

# Curvas de letalidad en antifúngicos

Emilia Cantón<sup>1</sup> y Javier Pemán<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Bacteriología Experimental, Centro de Investigación y <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España

Las curvas de letalidad o mortalidad-tiempo proporcionan una información importante sobre la dinámica de la acción microbicida de un antimicrobiano y sobre la relación entre la concentración de antimicrobiano y su actividad microbicida. Las curvas de letalidad se utilizan fundamentalmente para el estudio de nuevos antimicrobianos y para determinar el sinergismo/antagonismo de la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente.

En las bacterias, donde estos ensayos están muy desarrollados y estandarizados, los datos que se han obtenido han ayudado a comprender el mecanismo de acción de los antimicrobianos. De hecho, la determinación de las curvas de mortalidad-tiempo, se ha convertido en una herramienta de trabajo para determinar los efectos de los antimicrobianos sobre las bacterias. A pesar de su reconocimiento y de su utilidad, en micología estos estudios son muy escasos debido a que, hasta el año 1997, no se disponía de una metodología consensuada y estandarizada para la realización e interpretación de las pruebas de sensibilidad con antifúngicos [1]. Es de esperar que a partir del establecimiento de estas nuevas normas por parte del NCCLS, el número de publicaciones con estudios de curvas de mortalidad-tiempo se incrementará ayudando a la estandarización de las mismas [2].

Las curvas de letalidad en las levaduras se determinan como en las bacterias, aunque no todas las definiciones utilizadas en bacteriología sirven para la micología. En los antifúngicos se utilizan tres definiciones de CMI: la CMI-100, la CMI-80 y la CMI-50, es decir la mínima cantidad de antifúngico que inhibe el 100%, 80% y 50%, respectivamente, del crecimiento de la levadura con respecto al control después de 48 h de incubación. La primera definición se aplica a los antifúngicos poliénicos y la segunda y tercera, al grupo de los azoles. De la misma manera, el concepto de fungistático, tal y como se entiende para las bacterias, no se debería aplicar a los azoles ya que la definición de la CMI para los mismos admite un 20% de crecimiento de la levadura durante las 48 h de incubación.

## Curvas de mortalidad-tiempo

La técnica para determinar las curvas de mortalidad-tiempo es tan sencilla como larga y tediosa. Básicamente, consiste en inocular una serie de tubos que contienen concentraciones conocidas de antifúngico, con una concentración conocida de levaduras. A determinados tiempos se toma una muestra de la solución que, diluida convenientemente, se siembra en placas de agar glucosado de Sabouraud. Después de incubarlas durante 24-48 h se cuenta el número de colonias por placa (UFC). Multiplicando el número de colonias por la dilución ensayada, obtendremos el número de células supervivientes.

Normalmente de cada concentración se ensayan dos o tres diluciones y más de una placa por dilución. De las placas sembradas se cuentan aquellas que tienen entre 10 y 100 colonias, aunque si sólo se tienen placas con menos de 10 colonias se pueden utilizar para los cálculos pero interpretándolas con cautela. Como norma, la diferencia en el número de colonias entre las placas de la misma concentración y tiempo no debe ser mayor del 10%. En caso contrario debemos analizar lo que ocurre. Una de las *fuentes de error* es no tener en cuenta el efecto del antifúngico arrastrado con la muestra. Otra, también muy importante, es la falta de agitación del tubo (unos 15 segundos) antes de tomar la muestra ya que las levaduras tienden a sedimentar rápidamente y, además, al dividirse suelen quedar agrupadas formando grumos. Algunos autores recomiendan para separar las células que la toma de muestra y las diluciones posteriores de la misma, se realicen en suero fisiológico con Tween 80 a una concentración final del 0,02%, incluso recomiendan añadir el Tween al medio de cultivo. En nuestra experiencia no hemos encontrado diferencias en el número de UFC tanto si las diluciones las hacemos en suero fisiológico, en suero fisiológico con Tween al 0,02%, o si añadimos Tween al medio de cultivo, aunque estos estudios necesitan una mayor evaluación.

Los resultados de los recuentos de colonias de las placas se pueden expresar en UFC/ml o bien como porcentaje de células supervivientes con respecto al tiempo inicial. Una vez hechos los cálculos es conveniente trasladarlos a una gráfica de papel semilogarítmico poniendo en el eje de las ordenadas el logaritmo del número de células supervivientes y en abscisas el tiempo (Figura 1). Observando la gráfica se puede determinar: i) si la actividad es fungicida o fungistática, y la relación entre la concentración y la letalidad producida; ii) el tiempo en el que se inicia la actividad fungicida (en la Figura 1 a la CMI y 1/2xCMI la actividad comienza a las 2 h de incubación; en las otras concentraciones comienza inmediatamente); iii) la mínima concentración de antifúngico con acción fungicida (en la Figura 1 es 1/2xCMI); iv) el número de células viables a las 24 y 48 h de incubación; v) el incremento máximo de UFC con respecto al número inicial (en

### Dirección para correspondencia:

Dr. Javier Pemán  
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe.  
Avda. Campanar, 21, 46009 Valencia, España  
Tel.: +34 96 386 2744; Fax: +34 96 398 7392

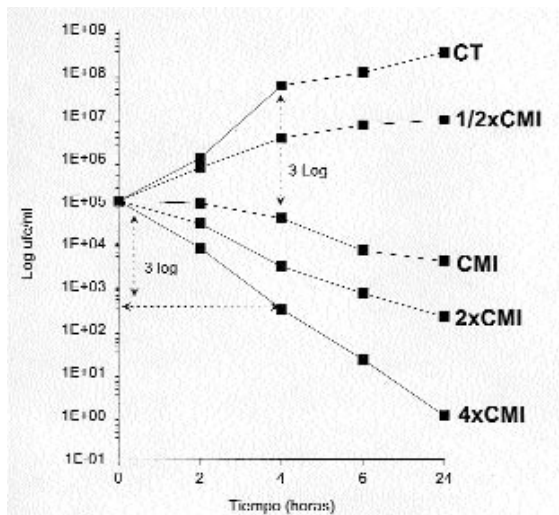


Figura 1. Representación gráfica de las curvas de letalidad a distintas concentraciones. La línea discontinua estima el tiempo en que se alcanza una diferencia de tres logaritmos con respecto al control o al inóculo.

el ejemplo es de 3,4 log en el control y de 1,9 log a 1/2xCMI); vi) el tiempo en que la concentración es fungicida, es decir el tiempo en el que el descenso de UFC es de 3 log con respecto al tiempo inicial (en la Figura 1 este tiempo es de 6 h a 4xCMI); y vii) el tiempo en que la diferencia en UFC entre el control y el antifúngico es de 3 log (en nuestro ejemplo, a la CMI este tiempo es de 4 h). En las bacterias se considera que cuando se alcanza esta diferencia el antibiótico tiene buena acción bactericida. Sin embargo, en los antifúngicos esta relación no está todavía determinada.

La relación entre la concentración y la letalidad la estableceremos, calculando la tasa de crecimiento y/o letalidad de cada concentración. Esta tasa es la pendiente de la curva de letalidad y debe determinarse matemáticamente. Representa la velocidad a la que mueren las células y se mide en UFC/tiempo

### Cálculo de la curva de letalidad

Una vez determinadas las UFC en cada tiempo y concentración, debemos buscar la función matemática que mejor se ajusta a los datos obtenidos. Los antifúngicos, como los antibióticos pueden mostrar distintas cinéticas: *monoexponencial*, en la que la letalidad aumenta proporcionalmente con el tiempo de incubación. *Bioxponencial* o bifásica, en la que hay dos velocidades de letalidad, una rápida y otra de más lenta, en este caso se obtienen dos pendientes. La letalidad también puede seguir una curva *sigmoidea*, es decir, que hay una fase de latencia antes de empezar la letalidad, seguida de una fase rápida y, finalmente, otra fase en la que la letalidad se mantiene constante o bien no aumenta significativamente.

Normalmente, tanto los antifúngicos como los antibióticos siguen una cinética monoexponencial de primer orden, cuya fórmula es:  $N_T = N_0 \cdot e^{-KT}$ . Aplicando logaritmos se transforma en:  $\ln N_T = \ln N_0 - KT$ .

El número de UFC en un determinado tiempo ( $N_T$ ) depende del inóculo ( $N_0$ ) y de una serie de factores que vienen determinados por una constante, K (tasa de letalidad o crecimiento), cuyo valor depende de las condiciones de incubación, del medio de cultivo, de la concentración del antifúngico, de la levadura, etc. Es la pendiente de la curva o de la recta, si se aplican logaritmos, y mide la velocidad de crecimiento de la levadura

cuando es positiva, y la velocidad a la que mueren las células cuando es negativa.

El valor de K es un parámetro muy importante para comparar tanto el efecto de las distintas concentraciones como de otros parámetros (inóculo, medio de cultivo, temperatura etc.) en la cinética de la acción fungicida. Con este valor se reduce la curva a un sólo punto. Comparando las pendientes de las distintas concentraciones ensayadas podemos determinar el efecto de la concentración o del parámetro de estudio (inóculo, medio de cultivo, temperatura, etc.), en la letalidad. Aplicando un análisis de varianza a las pendientes se puede determinar la concentración a partir de la cual puede considerarse que hay un aumento de letalidad y entre que concentraciones hay diferencias significativas de letalidad. Si la diferencia entre las pendientes no es estadísticamente significativa puede afirmarse que el aumento de concentración no conlleva un aumento de letalidad. Para visualizar mejor los resultados es conveniente dibujar la gráfica, representando en la ordenada las constantes de letalidad (K) y en la abscisa la concentración o el parámetro que estamos estudiando (Figura 2).

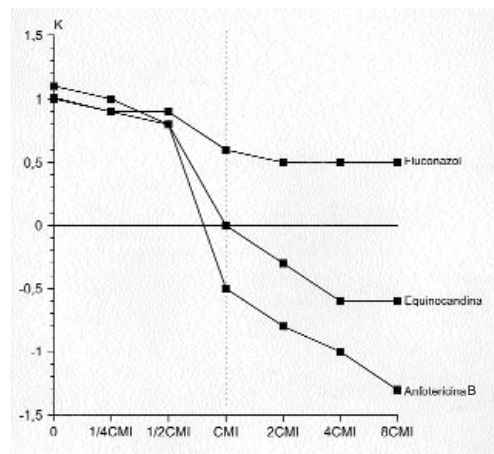


Figura 2. Representación gráfica de las pendientes de las curvas de letalidad (K) con respecto a la concentración de antifúngico.

La curva de letalidad es un concepto dinámico por ello es conveniente que las tasas de letalidad se determinen matemáticamente y no restando al número inicial de células el obtenido a un determinado tiempo. A partir de la ecuación de la curva de letalidad puede calcularse el tiempo de generación (en las curvas de crecimiento), el tiempo que tarda la población en reducirse a la mitad (en las curvas de letalidad) aplicando la fórmula:  $T_{1/2} = \ln 2/K$ ; el tiempo necesario para reducir la población viable en un 90%; etc.

### Parámetros que se deben conocer antes de realizar la curva de letalidad-tiempo

Antes de realizar los estudios de letalidad-tiempo, hay una serie de parámetros que debemos conocer como son: i) la CMI del microorganismo en el medio de cultivo que vamos a determinar la curva de letalidad; ii) las *concentraciones* que vamos a ensayar, normalmente suelen estudiarse las concentraciones comprendidas entre 1/2 y 4xCMI, también se utilizan la concentración media plasmática y la concentración media que se alcanza en distintos tejidos; iii) a ser posible, también es conveniente conocer la *dinámica de crecimiento* de la levadura, muy

útil para determinar los tiempos en que se debe realizar la toma de las muestras. En los estudios realizados por nosotros con seis cepas de *C. albicans*, en medio de RPMI 1640, el tiempo medio de generación fue de 2 h y la duración de la fase logarítmica de crecimiento de 12 h. Según esta cinética de crecimiento, en *C. albicans*, parece razonable tomar muestras al inicio, a mitad y al final de la fase logarítmica de crecimiento, es decir a las 0, 6, 12, y 24 h. Con los antifúngicos también es conveniente tomar muestra a las 48 h de incubación; iv) el efecto del antifúngico arrastrado con la muestra es importante determinarlo antes de realizar la curva, ya que de lo contrario puede considerarse como fungicida una concentración en la que la disminución del número de UFC se debe a que la cantidad de antifúngico arrastrado con la muestra es suficiente para inhibir el crecimiento de la levadura. Esta determinación es muy sencilla, basta con extender, en una placa de cultivo, y de cada concentración de antifúngico sin inocular, el mismo volumen que tomamos en las muestras, dejar secar durante 30 min y, posteriormente, sembrar una concentración conocida de levaduras. Después de incubar 24 h se compara el número de colonias de las placas con antifúngico con el número de colonias de las placas control en la que en lugar del antifúngico se ha extendido agua destilada. Si la diferencia de UFC entre la placa control y la de antifúngico es menor del 25% se puede considerar que no hay efecto antifúngico de arrastre. Generalmente, en los azoles y equinocandinas suele encontrarse este efecto a concentraciones iguales o superiores a 16xCMI y con anfotericina B a concentraciones iguales o superiores a 2xCMI [2,3]; y v) el inóculo del cual debemos partir. En las bacterias se utiliza el mismo inóculo que para la CMI; sin embargo, en las levaduras esto no es posible, ya que si partimos del inóculo utilizado en la CMI (de 0,5 a 2,5x10<sup>3</sup> UFC/ml) no se puede determinar la concentración fungicida (el límite de detección de la técnica no lo permite). Klepser y cols. [2] han estudiado el efecto del inóculo en la velocidad de crecimiento de tres especies de *Candida*, en el que concluyen que si se parte de un inóculo de 10<sup>3</sup> UFC/ml la población viable, a las 24 h de incubación, aumenta más de tres logaritmos. Si oscila entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UFC/ml se puede determinar el efecto fungicida pero el aumento de la población viable a las 24 h de incubación es menor de dos logaritmos. Por último, si el inóculo está comprendido entre 5x10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFC/ml se puede determinar mejor el efecto fungicida pero tiene el inconveniente de que el aumento de la población viable es menor de 1 logaritmo por lo que no se puede relacionar la dinámica de crecimiento de la levadura con la de letalidad. Según estos datos el autor recomienda determinar las curvas de letalidad, en el medio de RPMI, partiendo de un inóculo de 10<sup>5</sup> UFC/ml.

### Factores que influyen en la actividad fungicida

La actividad fungicida de los antifúngicos al igual que la de los antibacterianos depende de una serie de factores como son: La temperatura de incubación, cuya influencia viene determinada por su incidencia en la velocidad de crecimiento de la levadura. Se ha determinado que la agitación no influye en la actividad antifúngica de anfotericina B, fluconazol y de la equinocandina LY303366, aunque se recomienda la agitación cuando se utilizan volúmenes grandes [2]. La influencia del pH y del tampón ha sido muy estudiada en la determinación de la CMI, pero no hay estudios comparativos de su influencia en la cinética de la letalidad. En cuanto a la influencia del medio de cultivo en la dinámica de la actividad fungicida

hay pocos estudios comparativos; por ejemplo, se ha determinado que la presencia de suero en el medio de cultivo disminuye la actividad fungicida de anfotericina B de tal manera que cuando la concentración de suero en el medio de cultivo es del 90% la concentración fungicida a las 24 h de incubación aumenta 16 veces [4]. Nosotros hemos estudiado la dinámica de la actividad fungicida del fluconazol en dos medios de cultivo, RPMI y RPMI con un 2% de glucosa; encontrando que a 2xCMI, el tiempo de generación es de 3 h en RPMI y de 2,75 h en RPMI-2%, mientras que en la curva control este tiempo es de 1,99 h en RPMI y de 1,66 h en RPMI-2%. Hay otros estudios comparativos de la influencia de los medios de cultivo, Antibiotic Medium n°3 (AM#3, Difco, España) y RPMI 1640, en la actividad fungicida de la anfotericina B, y las equinocandinas LY743,872 y LY303366. Con la anfotericina B no hay diferencias; sin embargo con las equinocandinas la actividad fungicida es mayor y más rápida en el medio AM#3 [5]. Con respecto a la influencia del inóculo en la actividad fungicida también hay pocos trabajos publicados, con la anfotericina B y el fluconazol no influye el inóculo pero si que influye en la actividad de LY303366 [2]; sin embargo, el miconazol dependiendo del inóculo inicial se comporta como fungicida o fungistático [6]. La influencia de la fase de crecimiento en la actividad fungicida, ha sido estudiada en el imidazol [7], encontrando que si este se añade cuando la levadura lleva 3 h de incubación, se comporta como fungicida, en cambio si se ponen juntos levadura y antifúngico, se comporta como fungistático. La actividad fungicida también depende de la cepa; un mismo antifúngico, a la misma concentración relativa (múltiplo de la CMI) puede comportarse como fungicida o como fungistático no sólo dependiendo de la especie sino también de la cepa de *Candida* ensayada; por ejemplo, LY743,872 se comporta como fungicida sobre un aislamiento clínico de *C. albicans* y sobre *C. albicans* ATCC 90028 tiene acción fungistática incluso a 16xCMI [8]. Y, por último, la dinámica de la acción fungicida depende del tipo de antifúngico y su modo de acción. En relación con la concentración se han descrito tres tipos de antifúngicos: Los fungicidas dependientes de la dosis, como los polienos; cuya actividad aumenta con la concentración y tiempo de incubación; los fungicidas dosis independientes, como las equinocandinas [8] y los fungistáticos, como los azoles, en los que se han definido tres modelos de crecimiento: el que producen las concentraciones inferiores a la CMI (paralelo a la curva de crecimiento del control), el que producen las concentraciones comprendidas entre la CMI y 2xCMI con un crecimiento inferior al control y el que producen las concentraciones superiores a 2xCMI con una inhibición del crecimiento menor de tres logaritmos [9].

En resumen, en el estudio de las curvas de letalidad de los antifúngicos se recomienda partir de un inóculo entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UFC/ml, utilizar el mismo medio de cultivo que en la determinación de la CMI (generalmente el medio RPMI 1640 tamponado con MOPS y ajustado a pH 7), incubar a 35°C con agitación, un volumen final de 10 ml y tomar muestras a tiempo cero, al inicio, mitad y final de la fase logarítmica, así como a las 24 y 48 h de incubación.

**Bibliografía**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 1997.
2. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller M. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1207-1212.
3. Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller M. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1387-1391.
4. van Etten EWM, van de Rhee NE, van Kampen KM, Bakker-Woudenberg IAJM. Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2275-2281.
5. Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. Growth medium effect on the antifungal activity of LY303366. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;29:227-231.
6. De Logu A, Fadda AM, Anchisi C, *et al*. Effects of *in vitro* activity of miconazole and ketoconazole in phospholipid formulations. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:889-893.
7. Beggs WH. Growth phase in relation to ketoconazole and miconazole susceptibilities of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:316-318.
8. Ernst EJ, Klepser ME, Messer SA, Ernst ME, Pfaller MA. Antifungal dynamics of LY743,872 against *Candida* spp. determined by time-killing methods. En: *Proceedings and abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, Washington, DC; 1997: 159 (Abtr. F-78).
9. Klepser ME, Ernst EJ, Jones WR, Nithingale CH, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1392-1395.