

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA

ADHERENCIA DE CEPAS DE E.coli EN PACIENTES CON
CIRROSIS EN RELACIÓN AL FACTOR DE RESISTENCIA A
QUINOLONAS

ISABEL GASCÓN ROS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 d'Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- D^a. Marina Herráez Domínguez
- D^a. M^a Dolores Crespo Sánchez
- D. Miguel Pérez – Mateo Regadera
- D^a. Matilde Merino Sanjuán
- D. Carlos Guarner Aguilar

Va ser dirigida per:

Dra. D^a. Virginia Merino

Dr. D. José Such

Dr. D. Joaquín Plazas

©Copyright: Servei de Publicacions
Isabel Gascón Ros

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6093-1

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

FACULTAD DE FARMACIA

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

“Adherencia de cepas de *E. coli* en pacientes con cirrosis, en relación al factor de resistencia a quinolonas”

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Farmacia, presenta:

Isabel Gascón Ros

Valencia, a 26 de Mayo de 2003

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
FACULTAD DE FARMACIA
VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

Dña. Virginia Merino Sanjuán, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia, **D. Joaquín Plazas Ruiz**, Doctor en Farmacia y Jefe de Sección de Microbiología y Parasitología del Hospital General Universitario de Alicante, y **D. José Such Ronda**, Doctor en Medicina y Facultativo Especialista de la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante,

CERTIFICAN:

Que la Memoria para optar al grado de Doctor en Farmacia realizada por D^a **Isabel Gascón Ros**, cuyo título es:

“Adherencia de cepas de E. coli en pacientes con cirrosis, en relación al factor de resistencia a quinolonas”

ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los requisitos para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, a 26 de Mayo de 2003.

Dra. Virginia Merino Sanjuán

Dr. Joaquín Plazas Ruiz

Dr. José Such Ronda

1.4.1. Adherencia bacteriana.....	36
1.4.1.1. Factores de adherencia	37
1.4.2. Resistencia bacteriana a quinolonas fluoradas	45
2. Hipótesis y Objetivos.....	49
3. Materiales y Métodos.....	51
3.1. Ámbito y duración del estudio	51
3.2. Pacientes	51
3.3. Tipo de estudio.....	52
3.4. Variables estudiadas.....	53
3.5. Consideraciones éticas	53
3.6. Protocolo de obtención de muestras.....	54
3.7. Procesado de muestras	55
3.8. Ensayo de adherencia bacteriana.....	56
3.8.1. Preparación de las soluciones de fármaco.....	56
3.8.2. Preparación previa de las cepas de <i>E. coli</i>	56
3.8.3. Ensayo de adherencia.....	57
3.9. Estudio de factores de adherencia.....	58
3.9.1. Prueba de la inhibición de la aglutinación	59
3.9.2. PCR.....	59
3.9.2.a. Extracción ADN bacteriano	61
3.9.2.b. Amplificación genómica.....	62
3.9.2.c. Detección de productos amplificados	66
3.10. Controles	67
3.10.1. Sujetos sanos	67
3.10.2. Ratas con cirrosis inducida.....	67
3.11. Análisis estadístico de los resultados.....	68
4. Resultados.....	69
4.1. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes	69
4.2. Características de las cepas aisladas.....	73

4.3. Estudio de adherencia bacteriana.....	73
4.4. Estudio de factores de adherencia bacteriana.....	78
5. Discusión	83
6. Resumen y Conclusiones	93
7. Bibliografía	97

ANEXO

BGN: Bacilo Gram negativo

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

Cols.: Colaboradores

DIS: Descontaminación intestinal selectiva

DS: Desviación estándar

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

FA: Factores de adherencia

LA: Líquido ascítico

MEM: Medio mínimo esencial

NOR: Norfloxacino

P₂₅: Percentil 25

P₇₅: Percentil 75

pb: Pares de bases

PBE: Peritonitis bacteriana espontánea

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QF: Quinolonas fluoradas

RQ: Resistente a quinolonas

RR: Riesgo relativo

SBI: Sobrecrecimiento bacteriano intestinal

SQ: Sensible a quinolonas

SRE: Sistema retículo endotelial

Introducción

Los pacientes cirróticos presentan infecciones bacterianas con una frecuencia superior a la observada en la población no hepatópata, gravadas, además, con una superior morbi-mortalidad (1). Se ha identificado una serie de pacientes con características de alto riesgo que podrían desarrollar un episodio de peritonitis bacteriana espontánea (PBE), infección más característica y,

Introducción 2

probablemente, mejor estudiada de estos pacientes. Dichos grupos de riesgo están constituidos por pacientes con hemorragia digestiva (2), pacientes que ya han presentado un episodio previo de infección de líquido ascítico (LA) (3), y pacientes con proteínas bajas en LA (4), aunque la consideración de grupo de riesgo de los pacientes incluidos en esta última categoría ha sido objeto de algunos debates (5).

La mayor parte de las infecciones bacterianas en estos pacientes están causadas por gérmenes de origen entérico, fundamentalmente bacilos Gram negativos (BGN) entre los que *E. coli* ocupa un papel predominante. Por esta razón, se utiliza con frecuencia la profilaxis antibiótica con norfloxacino para reducir la población intestinal de BGN y así disminuir la incidencia de estas infecciones, con buenos resultados e incluso con ventajas económicas asociadas (6). Sin embargo, la administración de norfloxacino a largo plazo en pacientes en situación de riesgo conduce a la aparición frecuente de gérmenes resistentes a las quinolonas (RQ) (7), y al desarrollo de infecciones debidas mayoritariamente a gérmenes Gram positivos, aunque en estudios recientes haya aumentado la proporción debida a BGN RQ (8-10). El comportamiento clínico de estos últimos microorganismos no es diferente al de las cepas sensibles a quinolonas (SQ) y no presentan resistencia cruzada con cefotaxima, que es el antibiótico más comúnmente utilizado en pacientes con PBE.

En un estudio de nuestro grupo la aparición de resistencias en BGN de flora fecal ascendió al 43% para pacientes que habían recibido norfloxacino como profilaxis primaria o secundaria de infecciones bacterianas. Asimismo, el 42% de los pacientes que recibieron norfloxacino durante la hospitalización y que en los que los cultivos iniciales no mostraron cepas de *E. coli* RQ las desarrollaron durante la hospitalización (7). Sin embargo, tanto en nuestra serie como en otras publicadas, las infecciones provocadas por gérmenes RQ son un hecho poco

frecuente. En un artículo publicado por Llovet y cols. sobre los microorganismos aislados en una gran serie de episodios de infección de LA, sólo 3 de los 229 episodios fueron debidos a cepas RQ (11). No obstante, esto está cambiando en las series más recientes debido, probablemente, a la larga duración de los tratamientos profilácticos actuales.

En la literatura no existen datos que expliquen por qué aquellos pacientes en los que se detecta la presencia de gérmenes RQ en heces, no desarrollan con la frecuencia esperable infecciones por dichos gérmenes, excepto aquellos en tratamiento con quinolonas a muy largo plazo (9), en los que se podría considerar la posibilidad de sobrecrecimiento bacteriano de dichas cepas, al desarrollarse en un ecosistema adecuado.

Se ha descrito que la presencia de concentraciones subinhibitorias de determinados antibióticos, tales como las quinolonas fluoradas, disminuye significativamente el grado de adherencia bacteriana a células epiteliales (12-14). Este efecto parece ser debido a alteraciones en el proceso de síntesis de los factores implicados en la adherencia, tales como la síntesis proteica fimbrial (15).

En los pacientes cirróticos que están recibiendo de forma continua norfloxacin como profilaxis primaria o secundaria de infecciones de LA se plantea una situación paradójica. El desarrollo de cepas de BGN RQ es un acontecimiento muy frecuente y precoz (7;16), y sin embargo, como hemos detallado previamente, las infecciones de LA por gérmenes RQ es relativamente infrecuente (11). Por tanto, estos pacientes -en los que no se investiga de forma rutinaria el desarrollo de cepas de BGN RQ en heces- generalmente continúan recibiendo norfloxacin de forma indefinida, a pesar de que algunos de ellos han desarrollado cepas RQ. El efecto de concentraciones persistentes de norfloxacin en la luz intestinal sobre cepas RQ podría estar dificultando la

Introducción 4

capacidad de adherencia de las mismas a las células epiteliales, lo que podría explicar en parte la eficacia terapéutica de las quinolonas fluoradas en esta situación clínica.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1. CIRROSIS Y PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA

La cirrosis es una enfermedad crónica e irreversible del hígado, caracterizada desde el punto de vista anatomopatológico por una fibrosis difusamente distribuida por todo el parénquima hepático y con alteración de la estructura normal del mismo, por formación de nódulos de regeneración (17). El pronóstico de la enfermedad es grave y los pacientes generalmente fallecen por complicaciones relacionadas con la hipertensión portal, como hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas o síndrome hepatorenal, insuficiencia hepática, degeneración neoplásica o infecciones bacterianas.

En España, las causas más frecuentes de cirrosis en los adultos son el alcohol, el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B. Causas menos frecuentes son la cirrosis biliar primaria, la hemocromatosis, la enfermedad de

Antecedentes 6

Wilson y la hepatitis autoinmune, entre otras. En ocasiones, un mismo paciente puede presentar más de un factor etiológico de cirrosis, en especial alcohol e infección crónica por el virus de la hepatitis C.

El diagnóstico se realiza en algunas ocasiones en fase asintomática u oligosintomática antes de que el paciente haya presentado complicaciones mayores de la enfermedad. En esta fase se habla de *cirrosis compensada*. En otras ocasiones, el diagnóstico de la enfermedad se realiza cuando el paciente presenta alguna de las complicaciones mayores propias de esta patología y que son consecuencia de un fallo hepatocelular progresivo y/o del desarrollo de hipertensión portal, como ascitis, hemorragia digestiva por varices esofágicas, síndrome hepatorrenal, síndrome hepatopulmonar, infecciones bacterianas o encefalopatía hepática. Es en estas situaciones cuando se habla de *cirrosis descompensada*.

Tanto los mecanismos que intervienen en la cirrosis como sus manifestaciones se han estudiado en profundidad, pero todavía quedan muchas dudas por resolver y en especial, algunas relacionadas con los mecanismos implicados en el desarrollo de las complicaciones de la enfermedad.

Una de las complicaciones de la cirrosis mejor definida y que más interés ha suscitado es la PBE (18;19), que, aun no siendo la más frecuente, aparece entre un 10 y un 30% de los pacientes cirróticos que ingresan en un hospital (20), de las cuales aproximadamente la mitad se diagnostican en el momento del ingreso, y el resto se consideran nosocomiales (21-23).

La PBE se define como una infección del líquido ascítico asociada a un recuento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en líquido ascítico $\geq 250/\text{mm}^3$, en ausencia de un foco de sepsis intraabdominal tratable quirúrgicamente

(1;24;25). Esta complicación ocurre casi exclusivamente en los pacientes cirróticos, pero también puede presentarse en niños con síndrome nefrótico, en hepatitis víricas graves y en ascitis por insuficiencia cardíaca o por metástasis hepáticas masivas (26).

Se trata de una infección monomicrobiana producida en su mayor parte por BGN, de los que *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son los gérmenes más frecuentemente aislados (27-29), y en un 25% se han encontrado episodios de PBE producidos por cocos Gram positivos, especialmente estreptococos. Esta incidencia se ha podido ver aumentada en los últimos tiempos debido a la descontaminación intestinal selectiva (DIS) con quinolonas fluoradas que suprimen la flora bacteriana Gram negativa y reducen la incidencia de PBE. El hallazgo de microorganismos anaerobios es, sin embargo, un evento infrecuente y se relaciona con otro tipo de peritonitis secundaria a tratamiento quirúrgico (1;30).

La mortalidad de la PBE, anteriormente a la aparición de las cefalosporinas de 3ª generación, era muy elevada, llegando a alcanzar niveles de mortalidad del 80-90% (31-35). Actualmente la supervivencia ha mejorado notablemente situándose por encima del 70% (21;22;36;37) y esto es debido a diversos factores entre los que cabe destacar, el diagnóstico precoz de la PBE gracias a la realización de paracentesis diagnósticas, y a la estandarización de los criterios diagnósticos de la PBE, considerándose criterio suficiente de inicio de tratamiento empírico un recuento de PMN en líquido ascítico $\geq 250/\text{mm}^3$ (19;24;38-40).

Sin embargo, el factor que más ha influido en el aumento espectacular de la supervivencia ha sido el abandono de los tratamientos previos de doble terapia, que asociaban un β -lactámico (ampicilina o cefalosporina de 2ª

Antecedentes 8

generación) a un aminoglucósido (41). Esta combinación, además de demostrar una escasa eficacia terapéutica, con tasas de curación del 50-60% de los episodios infecciosos (35;42), llevaba consigo una alta nefrotoxicidad relacionada con el uso de los aminoglucósidos, efecto este que resultaba potenciado en caso de asociaciones con cefalotina (41;42). Esta pauta de tratamiento fue sustituida por monoterapia con cefotaxima (36), cefalosporina de 3ª generación no nefrotóxica (43) y que presentaba una adecuada penetración en líquido ascítico (44;45). En los estudios realizados por Felisart y cols. (36) en 1985 ya se consiguió una tasa de curación de los episodios de PBE del 85% frente a un 56% con la terapia combinada anterior. Éste hecho fue corroborado con varios estudios posteriores (45-47) y ha hecho que, desde entonces, la cefotaxima sea el tratamiento empírico de elección para la PBE. Respecto a las dosis y la duración del tratamiento se han realizado múltiples estudios en los que se ha demostrado eficaz la administración intravenosa de 2g cada 12 horas durante 5 días, incluso en el caso de bacteriemia (45;47).

Además de la cefotaxima, se han probado otras cefalosporinas tales como la ceftriaxona (48-50), cefonicid (48) y ceftazidima (51), demostrándose para todas ellas una eficacia similar a la primera. El mismo resultado se obtuvo al administrar amoxicilina-clavulánico (1g/200mg) intravenoso con un coste económico significativamente inferior (52;53). En el caso del aztreonam, sin embargo, no se consiguió una buena eficacia y se asoció a un mayor número de sobreinfecciones (54). En cuanto a terapia oral, se han probado diversos fármacos en pacientes con PBE no complicada, obteniéndose buenos resultados para la combinación de una quinolona fluorada (pefloxacino) con otros antibióticos orales (55) y para el caso del ofloxacino oral respecto de la cefotaxima intravenosa (23). Estas pautas orales con quinolonas fluoradas de elevada biodisponibilidad, tales como el ofloxacino, se podrán administrar solo

en el caso de pacientes con PBE no complicada y que no hayan recibido quinolonas como profilaxis, o bien en casos de alergia a los β -lactámicos.

Por otro lado, en pacientes con cirrosis y PBE se ha comprobado que el tratamiento con albúmina intravenosa añadida al antibiótico reduce la incidencia del fracaso renal y muerte en comparación con el tratamiento antibiótico sólo (56).

A pesar de todos estos avances en el diagnóstico y tratamiento de la PBE, y aunque la mortalidad inmediata puede considerarse casi nula, la morbilidad sigue siendo muy alta y un número significativo de pacientes desarrollarán complicaciones relacionadas con la infección que condicionan una mortalidad hospitalaria del 30%, independientemente de la eficacia de la cefotaxima (21;22;36).

El pronóstico a largo plazo de los pacientes que sobreviven a un primer episodio de PBE está demostrado que es extremadamente malo y debe plantearse la posibilidad de un trasplante hepático si no existen contraindicaciones (57;58). Entre un 40 y un 70% de los pacientes que han sobrevivido a un episodio de PBE, desarrollarán uno nuevo en el plazo de un año (3;59;60), y se estima que la probabilidad de supervivencia a 1 y 2 años tras un episodio de PBE, es del 30 y 20% respectivamente (61;62).

1.2. PATOGENIA DE LA PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA

1.2.1. Acceso de bacterias al líquido ascítico

1.2.1.1. *Motilidad intestinal y sobrecrecimiento bacteriano intestinal*

La cirrosis, junto con la hipertensión portal que conlleva, desencadenan una serie de complicaciones tales como el edema de pared intestinal (63-66) y la neuropatía autonómica (67;68). En especial esta última, afecta de manera

importante a la motilidad del intestino delgado produciendo un enlentecimiento del tránsito intestinal. Este hecho se ha comprobado en estudios realizados tanto en modelos experimentales con ratas cirróticas (69) como en pacientes cirróticos (70). Además, se ha descrito una alteración en la duración de las fases del complejo motor interdigestivo junto con ciclos de contracciones anormales que aunque en algunos estudios no se relacionan con el grado de afectación hepática (71), en otros más recientes (72) sí aparece una relación clara entre ambos.

En individuos sanos el intestino delgado se encuentra colonizado por pocas bacterias, siendo en su mayoría *Lactobacillus sp*, *Enterococcus sp*, cocos Gram positivos aerobios y anaerobios facultativos en concentraciones alrededor de 10^4 bacterias/ml. En el caso de los coliformes la concentración raramente sobrepasa las 10^3 bacterias/ml y es difícil encontrar microorganismos anaerobios en esta parte del intestino. En condiciones normales existen distintos mecanismos que previenen el sobrecrecimiento de estas bacterias en intestino delgado, tales como el peristaltismo, el ácido gástrico del estómago, las enzimas proteolíticas del intestino delgado, el moco intestinal, la integridad de la válvula ileocecal y un correcto funcionamiento del sistema inmunitario (73-77). En el momento que se produce una alteración en alguno de estos factores puede producirse un crecimiento bacteriano excesivo que se denomina sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) y que se caracteriza principalmente por la colonización del intestino delgado por flora bacteriana colónica. Este es el caso de patologías como la cirrosis, en la que se dan varios de estos factores predisponentes para que tenga lugar un SBI.

Así, en algunos pacientes cirróticos se ha comprobado una colonización del intestino delgado por flora bacteriana que normalmente está localizada en colon (78-81). En un estudio realizado por Casafont y cols. (82) se observó la

presencia de SBI en un 30% de los pacientes con cirrosis y una mayor frecuencia de SBI (48%) en los pacientes con estadios más evolucionados de la enfermedad. Un tercio de los pacientes con SBI desarrollaron PBE durante el seguimiento posterior, mientras que sólo un 9% de aquellos con ausencia de SBI presentaron esta complicación. Siguiendo con esta misma línea de investigación, Chang y cols. (81) demostraron que la incidencia de SBI era mayor en los pacientes cirróticos con PBE, y que las disfunciones de la motilidad intestinal eran más graves si existía historia previa de PBE. En modelos experimentales con ratas cirróticas se comprobó que prácticamente la totalidad de las bacterias que habían traslocado a ganglios linfáticos mesentéricos se encontraban en número excesivo en intestino (83) y que ambos fenómenos coincidían con el enlentecimiento del tránsito gastrointestinal (84). Por lo tanto, la presencia de SBI es, probablemente, un requisito previo para que se produzca la traslocación bacteriana y la PBE en el contexto de la cirrosis. Así mismo, un tránsito intestinal enlentecido parece ser una de las causas principales de la aparición de SBI en estos pacientes.

Puesto que el SBI y la alteración en el tránsito intestinal en la cirrosis son hechos relacionados, se han ensayado distintos fármacos procinéticos en ratas cirróticas, como es el caso de cisaprida (fármaco antagonista de receptores 5HT-4). En estos estudios la administración del fármaco se asoció a una disminución del contenido bacteriano yeyunal total, y en especial de *E. coli*, junto con una reducción de la traslocación a ganglios linfáticos mesentéricos. En pacientes cirróticos con tránsito intestinal enlentecido y SBI, la administración de cisapride logró igualmente una disminución importante tanto del tiempo de tránsito orocecal como del contenido bacteriano yeyunal (85). En otro estudio similar con animales se estudió el efecto de un β -bloqueante como el propranolol, observándose un aumento en la velocidad del tránsito intestinal junto con una disminución del SBI y de la traslocación bacteriana (86). Estos hallazgos

sugieren una posible utilidad de los fármacos procinéticos como tratamiento coadyuvante o alternativo a la DIS con antibióticos en la profilaxis de la PBE, sin embargo no existen estudios prospectivos que avalen dicha hipótesis.

En la cirrosis, además de un retardo en el tiempo de tránsito intestinal, hay una respuesta inmune alterada que, a nivel del intestino, se traduce en una disminución en la síntesis local y secreción biliar de IgA (87). El papel de estas inmunoglobulinas es dificultar la adherencia de las bacterias a las células intestinales, evitando así la penetración de las mismas a través de la mucosa (88;89) y bloquear la liberación de toxinas (90), por lo que una disminución en la respuesta inmune a este nivel se considera otro de los factores implicados en la aparición del SBI.

Según lo expuesto, en los pacientes cirróticos existe una conjunción de situaciones estrechamente relacionadas entre sí, y sólo conocidas parcialmente. En este caso, tanto una motilidad intestinal alterada como el déficit de IgA han demostrado que juegan un papel fundamental en el desarrollo del SBI y, en consecuencia, de la PBE, aunque probablemente existan otros factores implicados en la patogenia del mismo.

1.2.1.2. Permeabilidad intestinal

El concepto de permeabilidad se relaciona con la propiedad que posee una membrana para permitir el paso de solutos a su través. Sin embargo el intestino tiene la capacidad de impedir la entrada masiva de los mismos y de otros elementos extraños. Es decir, posee al mismo tiempo una función absorbente y una función barrera.

En la medida de la permeabilidad del intestino delgado se han usado diferentes test. En la práctica clínica, los métodos empleados para medir la

permeabilidad *in vivo*, se basan en la cuantificación de una o dos moléculas (cuya elección depende del test utilizado) que aparecen en orina tras su administración oral. Los resultados obtenidos en pacientes cirróticos son dispares, aunque parece detectarse una tendencia a que exista un aumento de la permeabilidad intestinal en estos pacientes (91-95).

Las alteraciones en la función barrera del intestino se han relacionado con varios procesos patológicos entre los que se encuentra la cirrosis. En esta patología la presencia de hipertensión portal está asociada a alteraciones tanto morfológicas como funcionales de la barrera intestinal, y que condicionan un aumento de la permeabilidad de la mucosa para macromoléculas (63;96).

A nivel macroscópico dichas alteraciones se caracterizan por la aparición de congestión vascular y edema de la pared intestinal (97;98), probablemente derivados de una mala perfusión de la mucosa intestinal y de la consiguiente hipoxia. La presencia de este edema se ha podido apreciar incluso por métodos radiológicos como es el caso de la tomografía axial computerizada abdominal (63;65).

Estudios microscópicos del epitelio intestinal demuestran una congestión vascular en la lámina propia (99;100), junto con un aumento del número y tamaño de los vasos (97;101) y un engrosamiento de la pared de los mismos (101;102). Se ha descrito la existencia de edema intracelular (100;102) con aumento del espacio intercelular (98). En un estudio reciente realizado por nuestro grupo (103), hemos observado la existencia de un aumento del espacio intercelular junto con la presencia de "tight junctions" morfológicamente intactas y una disminución de la altura y grosor del ribete vellositario respecto de los controles. En general, en la mayoría de estos estudios no se ha encontrado una correlación entre la aparición de estas alteraciones y el grado de hipertensión

portal y/o la gravedad de la hepatopatía. Sin embargo, sí se ha relacionado la presencia de antecedentes de descompensación de la hepatopatía (PBE, ascitis y encefalopatía hepática) con la existencia de una permeabilidad intestinal aumentada (104).

Por otro lado, se ha observado experimentalmente que la endotoxina incrementa la permeabilidad intestinal (105) y produce además una alteración de las respuesta inmune (106). En pacientes cirróticos se ha observado que la presencia de endotoxemia sistémica está asociada, sobre todo, a la presencia en dichos pacientes de ascitis y de enfermedad hepática avanzada (107).

Todos estos fenómenos se pueden ver agudizados durante los episodios de hemorragia digestiva alta debido a la hipoxia de la pared intestinal, facilitando considerablemente el paso de bacterias o sus productos a la circulación portal (108). De hecho, se ha demostrado una incidencia elevada de traslocación bacteriana en ratas con hipertensión portal crónica (109) y en ratas cirróticas con shock hemorrágico (110).

Por lo tanto, en pacientes cirróticos existe una alteración de la estructura y función de la pared intestinal, que podría explicar el incremento en la permeabilidad de la barrera intestinal y que facilitaría, teóricamente, la traslocación de bacterias a través del epitelio intestinal que tiene lugar en muchos de estos pacientes. No hay, sin embargo, estudios que demuestren que estos parámetros estén relacionados entre sí.

1.2.1.3. Hipótesis de la traslocación bacteriana

El tracto gastrointestinal, además de ser un sistema de digestión y absorción de nutrientes, realiza una importante función de protección contra los patógenos intraluminales, evitando su paso a la circulación sistémica.

La barrera intestinal está formada por células epiteliales unidas entre sí en la zona apical por las "tight junction", de cuya integridad depende el paso de partículas procedentes de la luz intestinal a través de las células y los canales paracelulares. El correcto mantenimiento de este sistema viene regulado por una serie de mecanismos inmunológicos entre los que se encuentran las placas de Peyer de la pared intestinal, linfocitos, macrófagos e IgA local y biliar, que aportan una especial línea de defensa. Si, a pesar de todo ello, existen partículas o microorganismos que han conseguido evadir esta barrera, existe un segundo escalón formado consecutivamente por los nódulos linfáticos espláncnicos, las células de Kupffer y las células endoteliales del sinusoides hepático, que actuarán de defensa impidiendo su paso a la circulación sistémica (111).

La *traslocación bacteriana* es un fenómeno conocido como el paso de bacterias viables desde la luz intestinal a través del epitelio del tracto gastrointestinal hacia otras localizaciones del organismo, especialmente los ganglios linfáticos mesentéricos, sin que haya rotura aparente de la pared abdominal. Este concepto fue definido la primera vez en 1979 por Berg (112) y posteriormente fue redefinido por Alexander como el paso de gérmenes viables y no viables, y productos bacterianos como la endotoxina, a través de una barrera intestinal que, en apariencia, presenta una anatomía intacta (113). En dicho trabajo demostró en un modelo animal la presencia de microorganismos y toxinas bacterianas en el interior de los enterocitos, cuya morfología estaba aparentemente inalterada. En base a los resultados obtenidos, parece ser que la vía de entrada más utilizada es la transcelular.

En estudios posteriores realizados por Ding (114) se consiguió aislar también *E. coli* en el interior de los enterocitos, pero en este caso el mecanismo

de paso a través de la mucosa parece que fue diferente de la fagocitosis y exocitosis clásica, teniendo lugar dicho episodio en la parte superior de las vellosidades.

Los mecanismos por los cuales se produce la traslocación todavía no se conocen con exactitud, pero lo que sí se ha demostrado en diversos estudios es la aparición de este fenómeno en determinadas circunstancias patológicas (115) tales como ictericia obstructiva (116), shock hemorrágico (117;118), endotoxemia (119), grandes quemados (120), obstrucción intestinal (121) o nutrición parenteral (122).

De todo ello se deduce que la traslocación bacteriana es el resultado de una serie de factores tales como (115;123):

1. Alteraciones en el *equilibrio ecológico intestinal* por variación de la composición de la flora intestinal normal y aumento anormal del número de bacterias (116), tal y como sucede en el sobrecrecimiento bacteriano con colonización de tramos altos de yeyuno, enlentecimiento del tránsito intestinal o inoculación experimental de bacterias.
2. Deficiencias en el *sistema inmunitario local y sistémico*, como consecuencia de determinadas patologías o secundario a tratamiento farmacológico (114).
3. Aumento de la *permeabilidad de la mucosa intestinal* por lesión de los enterocitos y/o reducción del flujo sanguíneo, lo que probablemente conllevaría fenómenos de peroxidación lipídica de la mucosa, secundarios a la hipoxia del tejido (124).

Por tanto, como consecuencia de este fenómeno de traslocación bacteriana, se produciría la colonización de áreas extraintestinales tales como ganglios linfáticos mesentéricos, hígado, bazo, riñón y sangre portal.

En base a lo expuesto, se ha postulado que los casos de sepsis por bacilos Gram negativos sin foco infeccioso aparente en pacientes críticos, podrían estar en relación con la traslocación bacteriana de gérmenes desde la luz intestinal a la circulación sistémica y a otras localizaciones, contribuyendo así al desarrollo del fallo multisistémico posterior (125;125-128).

Sin embargo, el estudio en humanos de la traslocación bacteriana presenta muchos problemas (129) puesto que se precisa del cultivo de ganglios linfáticos mesentéricos para su diagnóstico. Así, existen pocos estudios de este tipo y los resultados obtenidos hasta el momento resultan un tanto contradictorios, ya que mientras en algunos queda plenamente demostrado la relación entre cultivos positivos de ganglios mesentéricos y una mayor incidencia de sepsis (130-132), en otros no existe dicha relación (133) y/o no es posible aislar gérmenes de los tejidos analizados (134;135). Por lo tanto, el significado real y las consecuencias clínicas de la traslocación bacteriana no están todavía bien establecidas.

Al igual que sucede en los pacientes críticos, en los cirróticos también tiene lugar el fenómeno de la traslocación bacteriana, siendo éste uno de los mecanismos fundamentales en la patogenia de la PBE.

En la cirrosis la mayoría de infecciones son producidas por gérmenes aerobios Gram negativos, por lo que se supone que el origen de los mismos es el propio intestino del paciente. Aproximadamente entre el 67 y el 89% de los casos de PBE la bacteria aislada es un bacilo aerobio Gram negativo,

mayoritariamente *Escherichia coli* (4;27;28;38). Es raro que se produzca la infección por microorganismos anaerobios, pese a ser la flora predominante en el intestino, probablemente debido a que la traslocación de éstos a través de la pared intestinal está dificultada por la elevada saturación de oxígeno de la pared intestinal (136;137).

En modelos experimentales de cirrosis inducida se ha detectado traslocación bacteriana a ganglios linfáticos mesentéricos en el 45-78% de las ratas cirróticas con ascitis que fueron laparotomizadas frente a un 5% en ratas control (138-141). Además en la mayoría de estos estudios se ha demostrado que prácticamente todas las ratas con cirrosis y PBE, presentaron traslocación bacteriana en el momento de su sacrificio. La presencia de ascitis en estos casos parece ser un requisito importante en el desarrollo de la traslocación bacteriana, tal y como demuestran en su trabajo García-Tsao y cols. (141), en el cual sólo se detectó traslocación en ratas cirróticas con ascitis.

En un estudio realizado por Llovet y cols. (142) se ha demostrado la identidad genética de las bacterias cultivadas de la luz intestinal, de los ganglios mesentéricos y del líquido ascítico en la rata con cirrosis. Por tanto, el papel de la traslocación de bacterias de la luz intestinal a los ganglios mesentéricos parece ser fundamental en la patogenia de la PBE y, en general, de la mayoría de infecciones bacterianas en la cirrosis.

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado recientemente un método basado en la amplificación genómica mediante PCR para detectar ADN bacteriano en sangre y líquido ascítico. Mediante este método se ha comprobado la presencia de ADN bacteriano en aproximadamente el 40% de los pacientes con cirrosis y ascitis, lo que se ha interpretado como la demostración molecular de la traslocación bacteriana (143).

1.2.2. Sistema inmunitario del paciente cirrótico

En la cirrosis existe una respuesta inmune disminuida tanto a nivel local como sistémico, lo cual facilitaría que bacterias traslocadas desde la luz intestinal podrían alcanzar la circulación sistémica e infectar otros órganos y tejidos. Así, un sistema inmune alterado se considera un factor importante en la patogénesis de la PBE (144).

En pacientes cirróticos la alteración en la actividad de los macrófagos intestinales favorecería, junto con otros factores, la traslocación de bacterias a nódulos linfáticos mesentéricos. En condiciones normales éstos deberían ser capaces de eliminar dichas bacterias, pero en esta patología es frecuente el paso de microorganismos a la circulación sistémica (140).

Una vez que las bacterias alcanzan el torrente circulatorio son reconocidas y opsonizadas por el sistema bactericida inespecífico (IgG y C3) (145), hasta su destrucción por los neutrófilos y macrófagos circulantes (146). Sin embargo, en el contexto de la cirrosis se han descrito distintas anomalías en los sistemas humoral y celular, tales como alteraciones en la quimiotaxis, actividad bactericida y en la capacidad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) (147-150). Uno de los mecanismos implicados en el mal funcionamiento de los neutrófilos parece ser la reducida producción de metabolitos oxidativos (148). In vitro se ha conseguido compensar estas alteraciones de los PMN mediante la utilización de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (151), aunque su utilidad clínica no está demostrada.

Los macrófagos, por otro lado, constituyen la primera línea de defensa frente a la presencia de agentes externos, realizando una importante función de

reconocimiento y eliminación de los organismos unidos a la IgG localizados en la cavidad peritoneal (152), hígado (153) y bazo (154). Sin embargo, en pacientes con cirrosis biliar primaria (155) se ha descrito un defecto en el funcionamiento del receptor Fc-gamma de los macrófagos. Similares resultados obtuvieron Gómez y cols. (156) en otro estudio posterior en pacientes con cirrosis alcohólica, por lo que podría ser una de las causas predisponentes para el desarrollo de infecciones bacterianas en estos pacientes.

En condiciones normales, aquellas bacterias que alcanzan la circulación sistémica son eliminadas por el sistema mononuclear fagocítico, también llamado sistema retículoendotelial (SRE), localizado principalmente en el hígado y representado fundamentalmente por las células de Kupffer (157). Tal y como demostraron Rimola y cols. en 1984 (158), en cirróticos la capacidad funcional del SRE está disminuida de manera importante respecto a los sujetos sanos. En un estudio posterior realizado por Bolognesi y cols., se relacionó una mayor gravedad de la enfermedad hepática con un incremento de la disfunción del SRE, así como con un mayor riesgo de bacteriemia y/o PBE, unido a una disminución en la supervivencia de estos pacientes (159).

Por otro lado, esta disminución en la funcionalidad del SRE podría estar relacionada con un incremento de los shunts porto-sistémicos que se producen como consecuencia de la hipertensión portal, ya que evitan el paso de las bacterias circulantes a través del hígado y, por tanto, su encuentro con las células Kupffer. Esta capacidad disminuida para eliminar bacterias parece ser que favorece la aparición de episodios prolongados de bacteriemia, aumentando de esta forma la probabilidad de invasión bacteriana de tejidos y del líquido ascítico y, consecuentemente, aumentando las posibilidades de desarrollar una PBE (158).

Tal y como se resume en la figura siguiente (**Figura 1.1**), el desarrollo de un episodio de PBE no es monofactorial, sino que, como ya hemos expuesto, se necesita la intervención de una serie de factores predisponentes entre los que destacan el sobrecrecimiento bacteriano intestinal, la alteración en la permeabilidad intestinal, la traslocación bacteriana y la presencia de un sistema inmunitario alterado.

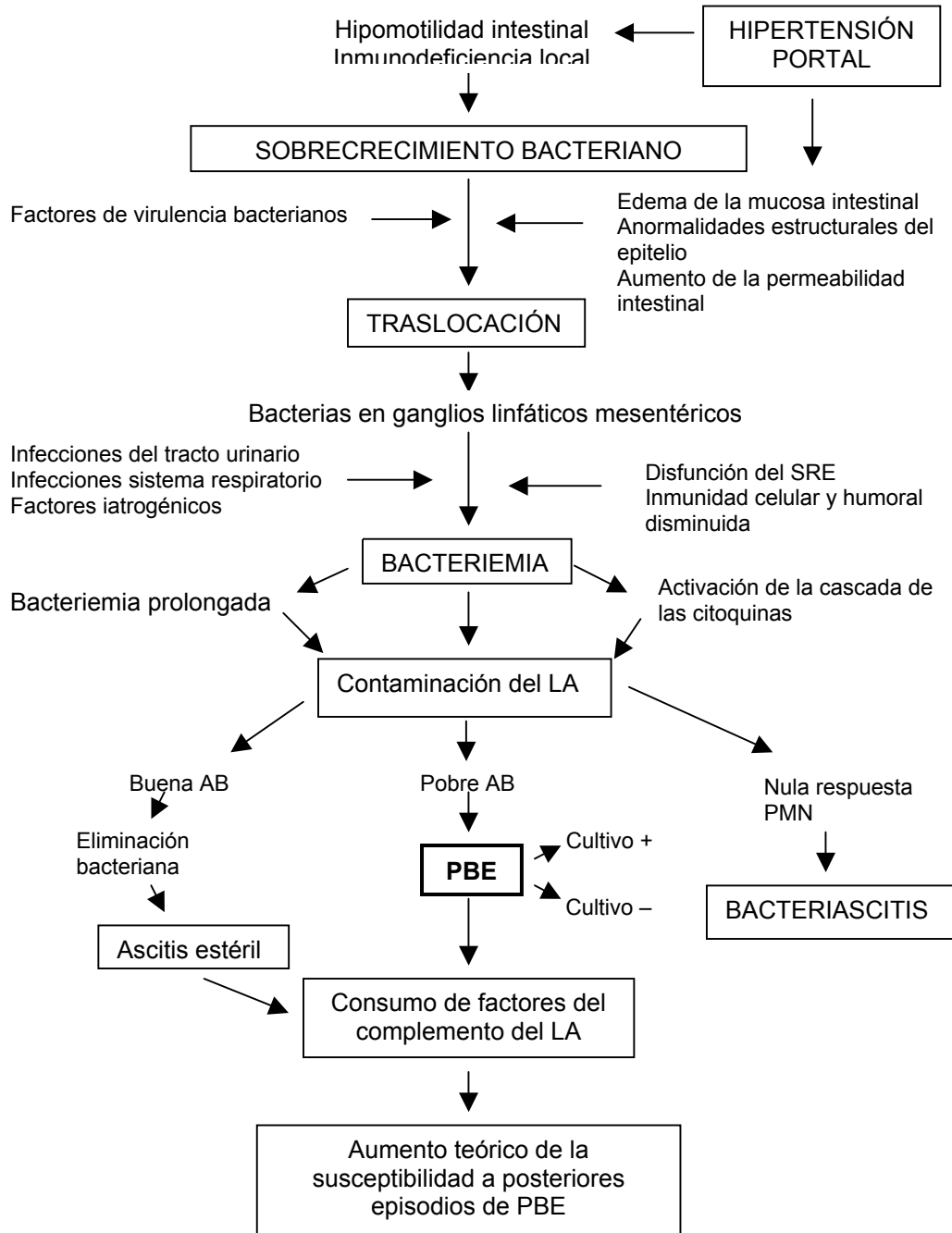


Figura 1.1. Esquema de los mecanismos implicados en la patogénesis de la PBE.

SRE, sistema retículoendotelial; LA, líquido ascítico; PMN, polimorfonucleares; AB, actividad bactericida; PBE, peritonitis bacteriana espontánea.

1.3. PROFILAXIS DE LA PERITONITIS BACTERIANA ESPONTÁNEA

Las infecciones bacterianas, entre las que se encuentra la PBE, constituyen una complicación importante y frecuente de la cirrosis hepática (38). Por tanto, resulta interesante profundizar en el estudio de métodos eficaces para su prevención, siendo la profilaxis con antibióticos el único método aprobado para su uso en la práctica clínica.

La PBE está producida fundamentalmente por bacterias Gram negativas aerobias facultativas de origen entérico (24;38;160), por lo que el método profiláctico más utilizado es la administración de antibióticos orales que inhiban selectivamente el crecimiento de dichas bacterias en la flora intestinal (161-167) y disminuyan en lo posible el fenómeno de la traslocación bacteriana.

Este proceso de DIS se ha utilizado ampliamente en la prevención de la PBE en cirróticos (27;161;163;166;167) y posee una gran relevancia clínica, aunque no puede eliminar los factores propios de estos pacientes críticos cuyas condiciones resultan especialmente favorables para la traslocación de bacterias. Se han ensayado diferentes antibióticos (161;164;166-168), pero ha sido el norfloxacino el mayoritariamente aceptado como fármaco de primera elección para instaurar una pauta profiláctica en este tipo de pacientes (20).

La experiencia existente con norfloxacino demuestra una importante reducción de la incidencia de traslocación bacteriana y de PBE por BGN, tanto en modelos experimentales con ratas cirróticas (110;169) como en pacientes sometidos a DIS con esta fluorquinolona (2;3;170).

Además, existen una serie de medidas generales encaminadas a mejorar el estado del paciente cirrótico y que podrían prevenir el desarrollo de una PBE. Entre ellas se encuentran la mejoría del estado nutricional, abstinencia de alcohol, reducción del riesgo de hemorragia gastrointestinal y de desarrollo de ascitis, así como el tratamiento diurético para reducir el volumen de líquido ascítico.

También se ha estudiado el efecto que tiene la preservación de la integridad de la pared intestinal en la prevención de la traslocación de bacterias (171;172). Los ensayos realizados con nutrición enteral demuestran una menor incidencia de dicho fenómeno debido al papel protector de ésta sobre la mucosa intestinal (173). En humanos los estudios realizados han sido en pacientes críticos, donde esta hipótesis ha sido corroborada al demostrarse la ausencia de complicaciones sépticas (125;174;175).

Se ha estudiado, por otra parte, el efecto de la preservación de la flora intestinal mediante la administración de *Lactobacillus sp.* junto con la DIS con norfloxacino en la prevención de la PBE. Los lactobacilos son parte importante en la composición de la flora intestinal y están implicados en el metabolismo (176;177), pero además poseen actividad antimicrobiana por liberación de bacteriocinas y otras sustancias y metabolitos en el tracto intestinal (178-180). Sin embargo, su papel real en la profilaxis de la traslocación bacteriana es controvertido (181;182). La bacterioterapia con estos microorganismos podría tener efectos beneficiosos puesto que son capaces de estimular la respuesta inmunitaria, aumentar la resistencia a la infección, activar los macrófagos hepáticos y peritoneales y mejorar la función inmunitaria intestinal de los animales estudiados (183).

En relación al tipo de pacientes con cirrosis, hay que destacar que no todos presentan el mismo riesgo de desarrollar infecciones bacterianas, habiéndose identificado diversos grupos de alto riesgo de infección, que serían los candidatos a recibir profilaxis antibiótica:

1. pacientes con hemorragia digestiva
2. pacientes con antecedentes de PBE
3. pacientes con niveles bajos de proteínas en líquido ascítico

1. Pacientes con hemorragia digestiva: Este tipo de pacientes cirróticos presentan un alto riesgo de desarrollar infecciones bacterianas durante los primeros días del ingreso hospitalario, detectándose más de un 20% de éstas en el momento del ingreso y entre un 30 y un 60% se desarrollan durante la hospitalización (165;184;185). Es probable que este riesgo esté asociado con la situación aguda que supone la hemorragia, pero por otro lado, también es posible que la infección tenga un papel importante tanto en la falta de control de la hemorragia como en la recidiva de la misma (186-188). En estudios realizados en ratas cirróticas expuestas a shock hemorrágico, el norfloxacinó ha demostrado una buena actividad reduciendo significativamente la traslocación bacteriana (189). En estudios en pacientes cirróticos con hemorragia digestiva, se ha demostrado que la DIS durante 7 días resulta eficaz en la prevención de la PBE y otras infecciones bacterianas (165;184), reduciendo la incidencia de infecciones intrahospitalarias hasta el 10%. Por otro lado, la administración parenteral de antibióticos como ciprofloxacino o amoxicilina-ácido clavulánico, también ha demostrado una buena eficacia sobre todo en pacientes con hemorragia digestiva y alto riesgo de padecer infecciones (190-192). En la actualidad se recomienda administrar profilaxis antibiótica para reducir la incidencia de infecciones, siendo el norfloxacinó (oral o por sonda nasogástrica) el antibiótico de primera elección, en una pauta de 400 mg cada 12 horas durante 7 días (20).

2. Pacientes con antecedentes de PBE: Los pacientes que han superado un episodio de PBE presentan una elevada probabilidad de recidiva, entre el 35 y el 70% al año de seguimiento (61;62). Representan la única población en la que realmente se puede evaluar el efecto de la DIS como profilaxis secundaria de la PBE, puesto que se les administra el tratamiento de forma indefinida (62). En un estudio controlado y doble ciego realizado por Ginés y cols. (161) la probabilidad anual de recidiva de la PBE pasó de un 68% en el grupo placebo, a un 20% en el grupo tratado con norfloxacino. La probabilidad de que dichas infecciones fueran producidas por bacilos Gram negativos aerobios fue del 60 y del 3% (placebo vs. tratamiento, respectivamente). Por lo tanto, la DIS con norfloxacino disminuye significativamente la tasa de recurrencia de PBE y su uso está ampliamente aceptado en la práctica clínica habitual, recomendándose una pauta de 400 mg cada 24 horas de forma indefinida (20). Sin embargo, el pronóstico de estos pacientes es malo y, por tanto, debe plantearse la posibilidad de un trasplante hepático siempre que sea posible.

3. Pacientes con niveles bajos de proteínas en líquido ascítico: Este grupo de pacientes con niveles de proteínas en líquido ascítico <10-15 g/L constituyen un grupo de riesgo para el primer episodio de PBE tanto a corto (29;193), como a largo plazo, estimándose la probabilidad al año de seguimiento entre un 15 y un 45% (59;60). En este tipo de pacientes sin antecedentes de PBE, la instauración de una pauta profiláctica está dirigida a prevenir el primer episodio infeccioso. El norfloxacino administrado con una pauta de dosificación de 400 mg cada 24 horas, ha demostrado una buena eficacia tanto en estudios en los que se ha evaluado el tratamiento profiláctico durante la estancia hospitalaria (164), como durante un periodo de seguimiento prolongado (162;163). Se han obtenido también buenos resultados con otros antimicrobianos como el ciprofloxacino (166) y el trimetoprim-sulfametoxazol

(167), aunque debido a la heterogeneidad de los pacientes incluidos es difícil extrapolar su eficacia real como profilaxis primaria en este grupo. Por otro lado, y con el fin de optimizar la profilaxis primaria en los pacientes con niveles bajos de proteínas en líquido ascítico y evitar innecesariamente el desarrollo de resistencias bacterianas, se ha intentado delimitar dentro de este grupo a aquéllos con un mayor riesgo de presentar una PBE. Así, se ha observado que la presencia de niveles de bilirrubina elevados ($> 3,2$ mg/dL) junto con cifras de plaquetas bajas ($< 98.000/\text{mm}^3$) supone una probabilidad aumentada de desarrollar una PBE (194). Estos pacientes junto con los que se encuentran en lista de espera de un transplante hepático serían, por tanto, los que más podrían beneficiarse de la profilaxis antibiótica, aunque no existe consenso al respecto (20).

Por otro lado, se han realizado diferentes estudios en los que se ha demostrado una buena relación coste/efectividad de la profilaxis antibiótica en pacientes de alto riesgo de infección, es decir, en aquellos con antecedentes de PBE y en pacientes con proteínas bajas en líquido ascítico y valores elevados de bilirrubina (6;195;196).

1.3.1. Norfloxacin

El norfloxacin (**Figura 1.2**) es un compuesto perteneciente al grupo de las quinolonas, la primera de las cuales fue el ácido nalidíxico que se obtuvo por vez primera en 1962 (197). A continuación se sintetizaron otras como el ácido pipemídico y la flumequina (198-200) que, junto con la primera, constituyen la primera generación de quinolonas. Todas ellas tienen un espectro dirigido hacia BGN y se han utilizado preferentemente como antisépticos urinarios, intestinales y biliares.

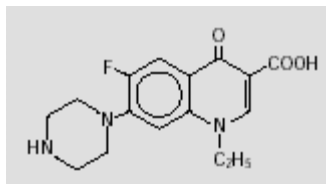


Figura 1.2. Norfloxacin

En la década de los 80 se descubrió que la fluoración en posición 6 aumentaba la actividad de estos compuestos, dando lugar al grupo de las 6-fluorquinolonas entre las que se encuentran norfloxacin (201), enoxacin, pefloxacin, ciprofloxacino y ofloxacino, entre otras. Todas ellas conforman la segunda generación de quinolonas y se caracterizan por poseer un amplio espectro que abarca bacterias Gram positivas, Gram negativas y micobacterias, y por estar dotadas de propiedades farmacológicas que las hacen útiles para el tratamiento de infecciones sistémicas.

Esencialmente, este grupo de quimioterápicos poseen un efecto bactericida. Penetran en la bacteria a través de las porinas, no afectándoles la integridad de la pared celular. Una vez dentro de la célula actúan inhibiendo una enzima que prepara el ADN para la transcripción (202), la ADN-girasa (topoisomerasa II), por lo que se les ha denominado «inhibidores de la girasa». Esta enzima está compuesta de cuatro subunidades (dos subunidades A y dos B) y es la responsable del enrollamiento de las bandas de ADN. Las quinolonas actúan interfiriendo en la síntesis del ADN al bloquear la reacción de superenrollamiento dependiente del ATP y catalizada por la girasa. Esta enzima es también responsable de otras actividades necesarias para la integridad del ADN como son la unión y separación de las bandas que lo componen y la hidrólisis del ATP, y que por tanto también serán alteradas (203). Hay evidencias

de que otra diana de las quinolonas es la topoisomerasa IV de la mayoría de bacterias Gram positivas (204;205), y recientemente se ha comprobado la acción del ácido oxolínico y el norfloxacinó sobre la topoisomerasa IV de *E. coli* (206).

Adicionalmente a los mecanismos expuestos, existe una respuesta de autoprotección de la bacteria frente a la inhibición de la ADN-girasa mediante una cascada de proteínas, denominada SOS (SOS-RecA), que detiene la división celular y protege su supervivencia (207;208). Esto conlleva un aumento en la producción de β -galactosidasa, lo que explicaría las formas filamentosas que adquieren las bacterias Gram negativas tras el contacto con las quinolonas.

Estos fármacos, sin embargo, no modifican la estructura de los cromosomas humanos, ya que la topoisomerasa II de las células humanas está formada únicamente por dos subunidades en lugar de cuatro. La acción inhibidora sobre la topoisomerasa II de las células eucariotas se ha relacionado sobre todo con nuevos derivados, y podría asociarse con una potencial actividad antitumoral.

La acción bactericida se observa principalmente en las fluorquinolonas, siendo además bifásica: para cada quinolona existe una concentración bactericida máxima por encima de la cual la actividad disminuye, pero que vuelve a aumentarse si se incrementa más la concentración. Esta característica parece que se explica por el hecho de que con ciertas concentraciones la acción bacteriostática impide la síntesis de proteínas que participan en la acción bactericida. También disminuye la actividad bactericida si previamente se ha inhibido la síntesis de proteínas en las bacterias; por ello, no es recomendable su utilización conjunta con sustancias que inhiban la síntesis proteica o el ARN bacteriano (rifampicina y cloranfenicol) ya que puede reducirse de forma significativa la actividad bactericida (209).

Se ha demostrado, por otra parte, que se liberan polisacáridos al actuar algunas quinolonas sobre las bacterias, aumentando la hidrofobicidad de la superficie celular y, por tanto, facilitando la entrada de antibióticos β -lactámicos, la lisis por detergentes y aumentando la vulnerabilidad a otros fármacos (210). Además, condicionan el hecho de que los microorganismos sean más sensibles a la acción del complemento sérico (C3), aumentando la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares y PMN, sin modificar su efecto microbicida (211;212).

Las quinolonas poseen además efecto postantibiótico, es decir, que tras una corta exposición del microorganismo al antibiótico la supresión del crecimiento de éste persiste durante un tiempo determinado. Dicho efecto se produce cuando el antimicrobiano se ensaya a concentraciones iguales o superiores a la CMI de los microorganismos (213). La duración del efecto postantibiótico de las quinolonas sobre bacterias Gram negativas varía entre 1 y 2 horas, aumentando con el incremento de la concentración plasmática y el tiempo de exposición a estos antibióticos.

En cuanto a las características farmacocinéticas, cabe destacar que el norfloxacinó administrado por vía oral presenta una absorción rápida, entre una y dos horas, aunque se absorbe poco, logrando una concentración plasmática máxima (C_{máx}) baja, <2 mg/L. La biodisponibilidad es también reducida, entre un 30 y un 45%, pero presenta una buena distribución a tejidos (214-216). La unión a proteínas plasmáticas es pequeña (10-15%) y la semivida de eliminación ($t_{1/2}$) se encuentra entre 2 y 5 horas (215). En condiciones normales, el norfloxacinó se elimina por orina en un 15-50% en forma inalterada y del 10 al 15% en forma de metabolitos, recuperándose inalterado en heces el restante 20-40% (217).

El norfloxacinó ha demostrado ser un fármaco muy apropiado en la DIS a largo plazo puesto que se absorbe poco en el intestino, es muy activo frente a microorganismos aerobios Gram negativos, presenta baja actividad frente a gérmenes anaerobios y posee una baja incidencia de reacciones adversas cuando se administra durante largos periodos de tiempo (161;218). Así, en el estudio realizado por Ginés y cols. (161) se comprobó que la DIS con norfloxacinó en pacientes con cirrosis descompensada, redujo de forma importante la flora aerobia Gram negativa, mientras que no afectó a la flora anaerobia y a la Gram positiva aerobia. Además, en este caso tampoco se asoció con la aparición de bacterias resistentes ni con sobrecrecimiento de levaduras.

En pacientes con cirrosis y ascitis, los niveles plasmáticos en valle (C_{min}) durante el tratamiento profiláctico fueron similares o superiores a la CMI_{90} de norfloxacinó para la mayoría de enterobacterias (161). Por tanto, la presencia constante de niveles bactericidas de este antibiótico frente a BGN en suero y, supuestamente, en líquido ascítico, podría explicar, al menos en parte, la eficacia de este fármaco en la prevención de la PBE (219).

Por otro lado, es conocida la función inmunorreguladora de las quinolonas estimulando la capacidad bactericida de los leucocitos PMN o disminuyendo la adhesión bacteriana a las mucosas (220-222). En un estudio realizado por Such y cols. (223) se comprobó que la DIS con norfloxacinó en pacientes cirróticos con ascitis y concentraciones bajas de proteínas en líquido ascítico, produjo un incremento de los niveles de complemento C3 tanto en suero como en el líquido ascítico, lo que se interpretó como la recuperación de los niveles de factores del sistema del complemento al reducir la traslocación bacteriana y, por tanto, el consumo de dichos factores.

1.4. PAPEL DE *ESCHERICHIA COLI* EN LAS INFECCIONES EN LA CIRROSIS

La incidencia de infecciones bacterianas en pacientes cirróticos que ingresan en un hospital es muy alta, siendo las más importantes la PBE y la bacteriemia (38;39). En el caso de la PBE, se trata de una infección monomicrobiana producida principalmente por microorganismos aerobios Gram negativos de origen entérico (68%), entre los que *Escherichia coli* es el más frecuentemente aislado (4;27;28). En un porcentaje mucho menor se han encontrado episodios de PBE producidos por cocos Gram positivos, fundamentalmente estreptococos, aunque dicha incidencia se ha visto aumentada últimamente debido a la DIS con fluorquinolonas. Contrariamente a lo que cabría esperar, el aislamiento de bacterias anaerobias resulta poco frecuente y precisa descartar otro tipo de peritonitis.

Escherichia coli es un BGN (**Figura 1.3**), anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Su tamaño oscila entre 0.3 y 3 µm y metabólicamente se caracteriza porque fermenta rápidamente la lactosa, es oxidasa negativo, indol y Voges-Proskauer positivo y produce gas. Es móvil gracias a la presencia de flagelos de localización peritrica. Nutricionalmente, son bacterias poco exigentes y crecen bien en los medios habituales del laboratorio. A las 18-24 horas de incubación a 37°C, en medios líquidos producen un enturbiamiento muy visible y en medios sólidos dan lugar a colonias de entre 2 y 5 µm fácilmente observables (224).

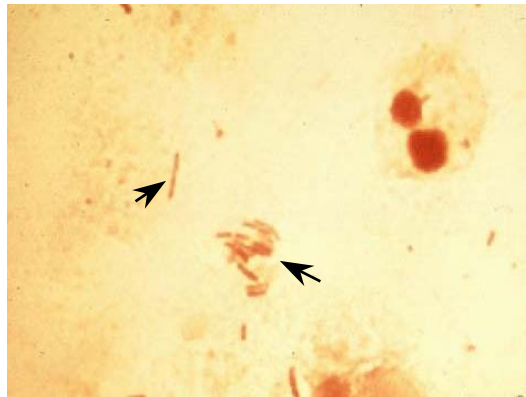


Figura 1.3. Tinción de Gram con *E. coli* (flechas).

Esta bacteria fue descubierta en 1885 por un pediatra llamado T. Escherich, a quien se debe el nombre de Escherichia, en las heces de un bebé sano (225). Es uno de los componentes de la flora normal del tracto gastrointestinal y normalmente se considera un patógeno oportunista en pacientes hospitalizados o con alteraciones en el sistema inmunológico, además de ser el germen más frecuente en infecciones del tracto urinario en la población normal.

E. coli y en general todas las enterobacterias, son células procariotas de gran complejidad biológica que están formadas por una gran cantidad de macromoléculas con capacidad inmunogénica. En medicina poseen interés sólo los antígenos O, H y K, en los que se basa el tipado serológico de *E. coli*. El primero de ellos es el antígeno somático y se encuentra localizado en el lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa de la pared de las enterobacterias. Al LPS se le conoce también como endotoxina y su toxicidad depende de la parte lipídica, también llamada lípido A. El segundo de ellos, el antígeno H, está formado por las subunidades proteicas (flagelina) de los flagelos y resulta altamente antigénico. Respecto al antígeno K, es de naturaleza polisacárida y está localizado en la cápsula, por lo que no está siempre presente

(224). Respecto a este último, se trata de uno de los factores de virulencia mejor estudiados en las infecciones producidas por *E. coli* (226-232) y su presencia se ha asociado con una mayor frecuencia de infecciones invasivas respecto a las cepas no encapsuladas (226;227;229;233;234). En el caso de pacientes con cirrosis y PBE, se ha comprobado además la relación entre la infección por cepas encapsuladas y la presencia de una mayor incidencia de complicaciones y de un aumento de la mortalidad en este tipo de pacientes (235).

Existen además otros factores implicados en la virulencia de *E. coli* y de cuya selección específica depende su patogenia en cada caso. En la tabla siguiente están resumidos los determinantes de virulencia que se pueden encontrar en este microorganismo según su función (**Tabla 1.1**)

FUNCIÓN	FACTORES DE VIRULENCIA
Adhesinas	Fimbrias tipo I Fimbrias P Fimbrias S Adhesinas afimbriales Intimina CFAI/CFaII
Invasinas	Hemolisinas Sideróforos Invasinas tipo Shigella
Motilidad/ Quimiotaxis	Flagelos
Toxinas	Toxina LT Toxina ST Toxina tipo Siga Citotoxinas Endotoxina (LPS)
Propiedades antifagocíticas	Cápsula Antígeno K LPS
Defensa frente a la reacción bactericida del suero	LPS Antígeno K
Defensa frente a la respuesta inmune	Cápsula Antígeno K LPS Variación antigénica
Atributos genéticos	Intercambio genético Transmisión de plásmidos Factores R y plásmidos de resistencia Plásmidos de virulencia

Tabla 1.1. Factores de virulencia de *E. coli* clasificados según su función.

De todos los factores expuestos tienen especial importancia las adhesinas, puesto que permiten a las bacterias entrar en contacto con el

huésped, lo cual constituye un requisito previo para la proliferación local de los microorganismos y la posterior invasión y diseminación de los mismos (236).

1.4.1. Adherencia bacteriana

El primer paso para el desarrollo de la infección es la interacción del patógeno con el huésped. Los microorganismos patógenos aprovechan habitualmente las zonas de contacto con el huésped como puertas de entrada, que en el hombre incluyen, sobre todo, tracto urogenital, digestivo y respiratorio y la conjuntiva ocular (236). Los organismos que normalmente infectan estas regiones han desarrollado mecanismos de adherencia a los tejidos y la habilidad para superar la presión ejercida por los sistemas de defensa del huésped. La adherencia bacteriana es un fenómeno altamente específico que requiere la participación tanto de las adhesinas bacterianas como de los receptores del huésped (237). Las adhesinas son macromoléculas microbianas que median en la adherencia o unión de los microorganismos al huésped (238;239). El tipo más frecuente tanto en Gram positivos como en Gram negativos son las lectinas bacterianas (240-243). Son proteínas que se adhieren de forma específica y complementaria a los carbohidratos o residuos peptídicos de la superficie de las células eucarióticas, si bien es cierto que una adhesina determinada puede unirse a más de un tipo de receptor y viceversa, un solo receptor puede ser reconocido por diferentes adhesinas.

Los mecanismos de adherencia específica pueden incluir dos pasos:

1. *Unión reversible de la bacteria a la superficie de la célula eucariótica*: incluye interacciones y fuerzas de atracción inespecíficas que permiten el acercamiento de la bacteria a la superficie celular. Aquí estarían incluidas las interacciones hidrofóbicas, las atracciones electrostáticas, las vibraciones atómicas y moleculares, el movimiento browniano y la captación por parte de los polímeros de biofilm.

2. *Unión irreversible y permanente del microorganismo a la superficie celular:* implica la formación de enlaces permanentes y específicos tipo llave-cerradura entre moléculas complementarias de cada superficie (239). Requiere que tanto la adhesina como el receptor complementario estén accesibles y situados de forma que se puedan establecer las uniones entre ambos.

Generalmente ocurren en este orden, es decir, primero existe una unión reversible seguido de una no reversible, pero existen casos en que la adherencia específica no reversible precede a otra reversible. Cuando ocurre solamente una unión reversible se denomina adherencia inespecífica.

El conocimiento de los mecanismos implicados en la adherencia, así como el estudio de las adhesinas bacterianas y de los receptores celulares resultan de gran importancia pues permiten mejores aproximaciones en la prevención de las infecciones bacterianas (238), tales como: (a) la aplicación de componentes purificados de las adhesinas o los receptores, o sus análogos, como inhibidores competitivos de la adherencia bacteriana (244;245); (b) administración de concentraciones subinhibidoras de antibióticos que supriman la formación y/o expresión de adhesinas bacterianas (246) y (c) desarrollo de vacunas contra los componentes de la superficie bacteriana implicados en la adhesión a las superficies mucosas (247).

1.4.1.1. Factores de adherencia

Existen una gran variedad de adhesinas o factores de adherencia, aunque en general se pueden agrupar por su estructura en fimbriales o no fimbriales (240).

En las fimbrias, las proteínas adhesivas que permiten la unión a la superficie celular están localizadas en el extremo distal del apéndice (**Fig. 1.4 A**), sin embargo, en las afimbriales las adhesinas están localizadas directamente en la superficie bacteriana (**Fig. 1.4. B**). En otras ocasiones, además de ejercer de mediadores en la interacción con el huésped, el proceso mismo de la adherencia bacteriana a través de proteínas como la intimina (248-254) activa una serie de reacciones como la reordenación de filamentos de actina y la internalización de la bacteria, así como la inducción de cambios en las señales y funciones celulares (**Fig. 1.4. C**). En algunos casos la bacteria misma es la que secreta una proteína llamada Hp90 (**Fig. 1.4. D**), que se introduce en la célula del huésped y tras su fosforilación actúa como receptor para la propia bacteria (255).

De los cuatro tipos de factores de adherencia expuestos (**Fig. 1.4**), los más relevantes y mejor estudiados hasta el momento son los tres primeros, los cuales se detallan a continuación.

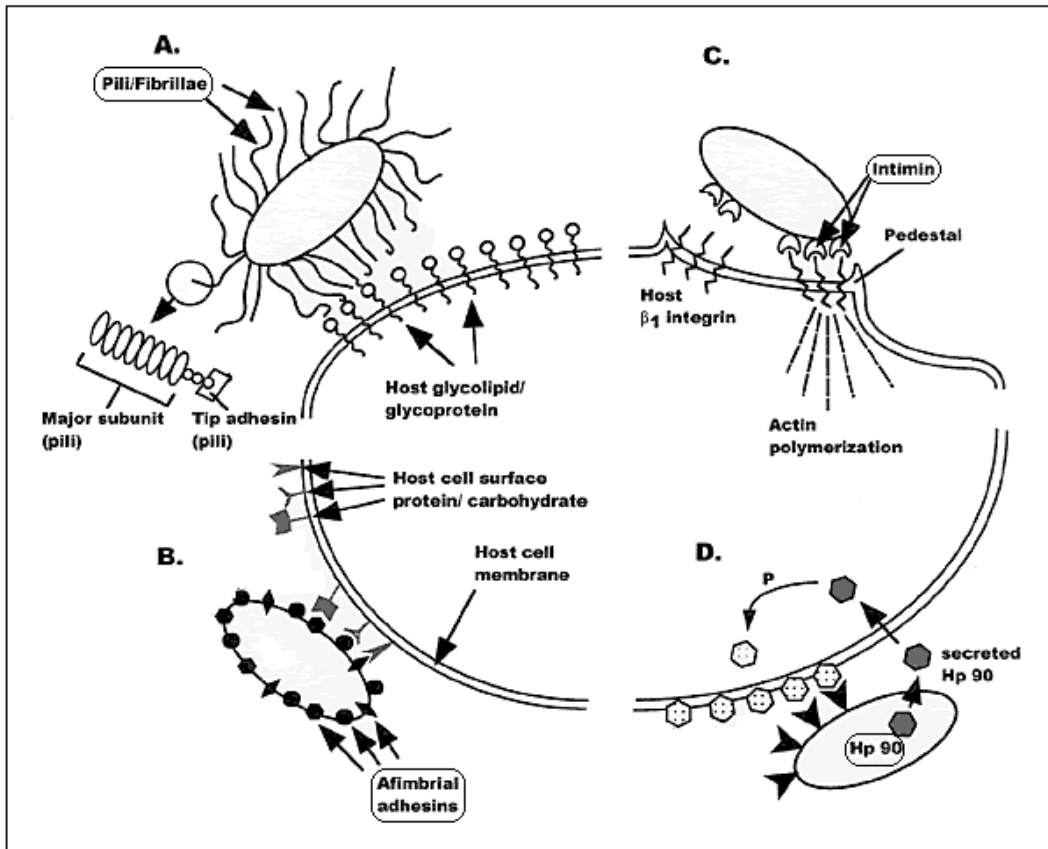


Figura 1.4. Mecanismos de adherencia bacteriana según el esquema propuesto por Wizemann y cols (247).

Las **fimbrias** son filamentos de naturaleza proteica, de un longitud comprendida entre 2 y 7 nm, que se encuentran distribuidas de forma períttrica en la superficie bacteriana en un número entre 100 y 1000 por célula (256;257). Por su tamaño, sólo son visibles mediante microscopio electrónico tal y como se muestra en la **Figura 1.5**. En *E. coli*, las adhesinas fimbriales son las más comunes, pudiendo una sola cepa expresar distintos tipos de fimbrias

codificadas por distintas regiones del cromosoma o de plásmidos, lo que le permite adaptarse a las diferentes superficies celulares y a los cambios en el medio (226). Las más frecuentes en esta bacteria son la tipo I, las P y las S. Las primeras se unen a los residuos de D-manosa de las células eucarióticas, denominándose también manosa-sensibles, ya que se puede bloquear la unión a los receptores mediante la adición de manosa exógena (226;258). Las fimbrias P reconocen disacáridos de galactosa y las fimbrias S se unen al ácido siálico. Tanto las fimbrias P como las tipo I son los factores más importantes en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario, mientras que la presencia de las fimbrias S se ha asociado sobre todo con meningitis y bacteriemia en neonatos.



Figura 1.5. *E. coli* con fimbrias visibles al microscopio electrónico.

Las tipo I son las fimbrias más comunes en *Escherichia coli*, y son probablemente los factores mejor estudiados. Se ha comprobado que además de a las células del tracto urinario, se adhieren a receptores de células epiteliales de la boca, células intestinales y células vaginales (259;260). Así, en un estudio realizado por Nakano y cols. en ratas, se demostró que la presencia de fimbrias tipo I confería una adherencia a las células intestinales mayor que a las células del tracto urinario (261). Estructuralmente están compuestas por una serie de

fracciones de 1 a 3 μm de longitud (256;262), entre las cuales se encuentran las subunidades helicoidales repetidas de unos 7 nm de diámetro de FimA, la principal subunidad proteica de la fimbria, unidas a un extremo de 3 nm de diámetro que contiene dos proteínas adaptadoras, FimG y FimF, y la adhesina FimH (262;263). Ésta última es una proteína de 30kDa responsable de la adherencia específica de la bacteria a los residuos de manosa de las células eucariotas (264), demostrándose eficaz el bloqueo específico de esta proteína en modelos animales en la prevención de la infección de la mucosa urogenital por *E. coli* (265;266).

En numerosos estudios se ha asociado la presencia y expresión de fimbrias tipo I con la patogénesis de determinadas infecciones, sobre todo del tracto urinario (226;267). Como se ha demostrado recientemente en células de la vejiga, este tipo de fimbrias no sólo son mediadoras en la adherencia al huésped, sino que también están implicadas en la invasión de éstas (268;269), siendo la subunidad FimH de la fimbria la responsable de la internalización de la bacteria en las células (270). Por otra parte, se ha comprobado que la interacción de las fimbrias tipo I de la bacteria con las células epiteliales desencadenan una serie de reacciones entre las que se encuentran las propias de defensa inmunológica del huésped, que contribuyen en gran medida a detener la invasión bacteriana y a eliminar rápidamente las bacterias en pacientes sin alteraciones en la inmunidad (269). Sin embargo, en pacientes con alteraciones en el sistema inmunitario como podrían ser los cirróticos, las bacterias no son opsonizadas por los anticuerpos y pueden interaccionar directamente con los macrófagos. Esta unión cuando está mediada por la lectina FimH permitiría a *E. coli* su internalización y supervivencia en los macrófagos según el modelo propuesto por Baorto y cols. (271) y justificaría el desarrollo de infecciones oportunistas en pacientes con capacidad inmunitaria disminuida o en partes del cuerpo con baja capacidad opsonizante.

Por otro lado, la expresión de las fimbrias tipo I es fase-variable, es decir, pasa de estado no fimbriado a fimbriado o viceversa según las necesidades de la bacteria. La presencia de fimbrias confiere a las bacterias una mayor capacidad infectiva (272), mientras que la ausencia de las mismas permite eludir la respuesta del sistema inmune y confiere una mayor virulencia a la bacteria una vez en el interior del huésped (273). Esta variación reversible en el estado de las fimbrias se ha detectado *in vivo* en peritonitis y en infecciones del tracto urinario experimentales con ratones (274;275), constituyendo un importante factor de virulencia bacteriana.

Las **adhesinas afimbriales** son otros de los factores implicados en la adherencia bacteriana de *E. coli* a las células epiteliales. Son estructuras proteicas localizadas en la superficie bacteriana y pertenecientes a la familia de adhesinas Dr, en la cual están incluidas también adhesinas fimbriales, y denominadas de este modo por reconocer al antígeno sanguíneo Dr (a⁺) (276). Esta familia de adhesinas constituye el tercer grupo más frecuente de factores de colonización bacteriana y se han identificado receptores Dr en tracto digestivo, urinario genital y respiratorio. Se ha detectado la expresión de estas adhesinas principalmente en *E. coli* implicados en infecciones del tracto urinario y en diarreas (277). Dentro de las adhesinas afimbriales de este grupo, las más importantes son Afa-I y Afa-III, ambas aisladas por Labigne-Roussel y cols. en 1984 y 1988 respectivamente (277;278). La adhesina Afa-I está compuesta por una sola subunidad polipeptídica identificada como una hemaglutinina. El operon Afa-I posee una organización similar a la de otros miembros de la misma familia y consiste en al menos 5 genes implicados en la biogénesis de la adhesina. Para identificar mediante PCR las secuencias características de este factor de adherencia, se ha utilizado como diana un fragmento específico de la región *afaB* de 750 pb (277). El operon Afa-III, por el contrario, está localizado en un

plásmido de 110 kb de un aislado de *E. coli* de origen intestinal o urinario. El cluster de genes *afa* controla la formación de una cubierta afimbrial que está compuesta por las proteínas AfaE y AfaD, las cuales son una adhesina y una invasina respectivamente (279;280). Las adhesinas afimbriales AfaE son las responsables de la hemaglutinación resistente a la manosa de eritrocitos humanos y la unión específica a las células epiteliales tiene lugar por el reconocimiento de la molécula del factor acelerador de la descomposición (DAF= decay-accelerating factor) como receptor (276). Por lo tanto, un mismo cluster de genes permite la adherencia y unión a células, así como la internalización de la bacteria dentro de la célula (280).

El tercer factor implicado en la adherencia es la **intimina**, una proteína de 94 kDa codificada por el locus *eae*. Es uno de los factores implicados en la formación de lesiones A/E (attaching and effacing), caracterizadas por la destrucción localizada del borde del cepillo de microvilli, la adhesión íntima y la formación de un citoesqueleto de actina por debajo de las bacterias íntimamente unidas (281;282). Este tipo de lesiones son típicas de cepas de *Escherichia coli* enteropatógenicas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC) (283). En estudios realizados con cepas EPEC mutadas en las que se ha eliminado el gen *eaeA*, se ha visto que son incapaces de formar una unión íntima o de producir lesiones A/E en cultivos celulares (284), además de demostrar un nivel de virulencia reducido tanto en modelos animales como humanos (285;286). Por otro lado, se ha comprobado que la unión de la intimina a la célula tiene lugar a través de un receptor denominado Tir, el cual es el receptor traslocado previamente a la célula y formado a partir de la fosforilación de la proteína Hp90 secretada por la propia bacteria (287).

La regulación de la expresión de la intimina depende tanto de las condiciones ambientales y del medio de crecimiento, como de la fase de

crecimiento en que se encuentre. Así, se ha demostrado que la expresión de intimina está favorecida cuando la bacteria se encuentra en fase logarítmica de crecimiento e igualmente, se encuentra considerablemente aumentada en presencia de Medio Mínimo Esencial (MEM) (282;288).

Existen numerosos estudios en los que se ha ensayado el efecto que sobre estos y otros factores de virulencia tienen distintos antibióticos en concentraciones por debajo de la CMI (14;246;289). En condiciones normales, cualquier antibiótico en concentración por encima de la CMI es capaz de matar los microorganismos, sin embargo, a concentraciones por debajo de ésta, los microorganismos no mueren, sino que el crecimiento de la bacteria queda inhibido (290;291) o bien se produce una alteración importante en los factores de virulencia bacterianos (14;292;293).

En general, la exposición a quinolonas en concentraciones subinhibidoras conlleva una serie de procesos tales como la modificación de la morfología celular, la inhibición de la síntesis o expresión de adhesinas, la síntesis o eliminación de componentes de la superficie celular y la alteración en las estructuras implicadas en la adhesión, lo cual impide a la bacteria interactuar adecuadamente con los receptores celulares del huésped (294;295). Además, produce un trastorno en los mecanismos que controlan la producción de enzimas exocelulares y el mantenimiento de plásmidos (292). Se han ensayado distintas concentraciones de quinolonas por debajo de la CMI frente a *E. coli*, obteniéndose resultados variables. En general, las concentraciones equivalentes a $\frac{1}{2}$ x y $\frac{1}{4}$ x CMI son las que muestran un mayor efecto sobre los factores estudiados así como una menor variabilidad entre los ensayos (14;292). Se ha comprobado en numerosos estudios el efecto de estos antibióticos frente a las fimbrias, tanto P como tipo I, demostrándose en ambos casos tanto una alteración de su morfología como una disminución en la capacidad de

adherencia de las mismas (296;297). El mecanismo de acción por el cual tiene lugar este efecto parece ser la inhibición de la síntesis proteica fimbrial, secundario a la puesta en marcha de mecanismos de reparación generales de la célula expuesta al antimicrobiano (15).

Por otra parte, se ha demostrado que la exposición a concentraciones de hasta 1/8 x CMI de antibiótico, produce un aumento de la susceptibilidad a la actividad fagocítica de los neutrófilos humanos (292), probablemente debido a la disminución en la hidrofobicidad de la bacteria.

1.4.2. Resistencia bacteriana a quinolonas fluoradas

El problema de la utilización continuada de quinolonas en la profilaxis de la PBE es la posibilidad de seleccionar bacterias resistentes a estos antibióticos y de que los microorganismos fecales, inicialmente sensibles, desarrollen resistencias (298;299). En un estudio realizado por Dupeyron y cols. (300), se demostró que en estos pacientes la aparición de resistencias puede tener lugar durante los primeros 45 días de tratamiento antibiótico.

Las resistencias que presentan las bacterias frente a las quinolonas son cruzadas entre las de la primera generación y parece serlo también en las fluorquinolonas entre sí. Pero no parece que exista resistencia cruzada entre ambos grupos ni con otros quimioterápicos y antibióticos.

Las quinolonas de primera generación presentan resistencias de tipo cromosómico que se deben a impermeabilidad o a mutación de la enzima sobre la que actúan. Existe resistencia cruzada entre los ácidos nalidíxico, oxolínico y piromídico, aunque muchas cepas continúan siendo sensibles al pipemídico por no afectar a este último la impermeabilidad de los otros. En la práctica clínica se

han observado resistencias en un solo escalón que al parecer se debe a la utilización de dosis insuficientes.

En las quinolonas de segunda generación, las resistencias por plásmidos son raras. Las más importantes clínicamente son de tipo cromosómico, debidas a modificación enzimática de la subunidad A de la girasa (301-303) o a la impermeabilidad probablemente originada por modificarse los lipopolisacáridos de la pared celular de la bacteria, con lo que se alterarían las porinas e impedirían la entrada en la bacteria del quimioterápico (304).

Respecto a las resistencias de tipo cromosómico, dan lugar a mutaciones en segmentos de los genes que codifican la DNA girasa y la topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (*Quinolone Resistanse-Determining Region*) (305). Normalmente el desarrollo de la resistencia a quinolonas es un proceso secuencial en el cual las primeras mutaciones se producen en el gen *gyrA* de la DNA girasa, seguido de mutaciones en el *parC* de la topoisomerasa IV. Este proceso da lugar a un alto grado de resistencia frente a estos antibióticos (306).

Las mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren bajos grados de resistencia a las quinolonas (aumento de 2 a 4 diluciones \log_2 de la CMI) y producen habitualmente resistencias cruzadas con otros antibióticos estructuralmente no relacionados (307). Las resistencias por alteraciones de la permeabilidad son más frecuentes en el caso de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas*. Un tercer mecanismo implicado en la resistencia a quinolonas es la bomba de expulsión activa, que en *E. coli* se denomina AcrAB. Se trata de una bomba de flujo multifármaco que extrae de la célula una amplia variedad de antibióticos, incluidas las quinolonas y otras sustancias (308). Este último mecanismo es importante porque permite a las bacterias sobrevivir durante un corto periodo de tiempo, lo cual favorece el desarrollo de resistencias

vía mutaciones en los lugares clave de los genes de las dianas de las quinolonas.

En general, los mecanismos de resistencia expuestos pueden manifestarse solos o en combinación, aunque se cree que el aumento en el grado de resistencia a las quinolonas *in vivo* se debe a la presencia de varios mecanismos simultáneos o secuenciales (309).

Con la comercialización y el uso probablemente abusivo de las modernas fluorquinolonas se ha observado un notable incremento de las resistencias, especialmente en bacilos Gram negativos, lo que obliga a considerar de forma muy rigurosa las indicaciones de estos quimioterápicos.

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

El desarrollo de cepas RQ en pacientes con cirrosis que reciben profilaxis antibiótica con norfloxacino es un acontecimiento frecuente, y sin embargo, las infecciones provocadas por bacilos Gram negativos RQ no son tan habituales como cabría esperar, probablemente debido a una disminución de la capacidad invasiva de este tipo de cepas. Dado que estos pacientes siguen recibiendo norfloxacino como profilaxis secundaria, es posible que este hecho reduzca la capacidad de adherencia bacteriana a las células epiteliales intestinales aún en el caso de cepas RQ, reduciendo así la capacidad de traslocación y por tanto el desarrollo de infecciones. Este hecho, en caso de comprobarse, justificaría el mantenimiento de profilaxis con norfloxacino en el grupo de pacientes indicado, aun en el caso de que aparezcan cepas RQ en el escobillado rectal.

Objetivos

1. Comparar *in vitro* la capacidad de adherencia de cepas de *E. coli*, obtenidas por cultivo de muestras rectales de pacientes, a células epiteliales de la boca de los propios pacientes, según su sensibilidad o resistencia a quinolonas fluoradas (QF).
2. Comprobar si la presencia de QF en concentraciones subinhibitorias en el medio de estudio reduce la capacidad de adherencia bacteriana a células epiteliales tanto en el caso de cepas sensibles como resistentes a QF obtenidas de pacientes con cirrosis.
3. Estudiar si existe alguna relación entre la presencia de factores de adherencia de dichas cepas, tales como la presencia de fimbrias tipo I, adhesinas afimbriales e íntima y el grado de adherencia de las bacterias a las células epiteliales.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. ÁMBITO Y DURACIÓN DEL ESTUDIO

Desde Diciembre de 1999 hasta Mayo de 2001, se estudiaron las cepas de *E. coli* aisladas en los pacientes atendidos en la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante.

3.2. PACIENTES

Los pacientes estudiados cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- 1) *Pacientes cirróticos*: Pacientes con cirrosis diagnosticada mediante histología, o mediante datos clínicos, analíticos y/o ultrasonográficos,

con independencia de su grado de afectación clínico-analítica de acuerdo a la clasificación de Child-Pugh.

- 2) *Pacientes control*: Pacientes ingresados por hemorragia digestiva alta de origen péptico, hemodinámicamente estables durante el ingreso y en los cuales se consideró resuelta la hemorragia en el momento de obtener la muestra.

Criterios de exclusión:

- 1) *Pacientes cirróticos*:
 - a. Rechazo a participar en el estudio
 - b. Uso de antibióticos (excepto norfloxacino) en las dos semanas previas
 - c. Hemorragia digestiva alta
 - d. Edad: menor de 18 años ó mayor de 80 años
- 2) *Pacientes control*:
 - a. Rechazo a participar en el estudio
 - b. Uso de antibióticos (excepto norfloxacino) en las dos semanas previas
 - c. Edad: menor de 18 años ó mayor de 80 años

Siguiendo los criterios expuestos, se incluyeron en el trabajo un total de 53 pacientes elegidos de manera consecutiva durante el periodo de tiempo mencionado.

3.3. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, transversal en el que se incluyó una parte experimental con un modelo animal.

3.4. VARIABLES ESTUDIADAS

1. Datos analíticos y clínicos de los pacientes (glucosa, bilirrubina, hemoglobina, plaquetas, leucocitos y albúmina, entre otros, y parámetros marcadores del estadio evolutivo de la cirrosis, tales como el grado de Child-Pugh).
2. Tipo de cepa de *E. coli* aislada a cada paciente (sensible o resistente a QF) a partir de muestras rectales.
3. Capacidad de adherencia de las cepas de *E. coli* aisladas, expresada como el porcentaje de células epiteliales que presentaron adherencia frente a *E. coli*, y como la media del número de bacterias adheridas por célula, tanto en los ensayos con concentraciones subinhibitorias de norfloxacino, como en los realizados sin antibiótico.
4. Presencia de fimbrias tipo I, adhesinas afimbriales e íntima, en las cepas de *E. coli* aisladas, como factores de adherencia más representativos.
5. Capacidad de adherencia de cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a quinolonas fluoradas frente a células intestinales obtenidas de rata con ligadura biliar, tanto en presencia como en ausencia de concentraciones subinhibitorias de norfloxacino.

3.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital General de Alicante y todos los pacientes dieron su consentimiento informado para su inclusión en el mismo.

3.6. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

- *Datos analíticos y clínicos:* A los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una analítica sanguínea de rutina en cada ocasión en que fueron atendidos en la Unidad Hepática. Además se evaluaron todos aquellos datos clínicos relativos al estado evolutivo de la cirrosis, tales como la clasificación de Child-Pugh, la presencia de ascitis y encefalopatía y la administración de profilaxis secundaria con norfloxacin.

- *Recogida de muestras bucales:* La obtención de estas muestras se realizó mediante repetidos enjuagues de la boca de los pacientes con solución salina fisiológica. Una vez en el laboratorio se sometieron a distintos lavados con solución salina al 0.9% de ClNa y se centrifugaron a 500 rpm durante 5 minutos hasta obtener un pellet de células, el cual se resuspendió en Medio Mínimo Esencial (MEM) y se mantuvo en nevera a 4 °C hasta su utilización.

Tal y como está descrito en la literatura (310;311), la obtención de células epiteliales mediante enjuagues bucales es un método fácil, rápido e indoloro que permite conseguir una gran cantidad de células viables. Además el empleo de células epiteliales en ensayos de adherencia es un método que se ha utilizado ampliamente y con buenos resultados (289;310).

- *Obtención de muestras rectales:* En los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión anteriormente mencionados, se realizó un escobillado rectal empleando dispositivos Portagerm Amies Agar + Swab/Écouvillon (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France). Cada muestra se identificó y se marcó con un código de laboratorio.

3.7. PROCESADO DE MUESTRAS

Siembra de las muestras rectales: Las escobillas rectales se sembraron por el procedimiento normal en una placa de medio agar Mueller-Hinton (Difco, Detroit, Michigan, USA). Se incubaron en estufa de 37°C y a las 18-24 horas se estudiaron los tipos de colonias bacterianas aisladas (sensibles o resistentes a quinolonas) mediante impronta en dos placas de agar McConkey: una sin antibiótico y otra con 1 µg/ml de norfloxacino. Esta concentración de norfloxacino que se añadió al medio de cultivo se eligió de acuerdo con las recomendaciones del Grupo MENSURA (Mesa Española de Normalización de la Susceptibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos) (312), puesto que permite detectar con mayor fiabilidad aquellos microorganismos con niveles bajos de resistencia a quinolonas. Estas placas se incubaron otras 18-24 horas a 37°C y de esta forma obtuvimos una copia exacta de la distribución en la placa original de las cepas de *E. coli* en función de su sensibilidad o resistencia al norfloxacino, así como del porcentaje de cepas de cada tipo presentes, en caso de coexistir, en un mismo escobillado rectal.

Identificación de las bacterias aisladas: La identificación preliminar se realizó mediante tinción de Gram y prueba del indol de las colonias bacterianas características. En todos los casos se confirmó dicha identificación mediante las tarjetas GNI del sistema automático Vitek (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) que incluye un panel completo de pruebas enzimáticas específicas de bacterias Gram negativas.

Determinación de la CMI de norfloxacino: La concentración mínima inhibitoria (CMI) de norfloxacino frente a la bacteria se obtuvo siempre por medio de tiras de E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante. De acuerdo con las recomendaciones del Grupo

MENSURA, se consideraron sensibles al norfloxacino las cepas de *E. coli* con $CMI \leq 1 \mu\text{g/ml}$, intermedias aquellas cuya CMI está comprendida entre 1 y 4 $\mu\text{g/ml}$ y resistentes aquellas cuya $CMI > 4 \mu\text{g/ml}$.

En nuestro estudio el grupo de sensibilidad intermedia lo consideraremos dentro del grupo de los resistentes puesto que una $CMI > 1 \mu\text{g/ml}$ indica que existe una sensibilidad alterada frente al antibiótico.

3.8. ENSAYO DE ADHERENCIA BACTERIANA

3.8.1. Preparación de las soluciones de fármaco: Las soluciones de fármaco utilizadas en los ensayos de adherencia se prepararon en condiciones asépticas y por dilución a partir de una solución madre de norfloxacino, cuya composición es la siguiente:

norfloxacino.....	100 mg
propilenglicol (Sigma®).....	5 ml
HCl 0,1N hasta la total disolución del fármaco	
Solución salina tamponada c.s.p.....	10 ml

3.8.2. Preparación previa de las cepas de *E. coli*: A partir de las cepas aisladas se realizó un inóculo de una de las colonias bacterianas mediante asa de 1 μl en un tubo con 3 ml de caldo tripticasa-soja (Difco, Detroit, Michigan, USA) y se incubó a 37°C durante 18-24 h, ya que en estas condiciones se ha demostrado que se favorece la expresión de las fimbrias (313).

Pasado este periodo de incubación se transfirió a otro tubo con caldo fresco una alícuota de esta suspensión y se incubó a 37°C durante 2 h, que es el tiempo estimado para que una bacteria alcance la fase logarítmica de crecimiento (14) y, por tanto, es la fase óptima para realizar el ensayo de adherencia.

3.8.3. Ensayo de adherencia: Del caldo de cultivo anterior, se tomaron 20 μ l de suspensión bacteriana y se pusieron en contacto con las células epiteliales del paciente correspondiente. Este ensayo se llevó a cabo siempre en ausencia y en presencia de una concentración en el medio de 0,250xCMI de norfloxacino, es decir, una concentración de antibiótico cuatro veces inferior a la CMI del microorganismo. Tras la incubación a 37° C durante 2 h 30 min, las muestras se centrifugaron a 500 rpm durante 10 min y se sometieron a un proceso de cuatro lavados con tampón fosfato (PBS) (pH 7.2) para eliminar las bacterias no adheridas.

La suspensión de células resultante se ajustó, mediante recuento en cámara de Neubauer, a una concentración de 200 células por 100 μ l y se transfirió a un porta especial mediante centrifugación en Cytospin para obtener una monocapa de células. La preparación se fijó con una solución de formaldehído al 5% y se tiñó (técnica de sandwich) con anticuerpo frente a *E. coli* (diluido al 1/1000) y con un anti-anticuerpo de conejo marcado con fluoresceína (diluido al 1/200) (Dako, Copenhague, Denmark). La tinción se observó en microscopio de fluorescencia (y en contraste de fases) contándose un número mínimo de 100 células epiteliales por paciente.

Tal y como ya se ha expuesto, se midió la adherencia bacteriana como el porcentaje de células epiteliales que presentaron adherencia positiva y como la media del número de bacterias adheridas por célula. Este ensayo está basado en el método descrito previamente por Vranes (14). Durante todo el estudio se utilizó una cepa control de *E. coli* (ATCC 25922) sensible a QF y procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), que sirvió como control de calidad de todo el proceso.

En relación a la tinción fluorescente, y para comprobar que no hubiese ninguna interferencia entre los anticuerpos usados en la tinción y la flora normal de las células epiteliales de la boca, se realizó un ensayo previo en el que se tiñeron células epiteliales obtenidas de la boca de varios pacientes seleccionados al azar y lavadas únicamente con PBS. En ningún caso se encontró fluorescencia específica.

3.9. ESTUDIO DE FACTORES DE ADHERENCIA

Tal y como se ha expuesto en el capítulo de Antecedentes, existen diferentes tipos de factores de adherencia en *E. coli* en función de su mecanismo de unión a las células epiteliales. De éstos, los factores de adherencia estudiados fueron:

- **Fimbrias tipo I:** En este caso, se estudió tanto la presencia de una parte del gen que codifica este factor, llamada *fimA*, como la expresión de dicho factor de adherencia. Solamente en este factor se estudió su expresión puesto que se trata de un método ampliamente utilizado y validado. La determinación de la presencia del gen se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y detección por electroforesis de las secuencias específicas, mientras que la expresión de dicho factor se estudió mediante la prueba de inhibición de la aglutinación con alfa-D-manosa. Ambos ensayos se detallan a continuación.
- **Adhesina afimbrial:** Este factor de adherencia está codificado por el gen *afa* y su determinación se realizó mediante amplificación por PCR y detección de la secuencia característica.
- **Intimina:** Está codificada por el gen *eae* y su determinación se realizó igualmente mediante PCR y detección de la secuencia característica.

3.9.1. Prueba de la inhibición de la aglutinación

La presencia de fimbrias tipo I se determinó mediante la aglutinación sensible a la manosa de *Saccharomyces cerevisiae* (314). Las cepas de *E. coli* se cultivaron en caldo cerebro-corazón a 35°C durante 18-24 horas y se ajustó la densidad a un McFarland de 6. A partir de un cultivo de 24 h de *S. cerevisiae*, se preparó una suspensión en agua estéril y se ajustó la densidad igualmente a un McFarland de 6. Se mezcló en un porta de cristal una gota de la suspensión de *E. coli* con una gota de la suspensión de *S. cerevisiae*, se mantuvo en rotación durante 2 min y se observó la aglutinación. En el caso de cepas cuya aglutinación fue negativa se repitió la prueba tras 6 subcultivos en caldo cerebro-corazón. Para determinar si la alfa-D-manosa es capaz de inhibir dicha aglutinación, se realizó el mismo proceso anterior tras añadir una gota de manosa al 5% a una gota de la suspensión de *E. coli*. Se mezcló bien por rotación durante 2 min y se añadió una gota de la suspensión de *S. cerevisiae* siguiendo el proceso arriba descrito. Este método está basado en el descrito por Andreu y cols. (315).

3.9.2. PCR

- Fimbrias tipo I: Tanto las condiciones de la PCR como las secuencias de los primers utilizados, están basados en los descritos por Ruiz y cols. (316).

Los primers utilizados fueron:

fimA1 5'-GTTGTTCTGTCCGGCTCTGTC-3'

fimA2 5'-ATGGTGTTGGTTCCGTTATTC-3'

La temperatura de anillamiento utilizada fue de 55°C durante 30 seg y se realizaron 30 ciclos, obteniéndose un producto amplificado de 447 pb.

Como controles positivo y negativo de la PCR se utilizaron las cepas de *E. coli* suministradas por el Dr. Joaquín Ruiz, las cuales fueron previamente analizadas en un estudio llevado a cabo por su grupo de investigación (316).

- Adhesinas afimbriales: Las condiciones de la PCR así como la secuencia de los primers, están basadas en las descritas por Le Bouguenec y cols. (317).

Los primers empleados fueron:

afa1 5'-GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC-3'

afa2 5'-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG-3'

La temperatura de anillamiento utilizada fue de 65°C durante 1 min y se realizaron 25 ciclos, obteniéndose un producto amplificado de 750 pb.

Como controles positivo y negativo de la PCR se utilizaron las cepas de *E. coli* KS52 y *E. coli* K-12 HB101 (317), suministradas por la CECT.

- Intimina: Las condiciones de la PCR así como la secuencia de los primers, están basadas en las descritas por Reid y cols. (318) aunque con algunas modificaciones.

Los primers empleados fueron:

eae1 5'-CTGAACGGCGATTACGCGAA-3'

eae2 5'-CCAGACGATACGATCCAG-3'

La temperatura de anillamiento empleada fue de 55°C en lugar de 53°C y se utilizaron 25 ciclos en lugar de 30. El tamaño del producto amplificado fue de 917 bp.

Como control positivo se utilizó la cepa de *E. coli* E2348/69 (O127:H6) (288) procedente de la Colección Alemana de Cultivos (DSMZ), y como control negativo *E. coli* C600 procedente de la CECT.

3.9.2.a. Extracción ADN bacteriano

Se realizó con el QIAamp® DNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante para el aislamiento de ADN de bacterias a partir de cultivos:

1. A partir de una suspensión de cultivo bacteriano, se pipetea 1mL en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifuga a 7500 rpm durante 5 minutos.
2. Se calcula el volumen de pellet y se añade Buffer ATL (suministrado por el kit) hasta un volumen total de 180 μ L.
3. Añadir 20 μ L de Proteinasa K, mezclar bien en vortex e incubar a 56°C hasta que todo el sedimento esté completamente lisado.
4. Centrifugar durante unos segundos. Añadir 200 μ L de Buffer AL, mezclar en vortex unos segundos e incubar a 70°C durante 10 minutos.
5. Centrifugar brevemente y añadir 200 μ L de etanol (96-100%). Mezclar en vortex y centrifugar de nuevo unos segundos.
6. Recoger toda la muestra obtenida en el paso anterior en una columna QIAamp de centrifugado suministrada por el kit. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto. Colocar la columna QIAamp en un tubo especial de 2 mL y desechar el filtrado.
7. Añadir 500 μ L de Buffer AW1 y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto. Desechar el filtrado y poner la columna en otro tubo nuevo.
8. Añadir 500 μ L de Buffer AW2 y centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos.

Nota: tampón AW2 residual en la columna podría interferir en aplicaciones posteriores. Para asegurar una eliminación completa del residuo colocar la columna en un nuevo tubo de 2mL y centrifugar a 13.000 rpm. durante 1 minuto.

9. Eliminar el filtrado anterior y volver a centrifugar a 13000 rpm. durante 1 minuto.

10. Colocar la columna en un eppendorff estéril de 1.5 mL, eliminar el eluído anterior y añadir a la columna 200 μ L de Buffer AE. Centrifugar a 13.000 rpm. durante 1 minuto. El eluído final contiene el ADN purificado.

Incubar la columna con Buffer AE durante 5 minutos a temperatura ambiente aumenta el rendimiento de la extracción.

3.9.2.b. Amplificación genómica

Las amplificaciones de los genes *fimA*, *afa* y *eae* de *Escherichia coli* se llevaron a cabo mediante PCR, técnica que posibilita la obtención de múltiples copias de un segmento de ADN existente entre dos regiones de secuencia conocida.

Mediante el empleo de dos oligonucleótidos a modo de cebadores, de secuencia complementaria y flanqueante a la región de ADN que se pretende amplificar, se realizan una serie de reacciones de síntesis catalizadas por una polimerasa. El ADN original es desnaturalizado por calor en presencia de un exceso molar de los oligonucleótidos y de los cuatro deoxiribonucleósido trifosfato (dNTPs), empleados por la polimerasa como sustrato. El calentamiento produce la separación de las dos hebras de ADN que posteriormente son hibridadas con los cebadores mediante el descenso de la temperatura hasta un valor óptimo para la reacción (este valor de temperatura viene determinado por la secuencia de los cebadores y su temperatura de fusión o T_m). Tras la hibridación se produce la extensión de los cebadores a través de la ADN polimerasa. Esta dinámica de reacciones: desnaturalización, anillamiento y síntesis de ADN se repite durante un determinado número de ciclos, obteniéndose como producto principal de esta reacción exponencial un segmento de ADN de doble cadena, cuyo límite queda definido por el extremo 5' de los cebadores y con una longitud igual a la distancia entre los mismos.

Mezcla de reacción de PCR:

Todas las reacciones de PCR se ajustaron a un volumen final de 50 μ L.

REACTIVOS	[] FINAL	VOLUMEN
10x NH ₄ Reaction Buffer	1x	5 μ L
MgCl ₂ 50Mm	1.5mM	1.5 μ L
BioTaq DNA polymerase 5u/ μ L	1.25u	0.2 μ L
DNTPs (100mM/dNTP) ¹	200 μ M/dNTP	0.5 μ L
Primer 1 (nmol/ μ L) ²		X μ L
Primer 2 (nmol/ μ L) ²		X μ L
dH ₂ O c.s.p.		50 μ L

Volumen X utilizado de cada primer:

fimA1 (0.346 nmol/ μ L): 0.5 μ L ; **fimA2** (0.322 nmol/ μ L): 0.5 μ L

ea1 (0.377 nmol/ μ L): 0.8 μ L; **ea2** (0.659 nmol/ μ L): 0.9 μ L

afa1 (0.373 nmol/ μ L): 0.65 μ L; **afa2** (0.551 nmol/ μ L): 0.65 μ L

A la mezcla se añadieron 2 μ L de la muestra correspondiente en cada caso, completando los 50 μ L antes mencionados.

¹ Se preparó una mezcla con los cuatro dNTPs a una concentración final de 20mM de cada uno. El volumen que aparece en la tabla hace referencia al utilizado a partir de esta dilución previa.

² Se preparó una dilución previa de ambos cebadores a una concentración de 100 μ M. El volumen X que aparece en la tabla corresponde al utilizado a partir de esta dilución previa.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems), con el perfil de temperaturas y tiempos que se muestran en los gráficos siguientes:

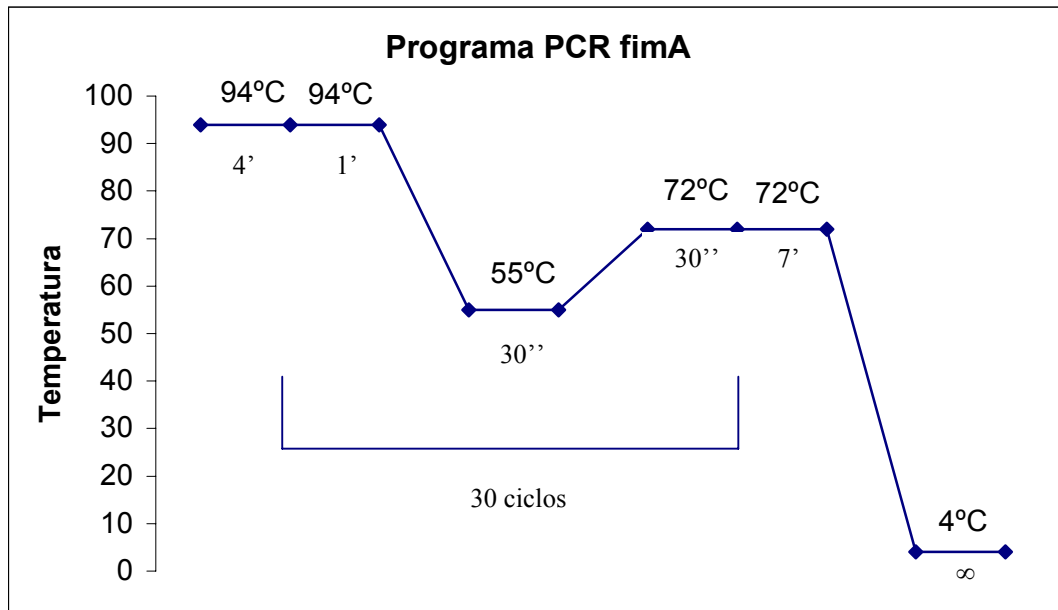


Gráfico 3.1. Diagrama de temperaturas y tiempos finalmente empleados en la reacción de PCR para la amplificación del gen *fimA*.

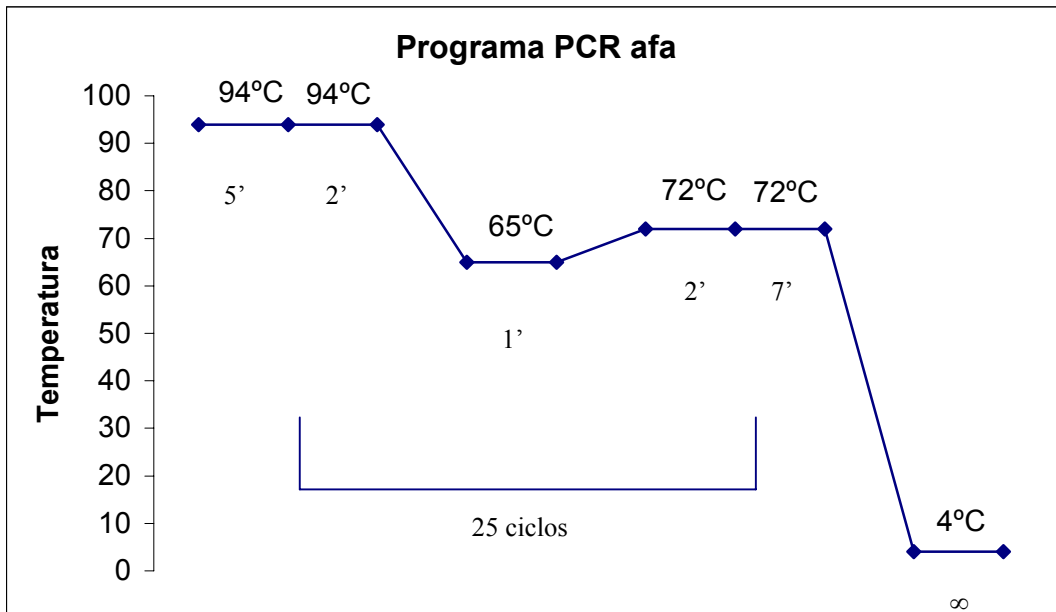


Gráfico 3.2. Diagrama de temperaturas y tiempos finalmente empleados en la reacción de PCR para la amplificación del gen *afa*.

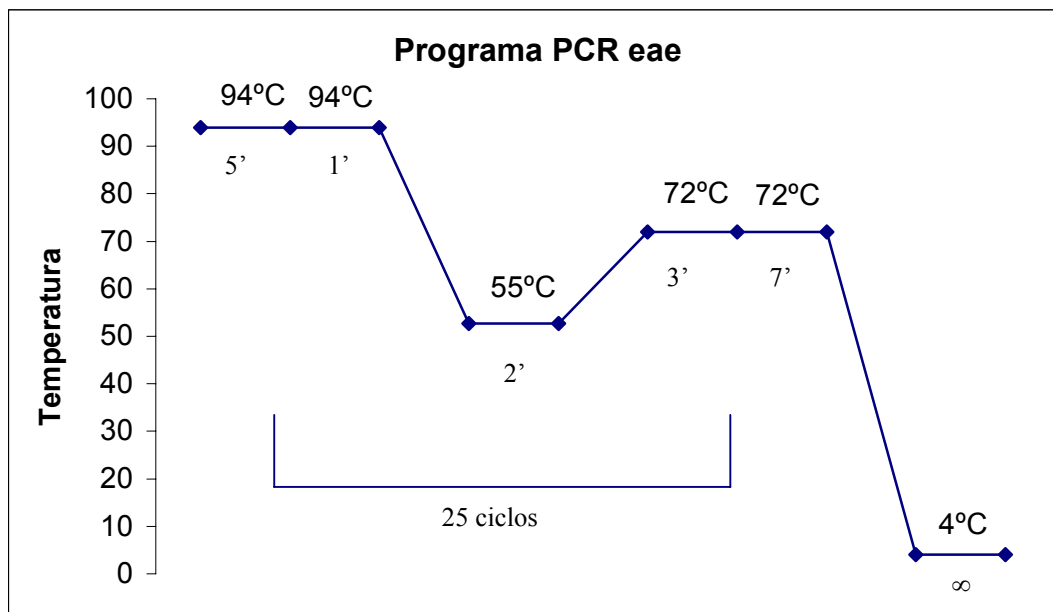


Gráfico 3.3. Diagrama de temperaturas y tiempos finalmente empleados en la reacción de PCR para la amplificación del gen *eae*.

3.9.2.c. Detección de Productos Amplificados

La detección de productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Agarose LE Analytical Grade (Promega®)	0.8 g (2%)
Tampón TBE 0.5X	40 mL
Bromuro de Etidio	2 µL
6X Loading Dye ³ (Promega®)	2 µL
Muestra amplificada por PCR	10 µL

³ Se realiza una dilución previa del tampón de carga a 1X con agua destilada. Los dos microlitros a los que hace referencia la tabla proceden de esta dilución.

Procedimiento de trabajo: se pesan los gramos de agarosa necesarios para preparar una disolución al 2% de agarosa en tampón TBE 0.5x. La mezcla se calienta hasta su ebullición y la total disolución del polímero. Tras unos minutos a temperatura ambiente se añade bromuro de etidio, se vierte la disolución en el *casting* de electroforesis y se colocan los peines que corresponderán a los pocillos de carga de cada muestra, dejando polimerizar el gel.

Una vez cargadas las muestras se administra una corriente de 120V durante 15 minutos.

Una vez separadas todas la bandas, se procede a su observación mediante luz UV.

3.10. CONTROLES

3.10.1. *Sujetos sanos*: Según los criterios de inclusión expuestos anteriormente, se estudió un grupo de 20 sujetos, obteniéndose mediante el correspondiente escobillado rectal un total de 20 cepas de *E. coli*, a las cuales se les practicó el mismo proceso que a las obtenidas de los pacientes.

3.10.2. *Ratas con cirrosis inducida*: Se utilizó el modelo experimental de ligadura biliar en ratas (319), el cual consigue desarrollar fibrosis hepática junto con esplenomegalia, en un tiempo medio de 4 semanas, como expresión de la existencia de hipertensión portal. Se recogieron en un frasco estéril con solución salina fisiológica las células intestinales obtenidas mediante raspado de la zona. Dichas células se procesaron de igual modo que en el caso de las células epiteliales bucales de los pacientes y se estudiaron frente a una serie de cepas de *E. coli* de las aisladas en los pacientes y elegidas al

azar. Se estudiaron un total de 10 cepas sensibles a quinolonas y 10 resistentes.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los datos se han presentado como el valor de la media \pm la desviación estándar (DS) para las variables cuantitativas que siguen una distribución paramétrica, y como el valor de la mediana y los percentiles 25 y 75 (P_{25} - P_{75}) en caso de distribución no paramétrica. Previamente se ha realizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar esta condición de normalidad (si $p < 0.05$ no hay normalidad). En el caso de variables cualitativas, los resultados se han expresado como frecuencias. La comparación entre los grupos de variables continuas con distribución paramétrica se realizó mediante el test de la t de Student para la comparación de medias, mientras que en aquellas con distribución no paramétrica se utilizó el test de la U de Mann-Whitney. El análisis estadístico de las variables cualitativas se realizó mediante el test de χ^2 . Las comparaciones realizadas dentro del mismo grupo se analizaron con el T-test para datos apareados y, en el caso de datos no paramétricos, con el test de Wilcoxon. Se ha considerado estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Todo el análisis estadístico se ha llevado a cabo empleando el paquete estadístico SPSS 10.0 (SPSS Inc).

Capítulo 4. Resultados

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

De acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión definidos previamente, en el estudio se incluyeron de forma consecutiva un total de 53 pacientes cirróticos, 39 hombres y 14 mujeres. En general, la etiología más frecuente en estos pacientes fue la alcohólica (60.4%), seguido de la vírica (24.5%), vírica y alcohólica (11.3%) y otras (3.8%). Respecto al estado evolutivo de la cirrosis y según la clasificación de Child-Pugh, un 23.1% pertenecían a la clase A, 42.3% a la B y un 34.6% a la C. Además, en un 66% de los casos se había detectado la presencia de ascitis y un 22.6% habían presentado encefalopatía. De todos los pacientes incluidos, el 18.9% habían recibido profilaxis secundaria con norfloxacino.

A partir de dichos pacientes obtuvimos un total de 59 cepas de *E. coli*. Hay 6 pacientes a los cuales se les detectó simultáneamente cepas sensibles y resistentes a quinolonas. En estos casos y, puesto que el punto de partida de este trabajo es fundamentalmente microbiológico, se duplicaron los datos analíticos y clínicos de los pacientes a los cuales pertenecían dichas cepas.

Para su estudio se clasificaron en dos grupos, Grupo I y II, en función de la sensibilidad a fluorquinolonas de las cepas obtenidas en el escobillado rectal correspondiente. Así, se incluyeron en el Grupo I todos los pacientes con cepas sensibles a quinolonas, y en el Grupo II aquellos con cepas con sensibilidad intermedia o resistentes a quinolonas. En la **Tabla 4.1** se muestran las principales características analíticas y clínicas de dichos pacientes en relación con el tipo de cepa obtenida. Tanto la albúmina y la hemoglobina, como el resto de parámetros clínicos estudiados, mostraron un mayor grado de deterioro de la función hepática en los pacientes del Grupo II, si bien no todos ellos alcanzaron significación estadística por lo reducido de la serie ($p=0.07$ y 0.06 , respectivamente). Sí existen diferencias significativas entre los dos grupos en el grado de Child-Pugh y en la proporción de pacientes que recibieron profilaxis secundaria de PBE con norfloxacino, ambos aumentados en el Grupo II.

	Grupo I (SQ)		Grupo II (RQ)		p
	Media ± DS	n (%)	Media ± DS	n (%)	
No. de casos	37		22		
Edad (años)	62.8 ± 9.97		61.3 ± 9.9		NS
Índice de Quick (%)	66.3 ± 17.2		60.9 ± 12.2		NS
Hemoglobina (mg/dL)	13 ± 2.27		11.28 ± 2.14		<0.05
Plaquetas	124772.97 ± 57885.14		110357.14 ± 58431.26		NS
Leucocitos *	5300 (3920-7165)		4560 (3840-6400)		NS
Urea (mg/dL)*	30.5 (23-47)		33 (23-45)		NS
Creatinina (mg/dL)*	0.7 (0.6-0.9)		0.7 (0.65-0.9)		NS
Glucosa (mg/dL)*	105.5 (89-133.75)		96 (88-174)		NS
Bilirrubina total (mg/dL)*	1.6 (1.05-3.75)		1.7 (0.95-3.5)		NS
Bilirrubina Directa (mg/dL)*	0.8 (0.4-2.2)		0.7 (0.4-1.3)		NS
Albúmina (g/dL)	3.2 ± 0.7		2.8 ± 0.6		<0.05
Gamma globulina (g/dL)	1.8 ± 0.757		2 ± 0.881		NS
Puntuación Child-Pugh	7.9 ± 2.4		9.4 ± 1.7		<0.05
Ascitis		22 (59%)		18 (81.8%)	NS(0.07)
Encefalopatía		7 (18.9%)		9 (40.9%)	NS(0.06)
DIS		1 (2.7%)		10 (45.5%)	<0.001

Tabla 4.1. Características analíticas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio clasificados según el tipo de cepa de *E. coli* aislada en escobillado rectal.

(*Valores con distribución no paramétrica. Expresados como mediana y percentiles (P25-P75))

Por otro lado, se evaluó el riesgo de aparición de cepas resistentes en función de la situación clínica de los pacientes estudiados. Así, y tal como se muestra en la **Tabla 4.2**, la administración previa de DIS con norfloxacino supuso un incremento significativo en la frecuencia de aparición de resistencias, siendo el riesgo de aparición de resistencias 3.6 veces mayor en el grupo que recibió DIS con norfloxacino.

		Frecuencia de aparición de resistencia (%)	RR (IC 95%)	P
Ascitis	Sí	45	2.1 (0.8-5.5)	NS (0.076)
	No	21.1	1	
Encefalopatía	Sí	56.3	1.9 (0.99-3.5)	NS (0.066)
	No	30.2	1	
Administración SID	Sí	90.9	3.6 (2.1-6.1)	<0.001
	No	25	1	
Child-Pugh	C	38	1 (0.5-2.2)	NS
	A+B	35	1	
Etiología	Alcohol +/- virus	38	1 (0.5-2.3)	NS
	Virus + otros	35.3	1	

Tabla 4.2. Frecuencia y riesgo relativo de aparición de cepas resistentes a fluorquinolonas según características clínicas de los pacientes.
(RR: Riesgo relativo)

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

Según lo ya expuesto en el apartado anterior, se estudiaron un total de 59 cepas de *E. coli*, de las cuales 37 fueron sensibles (Grupo I) y 22 fueron cepas con sensibilidad intermedia o resistentes a fluorquinolonas (Grupo II). Las CMI fueron significativamente mayores en el Grupo II, tal y como se muestra en la **Tabla 4.3**.

La mayoría de cepas aisladas presentaron una morfología típica en placa y se identificaron sin ningún problema siguiendo los protocolos habituales.

	Grupo I	Grupo II	<i>p</i>
CMI (µg/ml)	0.094 (0.064- 0.125)	44 (1.5- 256)	<0.0001

Tabla 4.3. Mediana y percentiles (P₂₅-P₇₅) de las CMI de norfloxacino frente a las cepas de *E. coli* aisladas

4.3. ESTUDIO DE ADHERENCIA BACTERIANA

En la **Tabla 4.4** se resumen los resultados obtenidos en los estudios de adherencia. En los ensayos realizados sin antibiótico, la media del porcentaje de células epiteliales que presentaron bacterias adheridas fue similar en ambos grupos (*p*=NS). Cuando la adherencia se expresó como mediana de bacterias adheridas por cada célula epitelial, obtuvimos idénticos resultados tanto en el grupo de cepas sensibles como en el de resistentes a quinolonas.

Cuando añadimos norfloxacino al medio observamos que tanto las medias de los porcentajes de adherencia como la mediana de bacterias adheridas por célula fueron similares entre ambos grupos (I y II). Además, cuando comparamos estos resultados con los anteriores se observa una disminución importante y significativa de la adherencia, y este hecho resulta independiente del tipo de cepa estudiada (sensible o resistente a quinolonas), y de la forma de medir la adherencia.

	Grupo I (n=37)	Grupo II (n=22)	<i>p</i>
Media del % adh. sin NOR ± DS	78.2 ± 15.5	80.6 ± 13.6	0.51
Media del % adh. con NOR ± DS	48.5 ± 22.4	45.9 ± 18.8	0.39
<i>p</i>	<0.001	<0.001	
Mediana de bacterias por célula sin NOR (P₂₅-P₇₅)	8 (4.5-16)	8 (5-12.7)	0.83
Mediana de bacterias por célula con NOR (P₂₅-P₇₅)	3 (2-6)	4 (2-7)	0.64
<i>p</i>	<0.001	<0.001	

Tabla 4.4. Resultados del análisis de la adherencia bacteriana de las cepas de *E. coli* sensibles (Grupo I) y resistentes (Grupo II) a quinolonas fluoradas de los pacientes con cirrosis.

En la **figura 4.1** se muestran unas imágenes de células epiteliales de la boca de los pacientes tal y como se observaron al microscopio. En ellas se aprecia la diferencia expuesta en la tabla anterior en el número de bacterias

adheridas por célula entre las no expuestas a antibiótico (a) y las observadas en presencia (b) de norfloxacino en el medio.

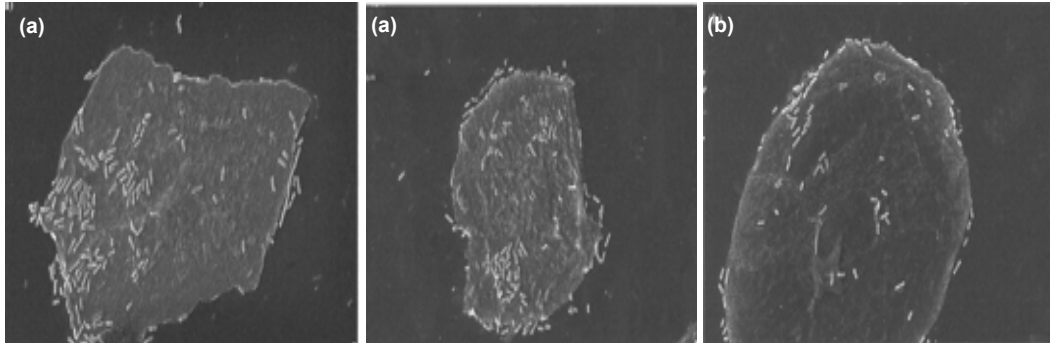


Figura 4.1. Células epiteliales de la boca de pacientes con cirrosis tras su incubación con bacterias. (a) *E. coli* sin antibiótico; (b) *E. coli* incubadas con 0.125x CMI de norfloxacino.

Para descartar la posibilidad de que exista algún factor dependiente de la cirrosis que pueda influir en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales, se realizó un ensayo con 20 sujetos sanos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.5**, siendo similares a los expuestos en la **Tabla 4.4** ($p=NS$). De esto se deduce que, por lo menos en un primer momento, las células epiteliales se comportan de manera semejante y no parece existir ningún factor cirrosis dependiente.

	SQ (n=10)	RQ (n=10)	<i>p</i>
Media del % adh. sin NOR ± DS	82.3 ± 17.7	81.9 ± 17.5	0.96
Media del % adh. con NOR ± DS	50.7 ± 21.7	42.7 ± 30.1	0.5
<i>p</i>	<0.001	<0.001	
Mediana de bacterias por célula sin NOR (P₂₅-P₇₅)	15 (7.5-20)	7 (5.7-14.5)	0.25
Mediana de bacterias por célula con NOR (P₂₅-P₇₅)	5 (3-10)	4 (2-9.2)	0.39
<i>P</i>	<0.001	<0.05	

Tabla 4.5. Resultados del análisis de la adherencia bacteriana de las cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a quinolonas fluoradas de los controles sanos.

Con el fin de comprobar que el estudio de adherencia realizado en estos experimentos es equiparable a lo que sucede en células intestinales, se realizó un estudio similar utilizando células epiteliales obtenidas de intestino delgado de rata 4 semanas después de realizar una ligadura biliar. Se estudió el grado de adherencia de cepas de los pacientes elegidas al azar: 10 sensibles y 10 resistentes a quinolonas (**Tabla 4.6**). Al igual que ocurrió con los controles sanos, no se encontraron diferencias significativas con la capacidad de adherencia observada en los pacientes cirróticos.

	SQ (n=10)	RQ (n=10)	<i>P</i>
Media del % adh. sin NOR ± DS	71.8 ± 16.2	80.2 ± 15.9	0.26
Media del % adh. con NOR ± DS	43 ± 16.4	55.2 ± 22.9	0.19
<i>p</i>	<0.05	<0.001	
Mediana de bacterias por célula sin NOR (P₂₅-P₇₅)	6 (4.7-12.7)	15 (7-20.5)	0.12
Mediana de bacterias por célula con NOR (P₂₅-P₇₅)	4 (2.7-9.25)	4.5 (2-9.2)	0.79
<i>p</i>	<0.05	<0.001	

Tabla 4.6. Resultados del análisis de la adherencia bacteriana de cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a quinolonas fluoradas frente a células intestinales de ratas con ligadura biliar.

Dentro de los ensayos de adherencia realizados, se llevó a cabo un segundo análisis para comprobar si el norfloxacinó podría tener un efecto directo en las células epiteliales que pudiera modificar el grado de adherencia bacteriana. Se incubaron las células con concentraciones subinhibitorias de norfloxacinó durante 2h 30min a 37°C. Tras cuatro lavados con PBS (pH 7.2) para eliminar el antibiótico, se pusieron en contacto con las cepas de *E. coli* y se siguió con el ensayo de igual forma que antes. En general, se obtuvo una disminución del 5% en la adherencia bacteriana tanto en las cepas sensibles como en las resistentes a quinolonas.

4.4. ESTUDIO DE FACTORES DE ADHERENCIA BACTERIANA

De los tres factores de adherencia estudiados en las cepas de *E. coli* aisladas en cirróticos, el más frecuente fue el gen *fimA* que se encontró en un 71,2% de las cepas analizadas. Sin embargo, su expresión se comprobó en un 52,5% de las mismas. El resto de factores se detectaron en proporciones mucho menores, tal y como se muestra en la **Tabla 4.7**.

En las figuras siguientes se muestra un ejemplo de la detección por electroforesis de las PCR de cada uno de los genes que codifican los factores de adherencia ensayados: *fimA* (**Figura 4.2**), *eae* (**Figura 4.3**) y *afa* (**Figura 4.4**).



Figura 4.2. PCR gen *fimA*

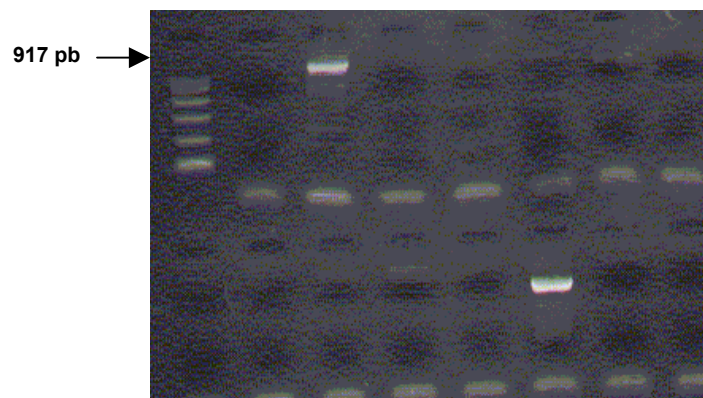
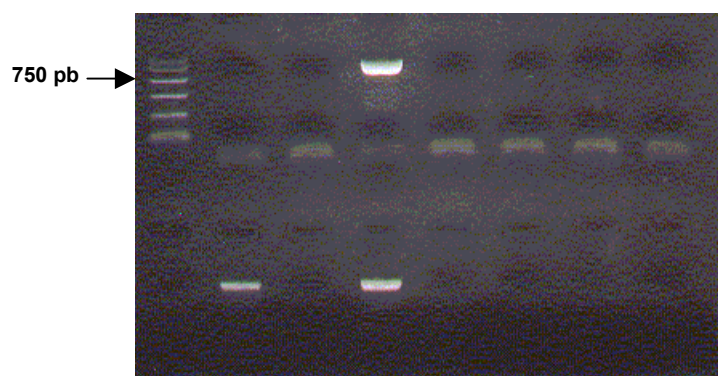


Figura 4.3. PCR gen *eae*

Figura 4.4. PCR gen *afa*

Factores de Adherencia	Frecuencia (%)		<i>p</i>
	Cirrosis (n=59)	Controles (n=20)	
Gen <i>eae</i>	22	10	NS
Gen <i>afa</i>	10.2	5	NS
Gen <i>fimA</i>	71.2	85	NS
Expresión gen <i>fimA</i>	52.5	70	NS

Tabla 4.7. Presencia de factores de adherencia en cepas de *E. coli* de pacientes con cirrosis y en controles.

Tal y como se muestra en la **Tabla 4.7**, no existen diferencias significativas entre la presencia de factores de adherencia en el grupo de cepas aisladas en los pacientes cirróticos respecto a la población sana estudiada.

Por otro lado, se estudió la presencia de los factores de adherencia según la sensibilidad o resistencia de las cepas. Así, en la **Tabla 4.8** se puede

observar que todos ellos, y en especial el gen *afa*, están presentes en mayor proporción en las cepas sensibles a fluorquinolonas.

Presencia de Factores de Adherencia (%)				
	Gen <i>eae</i> (n=13)	Gen <i>afa</i> (n=6)	Gen <i>fimA</i> (n=42)	Expresión gen <i>fimA</i> (n=31)
Sensible	61.5 (8)	100 (6)	59.5 (25)	54.8 (17)
Resistente	38.5 (5)	-	40.5 (17)	45.2 (14)
<i>p</i>	NS	<0.05	NS	NS

Tabla 4.8. Presencia de factores de adherencia en cepas de *E. coli* de pacientes con cirrosis según la sensibilidad a fluorquinolonas.

En relación con la adherencia bacteriana, se comparó la presencia de cada uno de estos factores con la adherencia observada en dichas cepas. Los resultados obtenidos se muestran en la siguientes tablas (**Tablas 4.9 y 4.10**).

Factores de Adherencia (FA)	Media del % adherencia basal		<i>p</i>
	Presencia FA	Ausencia FA	
Gen <i>eae</i>	76.5	79.9	NS
Gen <i>afa</i>	79.7	79.0	NS
Gen <i>fimA</i>	79.9	77.2	NS
Expresión gen <i>fimA</i>	80.9	77.1	NS

Tabla 4.9. Media del porcentaje de adherencia basal en relación con la presencia o ausencia de los factores de adherencia en las cepas de *E. coli* de pacientes con cirrosis.

Factores de Adherencia (FA)	N° <i>E. coli</i> / célula		<i>p</i>
	Presencia FA	Ausencia FA	
Gen <i>eae</i>	8.9	10.2	NS
Gen <i>afa</i>	8.5	10.4	NS
Gen <i>fimA</i>	9.9	9.6	NS
Expresión gen <i>fimA</i>	10.2	9.5	NS

Tabla 4.10. Mediana del número de bacterias adheridas por célula en relación con la presencia o ausencia de los factores de adherencia en las cepas de *E. coli* de pacientes con cirrosis.

Como se observa en ambas tablas, las medias de los porcentajes de adherencia basal al igual que la mediana del número de bacterias adheridas por célula, son similares tanto en presencia como en ausencia de los factores de adherencia, no existiendo diferencias significativas en ninguno de los casos. Sólo se observa un ligero aumento de la adherencia, sin significación estadística, en los casos en que se produce la expresión del gen *fimA*.

El mismo tratamiento se realizó con los controles sanos, obteniéndose valores muy similares ($p=NS$) a los expuestos en la Tablas 4.9 y 4.10.

Por otra parte estudiamos la adherencia en función del número de factores de adherencia presentes. Los resultados se muestran en la tabla siguiente (**Tabla 4.11**), no observándose diferencias significativas entre la adherencia observada según el número de factores presentes por cualquiera de los dos métodos de medida de la misma.

Nº Factores de Adherencia		Frecuencia (%) (n= 59)	Media del % adherencia basal	Mediana del nº bacterias / célula
Ninguno	(n=11)	18.6	77.3	10.7
Un factor	(n=13)	22.0	79.0	8.8
Dos factores	(n=26)	44.1	79.4	10.1
Tres factores	(n=9)	15.2	80.8	9.7
<i>p</i>			NS	NS

Tabla 4.11. Adherencia bacteriana en función del número de factores de adherencia presentes en las cepas de *E. coli* de pacientes con cirrosis.

Si analizamos la adherencia observada en función del número de factores de adherencia existentes por cepa en relación a la condición de sensibilidad o resistencia a quinolonas fluoradas, los resultados que se obtienen son similares entre ambos grupos, excepto en el caso de la presencia de dos factores de adherencia en que el número de bacterias adheridas por célula fue significativamente mayor en el grupo de sensible a quinolonas (**Tabla 4.12**).

Nº Factores de Adherencia		Media del % adherencia basal			Mediana del nº bacterias/célula		
		SQ	RQ	<i>p</i>	SQ	RQ	<i>p</i>
Ninguno	(n=11)	72.7	85.2	NS	9.7	12.5	NS
Un factor	(n=13)	76.0	89.0	NS	7.2	14.3	NS
Dos factores	(n=26)	81.5	77.0	NS	12.6	7.2	<0.05
Tres factores	(n=9)	80.8	80.6	NS	8.3	12.3	NS

Tabla 4.12. Adherencia bacteriana en función del número de factores de adherencia presentes en las cepas de *E. coli* de pacientes con cirrosis según sensibilidad o resistencia a fluorquinolonas.

Capítulo 5. Discusión

Las infecciones bacterianas y, en especial la PBE, son complicaciones habituales de la cirrosis y una causa importante de morbi-mortalidad en estos pacientes (57). Tal y como ya se ha comentado previamente, uno de los mecanismos implicados en la patogenia de la PBE es la traslocación bacteriana, que consiste en el paso de bacterias de origen intestinal a través del epitelio gastrointestinal sin que haya rotura aparente del mismo, hacia los ganglios linfáticos mesentéricos y otras localizaciones (115). Además, existen una serie de factores concomitantes como la permeabilidad intestinal alterada (95), el enlentecimiento del tránsito intestinal (72) y el SBI (92), que junto con un estado inmunitario deficiente en la cirrosis (144), crearían una situación de riesgo añadido para el desarrollo de la traslocación bacteriana y eventualmente PBE en estos pacientes.

En este contexto se ha demostrado que la administración continua de norfloxacin, fluorquinolona de amplio espectro frente a BGN, se ha asociado con una disminución importante en la traslocación bacteriana en modelos animales (189), así como con una reducción de la incidencia de episodios de PBE en ratas cirróticas (169). En el contexto clínico, la DIS con norfloxacin se ha comprobado que reduce la incidencia de PBE en pacientes con proteínas bajas en líquido ascítico (320), con hemorragia digestiva alta (2) y en pacientes que ya han sobrevivido a un episodio previo de PBE (3).

Sin embargo, la administración continuada de norfloxacin se ha asociado con el desarrollo de cepas RQ en heces de estos pacientes (7;16). En nuestro estudio se confirman de nuevo estos resultados ya que el 90% de los pacientes con *E. coli* RQ en heces habían recibido previamente norfloxacin como profilaxis secundaria de PBE, lo que explica que la administración de profilaxis secundaria con norfloxacin esté asociada con un riesgo de aparición de resistencias cuatro veces mayor que cuando no se administra. Sorprendentemente, en estas situaciones de administración de DIS durante largo tiempo, la detección de PBE producidas por BGN RQ no es un acontecimiento frecuente (7;321), aunque sí se han descrito casos en series estudiadas recientemente (8;9). No está claro el mecanismo por el cual en estos pacientes que desarrollan BGN RQ en heces y continúan recibiendo norfloxacin, no sufren con la frecuencia esperada infecciones producidas por este tipo de gérmenes. Se ha postulado que, por un lado, las cepas RQ podrían poseer una capacidad infectiva menor que las sensibles, y por otro, que la presencia continuada de norfloxacin en el intestino podría reducir la capacidad infectiva incluso de las cepas RQ (8;10). Nuestro trabajo se ha llevado a cabo principalmente con el fin de aclarar, en la medida de lo posible, estas dos posibilidades. Por tanto, se ha estudiado la adherencia bacteriana de las cepas de *E. coli* SQ y RQ aisladas de pacientes cirróticos, a células de la boca de

éstos, así como el efecto que concentraciones de norfloxacino por debajo de la CMI tienen sobre la adherencia bacteriana en ambos tipos de cepas.

El paso previo en la traslocación de bacterias desde la luz intestinal a ganglios linfáticos mesentéricos es la adherencia de las bacterias a las células epiteliales intestinales, la cual se ha considerado como un importante factor de virulencia bacteriana (322;323). En nuestro caso, la adherencia observada fue similar ($p=NS$) para las cepas SQ y RQ (78.2 vs 80.6% de adherencia respectivamente; 8 bacterias/célula en ambos grupos), independientemente del método de medida de la misma, lo que indicaría que, por lo menos en un primer momento, ambos tipos de cepas se comportarían igual.

Estos resultados contrastan con la menor incidencia descrita de infecciones, sobre todo PBE, producidas por BGN RQ (10;27), pero en cambio concordaría con los resultados obtenidos por Velasco y cols., según los cuales las cepas RQ serían menos capaces de producir infecciones invasivas que las sensibles (324) y por tanto, tendrían menor capacidad para traslocar y provocar infecciones. Según Vila y cols. (325), la adquisición de la resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli* uropatógenas, estaría asociada a la pérdida o disminución en la expresión de algunos factores de virulencia, probablemente como consecuencia de los cambios fenotípicos que se producen al modificarse la sensibilidad de la bacteria (326). De igual forma y como discutiremos más adelante, en nuestra serie hemos observado una menor presencia de los factores de adherencia estudiados en cepas RQ que en SQ, aunque sólo es significativa en el caso de la presencia del gen que codifica la adhesina afimbrial (*afa*). Según nuestros datos, de los estudios realizados sobre la virulencia de cepas de *E. coli* RQ, éste es el primero en el que se analiza su comportamiento en el contexto de una patología como la cirrosis.

Hemos visto que la administración continua de norfloxacino como profilaxis de la PBE disminuye de forma importante la incidencia de ésta, probablemente debido al efecto que tiene sobre la población bacteriana la presencia continua del antibiótico en intestino. La administración de norfloxacino con intervalos de dosificación mayores de lo habitual (400mg cada 24 horas), resultan en una fluctuación de los niveles de antibiótico y, por tanto, se alcanzarían entre las dosis concentraciones por debajo de la CMI para el microorganismo. Así, en nuestro estudio ensayamos la adherencia de *E. coli* tras la adición al medio de concentraciones subinhibidoras de norfloxacino, obteniéndose una disminución importante y significativa ($p < 0.001$) respecto de los valores de adherencia obtenidos sin antibiótico, tanto en el caso de cepas SQ como RQ (48.5 vs 45.9% adherencia y 3 vs 4 bacterias/célula, respectivamente).

Una vez más, observamos que las cepas de *E. coli* se comportan de forma similar con respecto a la adherencia a células epiteliales, independientemente de su condición de sensibilidad o resistencia a fluorquinolonas, lo cual no deja de ser excepcional puesto que en el caso de las cepas RQ este comportamiento no era esperable. Sin embargo, sí concuerda con los resultados clínicos obtenidos en pacientes cirróticos sometidos a DIS, donde pese al desarrollo frecuente de cepas RQ en heces (7), no se encuentra con la frecuencia esperada infecciones por este tipo de cepas (11). En el caso de las cepas SQ, se ha comprobado en numerosos estudios (14;15;292) que la administración de concentraciones subinhibitorias de antibiótico alteran una serie de mecanismos implicados en la adherencia bacteriana, produciendo una notable disminución de ésta, al igual que sucede en nuestra serie. La presencia continua de norfloxacino en la luz intestinal parece ser que produciría en las bacterias RQ alguna alteración en los mecanismos de adherencia de la bacteria, de forma similar a lo que sucede en SQ (14;292), lo que explicaría la similar disminución en la adherencia de ambos fenotipos bacterianos. Esta teoría no ha

sido comprobada, pero en un futuro podría ser de gran utilidad. Solamente existe un trabajo publicado en 1987 en el que se describe una situación similar con ciprofloxacino, en la que tras 3 semanas de tratamiento y pese a la aparición a las dos semanas de un 40% de cepas RQ, la situación clínica se resolvió favorablemente (327).

En los últimos trabajos publicados se detecta un aumento del número de infecciones debidas a BGN RQ (10;328), sobre todo en pacientes sometidos a DIS durante largos periodos de tiempo y cuyo estado evolutivo de la cirrosis es más avanzado. En estos pacientes en tratamiento prolongado con antibiótico podemos suponer que suceden dos fases: la primera, una vez ha comenzado la administración de DIS con norfloxacino, en la que los BGN SQ empiezan a desaparecer de las heces (329); seguida de una segunda fase, en la que una elevada proporción de pacientes desarrolla cepas RQ en heces (7). Es lógico pensar que el mantenimiento de un tratamiento con norfloxacino en dosis bajas crearía un ecosistema adecuado para que bacterias RQ puedan multiplicarse, llegando a una situación teórica de sobrecrecimiento. Este hecho, a su vez, aumentaría la probabilidad de sufrir infecciones por BGN RQ (83), aunque su invasividad disminuida junto con la presencia continua de norfloxacino explicaría que, cuando se producen, sean en su mayoría de carácter leve (principalmente infecciones urinarias) (10;330).

Por otra parte, y como se muestra tanto en nuestra serie como en otras publicadas (7;328), los pacientes que desarrollan cepas RQ (Grupo II) suelen ser pacientes con un estado evolutivo de la cirrosis más avanzado, y por tanto, una buena proporción pertenece al grupo en tratamiento con DIS durante largos periodos de tiempo. De ahí que la presencia previa de episodios de ascitis y encefalopatía, al llevar frecuentemente asociada la administración de antibiótico y consecuentemente la aparición de cepas RQ en heces, se puede asociar a un

riesgo de aparición de resistencia de aproximadamente el doble que en ausencia de los mismos.

En consecuencia, en los pacientes en tratamiento profiláctico con norfloxacino podrían ocurrir dos situaciones opuestas. Por un lado pueden desarrollar con mayor frecuencia cepas RQ, las cuales poseerían, en teoría, una menor capacidad infectiva y además, como hemos visto, su adherencia es menor en presencia de antibiótico. Por otro lado, los pacientes en los que esta situación tiene lugar suelen estar generalmente en peor estado, es decir, presentan mayor número de factores de riesgo que favorecen la traslocación de bacterias y el desarrollo de infecciones. Por tanto, suponemos que existe un equilibrio entre ambas situaciones que, cuando se rompe da lugar a la aparición de las infecciones.

Siguiendo esta misma línea, numerosos estudios han coincidido en señalar que tiene tanta importancia la adherencia bacteriana como los factores locales del huésped en la patogénesis de las infecciones, sobre todo en las producidas por BGN RQ (331;332). Así, defectos en la fisiología del huésped, tales como alteraciones en la integridad de la mucosa o de la piel, o defectos en la inmunidad, pueden permitir a gérmenes sin factores de virulencia invadir los tejidos y proliferar. En el caso de pacientes con cirrosis se ha observado que aquellos con aclaramiento hepático deficiente, son más susceptibles de desarrollar sepsis por gérmenes carentes de adhesinas (333).

En nuestro trabajo se ha visto que, en relación con la presencia de adhesinas estudiadas en las cepas de *E. coli* obtenidas de los escobillados rectales de pacientes con cirrosis, en general no existen diferencias respecto a la frecuencia de aparición de éstas respecto a los controles sanos evaluados. Es decir, que por lo menos en un principio no parecen ser cepas distintas de las de

la población normal. De hecho, el factor más frecuentemente encontrado es la presencia de fimbrias tipo I, al igual que sucede en la población general (262). Sin embargo, cuando estudiamos por separado la presencia de dichos genes en relación con la sensibilidad o resistencia a fluorquinolonas, aunque no existen diferencias significativas, excepto en el gen que codifica las adhesinas afimbriales (gen *afa*), sí se puede observar un mayor número de dichos genes cuando las cepas son SQ. Lo cual estaría en consonancia con la teoría ya mencionada de la probable pérdida de factores de virulencia en cepas RQ (325). Por otro lado, no se observa que la presencia de dichos factores por separado confiera a la bacteria una mayor capacidad de adherencia, por lo menos en nuestra serie, respecto a la adherencia observada cuando se compara con la encontrada en ausencia de éstos. Solamente se aprecia un ligero aumento de la capacidad de adherencia cuando se produce la expresión de las fimbrias tipo I (Tabla 4.9), probablemente debido a la mayor presencia de éstas y a su coexistencia con otros factores.

Respecto a la coexistencia de varios factores de adherencia se ha observado que en nuestra serie existe un 18% de cepas en las que no hay ninguna de las adhesinas estudiadas. Respecto al 82% restante, lo más frecuente fue la presencia conjunta de dos de ellas (44%). Resultados similares se obtuvieron en un estudio que evaluó la presencia de adhesinas bacterianas de *E. coli* en relación con el desarrollo de bacteriemia (333), observándose que aunque un 69% de éstas presentaron algún factor de adherencia, existía un 31% que carecía de ellas lo que sugeriría que, por lo menos en estos casos no son estrictamente necesarias y que predominarían otros factores, tal como el estado del paciente.

Aunque no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, probablemente por el número de cepas estudiadas, hay un ligero aumento del

porcentaje de células que presentaron adherencia positiva cuando coexistían varios de estos factores a la vez. Estos datos demostrarían, en caso de ser significativos, los ya encontrados por otros investigadores donde se sugiere que la expresión de múltiples factores de virulencia están relacionados con un mayor potencial invasivo de dichas cepas (333;334). Así, según los datos de nuestro estudio, sólo podemos aventurar que o bien necesitaríamos analizar un mayor número de cepas para comprobar dicha hipótesis, o bien que existen otros factores no estudiados y que estarían influyendo en la adherencia e invasividad de dichas cepas.

Por último, la influencia de la presencia conjunta de un determinado número de factores de adherencia sobre la capacidad de adherencia bacteriana, no parece ser diferente entre los grupos de cepas SQ y RQ, lo que corroboraría los resultados obtenidos inicialmente según los cuales ambos fenotipos de *E. coli* se comportarían de forma similar.

En definitiva, en los pacientes con cirrosis se produce una situación especial y paradójica en la que debido a la administración continua de norfloxacino como profilaxis secundaria de la PBE, se desarrollarían cepas de *E. coli* RQ en el lumen intestinal que, contrariamente a lo esperado, se comportan de forma similar a las SQ. Como hemos demostrado en este estudio, la adherencia bacteriana, como paso previo a la invasión celular y a la traslocación bacteriana, es similar e independiente de la sensibilidad o resistencia a fluorquinolonas. Por otro lado, la exposición a norfloxacino en concentraciones por debajo de la CMI para la bacteria produce una disminución importante en la adherencia de ambos tipos de cepas a las células epiteliales, lo que explicaría la menor incidencia de infecciones por cepas RQ en pacientes sometidos a DIS (163). Es difícil predecir el comportamiento de este tipo de cepas en un futuro y, de hecho han aumentado el número de infecciones debidas a estas cepas en los

últimos años (328), quizá debido al tratamiento prolongado en el tiempo y a la posible existencia de sobrecrecimiento de un determinado tipo de cepa bacteriana. Cabe considerar que en estas condiciones el factor de sobrecrecimiento sea, probablemente, más relevante que el de la adherencia. Así, estudios actualmente en curso por nuestro grupo demuestran que la traslocación bacteriana es un fenómeno persistente y que se debe a clones únicos durante un periodo de tiempo de al menos 64 horas, lo que permite suponer que el factor de sobrecrecimiento es fundamental.

Aun así, los resultados obtenidos en este estudio apoyarían el mantenimiento de la profilaxis con este antibiótico, aun en el caso de desarrollo de cepas RQ en heces en pacientes cirróticos con alto riesgo de sufrir infecciones y tras valorar el riesgo-beneficio que supone para cada paciente en concreto. Sin embargo, podría ser interesante realizar rotaciones periódicas de dos o tres antibióticos en estos pacientes con el fin de eliminar las cepas resistentes que pudiesen aparecer, y así evitar su sobrecrecimiento.

Por último, este trabajo supone un nuevo enfoque de la profilaxis con concentraciones subinhibidoras de antibiótico y el efecto de éstas sobre la adherencia a células epiteliales de un germen tan habitual como es *E. coli*, y cuyos niveles de resistencia a fluorquinolonas entre la población normal se sitúan ya en torno al 24% (335).

Capítulo 6. Resumen y Conclusiones

El norfloxacinó es una fluorquinolóna de uso frecuente en la descontaminación intestinal selectiva en pacientes con cirrosis hepática, como profilaxis secundaria de la peritonitis bacteriana espontánea. Debido a su utilización prolongada, este hecho favorece la aparición de cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas en heces. Sin embargo, en estos pacientes el desarrollo de episodios infecciosos por este tipo de bacterias, no es tan frecuente como cabría esperar por razones no bien conocidas. Cabe considerar que la presencia continua de norfloxacinó en la luz colónica podría modificar alguno de los factores de virulencia bacteriana, tal como la capacidad de adherencia bacteriana a células epiteliales, entre otros.

El objetivo principal de nuestro proyecto fue estudiar *in vitro* la capacidad de adherencia bacteriana a células epiteliales de las cepas de *E. coli* aisladas en pacientes con cirrosis, tanto en presencia como en ausencia de concentraciones

subinhibidoras de norfloxacino en el medio, y valorar así la utilidad del tratamiento prolongado con esta quinolona. Además, se evaluó la presencia de tres de los factores de adherencia más importantes y su influencia en la adherencia al epitelio.

Se estudiaron 59 cepas de *E. coli* (22 resistentes y 37 sensibles a quinolonas) obtenidas mediante escobillado rectal en pacientes con cirrosis, que se incubaron con células epiteliales bucales, con y sin concentraciones subinhibidoras de norfloxacino en el medio. Se estudió la presencia de tres factores de adherencia: fimbrias tipo I, adhesina afimbrial e íntima, mediante reacción en cadena de la polimerasa. Ambos fenotipos bacterianos mostraron una capacidad basal de adherencia similar, que a su vez disminuyó significativamente en todos los casos al añadir concentraciones subinhibidoras de norfloxacino al medio. La presencia de los factores de adherencia bacteriana detallados fue menos frecuente en las cepas resistentes a quinolonas que en las sensibles, y el 18% de las cepas analizadas en su conjunto carecieron de todos los factores de adherencia estudiados. Aunque no encontramos diferencias significativas entre ambos fenotipos bacterianos, la presencia conjunta de varios factores de adherencia se correlaciona con un ligero aumento de la adherencia bacteriana.

Así, las conclusiones más relevantes de este trabajo son:

1. La capacidad de adherencia bacteriana a células epiteliales de cepas de *E. coli* sensibles y resistentes a quinolonas es similar, y disminuye significativamente en ambos casos al añadir norfloxacino al medio de cultivo. Estos resultados apoyarían el uso continuado de norfloxacino en estos pacientes, a pesar de la selección de cepas resistentes a quinolonas en heces.

2. Las cepas resistentes a quinolonas muestran una menor presencia de factores de adherencia, lo que respaldaría la conclusión anterior y sugiere la existencia de una pérdida de factores al adquirir la resistencia. Así mismo, podría asociarse a una posible disminución de la capacidad infectiva, ya que el fitness de la bacteria se resiente al desarrollar mecanismos de resistencia.

3. Estos datos, a su vez, sugieren que el desarrollo de cepas resistentes a quinolonas en la luz intestinal no es un factor determinante por sí mismo para inducir la traslocación bacteriana. Cabe considerar que otros factores tales como el sobrecrecimiento de estas cepas, pueda ser el factor que favorezca su traslocación.

Capítulo 7. Bibliografía

1. Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. Clin Infect Dis 1998; 27: 669-74.
2. Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzalez D, Sainz S, Anguera A, Cusso X, Balanzo J, . Norfloxacin prevents bacterial infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. Gastroenterology 1992; 103: 1267-72.
3. Gines P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forne M, Miranda ML, Llach J, Salmeron JM, . Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. Hepatology 1990; 12: 716-24.
4. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. J Hepatol 1988; 6: 80-4.
5. Gines P, Navasa M. Antibiotic prophylaxis for spontaneous bacterial peritonitis: how and whom? J Hepatol 1998; 29: 490-4.
6. Inadomi J, Sonnenberg A. Cost-analysis of prophylactic antibiotics in spontaneous bacterial peritonitis. Gastroenterology 1997; 113: 1289-94.

7. Aparicio JR, Such J, Pascual S, Arroyo A, Plazas J, Girona E, Gutierrez A, de Vera F, Palazon JM, Carnicer F, Perez-Mateo M. Development of quinolone-resistant strains of *Escherichia coli* in stools of patients with cirrhosis undergoing norfloxacin prophylaxis: clinical consequences. *J Hepatol* 1999; 31: 277-83.
8. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35: 140-8.
9. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, Sabat M, Vila MC, Guarner C, Vilardell F. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997; 25: 532-6.
10. Ortiz J, Vila MC, Soriano G, Minana J, Gana J, Mirelis B, Novella MT, Coll S, Sabat M, Andreu M, Prats G, Sola R, Guarner C. Infections caused by *Escherichia coli* resistant to norfloxacin in hospitalized cirrhotic patients. *Hepatology* 1999; 29: 1064-9.
11. Llovet JM, Rodriguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, Pardo A, Castells A, Cabre E, Arroyo V, Gassull MA, Rodes J. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol* 1997; 26: 88-95.
12. Breines DM, Burnham JC. The effects of quinolones on the adherence of type-1 fimbriated *Escherichia coli* to mannosylated agarose beads. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 911-25.
13. Vranes J, Zagar Z, Kurbel S. Influence of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the morphology and adherence of P-fimbriated *Escherichia coli*. *J Chemother* 1996; 8: 254-60.
14. Vranes J. Effect of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin, and azithromycin on the hemagglutination and adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Chemotherapy* 1996; 42: 177-85.
15. Abalia I, Rodriguez E, Umaman A, Lacalle J, Sarasua A, Huarte M, Ramon BJ. [Modulation of P-fimbriation by ciprofloxacin in uropathogenic *Escherichia coli*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15: 255-9.
16. Dupeyron C, Mangeney N, Sedrati L, Campillo B, Fouet P, Leluan G. Rapid emergence of quinolone resistance in cirrhotic patients treated with norfloxacin to prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 340-4.

17. Sherlock S, Dooley J. Hepatic cirrhosis. In: Sherlock S, Dooley J, eds. *Disease of the Liver and Biliary System*. Londres: Blackwell Scientific Publication, 1993;357-69.
18. Guarner C, Soriano G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 203-17.
19. Runyon BA. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis. In: Feldman M, Scharschmidt B, Sleisenger M, eds. *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease. Pathophysiology/ diagnosis/ treatment*. Philadelphia: WB Saunders, 1998;1310-1333.
20. Navasa M, Casafont F, Clemente G, Guarner C, de la MM, Planas R, Sola R, Suh J. [Consensus on spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis: diagnosis, treatment, and prophylaxis]. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 37-46.
21. Toledo C, Salmeron JM, Rimola A, Navasa M, Arroyo V, Llach J, Gines A, Gines P, Rodes J. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993; 17: 251-7.
22. Llovet JM, Planas R, Morillas R, Quer JC, Cabre E, Boix J, Humbert P, Guilera M, Domenech E, Bertran X, . Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 388-92.
23. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas V, Rimola A, Marco F, Guarner C, Forne M, Planas R, Banares R, Castells L, Jimenez De Anta MT, Arroyo V, Rodes J. Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1011-7.
24. Rimola A, Navasa M. Infections in liver disease. In: Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, Rizzeto M, Rodes J, eds. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. New York, Tokio: Oxford University Press, 1999;1861-76.
25. Runyon BA. Management of adult patients with ascites caused by cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27: 264-72.
26. Gines P, Arroyo V. Cirrosis hepática. In: Rozman C, ed. *Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman*. Madrid: Ediciones Harcourt, S.A., 2000.
27. Llovet JM, Rodriguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, Pardo A, Castells A, Cabre E, Arroyo V, Gassull MA, Rodes J. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol* 1997; 26: 88-95.

Bibliografía 100

28. Planas R, Arroyo V. Spontaneous bacterial peritonitis. *Acta Gastroenterol Belg* 1995; 58: 297-310.
29. Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988; 6: 80-4.
30. Such J, Guarner C, Runyon BA. Spontaneous Bacterial Peritonitis. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier R, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease*. Malden: MA: Blackwell Science, Inc., 1999;99-115.
31. Conn HO, Fessel JM. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme. *Medicine (Baltimore)* 1971; 50: 161-97.
32. Correia JP, Conn HO. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: endemic or epidemic? *Med Clin North Am* 1975; 59: 963-81.
33. Curry N, McCallum RW, Guth PH. Spontaneous peritonitis in cirrhotic ascites. A decade of experience. *Am J Dig Dis* 1974; 19: 685-92.
34. Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Arroyo V, Bruguera M, Teres J, Bordas JM, Gassull MA, Revert L. [Peritoneal infection in hepatic cirrhosis with ascitis]. *Rev Clin Esp* 1971; 123: 375-80.
35. Wyke RJ. Problems of bacterial infection in patients with liver disease. *Gut* 1987; 28: 623-41.
36. Felisart J, Rimola A, Arroyo V, Perez-Ayuso RM, Quintero E, Gines P, Rodes J. Cefotaxime is more effective than is ampicillin-tobramycin in cirrhotics with severe infections. *Hepatology* 1985; 5: 457-62.
37. Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: an explosion of information. *Hepatology* 1988; 8: 171-5.
38. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18: 353-8.
39. Garcia-Tsao G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21: 257-75.
40. Navasa M, Rimola A, Rodes J. Bacterial infections in liver disease. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 323-33.
41. Rimola A. Treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis. In: Rodes J, Arroyo V, eds. *Therapy in liver diseases*. Barcelona: Ediciones Doyma, 1991.

42. Cabrera J, Arroyo V, Ballesta AM, Rimola A, Gual J, Elena M, Rodes J. Aminoglycoside nephrotoxicity in cirrhosis. Value of urinary beta 2- microglobulin to discriminate functional renal failure from acute tubular damage. *Gastroenterology* 1982; 82: 97-105.
43. Carmine AA, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Cefotaxime. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 1983; 25: 223-89.
44. Runyon BA, Akriviadis EA, Sattler FR, Cohen J. Ascitic fluid and serum cefotaxime and desacetyl cefotaxime levels in patients treated for bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1782-6.
45. Runyon BA, McHutchison JG, Antillon MR, Akriviadis EA, Montano AA. Short-course versus long-course antibiotic treatment of spontaneous bacterial peritonitis. A randomized controlled study of 100 patients. *Gastroenterology* 1991; 100: 1737-42.
46. Fong TL, Akriviadis EA, Runyon BA, Reynolds TB. Polymorphonuclear cell count response and duration of antibiotic therapy in spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1989; 9: 423-6.
47. Rimola A, Salmeron JM, Clemente G, Rodrigo L, Obrador A, Miranda ML, Guarner C, Planas R, Sola R, Vargas V, . Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. *Hepatology* 1995; 21: 674-9.
48. Gomez-Jimenez J, Ribera E, Gasser I, Artaza MA, Del Valle O, Pahissa A, Martinez-Vazquez JM. Randomized trial comparing ceftriaxone with cefonicid for treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1587-92.
49. Mercader J, Gomez J, Ruiz J, Garre MC, Valdes M. Use of ceftriaxone in the treatment of bacterial infections in cirrhotic patients. *Chemotherapy* 1989; 35 Suppl 2: 23-6.
50. Mesquita MA, Balbino EP, Albuquerque RS, Carmona CA, Okubo BT, Lorena SL, Montes CG, Soares EC. Ceftriaxone in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis: ascitic fluid polymorphonuclear count response and short-term prognosis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1276-80.
51. McCormick PA, Greenslade L, Kibbler CC, Chin JK, Burroughs AK, McIntyre N. A prospective randomized trial of ceftazidime versus netilmicin plus mezlocillin in the empirical therapy of presumed sepsis in cirrhotic patients. *Hepatology* 1997; 25: 833-6.
52. Grange JD, Amiot X, Grange V, Gutmann L, Biour M, Bodin F, Poupon R. Amoxicillin-clavulanic acid therapy of spontaneous bacterial peritonitis: a

- prospective study of twenty-seven cases in cirrhotic patients. *Hepatology* 1990; 11: 360-4.
53. Ricart E, Soriano G, Novella MT, Ortiz J, Sabat M, Kolle L, Sola-Vera J, Minana J, Dedeu JM, Gomez C, Barrio JL, Guarner C. Amoxicillin-clavulanic acid versus cefotaxime in the therapy of bacterial infections in cirrhotic patients. *J Hepatol* 2000; 32: 596-602.
 54. Ariza J, Xiol X, Esteve M, Fernandez BF, Linares J, Alonso T, Gudiol F. Aztreonam vs. cefotaxime in the treatment of gram-negative spontaneous peritonitis in cirrhotic patients. *Hepatology* 1991; 14: 91-8.
 55. Silvain C, Breux JP, Grollier G, Rouffineau J, Becq-Giraudon B, Beauchant M. [Can septicemia and ascitic fluid infections in cirrhotic patients be treated by the oral route alone?]. *Gastroenterol Clin Biol* 1989; 13: 335-9.
 56. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, Castells L, Vargas V, Soriano G, Guevara M, Gines P, Rodes J. Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999; 341: 403-9.
 57. Altman C, Grange JD, Amiot X, Pelletier G, Lacaine F, Bodin F, Etienne JP. Survival after a first episode of spontaneous bacterial peritonitis. Prognosis of potential candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 47-50.
 58. Bac DJ. Spontaneous bacterial peritonitis: an indication for liver transplantation? *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 218: 38-42.
 59. Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, Coll S, Oliver MI. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterology* 1993; 1133-8.
 60. Llach J, Rimola A, Navasa M, Gines P, Salmeron JM, Gines A, Arroyo V, Rodes J. Incidence and predictive factors of first episode of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis with ascites: relevance of ascitic fluid protein concentration. *Hepatology* 1992; 16: 724-7.
 61. Silvain C, Besson I, Ingrand P, Mannant PR, Fort E, Beauchant M. Prognosis and long-term recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 19: 188-9.
 62. Tito L, Rimola A, Gines P, Llach J, Arroyo V, Rodes J. Recurrence of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: frequency and predictive factors. *Hepatology* 1988; 8: 27-31.

63. Balthazar EJ, Gade MF. Gastrointestinal edema in cirrhotics. Radiographic manifestations and pathogenesis with emphasis on colonic involvement. *Gastrointest Radiol* 1976; 1: 215-23.
64. Granger DN, Barrowman JA. Microcirculation of the alimentary tract. II. Pathophysiology of edema. *Gastroenterology* 1983; 84: 1035-49.
65. Hwang JC, Ha HK, Yoon KH, Lee M, Kim PN, Lee YS, Chung YH, Jung HY, Suh DJ, Auh YH. Colonic wall thickening in cirrhotic patients: CT features and its clinical significance. *Abdom Imaging* 1999; 24: 125-8.
66. Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic, and histopathologic features. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 944-54.
67. Hendrickse MT, Thuluvath PJ, Triger DR. Natural history of autonomic neuropathy in chronic liver disease. *Lancet* 1992; 339: 1462-4.
68. Hendrickse MT, Triger DR. Autonomic dysfunction in chronic liver disease. *Clin Auton Res* 1993; 3: 227-31.
69. Reilly JA, Jr., Quigley EM, Forst CF, Rikkens LF. Small intestinal transit in the portal hypertensive rat. *Gastroenterology* 1991; 100: 670-4.
70. Pardo A, Bartoli R, Lorenzo-Zuniga V, Planas R, Vinado B, Riba J, Cabre E, Santos J, Luque T, Ausina V, Gassull MA. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 858-63.
71. Chesta J, Defilippi C, Defilippi C. Abnormalities in proximal small bowel motility in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993; 17: 828-32.
72. Madrid AM, Cumsille F, Defilippi C. Altered small bowel motility in patients with liver cirrhosis depends on severity of liver disease. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 738-42.
73. Vanderhoof J, Young R. Pathogenesis and clinical manifestations of bacterial overgrowth. *UpToDate* . 17-12-1999. 24-8-2000.
Ref Type: Electronic Citation
74. Husebye E. Gastrointestinal motility disorders and bacterial overgrowth. *J Intern Med* 1995; 237: 419-27.
75. Saltzman JR, Kowdley KV, Pedrosa MC, Sepe T, Golner B, Perrone G, Russell RM. Bacterial overgrowth without clinical malabsorption in elderly hypochlorhydric subjects. *Gastroenterology* 1994; 106: 615-23.
76. Sarker SA, Gyr K. Non-immunological defence mechanisms of the gut. *Gut* 1992; 33: 987-93.

77. Schuffler MD, Rohrmann CA, Chaffee RG, Brand DL, Delaney JH, Young JH. Chronic intestinal pseudo-obstruction. A report of 27 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1981; 60: 173-96.
78. Shindo K, Machida M, Miyakawa K, Fukumura M. A syndrome of cirrhosis, achlorhydria, small intestinal bacterial overgrowth, and fat malabsorption. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 2084-91.
79. Lai D, Gorbach SL, Levitan R. Intestinal microflora in patients with alcoholic cirrhosis: urea-splitting bacteria and neomycin resistance. *Gastroenterology* 1972; 62: 275-9.
80. Chesta J, Silva M, Thompson L, del Canto E, Defilippi C. [Bacterial overgrowth in small intestine in patients with liver cirrhosis]. *Rev Med Chil* 1991; 119: 626-32.
81. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28: 1187-90.
82. Casafont F, de las Heras G, Martin L, Lopez MJ, Ledesma F, Pons F. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1252-6.
83. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26: 1372-8.
84. Casafont F, Almohalla C, Garcia PF, Pons RF. [Intestinal bacteria overgrowth in chronic hepatopathies]. *Rev Med Univ Navarra* 1998; 42: 183-7.
85. Pardo A, Bartoli R, Lorenzo-Zuniga V, Planas R, Vinado B, Riba J, Cabre E, Santos J, Luque T, Ausina V, Gassull MA. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 858-63.
86. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000; 31: 43-8.
87. Pelletier G, Briantais MJ, Buffet C, Pillot J, Etienne JP. Serum and intestinal secretory IgA in alcoholic cirrhosis of the liver. *Gut* 1982; 23: 475-80.
88. Walker WA, Isselbacher KJ, Bloch KJ. Intestinal uptake of macromolecules: effect of oral immunization. *Science* 1972; 177: 608-10.
89. Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 1972; 177: 697-9.

90. Pierce NF, Sack RB. Immune response of the intestinal mucosa to cholera toxoid. *J Infect Dis* 1977; 136 Suppl: S113-S117.
91. Budillon G, Parrilli G, Pacella M, Cuomo R, Menzies IS. Investigation of intestine and liver function in cirrhosis using combined sugar oral loads. *J Hepatol* 1985; 1: 513-24.
92. Bac DJ, Swart GR, van den Berg JWO, Wilson JHP. Small bowel wall function in patients with advanced liver cirrhosis and portal hypertension: studies on permeability and luminal bacterial overgrowth. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1993; 5: 383-7.
93. Resnick RH, Royal H, Marshall W, Barron R, Werth T. Intestinal permeability in gastrointestinal disorders. Use of oral [^{99m}Tc]DTPA. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 205-11.
94. Ersoz G, Aydin A, Erdem S, Yuksel D, Akarca U, Kumanlioglu K. Intestinal permeability in liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 409-12.
95. Campillo B, Pernet P, Bories PN, Richardet JP, Devanlay M, Aussel C. Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 755-9.
96. Pascual S. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatol-Gastroenterol* 2003; Accepted. In press..
97. Nagral AS, Joshi AS, Bhatia SJ, Abraham P, Mistry FP, Vora IM. Congestive jejunopathy in portal hypertension. *Gut* 1993; 34: 694-7.
98. Norman DA, Atkins JM, Seelig LL, Jr., Gomez-Sanchez C, Krejs GJ. Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1980; 79: 707-15.
99. Vigneri S, Termini R, Piraino A, Scialabba A, Bovero E, Pisciotta G, Fontana N. The duodenum in liver cirrhosis: endoscopic, morphological and clinical findings. *Endoscopy* 1991; 23: 210-2.
100. Astaldi G, Strosselli. Peroral biopsy of the mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J Dig Dis* 1960; 5: 603-12.
101. Viggiano TR, Gostout CJ. Portal hypertensive intestinal vasculopathy: a review of the clinical, endoscopic, and histopathologic features. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 944-54.
102. Misra V, Misra S, Dwivedi M, Gupta S. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Anat Pathol* 1996; 108: 652-7.

Bibliografía 106

103. Such J, Guardiola JV, de Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Sola-Vera J, Perez-Mateo M. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 371-6.
104. Pascual S. Estudio morfológico y funcional de la barrera intestinal en la cirrosis. 2000. Universidad Miguel Hernandez. Facultad de Medicina. Departamento de Medicina Clínica.
Ref Type: Thesis/Dissertation
105. Deitch EA, Specian RD, Berg RD. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med* 1991; 19: 785-91.
106. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979; 28: 293-450.
107. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-43.
108. Sorell WT, Quigley EM, Jin G, Johnson TJ, Rikkens LF. Bacterial translocation in the portal-hypertensive rat: studies in basal conditions and on exposure to hemorrhagic shock. *Gastroenterology* 1993; 104: 1722-6.
109. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993; 17: 1081-5.
110. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, Arnal J, Ojanguren I, Ausina V, Gassull MA. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996; 23: 781-7.
111. Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, Ferwerda CC, Cuesta MA, Meyer S, Westdorp RI. Clinical significance of translocation. *Gut* 1994; 35: S28-S34.
112. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11.
113. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990; 212: 496-510.
114. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willen R, Bengmark S. Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. *J Surg Res* 1994; 57: 238-45.

115. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23: 217-44.
116. Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990; 159: 79-84.
117. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 1988; 28: 896-906.
118. Deitch EA, Morrison J, Berg R, Specian RD. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic- decontaminated rats. *Crit Care Med* 1990; 18: 529-36.
119. Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987; 122: 185-90.
120. Maejima K, Deitch E, Berg R. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. *Arch Surg* 1984; 119: 166-72.
121. Maddaus MA, Wells CL, Biliar T, Simmons RL. Simple intestinal mechanical obstruction induces bacterial translocation of gram-negative bacteria to the mesenteric lymph nodes. *Surg Forum* 1998; 40: 186-8.
122. Alverdy JC, Aoys E, Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1988; 104: 185-90.
123. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 958-79.
124. Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; In press.
125. Border JR, Hassett J, LaDuca J, Seibel R, Steinberg S, Mills B, Losi P, Border D. The gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS = 40) in the ICU.
126. Deitch EA, Kemper AC, Specian RD, Berg RD. A study of the relationship among survival, gut-origin sepsis, and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *J Trauma* 1992; 32: 141-7.
127. Offenbartl K, Bengmark S. Intraabdominal infections and gut origin sepsis. *World J Surg* 1990; 14: 191-5.
128. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125: 403-4.

129. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 34: 32-7.
130. Reed LL, Martin M, Mangano R, Newson B, Kocka F, Barrett J. Bacterial translocation following abdominal trauma in humans. *Circ Shock* 1994; 42: 1-6.
131. Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology* 1994; 107: 643-9.
132. Schatten WE, Despeuz JD, Holden W. A bacteriological study of portal vein blood in man. *Arch Surg* 1955; 71: 404-9.
133. Macfie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999; 45: 223-8.
134. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, McAnena OJ, Peterson VM, Abernathy CM, Parsons PE. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma* 1991; 31: 629-36.
135. Peitzman AB, Udekwu AO, Ochoa J, Smith S. Bacterial translocation in trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 1083-6.
136. Sheckman P, Onderdonk AB, Bartlett JG. Anaerobes in spontaneous peritonitis. *Lancet* 1977; 2: 1223.
137. Targan SR, Chow AW, Guze LB. Role of anaerobic bacteria in spontaneous peritonitis of cirrhosis: report of two cases and review of the literature. *Am J Med* 1977; 62: 397-403.
138. Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26: 1372-8.
139. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994; 21: 792-6.
140. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Cabre E, Jimenez M, Urban A, Ojanguren I, Arnal J, Gassull MA. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994; 35: 1648-52.
141. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995; 108: 1835-41.

142. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Vinado B, Cabre E, Arnal J, Coll P, Ausina V, Gassull MA. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998; 28: 307-13.
143. Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazon JM, Perez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36: 135-41.
144. Rabinovitz M, Gavaler JS, Kumar S, Kajani M, Van Thiel DH. Role of serum complement, immunoglobulins, and cell-mediated immune system in the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1547-52.
145. Young LS, Martin WJ, Meyer RD, Weinstein RJ, Anderson ET. Gram-negative rod bacteremia: microbiologic, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 1977; 86: 456-71.
146. Guarner C, Soriano G. Spontaneous bacterial peritonitis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 203-17.
147. Feliu E, Gougerot MA, Hakim J, Cramer E, Auclair C, Rueff B, Boivin P. Blood polymorphonuclear dysfunction in patients with alcoholic cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1977; 7: 571-7.
148. Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP. Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* 1992; 16: 98-101.
149. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986; 6: 252-62.
150. Rajkovic IA, Yousif-Kadaru AG, Wyke RJ, Williams R. Polymorphonuclear leucocyte locomotion and aggregation in patients with alcoholic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1984; 58: 654-62.
151. Garcia-Gonzalez M, Boixeda D, Herrero D, Burgaleta C. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on leukocyte function in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105: 527-31.
152. Dunn DL, Barke RA, Ewald DC, Simmons RL. Macrophages and translymphatic absorption represent the first line of host defense of the peritoneal cavity. *Arch Surg* 1987; 122: 105-10.
153. Schifferli JA, Ng YC, Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med* 1986; 315: 488-95.

154. Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest* 1983; 71: 236-47.
155. Ekdahl KN, Loof L, Nyberg A, Nilsson UR, Nilsson B. Defective Fc receptor-mediated clearance in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1991; 101: 1076-82.
156. Gomez F, Ruiz P, Schreiber AD. Impaired function of macrophage Fc gamma receptors and bacterial infection in alcoholic cirrhosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1122-8.
157. Rogers DE. Host mechanisms which act to remove bacteria from the blood stream. *Bact Rev* 1960; 24: 50-66.
158. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology* 1984; 4: 53-8.
159. Bolognesi M, Merkel C, Bianco S, Angeli P, Sacerdoti D, Amodio P, Gatta A. Clinical significance of the evaluation of hepatic reticuloendothelial removal capacity in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 628-34.
160. Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1984; 4: 1209-11.
161. Gines P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forne M, Miranda ML, Llach J, Salmeron JM, . Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1990; 12: 716-24.
162. Grange JD, Roulot D, Pelletier G, Pariente EA, Denis J, Ink O, Blanc P, Richardet JP, Vinel JP, Delisle F, Fischer D, Flahault A, Amiot X. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial. *J Hepatol* 1998; 29: 430-6.
163. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, Sabat M, Vila MC, Guarner C, Vilardell F. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997; 25: 532-6.
164. Soriano G, Guarner C, Teixido M, Such J, Barrios J, Enriquez J, Vilardell F. Selective intestinal decontamination prevents spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 477-81.
165. Soriano G, Guarner C, Tomas A, Villanueva C, Torras X, Gonzalez D, Sainz S, Anguera A, Cusso X, Balanzo J, . Norfloxacin prevents bacterial infection in

- cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterology* 1992; 103: 1267-72.
166. Rolachon A, Cordier L, Bacq Y, Nousbaum JB, Franza A, Paris JC, Fratte S, Bohn B, Kitmacher P, Stahl JP, . Ciprofloxacin and long-term prevention of spontaneous bacterial peritonitis: results of a prospective controlled trial. *Hepatology* 1995; 22: 1171-4.
 167. Singh N, Gayowski T, Yu VL, Wagener MM. Trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 1995; 122: 595-8.
 168. Grange JD, Amiot X, Grange V, Gutmann L, Biour M, Bodin F, Poupon R. Amoxicillin-clavulanic acid therapy of spontaneous bacterial peritonitis: a prospective study of twenty-seven cases in cirrhotic patients. *Hepatology* 1990; 11: 360-4.
 169. Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 1719-24.
 170. Grange JD, Roulot D, Pelletier G, Pariente EA, Denis J, Ink O, Blanc P, Richardet JP, Vinel JP, Delisle F, Fischer D, Flahault A, Amiot X. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind randomized trial. *J Hepatol* 1998; 29: 430-6.
 171. Alverdy JC, Chi HS, Selivanov V, Morris J, Sheldon GF. The effect of route of nutrient administration on the secretory immune system. *Curr Surg* 1985; 42: 10-3.
 172. Saito H, Trocki O, Alexander JW, Kopcha R, Heyd T, Joffe SN. The effect of route of nutrient administration on the nutritional state, catabolic hormone secretion, and gut mucosal integrity after burn injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987; 11: 1-7.
 173. Alexander JW. Nutrition and translocation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990; 14: 170S-4S.
 174. Kudsk KA, Croce MA, Fabian TC, Minard G, Tolley EA, Poret HA, Kuhl MR, Brown RO. Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. *Ann Surg* 1992; 215: 503-11.
 175. Moore FA, Moore EE, Jones TN, McCroskey BL, Peterson VM. TEN versus TPN following major abdominal trauma--reduced septic morbidity. *J Trauma* 1989; 29: 916-22.

Bibliografia 112

176. Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dietary products. *FEMS Microbiol Rev* 1987; 46: 343-56.
177. Shahani KM, Ayebo AD. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 2448-57.
178. Axelsson LP, Chung TC, Dobrogsz WJ, Lindgren SE. Production of broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol Ecol Health Dis* 1989; 2: 131-6.
179. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991; 32: 439-42.
180. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1231-3.
181. Bauer TM, Fernandez J, Navasa M, Vila J, Rodes J. Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 36: 501-6.
182. Chiva M, Soriano G, Rochat I, Peralta C, Rochat F, Llovet T, Mirelis B, Schiffrin E, Guarner C, Balanzo J. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 37: 456.
183. Sato K, Saito H, Tomioka H. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: activation of liver macrophages and peritoneal macrophages by *Lactobacillus casei*. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 689-98.
184. Rimola A, Bory F, Teres J, Perez-Ayuso RM, Arroyo V, Rodes J. Oral, nonabsorbable antibiotics prevent infection in cirrhotics with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1985; 5: 463-7.
185. Bleichner G, Boulanger R, Squara P, Sollet JP, Parent A. Frequency of infections in cirrhotic patients presenting with acute gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1986; 73: 724-6.
186. Bernard B, Cadranet JF, Valla D, Escolano S, Jarlier V, Opolon P. Prognostic significance of bacterial infection in bleeding cirrhotic patients: a prospective study. *Gastroenterology* 1995; 108: 1828-34.
187. Goulis J, Armonis A, Patch D, Sabin C, Greenslade L, Burroughs AK. Bacterial infection is independently associated with failure to control bleeding in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1998; 27: 1207-12.
188. Goulis J, Patch D, Burroughs AK. Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding. *Lancet* 1999; 353: 139-42.

189. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Vinado B, Perez J, Cabre E, Arnal J, Ojanguren I, Ausina V, Gassull MA. Selective intestinal decontamination with norfloxacin reduces bacterial translocation in ascitic cirrhotic rats exposed to hemorrhagic shock. *Hepatology* 1996; 23: 781-7.
190. Blaise M, Pateron D, Trinchet JC, Levacher S, Beaugrand M, Pourriat JL. Systemic antibiotic therapy prevents bacterial infection in cirrhotic patients with gastrointestinal hemorrhage. *Hepatology* 1994; 20: 34-8.
191. Hsieh WJ, Lin HC, Hwang SJ, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Lee SD. The effect of ciprofloxacin in the prevention of bacterial infection in patients with cirrhosis after upper gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 962-6.
192. Pauwels A, Mostefa-Kara N, Debenes B, Degoutte E, Levy VG. Systemic antibiotic prophylaxis after gastrointestinal hemorrhage in cirrhotic patients with a high risk of infection. *Hepatology* 1996; 24: 802-6.
193. Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986; 91: 1343-6.
194. Guarner C, Sola R, Soriano G, Andreu M, Novella MT, Vila MC, Sabat M, Coll S, Ortiz J, Gomez C, Balanzo J. Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels. *Gastroenterology* 1999; 117: 414-9.
195. Das A. A cost analysis of long term antibiotic prophylaxis for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1895-900.
196. Younossi ZM, McHutchison JG, Ganiats TG. An economic analysis of norfloxacin prophylaxis against spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1997; 27: 295-8.
197. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8 naphthyridine derivatives: A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Chem* 1962; 5: 1063-5.
198. Kaminsky D, Meltzer RI. Quinolone antibacterial agents. Oxolinic acid and related compounds. *J Med Chem* 1968; 11: 160-3.
199. Lumish RM, Norden CW. Cinoxacin: in vitro antibacterial studies of a new synthetic organic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7: 159-63.
200. Shimizu M, Takase Y, Nakamura S, Katae H, Minami A. Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro properties. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8: 132-8.
201. Ito A, Hirai K, Inoue M, Koga H, Suzue S, Irikura T, Mitsuhashi S. In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17: 103-8.

Bibliografía 114

202. Cozzarelli NR. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 1980; 207: 953-60.
203. Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donnell TJ, Chu DW, Cooper CS, Rosen T, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug--DNA binding model. *Biochemistry* 1989; 28: 3886-94.
204. Munoz R, De La Campa AG. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2252-7.
205. Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2321-6.
206. Saiki AY, Shen LL, Chen CM, Baranowski J, Lerner CG. DNA cleavage activities of *Staphylococcus aureus* gyrase and topoisomerase IV stimulated by quinolones and 2-pyridones. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1574-7.
207. Little JW, Mount DW. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 1982; 29: 11-22.
208. Maxwell A. The molecular basis of quinolone action. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 409-14.
209. Aranza JR, Sádaba B, Mediavilla A. Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. In: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, eds. *Farmacología humana*. Barcelona: Masson, S.A., 1998;1145-51.
210. Chapman JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 438-42.
211. Desnottes JF, Jacotot F, Bruel J, Bassoullet MT, Niel G. Effects of pefloxacin on phagocytosis function of rat macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17 Suppl B: 53-7.
212. Williams P. Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interaction of complement and immunoglobulins with *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 758-62.
213. Craig WA, Gudmundsson S. The postantibiotic effect. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1986;515-36.
214. Adhami ZN, Wise R, Weston D, Crump B. The pharmacokinetics and tissue penetration of norfloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1984; 13: 87-92.

215. Bergeron MG. The pharmacokinetics and tissue penetration of the fluoroquinolones. *Clin Invest Med* 1989; 12: 20-7.
216. Sorgel F, Jaehde U, Naber K, Stephan U. Pharmacokinetic disposition of quinolones in human body fluids and tissues. *Clin Pharmacokinet* 1989; 16 Suppl 1: 5-24.
217. Neuman M. Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clin Pharmacokinet* 1988; 14: 96-121.
218. Vries-Hospers HG, Sleijfer DT, Mulder NH, van der WD, Neiweg HO, van Saene HK. Bacteriological aspects of selective decontamination of the digestive tract as a method of infection prevention in granulocytopenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 813-20.
219. Navasa M. Treatment and Prophylaxis of Spontaneous Bacterial Peritonitis. In: Arroyo V, Gines P, Rodes J, Schrier R, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease*. Malden: MA: Blackwell Science, Inc., 1999;539-49.
220. Braga PC, Piatti G. Favourable effects of sub-MIC rifloxacin concentrations in decreasing the pathogen-host cell adhesion. *Pharmacol Res* 1993; 28: 11-9.
221. Gemmell CG. Antibiotics and neutrophil function--potential immunomodulating activities. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31 Suppl B: 23-33.
222. Shalit I. Immunological aspects of new quinolones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 262-6.
223. Such J, Guarner C, Soriano G, Teixido M, Barrios J, Tena F, Mendez C, Enriquez J, Rodriguez JL, Vilardell F. Selective intestinal decontamination increases serum and ascitic fluid C3 levels in cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12: 1175-8.
224. Prats G, Mirelis B. Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. In: García-Rodríguez JA, Picazo JJ, eds. *Microbiología Médica*. Madrid: Mosby/Doyma Libros, S.A., 1996;223-38.
225. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 352-6.
226. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 80-128.
227. Orskov F. Virulence factors of the bacterial cell surface. *J Infect Dis* 1978; 137: 630-3.
228. Orskov F, Larsen JC, Orskov I. Immunogenicity of some common thermolabile surface antigens of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1981; 170: 117-33.

229. Orskov I, Orskov F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J Hyg (Lond)* 1985; 95: 551-75.
230. Robbins JB, McCracken GH, Jr., Gotschlich EC, Orskov F, Orskov I, Hanson LA. *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. *N Engl J Med* 1974; 290: 1216-20.
231. Stevens P, Huang SN, Welch WD, Young LS. Restricted complement activation by *Escherichia coli* with the K-1 capsular serotype: a possible role in pathogenicity. *J Immunol* 1978; 121: 2174-80.
232. Stevens P, Young LS, Adamu S. Opsonization of various capsular (K) *E. coli* by the alternative complement pathway. *Immunology* 1983; 50: 497-502.
233. Kaijser B. Immunology of *Escherichia coli*: K antigen and its relation to urinary-tract infection. *J Infect Dis* 1973; 127: 670-7.
234. McCabe WR, Carling PC, Bruins S, Greely A. The relation of K-antigen to virulence of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1975; 131: 6-10.
235. Soriano G, Coll P, Guarner C, Such J, Sanchez F, Prats G, Vilardell F. *Escherichia coli* capsular polysaccharide and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21: 668-73.
236. Krogfelt KA. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 721-35.
237. Savage DC. Adherence of normal flora to mucosal surfaces. In: Beachey EH, ed. *Bacterial adherence*. New York: Chapman and Hall, 1980;31-59.
238. Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 1981; 143: 325-45.
239. Beachey EH, Giampapa CS, Abraham SN. Bacterial adherence. Adhesin receptor-mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: S45-S48.
240. Hultgren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St GJ, III, Normark S. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 1993; 73: 887-901.
241. Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8: 175-200.
242. Ofek I, Sharon N. Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 151: 91-113.

243. St GJ, III. Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. *Adv Pediatr* 1997; 44: 43-72.
244. Chiarini F, Mastromarino P, Seganti L, Orsi N. A study on the erythrocyte structures involved in the interaction with mannose-resistant *E. coli* adhesins. *Boll Ist Sieroter Milan* 1983; 62: 420-5.
245. Johnson JR, Swanson JL, Neill MA. Avian P1 antigens inhibit agglutination mediated by P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992; 60: 578-83.
246. Beachey EH, Eisenstein BI, Ofek I. Sublethal concentrations of antibiotics and bacterial adhesion. *Ciba Found Symp* 1981; 80: 288-305.
247. Wizemann TM, Adamou JE, Langermann S. Adhesins as targets for vaccine development.
248. Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* 1997; 5: 109-14.
249. Falkow S. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. *J Clin Invest* 1997; 100: 239-43.
250. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 1989; 53: 210-30.
251. Hoepelman AI, Tuomanen EI. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect Immun* 1992; 60: 1729-33.
252. Meccas JJ, Strauss EJ. Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg Infect Dis* 1996; 2: 270-88.
253. Svanborg C, Hedlund M, Connell H, Agace W, Duan RD, Nilsson A, Wullt B. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 797: 177-90.
254. Zhang JP, Normark S. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* 1996; 273: 1234-6.
255. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997; 91: 511-20.
256. Brinton CC, Jr. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans N Y Acad Sci* 1965; 27: 1003-54.

257. Houwink AL, van Itersen W. Electron microscopic observations on bacterial cytology. II. A study on flagellation. *Biochem Biophys Acta* 1950; 5: 10-44.
258. Hopkins WJ, Reznikoff CA, Oberley TD, Uehling DT. Adherence of uropathogenic *E. coli* to differentiated human uroepithelial cells grown in vitro. *J Urol* 1990; 143: 146-9.
259. Little JS, Jr., Klee LW, Hoover DM, Rink RC. Long-term histopathological changes observed in rats subjected to augmentation cystoplasty. *J Urol* 1994; 152: 720-4.
260. Sauter SL, Rutherford SM, Wagener C, Shively JE, Hefta SA. Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from *Escherichia coli* on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. *J Biol Chem* 1993; 268: 15510-6.
261. Nakano Y, Fujisawa M, Matsui T, Arakawa S, Kamidono S. The significance of the difference in bacterial adherence between bladder and ileum using rat ileal augmented bladder. *J Urol* 1999; 162: 243-7.
262. Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2081-5.
263. Russell PW, Orndorff PE. Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *J Bacteriol* 1992; 174: 5923-35.
264. Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* 1990; 58: 1995-8.
265. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J, Barren P, Koenig S, Leath S, Jones CH, Hultgren SJ. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 1997; 276: 607-11.
266. Thankavel K, Madison B, Ikeda T, Malaviya R, Shah AH, Arumugam PM, Abraham SN. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest* 1997; 100: 1123-36.
267. Connell H, Agace W, Hedlund M, Klemm P, Shembri M, Svanborg C. Fimbriae-mediated adherence induces mucosal inflammation and bacterial clearance. Consequences for anti-adhesion therapy. *Adv Exp Med Biol* 1996; 408: 73-80.

268. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 2000; 19: 2803-12.
269. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1998; 282: 1494-7.
270. Schilling JD, Mulvey MA, Hultgren SJ. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis* 2001; 183 Suppl 1: S36-S40.
271. Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der MA, Lublin DM, Abraham SN. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 1997; 389: 636-9.
272. Struve C, Krogfelt KA. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology* 1999; 145 (Pt 10): 2683-90.
273. Silverblatt FJ, Ofek I. Influence of pili on the virulence of *Proteus mirabilis* in experimental hematogenous pyelonephritis. *J Infect Dis* 1978; 138: 664-7.
274. Alkan ML, Wong L, Silverblatt FJ. Change in degree of type 1 piliation of *Escherichia coli* during experimental peritonitis in the mouse. *Infect Immun* 1986; 54: 549-54.
275. Hultgren SJ, Porter TN, Schaeffer AJ, Duncan JL. Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985; 50: 370-7.
276. Nowicki B, Labigne A, Moseley S, Hull R, Hull S, Moulds J. The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect Immun* 1990; 58: 279-81.
277. Labigne-Roussel A, Falkow S. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial-adhesin- encoding operon (*afa*) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infect Immun* 1988; 56: 640-8.
278. Labigne-Roussel AF, Lark D, Schoolnik G, Falkow S. Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 1984; 46: 251-9.
279. Garcia MI, Gounon P, Courcoux P, Labigne A, Le Bouguenec C. The afimbrial adhesive sheath encoded by the *afa-3* gene cluster of pathogenic *Escherichia coli* is composed of two adhesins. *Mol Microbiol* 1996; 19: 683-93.

Bibliografia 120

280. Jouve M, Garcia MI, Courcoux P, Labigne A, Gounon P, Le Bouguenec C. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect Immun* 1997; 65: 4082-9.
281. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* 1987; 55: 69-77.
282. Ulshen MH, Rollo JL. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man--another mechanism. *N Engl J Med* 1980; 302: 99-101.
283. McDaniel TK, Jarvis KG, Sonnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1664-8.
284. Sonnenberg MS, Kaper JB. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 1991; 59: 4310-7.
285. Sonnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992; 60: 3953-61.
286. Sonnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* 1993; 92: 1412-7.
287. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, Finlay BB. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* 1996; 15: 2613-24.
288. Knutton S, Adu-Bobie J, Bain C, Phillips AD, Dougan G, Frankel G. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* 1997; 65: 1644-52.
289. Ofek I, Beachey EH, Eisenstein BI, Alkan ML, Sharon N. Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of beta-lactam and aminoglycoside antibiotics. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 832-7.
290. Dalhoff A, Doring G. Action of quinolones on gene expression and bacterial membranes. *Antibiot Chemother* 1987; 39: 205-14.
291. Elliott TS, Shelton A, Greenwood D. The response of *Escherichia coli* to ciprofloxacin and norfloxacin. *J Med Microbiol* 1987; 23: 83-8.
292. Sonstein SA, Burnham JC. Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 16: 277-89.

293. Zhanel G, Nicolle L. Effect of subinhibitory antimicrobial concentrations (sub-MICs) on in-vitro bacterial adherence to uroepithelial cells. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 617-27.
294. Braga PC, Sala MT, Dal Sasso M. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rifloxacin on bacterial virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1013-9.
295. Lorian V, Ernst J. Effects of antibiotics on bacterial structure and their pathogenicity. *Pathol Biol (Paris)* 1987; 35: 1370-6.
296. Eisenstein BI, Ofek I, Beachey EH. Loss of lectin-like activity in aberrant type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1981; 31: 792-7.
297. Breines DM, Burnham JC. Modulation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and adherence to uroepithelial cells following exposure of logarithmic phase cells to quinolones at subinhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 205-21.
298. Alarcon T, Pita J, Lopez-Brea M, Piddock LJ. High-level quinolone resistance amongst clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Spain. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 605-9.
299. Terg R, Llano K, Cobas SM, Brotto C, Barrios A, Levi D, Wasen W, Bartellini MA. Effects of oral ciprofloxacin on aerobic gram-negative fecal flora in patients with cirrhosis: results of s. *J Hepatol* 1998; 29: 437-42.
300. Dupeyron C, Mangeney N, Sedrati L, Campillo B, Fouet P, Leluan G. Rapid emergence of quinolone resistance in cirrhotic patients treated with norfloxacin to prevent spontaneous bacterial peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 340-4.
301. Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 378-424.
302. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1271-2.
303. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1647-50.
304. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 215-23.
305. Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 378-424.

Bibliografía 122

306. Heisig P. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 879-85.
307. Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1318-25.
308. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1996; 178: 5853-9.
309. Talens-Visconti R, Garrigues TM, Canton E. [Mechanisms of bacterial resistance to quinolones]. *Rev Esp Quimioter* 2002; 15: 25-31.
310. Desnottes JF, Diallo N. Effect of sparfloxacin on *Staphylococcus aureus* adhesiveness and phagocytosis. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 737-46.
311. Kozody NL, Harding GK, Nicolle LE, Kelly K, Ronald AR. Adherence of *Escherichia coli* to epithelial cells in the pathogenesis of urinary tract infection. *Clin Invest Med* 1985; 8: 121-5.
312. Baquero F, Martinez-Beltran J, Canton R. [Criteria of the MENSURA group for the definition of the critical points of sensitivity to antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998; 16: 85-92.
313. Malouin F, Chamberland S, Brochu N, Parr TR, Jr. Influence of growth media on *Escherichia coli* cell composition and ceftazidime susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 477-83.
314. Domingue GJ, Roberts JA, Laucirica R, Ratner MH, Bell DP, Suarez GM, Kallenius G, Svenson S. Pathogenic significance of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *J Urol* 1985; 133: 983-9.
315. Andreu A, Stapleton AE, Fennell C, Lockman HA, Xercavins M, Fernandez F, Stamm WE. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *J Infect Dis* 1997; 176: 464-9.
316. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, Moreno-Martinez A, Martinez JA, Jimenez DA, Mensa J, Vila J. Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4445-9.
317. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1189-93.

318. Reid SD, Betting DJ, Whittam TS. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2719-22.
319. Slocum MM, Sittig KM, Specian RD, Deitch EA. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992; 58: 305-10.
320. Soriano G, Guarner C, Teixido M, Such J, Barrios J, Enriquez J, Vilardell F. Selective intestinal decontamination prevents spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; 100: 477-81.
321. Llovet JM, Rodriguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, Pardo A, Castells A, Cabre E, Arroyo V, Gassull MA, Rodes J. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol* 1997; 26: 88-95.
322. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9827-32.
323. Mannhardt W, Becker A, Putzer M, Bork M, Zepp F, Hacker J, Schulte-Wissermann H. Host defense within the urinary tract. I. Bacterial adhesion initiates an uroepithelial defense mechanism. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 568-72.
324. Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, Moreno-Martinez A, Vila J, Martinez JA, Ruiz J, Barranco M, Roig G, Soriano E. Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1682-6.
325. Vila J, Simon K, Ruiz J, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Moreno A, Mensa J. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* 2002; 186: 1039-42.
326. Blazquez R, Menasalvas A, Carpena I, Ramirez C, Guerrero C, Moreno S. Invasive disease caused by ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 503-5.
327. Shalit I, Stutman HR, Marks MI, Chartrand SA, Hilman BC. Randomized study of two dosage regimens of ciprofloxacin for treating chronic bronchopulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *Am J Med* 1987; 82: 189-95.
328. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35: 140-8.

Bibliografía 124

329. Soriano G, Guarner C, Tomas A, Anguera A, Mirelis B, Fernandez C, Herrero M, Alonso C, Vilardell F. [The duration of the effect of norfloxacin on the fecal flora in cirrhosis patients]. *Rev Esp Enferm Dig* 1992; 81: 322-6.
330. Novella M, Sola R, Soriano G, Andreu M, Gana J, Ortiz J, Coll S, Sabat M, Vila MC, Guarner C, Vilardell F. Continuous versus inpatient prophylaxis of the first episode of spontaneous bacterial peritonitis with norfloxacin. *Hepatology* 1997; 25: 532-6.
331. Maslow JN, Mulligan ME, Adams KS, Justis JC, Arbeit RD. Bacterial adhesins and host factors: role in the development and outcome of *Escherichia coli* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 89-97.
332. Velasco M, Horcajada JP, Mensa J, Moreno-Martinez A, Vila J, Martinez JA, Ruiz J, Barranco M, Roig G, Soriano E. Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1682-6.
333. Maslow JN, Mulligan ME, Adams KS, Justis JC, Arbeit RD. Bacterial adhesins and host factors: role in the development and outcome of *Escherichia coli* bacteremia. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 89-97.
334. Hughes C, Phillips R, Roberts AP. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect Immun* 1982; 35: 270-5.
335. Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M, Gomez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruiz-Bremon A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2736-41.