

УДК 579.861.2.044+615.281.015.8

Предотвращение селекции резистентных стафилококков в динамической системе *in vitro*, моделирующей фармакокинетику фторхинолонов

А.А. Фирсов, С.Н. Востров, И.Ю. Лубенко, Ю.А. Портной

Лаборатория фармакокинетики и фармакодинамики НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва, Россия

С целью проверки гипотезы о существовании диапазона концентраций, в пределах которого наиболее вероятно селекция устойчивых мутантов (*mutant selection window* – MSW), изучали изменения чувствительности метициллинорезистентного штамма *Staphylococcus aureus* при моделировании *in vitro* фармакокинетических профилей моксифлоксацина (МОК), левофлоксацина (ЛЕВ) и цiproфлоксацина (ЦИП). Во всех случаях имитировался многократный прием МОК, ЛЕВ (оба – один раз в сутки) и ЦИП (2 раза в сутки), при котором снижение уровней хинолонов было моноэкспоненциальным с периодом полувыведения 12; 6,8 и 4 ч соответственно. Моделируемые значения максимальной концентрации (C_{max}) были равны или ниже МПК, выше МПК, но ниже концентрации, предотвращающей образование устойчивых мутантов (*mutant prevention concentration* – MPC), или выше MPC. Соответствующие значения $C_{max}/MПК$ находились в интервале от 1,3 до 24. Для всех трех хинолонов наиболее значительное повышение МПК наблюда-

лось при значениях $C_{max}/MПК$, составлявших от 2 до 6, когда уровни МОК, ЛЕВ и ЦИП находились внутри MSW на протяжении большей части интервала дозирования. Никаких изменений в МПК не наблюдалось при минимальных значениях $C_{max}/MПК$ (<1,5), а также при максимальных значениях $C_{max}/MПК$ (18–24), когда уровни хинолонов были выше MPC на протяжении большей части интервала дозирования. Пороговые значения $C_{max}/MПК$, которые предотвращают селекцию резистентных мутантов, соответствуют суточной дозе МОК, которая составляет 66% от клинической, и суточным дозам левофлоксацина и цiproфлоксацина, составляющим 220 и 640% от клинических доз соответственно. Таким образом, МОК способен предотвратить селекцию устойчивых стафилококков, а ЛЕВ и ЦИП – нет. Полученные данные подтверждают концепцию MSW.

Ключевые слова: устойчивость, фторхинолоны, *Staphylococcus aureus*, динамическая модель *in vitro*.

Контактный адрес:
Александр Алексеевич Фирсов
119021, Москва, Большая Пироговская ул., д. 11
Тел.: (095) 708-3341
Факс: (095) 245-0295
Эл. почта: kindyn@nm.ru

Prevention of the selection of resistant staphylococci in an *in vitro* dynamic model that simulates fluoroquinolone pharmacokinetics

A.A. Firsov, S.N. Vostrov, I.Yu. Lubenko, Yu.A. Portnoy

Department of Pharmacokinetics & Pharmacodynamics, Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

To study the hypothesis of the mutant selection window (MSW) in a pharmacodynamic context, the susceptibility of a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to moxifloxacin (MOX), levofloxacin (LEV) and ciprofloxacin (CIP) was tested daily using an *in vitro* dynamic model that simulates human pharmacokinetics. A series of monoexponential pharmacokinetic profiles that mimic once-daily administration of MOX (half-life 12 h) and LEV (half-life 6.8 h) and twice-daily administration of CIP (half-life 4 h) provided peak concentrations (C_{max}) that equaled the MIC, fell between the MIC and the mutant prevention concentration (MPC), i.e., inside the MSW, or that exceeded the MPC. The respective ratios of C_{max} to MIC varied from 1.3 to 24. With all three quinolones, the greatest increases in MIC

were observed at $C_{max}/MICs$ of 2–6, that corresponded to quinolone concentrations within the MSW over most of the dosing interval. No changes in MIC were observed with the smallest $C_{max}/MICs$ (<1.5) and at the highest $C_{max}/MICs$ (18–24) where quinolone concentrations exceeded the MPC over most of the dosing interval. These «protective» C_{max}/MIC ratios correspond to 66% of the usual clinical dose of MOX, 220% – of LEV and 640% of – CIP. Thus, MOX may protect against resistance development at sub-therapeutic doses whereas LEV and CIP provide a similar effect only at doses that exceed their usual clinical doses. These data support the MSW concept.

Key words: resistance, fluoroquinolones, *Staphylococcus aureus*, *in vitro* dynamic model.

Введение

Особенностью современной антимикробной терапии является все более широкое использование новых препаратов, которые отличаются от своих предшественников не столько большей активностью, сколько фармакокинетическими преимуществами. Это обстоятельство вынудило пересмотреть традиционную методологию отбора и сравнения новых антибиотиков по МПК и МБК, поскольку ни тот, ни другой показатель не отражает особенностей их фармакокинетики. Именно поэтому столь бурное развитие приобрели исследования антимикробного эффекта с помощью динамических систем [1], позволяющих моделировать *in vitro* фармакокинетические профили, которые реализуются у больного, получающего лечение антибиотиком.

Эти исследования открыли возможность прогнозирования эффекта новых препаратов, в частности фторхинолонов, установить пороговые значения их концентрации, обеспечивающие необходимый уровень эффективности в клинике, и рекомендовать оптимальные схемы дозирования [2]. Основой для таких прогнозов стало установление зависимости антимикробного эффекта от площади под фармакокинетической кривой (ПФК) «концентрация антибиотика – время», отнесенной к МПК (ПФК/МПК), которую удалось получить с помощью динамических систем [3–6].

Вместе с тем способность нового препарата вызывать гибель чувствительной части популяции, а

именно она обычно оказывается основной мишенью в динамической системе, вовсе не обязательно отражает его способность воздействовать на резистентные клетки, появляющиеся в результате спонтанных мутаций. Иными словами, исследования антимикробного эффекта как такового (динамика гибели чувствительных бактерий под действием антибиотика) отнюдь не заменяют оценки препарата как потенциального супрессора селекции устойчивых микроорганизмов.

До последнего времени этот аспект лишь изредка просматривался в работах, выполненных с помощью динамических систем [7–11]. Наблюдения за резистентной субпопуляцией носили случайный характер, а узость диапазона моделируемых значений ПФК/МПК не позволяла всерьез рассчитывать на установление взаимосвязи между селекцией устойчивых микроорганизмов и ПФК/МПК или отношением максимальной концентрации антибиотика (C_{max}) к МПК ($C_{max}/МПК$).

Целенаправленные попытки проследить зависимость резистентности от ПФК/МПК или от $C_{max}/МПК$ путем варьирования их значений в широких пределах были предприняты совсем недавно [12–17], однако в большинстве случаев они оказались неудачными. На этом фоне особенно странным выглядит стремление авторов названных работ прогнозировать критические уровни ПФК/МПК или $C_{max}/МПК$, которые якобы способны предотвратить селекцию устойчивых мутантов. Как и следовало

ожидать, такие прогнозы оказались весьма противоречивыми. Например, величина ПФК/МПК для грепафлоксацина, которая должна быть достаточной для подавления резистентности *Streptococcus pneumoniae*, по одним данным была оценена в 32 ч [12], а по другим – в 80 ч [18, 19]. Еще заметнее расходились подобные оценки для левофлоксацина – от 9 ч [12] до 26 ч [14] и даже 50 ч [19].

Столь большая разница в полученных результатах может быть обусловлена разными причинами, среди которых: очевидный дефицит данных – во многих случаях [12, 14, 15, 18–23] проследить динамику селекции резистентных бактерий просто не удалось; недостаточная продолжительность наблюдений (нередко 1–2 сут [12–16, 18, 19, 21, 22]), не позволявшая дожидаться видимых изменений в чувствительности; низкая посевная доза (менее 10^7 КОЕ/мл [13, 18]), которая могла вовсе не содержать спонтанных мутантов, и т.д.

Наряду с неадекватным планированием экспериментов негативную роль сыграл и неадекватный анализ полученных данных, в частности, попытки установить линейную корреляцию между изменениями в чувствительности и ПФК/МПК [17], хотя она может быть и нелинейной. Дело в том, что моделируемые концентрации антибиотиков могут находиться как внутри, так и вне так называемого окна, в пределах которого наиболее вероятна селекция устойчивых мутантов (*mutant selection window* [24] – MSW). Это окно отражает диапазон от МПК до концентрации антибиотика, предотвращающей селекцию устойчивых мутантов (*mutant prevention concentration* – MPC).

С целью проверки этой концепции изучена динамика изменения чувствительности *Staphylococcus aureus* при моделировании *in vitro* фармакокинетики моксифлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина с начальными концентрациями ниже МПК, внутри MSW или выше MPC.

Материал и методы исследования

Фторхинолоны, микроорганизм и оценка его чувствительности. Образцы субстанций моксифлоксацина и ципрофлоксацина были любезно предоставлены компанией Байер, а левофлоксацина – компанией Орто-МакНейл. Для исследования был выбран метициллинорезистентный клинический штамм *S. aureus* 201.

Значения МПК хинолонов определяли методом серийных разведений в трех повторностях после 24-часовой экспозиции в бульоне *Мюллера–Хинтона* (МХБ), обогащенном ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} , при посевной дозе 10^6 КОЕ/мл. Для получения более точных значений МПК использовали различные

исходные концентрации каждого хинолона (3, 4 и 5 мкг/мл) [25]. Величина МПК моксифлоксацина для изученного штамма *S. aureus* составляла 0,09 мкг/мл, левофлоксацина – 0,6 мкг/мл, а ципрофлоксацина – 0,8 мкг/мл.

Для определения MPC клетки *S. aureus* инкубировали в МХБ в течение 24 ч, затем центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об., отделяли от супернатанта и ресуспендировали в МХБ таким образом, чтобы концентрация полученной суспензии составляла 10^{10} КОЕ/мл [24]. Эту суспензию в объеме 1 мл вносили в чашки Петри с агаром, содержащим хинолон в концентрациях, превышающих величину МПК соответствующего хинолона. Чашки инкубировали при 37° С в течение 48 ч, после чего визуально подсчитывали число КОЕ на поверхности агаризованной среды. MPC оценивали, определяя зависимость величины КОЕ (в логарифмах) на чашке от концентрации хинолона. За величину MPC принимали значение точки пересечения графика с осью *x*, то есть наименьшее значение концентрации хинолона, при котором не образуются колонии [24]. Значения MPC моксифлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина составляли соответственно 0,34; 1,75 и 2,83 мкг/мл.

Моделирование фармакокинетических профилей хинолонов. Во всех случаях воспроизводились моноэкспоненциальные профили, которые могут создаваться в крови человека при ежедневном приеме моксифлоксацина и левофлоксацина один раз в сутки, а ципрофлоксацина – два раза в сутки. Моделируемые значения периода полувыведения моксифлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина составляли 12 ч [6], 6,8 ч [6] и 4,0 ч [3] соответственно.

Суточные дозы каждого хинолона были подобраны таким образом, чтобы соответствующие им отношения C_{max} к МПК были близкими: от 1,3–1,5 до 18–24, а время, в течение которого концентрация хинолонов находилась в пределах MSW (T_{MSW}), варьировало от менее 20% до 90% интервала дозирования (рис. 1).

Динамическая система *in vitro*. Динамическая система, использованная в работе, была описана нами ранее [26]. Она представляла собой два сосуда, один со свежим МХБ, другой с МХБ, содержащим бактериальную культуру (контрольный опыт) или бактериальную культуру с антибиотиком. При помощи перистальтического насоса МХБ из 1-го сосуда подавали во 2-й, объем раствора в котором составлял 60 мл, а при помощи другого насоса раствор из 2-го сосуда выводили с той же скоростью. Скорость потока составляла 3,5 мл/ч для моксифлоксацина, 6,1 мл/ч для левофлоксацина и 10,4 мл/ч для ципрофлоксацина, что обеспечивало

моноэкспоненциальную элиминацию хинолонов и бактериальной культуры из системы с константой скорости, равной 0,06; 0,1 и 0,17 ч⁻¹ соответственно. Надежность воспроизведения фармакокинетических профилей хинолонов в описанной динамической системе была подтверждена ранее [27].

Перед началом опыта систему заполняли свежим МХБ и термостатировали при 37° С. Во 2-й сосуд вносили 18-часовую бактериальную культуру (6×10⁹ КОЕ/мл – около 10⁸ КОЕ/мл в 60 мл раствора в сосуде), инкубировали в течение 2 ч, после чего вводили хинолон.

Выбор продолжительности эксперимента. Для выбора оптимальной продолжительности эксперимента предварительно было изучено изменение уровня чувствительности микроорганизма при ежедневном введении моксифлоксацина и левофлоксацина в течение 5 сут. При этом суточные дозы хинолонов были подобраны таким образом, чтобы значения их максимальных концентраций были близки соответствующим значениям МРС, а минимальных концентраций – значениям МПК (см. рис. 1).

Анализ изменений в чувствительности *S. aureus*. Для выявления возможных изменений в чувствительности величину МПК каждого хинолона по отношению к субкультурам, отобраным из системы, определяли через каждые 24 ч. Стабильность изменений в чувствительности *S. aureus* проверяли путем последовательных пересевов субкультур, выделенных на 3–5-е сутки экспозиции в динамической системе. Сразу после отбора проб и после 3-, 7- и 10-го пересевов определяли МПК описанным выше способом.

Зависимость изменения чувствительности *S. aureus*, выраженная отношением величины МПК в конце опыта к ее исходному значению (МПК_{final}/МПК_{initial}), от T_{MSW} описывали при помощи функции:

$$Y = (1 - Y_{\max}) / \{1 + \exp [(x - x_0) / dx]\} + Y_{\max}$$
,
где Y – отношение МПК_{final}/МПК_{initial} и Y_{max} – его

максимальное значение, x – T_{MSW}, x₀ – значение T_{MSW}, соответствующее величине Y_{max}/2, dx – параметр.

Результаты исследования

Возможности выявления селекции устойчивых мутантов в динамической системе. Для установления минимальной продолжительности эксперимента, позволяющей обнаруживать изменения в чувствительности *S. aureus*, моделировали 5-дневное введение моксифлоксацина и левофлоксацина в дозах, соответствующих значениям C_{max}/МПК, равным 4 и 5,6 соответственно. При этих значениях C_{max}/МПК уровни обоих хинолонов находились внутри MSW на протяжении большей части интервала дозирования (см. рис. 1, а).

Как видно на рис. 1, б, на фоне введения моксифлоксацина и левофлоксацина происходит систематическое возрастание значений МПК, заметное уже после 3-й дозы. Повышенные значения МПК сохранялись и после 3–10 пересевов культур, выделенных на 3–5-е сутки экспозиции *S. aureus* в динамической системе (таблица), что указывает на стабильность выявленных изменений в чувствительности *S. aureus*. Поскольку стабильное повышение МПК наблюдалось уже после 3-й дозы, длительность введения хинолонов в последующих экспериментах была ограничена 3 сутками.

Селекция устойчивых мутантов в зависимости от C_{max}/МПК. Отношения величины МПК после 3-кратного введения моксифлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина к соответствующим исходным значениям приведены на рис. 2. Наиболее заметное снижение чувствительности *S. aureus* (повышение величины отношения МПК_{final}/МПК_{initial}) происходит при значениях C_{max}/МПК от 2–3 до 4–6, когда концентрация хинолонов находится внутри MSW на протяжении большей части суток (значения T_{MSW} составляют 50–90% от интервала дозирования). Менее выраженное, хотя и значительное возра-

Изменения МПК хинолонов до и после 5-дневной экспозиции *S. aureus*

Хинолон	Продолжительность экспозиции, сутки	МПК, мкг/мл				
		до экспозиции	сразу после отбора пробы	после 3-го посева	после 7-го посева	после 10-го посева
Моксифлоксацин	3		0,25	0,25	0,19	0,19
	4	0,09	0,37	0,31	0,31	0,37
	5		0,5	0,5	0,5	0,5
Левофлоксацин	3		1	1	0,75	0,75
	4	0,6	2	2	1,5	1,5
	5		2	2	1,5	1,5

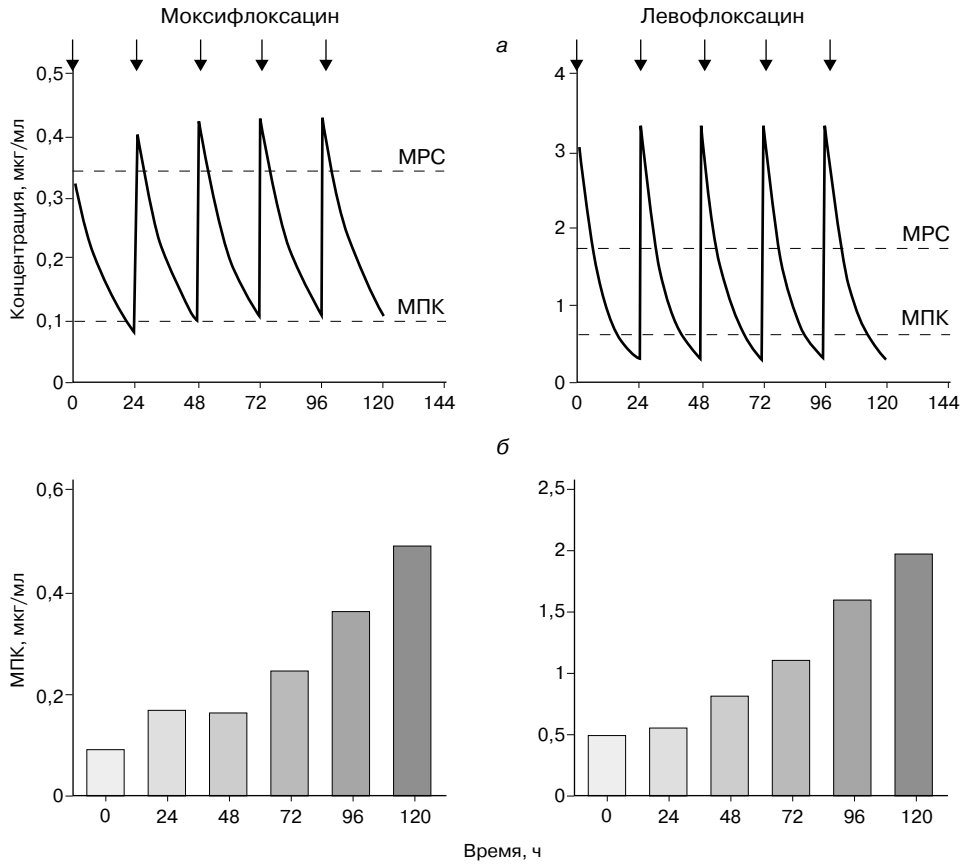


Рис. 1. Моделируемые фармакокинетические профили (а) и изменения в чувствительности *S. aureus* 201 (б) в процессе 5-дневного введения моксифлоксацина ($C_{max}/MПК = 4$) и левофлоксацина ($C_{max}/MПК = 5,6$).

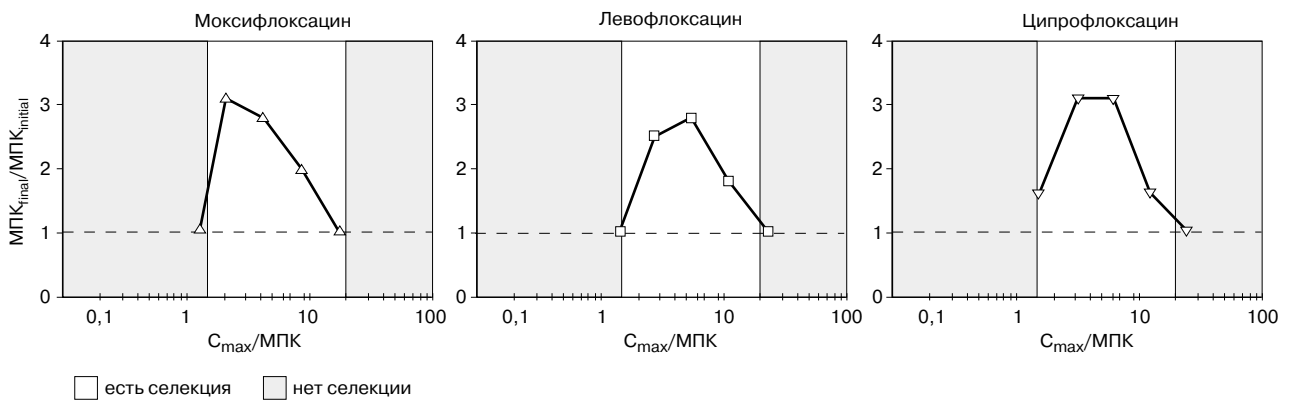


Рис. 2. Снижение чувствительности *S. aureus* к хинолонам при различных значениях $C_{max}/MПК$.

стание $MПК_{final}/MПК_{initial}$ наблюдается при значениях $C_{max}/MПК$ от 8 до 12 ($T_{MSW} - 40-50\%$ от интервала дозирования). При наименьших из моделированных значений $C_{max}/MПК$ (1,3–1,5), как и при наибольших значениях (18–24), когда уровни хино-

лонов были вне MSW ($T_{MSW} \leq 20\%$ от интервала дозирования), никаких изменений в чувствительности *S. aureus* не происходит.

Роль времени, в течение которого концентрация находится внутри MSW, становится очевидной при

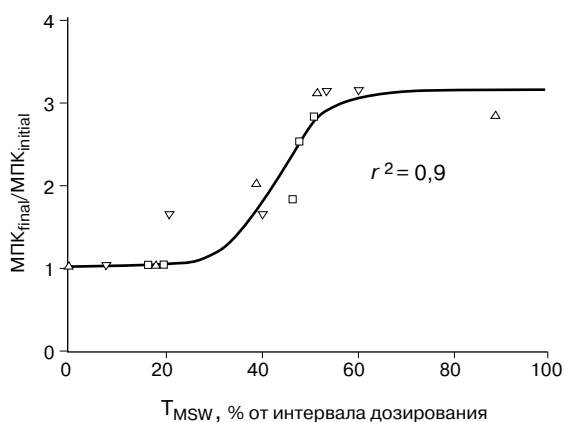


Рис. 3. Зависимость снижения чувствительности *S. aureus* от T_{MSW} для моксифлоксацина (треугольники), левофлоксацина (квадраты) и ципрофлоксацина (перевернутые треугольники) – комбинированные данные. $Y_{max} = 3,1$; $x_0 = 44$; $dx = 4,6$.

сопоставлении $MПК_{final}/MПК_{initial}$ с T_{MSW} (рис. 3). Зависимость $MПК_{final}/MПК_{initial}$ от T_{MSW} имеет форму сигмоиды, описываемой вышеприведенным уравнением, с высоким коэффициентом корреляции ($r^2 = 0,9$). Как видно на рис. 3, вне зависимости от величины $C_{max}/MПК$ селекция устойчивых мутантов *S. aureus* происходит, если значение T_{MSW} составляет более чем 20% от интервала дозирования.

Обсуждение результатов исследования

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что селекция резистентных стафилококков происходит при концентрациях хинолонов, превышающих их МПК, но не превышающих МРС, т.е. внутри MSW. При этом наибольшие потери в чувствительности *S. aureus* наблюдаются при значениях $C_{max}/MПК$ моксифлоксацина, левофлоксацина и ципрофлоксацина от 2 до 6, когда T_{MSW} составляет более 20% от интервала дозирования. В то же время никаких изменений в чувствительности не происходит при значениях $C_{max}/MПК < 1,5$ и > 20 . Таким образом, в изученном диапазоне смоделированных значений $C_{max}/MПК$ можно выделить три области, одна из которых ассоциируется с селекци-

ей резистентных стафилококков ($1,5 < C_{max}/MПК < 20$), а две – нет ($C_{max}/MПК < 1,5$ и $C_{max}/MПК > 20$) (см. рис. 2).

Наличие первой из этих «безопасных» областей представляет лишь теоретический интерес, поскольку при столь малых значениях $C_{max}/MПК$ хинолоны не способны подавить даже чувствительную часть популяции. Наличие второй «безопасной» области ($C_{max}/MПК > 20$), в которой все три хинолона вызывают гибель стафилококков, напротив, весьма важно в практическом отношении. В частности потому, что правую границу этой области ($C_{max}/MПК \geq 20$) можно считать пороговым значением $C_{max}/MПК$, обеспечивающим подавление селекции резистентных мутантов.

Хотя для изученных хинолонов эти пороговые значения примерно одинаковы, они соответствуют совершенно различным суточным дозам. Так, для моксифлоксацина оно соответствует дозе, которая составляет 66% от клинической (400 мг), в то время как для левофлоксацина и ципрофлоксацина – дозам, составляющим 220 и 640% от клинических (500 и 2×500 мг соответственно). Таким образом, моксифлоксацин в рекомендуемой дозе способен предотвратить селекцию устойчивых стафилококков, а левофлоксацин и ципрофлоксацин – нет.

Полученные в настоящем исследовании зависимости $MПК_{final}/MПК_{initial}$ от логарифма $C_{max}/MПК$ (см. рис. 2) по своей форме напоминают аналогичные зависимости, установленные для ПФК/МПК гатифлоксацина в отношении *S. aureus* [28] и моксифлоксацина в отношении *S. pneumoniae* [29]. И те, и другие нелинейны, поэтому могут быть описаны лишь более сложными функциями, например функцией Гаусса [28, 29]. В целом, эти данные согласуются с концепцией MSW [24], а также свидетельствуют о возможности использования динамических систем *in vitro* для прогнозирования способности антибиотиков препятствовать селекции устойчивых мутантов, хотя для подтверждения этих выводов необходимо продолжение подобных исследований с использованием других видов бактерий.

Благодарность. Данное исследование частично было поддержано грантом компании Bayer.

Литература

1. Фирсов А.А., Назаров А.Д., Черных В.М. Фармакокинетические подходы к оптимизации антибиотикотерапии. Итоги науки и техники. ВИНТИ, Москва. 1989; 17:1-228.

2. Firsov A.A., Zinner S.H. Use of modeling techniques to aid in antibiotic selection. *Curr Infect Dis Rep* 2001; 3:35-43.
3. Firsov A.A., Vostrov S.N., Shevchenko A.A., Portnoy Yu.A., Zinner S.H. A new approach to *in vitro* com-

- parisons of antibiotics in dynamic models: equivalent area under the curve/MIC breakpoints and equiefficient doses of trovafloxacin and ciprofloxacin against bacteria of similar susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2841-7.
4. Vostrov S.N., Kononenko O.V., Lubenko I.Y., Zinner S.H., Firsov A.A. Comparative pharmacodynamics of gatifloxacin and ciprofloxacin in an *in vitro* dynamic model: prediction of equiefficient doses and the breakpoints of the area under the curve/MIC ratio. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:879-84.
 5. Firsov A.A., Zinner S.H., Lubenko I.Y., Vostrov S.N. Gemifloxacin and ciprofloxacin pharmacodynamics in an *in vitro* dynamic model: prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints and doses. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:407-14.
 6. Firsov A.A., Lubenko I.Y., Vostrov S.N., Kononenko O.V., Zinner S.H., Portnoy Y.A. Comparative pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin in an *in vitro* dynamic model: prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints and equiefficient doses. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:725-32.
 7. Blaser J.B., Stone B., Groner M.C., Zinner S.H. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine the importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:1054-60.
 8. Dudley M.N., Mandler H.D., Gilbert D., Ericson J., Mayer K.H., Zinner S.H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin. *Studies in vivo and in an in vitro model*. *Am J Med* 1987; 82(Suppl. 4A): 363-8.
 9. Madaras-Kelly K.J., Larsson A.J., Rotschafer J.C. A pharmacodynamic evaluation of ciprofloxacin and ofloxacin against two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37:703-10.
 10. Madaras-Kelly K.J., Ostergaard B.E., Hovde L.B., Rotschafer J.C. Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:627-32.
 11. Marchbanks C.R., McKiel J.R., Gilbert D.H., et al. Dose ranging and fractionation of intravenous ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1756-63.
 12. Klepser M.E., Ernst E.J., Petzold C.R., Rhomberg P., Doern G.V. Comparative bactericidal activities of ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in a dynamic *in vitro* model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 673-8.
 13. Lacy M.K., Lu W., Xu X., et al. Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:672-7.
 14. Madaras-Kelly, K.J., Demasters T.A. *In vitro* characterization of fluoroquinolone concentration/MIC antimicrobial activity and resistance while simulating clinical pharmacokinetics of levofloxacin, ofloxacin, or ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37:253-60.
 15. Ross G.H., Wright D.H., Hovde L.B., Peterson M.L., Rotschafer J.C. Fluoroquinolone resistance in anaerobic bacteria following exposure to levofloxacin, trovafloxacin, and sparfloxacin in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2136-40.
 16. Wright, D.H., Gunderson S.M., Hovde L.B., Ross G.H., Ibrahim A.S., Rotschafer J.C. Comparative pharmacodynamics of three newer fluoroquinolones versus six strains of staphylococci in an *in vitro* model under aerobic and anaerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1561-3.
 17. MacGowan A.P., Rogers C.A., Holt H.A., Bowker K.E. Activities of moxifloxacin against, and emergence of resistance in, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1088-95.
 18. Coyle E.A., Kaatz G.W., Rybak M.J. Activities of newer fluoroquinolones against ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1654-9.
 19. Zhanel, G.G., Walters M., Laing N., Hoban D.J. *In vitro* pharmacodynamic modelling simulating free serum concentrations of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:435-40.
 20. Aeschlimann J.R., Kaatz G.W., Rybak M.J. The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* infection model. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:343-9.
 21. Peterson M.L., Hovde L.B., Wright D.H., Brown G.H., Hoang A.D., Rotschafer J.C. Pharmacodynamics of trovafloxacin and levofloxacin against *Bacteroides fragilis* in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:203-10.
 22. Peterson M.L., Hovde L.B., Wright D.H., et al. Fluoroquinolone resistance in *Bacteroides fragilis* following sparfloxacin exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2251-5.
 23. Thorburn C.E., Edwards D.I. The effect of pharmacokinetics on the bactericidal activity of ciprofloxacin and sparfloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and the emergence of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:15-22.
 24. Zhao X., Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001; 33(Suppl 3): S147-56.
 25. Hyatt J.M., Nix D.E., Schentag J.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2730-7.

26. Firsov A.A., Vostrov S.N., Shevchenko A.A., Cornaglia G. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effect examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1281-7.
27. Firsov A.A., Shevchenko A.A., Vostrov S.N., Zinner S.H. Inter- and intraquinolone predictors of antimicrobial effect in an *in vitro* dynamic model: new insight into a widely used concept. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:659-65.
28. Firsov A.A., Vostrov S.N., Lubenko I.Yu., Zinner S.H., Portnoy Yu.A. Concentration-dependent changes in the susceptibility and killing of *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* dynamic model that simulates normal and impaired gatifloxacin elimination. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23:60-6.
29. Zinner S.H., Lubenko I.Y., Gilbert D., et al. Emergence of resistant *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* dynamic model that simulates moxifloxacin concentrations inside and outside the mutant selection window: related changes in susceptibility, resistance frequency and bacterial killing. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:616-22.