición del aminoglucósido se hacen refractarias a éste debido a que se han tornado transitoriamente “impermeables” al mismo.

La resistencia adaptativa es transitoria y desaparece una vez que el antibiótico ha sido removido del medio. En el escenario *in vivo*, este fenómeno se evita con prolongados intervalos entre administraciones y en el caso de los aminoglucósidos, una administración diaria permite que las concentraciones de éstos disminuyan a valores casi nulos, y de esa manera se estaría evitando por un lado una administración innecesaria de los mismos y por otro reduciendo los riesgos de toxicidad renal y nerviosa característicos de éstos agentes.

Revisión de esquemas posológicos

Al inicio de la era antibiótica, el fundamento de la terapia antimicrobiana era el mantenimiento de concentraciones suprainhedoras ($>MIC$) durante todo el tiempo que durase el tratamiento, y los esquemas posológicos eran diseñados en consecuencia. Sin embargo en los últimos años se han originado dudas acerca de la conveniencia de este tipo de pauta posológica, y esos viejos esquemas que se asemejaban a una infusión continua de antibiótico han cedido su lugar a los esquemas posológicos intermitentes, en donde los intervalos entre dosis tienden a ser más prolongados.

Administración intermitente

Una de las explicaciones del éxito de los tratamientos intermitentes con prolongados intervalos entre dosis, ha sido la evidencia del retraso del crecimiento bacteriano una vez que las concentraciones del antibiótico decrecen a niveles inferiores a la MIC.

Dado que los betalactámicos inducen PAE de corta duración sobre cocos Gram positivos y prácticamente no inducen PAE sobre bacilos Gram negativos, es que este efecto carece de impacto sobre el diseño de los esquemas de dosificación para este grupo de antimicrobianos. En consecuencia los intervalos entre administraciones no deben ser muy espaciados, sin embargo la evidencia de efectos sub-MIC y la sensibilización a leucocitos, permite que en el intervalo que existe entre dosis los niveles séricos deban hallarse a 2-4 x MIC por lo menos durante un 50 a 80% del intervalo entre dosis. En este caso, las concentraciones sub-MIC no solo dañan de manera no letal a las bacterias que sobreviven y las hacen más susceptibles a los leucocitos, sino que al permitir que éstas reinicien su crecimiento, se tornen sensibles a la siguiente dosis del antibiótico.

Una dosis de aminoglucósidos que garantice un pico de concentración entre 8-10 x MIC seguido de un prolongado intervalo entre dosis (1 día), optimiza la actividad bactericida y la cura bacteriológica al tiempo que minimiza el riesgo de toxicidad inherente a este grupo de antimicrobianos y previene el desarrollo de cepas bacterianas resistentes.

Un régimen posológico de una dosis diaria ha sido propuesto para muchas fluoroquinolonas debido su prolongada semivida de eliminación y a la duración de su PAE.

Administración continua, (¿preparados de depósito?)

Las formas farmacéuticas de depósito o de liberación controlada que garantizan un perfil de concentración plasmática que se asemeja a una infusión a débito constante (cinética de orden cero), presentan algunas desventajas según el tipo de agente antibacteriano. En el caso de los betalactámicos, los niveles suprainhedoros y sostenidos actúan en contra de la actividad del mismo antibiótico, que necesita que las

bacterias se encuentren en fase de crecimiento para poder ejercer su actividad. Además las concentraciones sostenidas actúan como un poderoso factor para eliminar del hábitat a las bacterias sensibles, dejando un nicho ecológico disponible para las bacterias resistentes.

No obstante, hay casos concretos en que las concentraciones suprainhedorias y sostenidas de un antibiótico no solo son prudentes sino también convenientes. Tal es el caso de focos infecciosos localizados en sitios de difícil acceso a los antibióticos, ya sea por deficiente irrigación sanguínea, formación de películas biológicas (biofilms) o en casos de pacientes de alto riesgo; enfermedades crónicas, pacientes inmunocomprometidos y pacientes seniles.

La justificación de este tipo de terapéutica a “niveles sostenidos” en el caso de sitios de difícil acceso, se basa en una limitante farmacocinética. Cuando un fármaco debe llegar a un sitio de difícil acceso o con deficiente irrigación sanguínea, las concentraciones en el sitio de infección no pueden acompañar a los picos y los valles de concentraciones séricas entre administraciones originadas por un esquema posológico intermitente y se tarda mucho en obtener concentraciones estables. Este problema se soluciona con las concentraciones sostenidas que permiten obtener niveles estables en el sitio de infección. En el caso de pacientes de alto riesgo tales como los que padecen enfermedades crónicas o se hallan inmunocomprometidos, la ausencia de respuesta inmunológica obliga a mantener los niveles constantes de antibiótico para garantizar la cura bacteriológica.

Actualmente los casos en los que se aconseja el empleo de concentraciones sostenidas son el tratamiento de pacientes con endocarditis, osteomielitis, meningitis, sospecha de formación de biofilms; clavos intraóseos, férulas y sondas urinarias.

Conclusiones

El entusiasmo originado por el descubrimiento de la penicilina y el origen de la era de los antibióticos hizo creer a la comunidad científica que la guerra contra las enfermedades bacterianas podía ser ganada fácilmente.

Durante los primeros años de esta era fueron significativos los avances en este campo, al punto que en pocos años se descubrieron los grupos de antibióticos que hoy conocemos.

Sin embargo, el uso indebido de los antibióticos facilitó la aparición de cepas resistentes, pero la búsqueda de nuevas moléculas más eficaces empañó la preocupación por la aparición de las resistencias bacterianas. Cabe considerar que cuando para la industria farmacéutica le es menester invertir muchos años y mucho dinero para la investigación y el desarrollo de una nueva molécula con actividad antibacteriana, en lapsos a veces menores a un año ya se ha reportado la aparición de cepas resistentes al mismo.

El porcentaje de cepas bacterianas resistentes se ha incrementado de manera alarmante en los últimos veinte años (Figura 6), razón por la cual desde finales de la década del 70, la comunidad científica está abocada a la revisión de los viejos hallazgos de laboratorio tales como el PAE, el efecto sub-MIC y la participación de la respuesta inmune del hospedador, los que paradójicamente dejados de lado en el momento de haber sido reportados o propuestos, hoy en día son el fundamento de la terapéutica antibiótica de vanguardia.

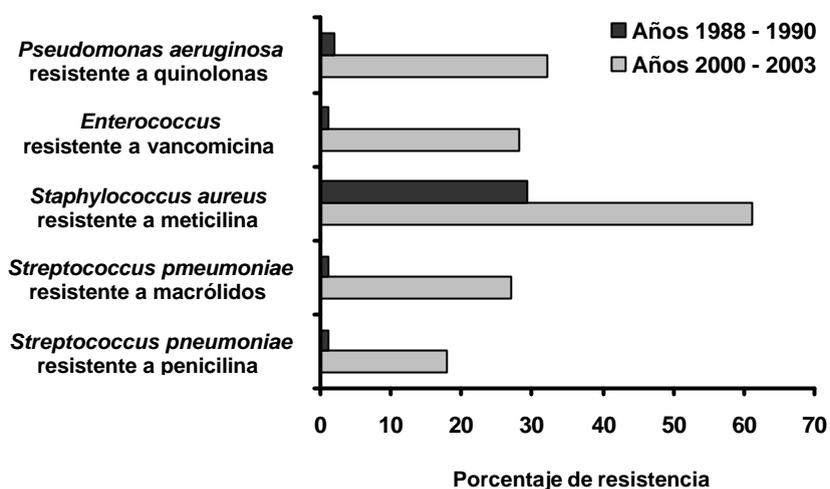


Figura 6. Evolución del porcentaje de algunas cepas bacterianas resistentes entre los años 1988 y 2003.

La moraleja es preocupante; “llegamos siempre demasiado tarde a un mundo demasiado viejo”. Si hay algo que caracteriza a los tiempos que vivimos es que el futuro llega demasiado rápido. Hace 20 años ya se hablaba del inevitable fin de las reservas de petróleo, y es posible que nuestros hijos o nuestros nietos lleguen a vivir en un mundo sin hidrocarburos. Igualmente se hablaba en ese tiempo del agujero de ozono y del efecto invernadero, pero aún así nos sonaba como algo muy distante y lejano, y hoy estamos viviendo las penosas consecuencias de un cambio climático.

Como profesionales de las ciencias médicas debemos tomar conciencia que tras el promisorio avance de la ciencia en materia de terapia antibiótica hace 70 años, al presente siendo muy optimistas nos encontramos solamente frenando el avance de las cepas bacterianas resistentes, y digo optimista porque es posible que la humanidad esté perdiendo posiciones en esta guerra sin cuartel, en la que tarde o temprano las bacterias saldrán vencedoras.

El clínico no está en condiciones de desarrollar esquemas terapéuticos ni de manipular índices PK-PD para optimizar los tratamientos antibióticos. Esto debe quedar reservado para centros de investigación y desarrollo especializados, los que basándose en experiencias rigurosamente controladas dispondrán de evidencia suficiente para proponer esquemas posológicos adecuados con base científica y racional, a fin de optimizar el uso de los agentes antibacterianos disponibles.

Queda en manos del clínico entonces realizar su labor a conciencia, empleando antibióticos cuando sea estrictamente necesario, conociendo o teniendo evidencia del microorganismo actuante y su sensibilidad antibiótica, evitando los tratamientos de “amplio espectro” sin motivo, respetando las dosis, los intervalos entre ellas y las duraciones de los tratamientos.

Referencias bibliográficas

- ? Aldridge, K.E. (2002) Comparison of the post-antibiotic effect (PAE) induced by ceftizoxime, ceftriaxone, cefoxitin, ampicillin-sulbactam, and ticarcillin-clavulanate against selected isolates of *Bacteroides fragilis* and *B. thetaiotaomicron*. *Anaerobe*. 8, 295-299.
- ? Braga, P.C. (1994) Effects of sub inhibitory concentrations of seven macrolides and four quinolones on adhesion of *Staphylococcus aureus* to human mucosal cells. *Chemotherapy*. 22, 304-310.
- ? Craig, W.A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases*. 26, 1-12.
- ? Craig, W.A. and Ebert, S. (1992) Continuous infusion of β -Lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 2577-2583.
- ? Daikos, G.L.; Lolans, V.T. and Jackson, G.G. (1991) Fist-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35: 1, 117-123.
- ? Eagle, H. and Musselman, A. (1949) The show recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *Section on Experimental Therapeutics, National Institutes of Health, U.S. Public Health Service, Bethesda 14 Maryland*. 58, 475-490.
- ? Fuursted, K.; Knudsen, J.D.; Petersen, M.B.; Poulsen, R.L. and Reijn, D. (1997) Comparative study of bactericidal activities, postantibiotic effects, and effects on bacterial virulence of penicillin G and six macrolides against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 4, 781-784.
- ? Kawamura-Sato, K.; Inhumu, Y.; Hasegawa, T.; Horii, T.; Yamashino, T. and Ohta, M. (2000) Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 10, 2869-2872.
- ? Kristian, S.A.; Timmer, a.M.; Liu, G.Y.; LATU, X.; Sal-Man, N.; Rosenfeld, Y.; Shai, Y.; Gallo, R.L. and Nizet, V. (2007) Impairment of innate immune killing mechanism by bacteriostatic antibiotics. *The FASEB Journal*. 21, 1107-1116.
- ? Lorian, V. (1975) Some effects and sub inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bulletin of New York Academy of Medicine*. 51, 1046-1455.
- ? Lorian, V. and Ernst, J., (1987) Effect of antibiotics on bacterial structure and their pathogenicity. *Pathology and Biology*. 1370-1376.
- ? Mehrotra, R.; De Gaudio, R. and Palazzo, M. (2004) Antibiotic pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in critical illness. *Intensive Care Medicine*. 30, 2145-2156.
- ? Odenholt, I. (2001) Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*. 17, 1-8.
- ? Rivas, C.S. (2006) ¿Antibióticos, ayer hoy y mañana...? *Revista Química Viva*. 2, 63-77.
- ? Ronchera-Oms, C.I., Gregorio, S. and Sanllehi, N. (1997) Should continuous infusion of β -lactam antibiotics be the first-line approach? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 22, 159-161.
- ? Shojaee, F.; Aliabadi and Lees, P. (2000) Antibiotic treatment for animal: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*. 14, 307-313.
- ? Spangler, S.K.; Lin, G.; Jacobs, M.R. and Eppelbaum, P.C. (1998) Postantibiotic effect and postantibiotic sub-MIC effect of levofloxacin compared to those of ofloxacin, ciprofloxacin, erythromycin, azithromycin, and clarithromycin against 20 pneumococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 5, 1253-1255.
- ? Toutain, P.L.; Del Castillo, J.R. and Bousquet-Mélou, A. (2002) The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*. 73, 105-114.
- ? Van Bambeke, F.; Tyteca, D.; Ouadrhiri, Y. et Tulkens, P.M. (1999) Optimisation des traitements antibactériens sur base de propriétés pharmacodynamiques des antibiotiques. *Louvain Medicine*. 118, 43-63.
- ? Vidya, K.G.; Mallya, P.S. and Rao, P.S. (2005) Inhibition of bacterial adhesion by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 32 (2), 102-105.
- ? Xiong, Y.Q.; Caillon, J.; Drugeon, H.; Potel, G. and Baron, D. (1996) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40: 1, 35-39.