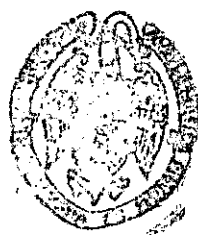


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



**ACTIVIDAD Y FARMACODINAMIA DE
CINCO ANTIFUNGICOS FRENTE A
*Cryptococcus neoformans***

TESIS DOCTORAL



ARCHIVO

LUIS GUARDIOLA GÓMEZ
MADRID, JULIO 1997



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

D. JOSÉ PRIETO PRIETO Catedrático del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y D. FERNANDO MÍNGUEZ MÍNGUEZ, Profesor del Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación, titulado: ACTIVIDAD Y FARMACODINAMIA DE CINCO ANTIFÚNGICOS FRENTE A *Cryptococcus neoformans* constituye la Memoria presentada por Luis Guardiola Gómez para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Madrid, Julio de 1997.

Fdo. Prof. Dr. Fernando Mínguez Mínguez

Fdo. Prof. Dr. José Prieto Prieto

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincera gratitud al Prof. Dr. José Prieto, bajo cuya dirección ha sido realizado este trabajo, por haber depositado su confianza en mis posibilidades desde el principio, así como por poner a mi alcance todos los recursos humanos y materiales para lograrlo, dándome siempre consejos acertados e ideas nuevas en los momentos más oportunos.

También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Fernando Mínguez, codirector de esta Tesis, por transmitirme su meticulosidad y constancia a lo largo de los años que hemos trabajado juntos.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología, que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo. Quiero hacer mención especial al Dr. Mario Lozano Chiu y al Dr. Ziad Daoud, de los cuales he aprendido la mayor parte de los conocimientos sobre técnicas experimentales de laboratorio.

Agradezco al Dr. Lorenzo Aguilar sus lecciones de farmacología, las cuales han contribuido de forma decisiva al diseño final de este trabajo, por sus constantes ánimos y amistad.

Al Catedrático de Ciencias José Guardiola, por infundirme el espíritu científico desde mi infancia.

A mi familia por permitirme robarles parte del tiempo que les habría dedicado. Especialmente a mi padre por su constante e incondicional apoyo, a Marina y a Elena, que han crecido con esta Tesis.

Esta Tesis está dedicada a Eva, porque con su constante apoyo, ánimo y compañía, ha conseguido una vez más que una ilusión se convierta en realidad.

ABREVIATURAS

5-FC: 5-fluorocitosina

AMB: Anfotericina B

AUC: Area Bajo la Curva de Concentración/Tiempo

AUKC: Area Bajo la Curva de Letalidad

CMA: Concentración Mínima Antimicrobiana

C_{max}: Concentración Máxima en Suero

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ERT: Tiempo de Recrecimiento Efectivo

FLU: Fluconazol

HPCL: Técnica Cromatográfica Líquida de Alta Presión

IC: Concentración Inhibitoria

IQ: Coeficiente inhibitorio (o terapéutico)

KTZ: Ketoconazol

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

PAE: Efecto Postantibiótico

PAFE: Efecto Postantifúngico

PMN: Leucocito Polimorfonuclear Neutrófilo.

UFC: Unidad Formadora de Colonias

UK: UK 109,496

INTRODUCCIÓN	1
ACTUACION DEL ANTIMICROBIANO: FARMACODINAMIA	1
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS FARMACOS: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD	4
1.- CMI.....	4
2.- CMB.....	5
3.- IQ.....	5
PARAMETROS FARMACODINAMICOS	6
1.- Cuantificación de la actividad microbica en el tiempo. Curvas de Letalidad.....	6
1.1.- Factores biológicos que influyen en la cinética de muerte microbiana.....	7
1.2.- Factores metodológicos que interfieren en la realización de curvas de letalidad.....	8
2.- Area Bajo la Curva de Muerte.....	10
3.- Persistencia de la actividad antimicrobiana tras la actuación del fármaco.Efecto postantibiótico	10
3.1.- Determinación del PAE <i>in vitro</i>	10
3.2.- Factores que influyen en el PAE.....	11
3.2.1.- Tipo de microorganismo.....	11
3.2.2.- Clase de microorganismo.....	12
3.2.3.- Condiciones experimentales.....	12
4.- Efecto de Concentraciones Subinhibitorias.....	12
5.- Tiempo de recrecimiento (ERT).....	14
FACTORES PROPIOS DEL HUESPED	15
AGENTES ANTIFUNGICOS	16
1.- Pruebas de sensibilidad. situación actual.....	16
2.- Estudios farmacodinámicos.....	19
3.- Estudios de interacción con procesos inmunológicos.....	20
4.- Anfotericina B.....	20
4.1.- Estructura, propiedades químicas y mecanismo de acción.....	20
4.2.- Actividad microbiológica.....	21
4.3.- Farmacocinética.....	21
4.5.- Dosificación.....	22
5.- 5-Fluorocitosina.....	22
5.1.- Estructura y propiedades químicas. Mecanismo de acción.....	22
5.2.- Actividad microbiológica.....	23
5.3.- Farmacocinética.....	23
6.- Ketoconazol.....	23
6.1.- Estructura y propiedades químicas. Mecanismo de acción.....	24
6.2.- Espectro de acción y actividad antifúngica.....	24
6.3.- Farmacocinética.....	24
7.- Fluconazol.....	25
7.1.- Estructura y propiedades químicas. Mecanismo de acción.....	25
7.2.- Espectro de acción y actividad antifúngica.....	25
7.3.- Farmacocinética.....	26
7.4.-Aplicación terapéutica.....	26
8.- UK 109,496	27
8.1.- Estructura, propiedades químicas y mecanismo de acción.....	27
8.2.- Espectro de acción y actividad antifúngica.....	27
8.3.- Farmacocinética.....	28
<i>Cryptococcus neoformans</i>	29
1.- Patogenicidad.....	29
2.- Clínica.....	31

OBJETIVOS	33
MATERIAL Y METODOS	35
MICROORGANISMO.....	35
ANTIFUNGICOS.....	35
MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS.....	35
CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	36
CURVAS DE CRECIMIENTO.....	37
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS.....	37
CINETICA DE MUERTE FUNGICA.....	39
EFECTO POSTANTIFUNGICO.....	41
EFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-CMI EN FASE POSTANTIFUNGICA.....	42
TIEMPO DE RECRECIMIENTO.....	43
ACTIVIDAD DEL SUERO.....	43
1.- Curvas de crecimiento.....	43
2.- Curvas de letalidad.....	44
3.- Efecto Postantifúngico.....	44
ANALISIS ESTADISTICO.....	44
RESULTADOS	46
CURVAS DE CRECIMIENTO.....	46
SENSIBILIDAD.....	46
CURVAS DE LETALIDAD.....	48
1.- Anfotericina B.....	48
2.- 5-Fluorocitosina.....	48
3.- Ketoconazol.....	49
4.- Fluconazol.....	49
5.- UK 109,496.....	50
EFECTO POSTANTIFUNGICO Y DE CONCENTRACIONES SUB-MIC. ERT.....	50
1.- Anfotericina B.....	50
2.- 5-Fluorocitosina.....	51
3.- Ketoconazol.....	52
4.- Fluconazol.....	52
5.- UK 109,496.....	52
EFECTO DEL SUERO.....	53
1.- Curvas de letalidad.....	53
1.1.- Anfotericina B.....	54
1.2.- 5-Fluorocitosina.....	54
1.3.- Ketoconazol.....	54
1.4.- Fluconazol.....	55
1.5.- UK 109,496.....	55
2.- Efecto Postantifúngico.....	55
TABLAS Y FIGURAS	55
DISCUSION	95
METODOLOGIA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y FARMACODINAMIA ANTIFUNGICA.....	96
ACTIVIDAD DE LOS AGENTES ANTIFUNGICOS FRENTE A <i>Cr. neoformans</i> . PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.....	100
CINETICA DE MUERTE CON ANTIFUNGICOS. CURVAS DE LETALIDAD.....	107
DISCUSION DEL EFECTO POSTANTIFUNGICO Y DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS EN FASE POSTANTIFUNGICA.....	115

INFLUENCIA DEL SUERO HUMANO EN EL COMPORTAMIENTO FARMACODINAMICO DE LOS AGENTES ANTIFUNGICOS FRENTE A Cr.neoformans.....	124
SUMARIO DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACODINAMICA DE CINCO ANTIFUNGICOS SOBRE LA LEVADURA Cr.neoformans.....	129
CONCLUSIONES.....	132
CITAS BIBLIOGRAFICAS.....	134
ANEXOS	

INTRODUCCION

ACTUACIÓN DEL ANTIMICROBIANO: FARMACODINAMIA

La farmacodinamia se puede definir de forma general como el estudio de los mecanismos de acción y los efectos bioquímicos y fisiológicos producidos por los fármacos (1).

El objetivo del análisis del modo de acción de los fármacos, es delimitar las interacciones bioquímico-físicas entre el fármaco y la célula diana, para así caracterizar la secuencia completa y el ámbito de acciones de cada quimioterápico (1)

Estos conceptos son aplicables también a las sustancias antimicrobianas, ya que están sujetas a las mismas condiciones (2). Así, su actividad se relaciona directamente con su capacidad para alcanzar el lugar específico del patógeno, unirse a él en concentraciones adecuadas y permanecer allí hasta que su efecto impida al microorganismo continuar sus funciones fisiológicas normalmente (3).

Para que un antimicrobiano erradique de forma efectiva a un microorganismo patógeno del cuerpo humano, no sólo debe unirse al lugar apropiado (diana), sino que además debe hacerlo en una cantidad suficiente. Cuando no se satura el número mínimo de lugares de unión, la actividad del antimicrobiano no es la adecuada, ya que este proceso viene determinado por las leyes del efecto masa (4). Clásicamente se pensaba que la actividad de un fármaco es proporcional a la fracción de receptores ocupados por él, y que el máximo efecto se obtenía cuando todos los receptores se hallaban ocupados. Posteriormente, se introdujo el término de *eficacia*, el cual implica una mayor precisión en la determinación de la actividad del fármaco, basándose en las relaciones concentración/respuesta (5).

Aunque esta relación no puede revelarnos mecanismos moleculares, sí nos ofrece conceptos numéricos de cómo la concentración de un antimicrobiano y su diana determinan la respuesta terapéutica (1).

Por tanto, la concentración del fármaco en las proximidades de los lugares de unión debe acercarse a un valor determinado, capaz de saturar el número necesario de estos sitios y producir la inhibición del crecimiento celular.

Desgraciadamente, la cantidad de lugares que deben ser ocupados por las moléculas de antimicrobiano para un único microorganismo nos es técnicamente imposible de definir, por lo que hemos de conformarnos con emplear métodos aproximados que estimen estos fenómenos.

Tanto la CMI como la CMB son buenos medidores de la cantidad de fármaco necesario para inhibir el crecimiento de los microorganismos por saturación de los lugares de unión (6).

Es obvio que la actividad de un compuesto en el cuerpo humano está directamente relacionada con la capacidad del antimicrobiano para penetrar en el lugar de unión apropiado, a una concentración adecuada y durante un periodo de tiempo suficiente (7). No obstante, en el organismo el fármaco está sujeto a una disposición especial, puesto que existe un gradiente de concentración y de tiempo que no se produce en las pruebas de laboratorio. El objeto de un tratamiento antibiótico es conseguir suficiente concentración de fármaco en el órgano o tejido afectado para conseguir el efecto erradicativo deseado (8).

Por tanto, las dos áreas de información, por un lado la de actividad microbiológica y por otro la farmacocinética, definen la eficacia de un antimicrobiano bajo el término de farmacodinamia (9).

A partir de esta relación de farmacocinética y actividad microbiológica, surgen múltiples parámetros importantes a la hora de determinar la eficacia del antimicrobiano. Así por ejemplo, el área bajo la curva de concentraciones séricas (AUC), la concentración sérica máxima (C_{max}) y la vida media de un fármaco pueden ser relacionados con la CMI del patógeno para generar parámetros farmacodinámicos como las relaciones AUC:CMI, C_{max} :CMI o el tiempo que permanecen las concentraciones séricas del antimicrobiano por encima de la CMI ($t > CMI$) (3).

La actuación de concentraciones inadecuadas de compuestos elimina tan sólo aquellas subpoblaciones más sensibles, persistiendo las más resistentes. Esto implica que la mayoría de estas bacterias supervivientes permanecen en una fase estática mientras el hospedador elimina el antibiótico, se recupera del daño en las partes afectadas, o sintetiza nuevas proteínas. A esta fase estática que resulta tras la exposición de un individuo a un antimicrobiano se la denomina efecto postantibiótico o PAE (10). El PAE es el tiempo durante el cual el crecimiento microbiano es inhibido una vez que la concentración del fármaco ha descendido a niveles por debajo de la CMI (11,12).

La duración del efecto PAE es dependiente de muchos factores: el microorganismo, el fármaco y la concentración a la que se encuentra, y la duración de la exposición (13-17). Una vez que la concentración del antibiótico ha desaparecido del entorno y la fase postantibiótica ha concluido, si el microorganismo ha conseguido sobrevivir comenzará de nuevo su ciclo vital a ritmo normal y entrará en la fase denominada de recrecimiento. A partir de este momento el

microorganismo puede volver a inducir una infección cuando alcance un tamaño de población óptimo (18).

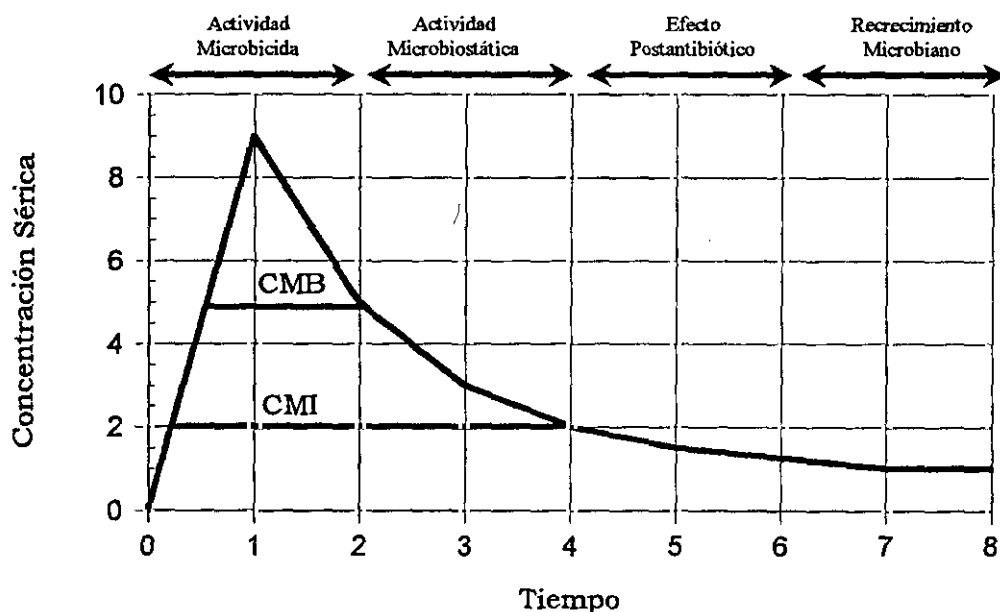


Figura 1. Relaciones farmacodinámicas entre la concentración de fármaco en suero y la actividad antimicrobiana.

Ya hemos dicho que una terapia antimicrobiana efectiva lleva implícita la idea de toxicidad selectiva, y requiere que el agente antimicrobiano alcance el lugar de infección en una concentración suficiente para inhibir y preferiblemente matar al microorganismo ofensivo, con la mínima toxicidad para el hospedador. (19). Resulta obvio pensar que ningún tubo de ensayo en el laboratorio va a reproducir de forma idéntica las condiciones en las cuales el microorganismo y el antimicrobiano se encuentran en el foco infeccioso. Lo sorprendente de este fenómeno no es que las pruebas de laboratorio fallen alguna vez al predecir la respuesta clínica, sino que muy a menudo son fructíferas en ello.

Se pueden identificar tres líneas generales de investigación que hayan sido exploradas en un intento de ganar más confianza en la manera de predecir el éxito terapéutico (20):

- 1.- Estudios designados para averiguar que ocurre en el encuentro microbio-fármaco en el tubo de ensayo (como sucede en las pruebas de actividad microbiológica).

- 2.- Esfuerzo en acercar las pruebas *in vitro* a la realidad. La correlación entre la farmacocinética y las pruebas de sensibilidad microbiana son un claro ejemplo de este proceso.
- 3.- Empleo de factores inmunológicos *ex vivo* para la extrapolación de resultados a los fenómenos que ocurren realmente en el proceso infeccioso.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS FÁRMACOS. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La actividad antimicrobiana intrínseca de los antibióticos se determina en el laboratorio mediante estudios de sensibilidad *in vitro*, partiendo de un número importante de cepas bacterianas frente a dichos fármacos (21). Existe actualmente una clara controversia en cuanto a cuál es el mejor y más práctico de los métodos de sensibilidad a antibióticos, o a cualquier sustancia que muestre actividad inhibitoria en el crecimiento de los microorganismos (22,23). Aunque ya se estén empleando métodos estandarizados (24,25), las dos herramientas más importantes en pruebas de sensibilidad antibacteriana, el método de difusión en agar y el de dilución en caldo, todavía muestran diferencias significativas entre ellas (26).

1.- Concentración Mínima Inhibitoria. CMI.

El método de la dilución en caldo determina ya sea con macro o micro-volúmenes (27,28) la CMI, es decir, la concentración de fármaco que inhibe el crecimiento de un cultivo de microorganismos expuestos a un fármaco en concentraciones seriadas al doble (29).

Esta CMI está aceptada como método de referencia, y prueba de ello es que las demás técnicas de sensibilidad se refieren siempre comparativamente con ella. Según la NCCLS (25), las pruebas de sensibilidad están indicadas para cualquier microorganismo que contribuya a un proceso infeccioso, siempre y cuando su sensibilidad no pueda ser predecible a partir del conocimiento de la identidad del microorganismo, y fundamentalmente en aquellas especies que pueden mostrar resistencia a los fármacos de uso común.

Indudablemente, la CMI tiene un valor incalculable a la hora de averiguar la sensibilidad de los microorganismos a los fármacos; sin embargo, también es cierto que presenta alguna desventaja (22):

- Sólo es útil si las comparaciones se realizan bajo las mismas condiciones.

- Se realiza casi invariablemente en la fase logarítmica de crecimiento, cuando la población celular cambia continuamente.
- A medida que transcurre el crecimiento celular, la cantidad de fármaco dirigido a los microorganismos oscila.
- Es un valor estático o puntual, es decir, no genera información de la actuación del fármaco sobre el microorganismo a lo largo del tiempo.

Estas desventajas de la CMI surgen y se explican básicamente por un motivo: la aplicación de los resultados no tiene el mismo fin. Cuando se habla de CMI con finalidad práctica, nos encontramos con una serie de normas o criterios de determinación de sensibilidad de los microorganismos a los diferentes fármacos, fundados en la universalización de las técnicas a emplear. Con ello se pretende que la capacidad de inhibir un microorganismo sea lo más parecida posible en todos los laboratorios que manejan muestras clínicas, y que se pueda enfocar de algún modo el tratamiento de una enfermedad infecciosa. Sin embargo, si empleamos la CMI con fines de investigación únicamente, las condiciones aplicadas son totalmente distintas, puesto que la finalidad no se enfoca hacia la reproductividad de las pruebas, sino a su utilidad científica.

2.- Concentración Mínima Bactericida. CMB

La CMB es la concentración mínima de antibiótico capaz de eliminar el 99,9% de la población celular procedente de un inóculo estándar (10^5 UFC/ml). Para determinar la CMB se siembran en agar alícuotas de las concentraciones que inhiben el crecimiento del microorganismo, y aquella dilución que no muestre indicio de crecimiento alguno en la placa se considerará la CMB (29).

3.- Cociente Inhibitorio. IQ.

El cociente inhibitorio o coeficiente terapéutico resulta de la relación obtenida entre el nivel medio alcanzado en suero en un tratamiento con dosis terapéuticas (expresado en microgramos), y la CMI del patógeno potencialmente infectante (30). Generalmente se escoge como valor óptimo el que parte como mínimo de 4, aunque depende de la aplicación clínica, microorganismo, niveles tisulares/séricos/LCR etc. (21,31). Así por ejemplo, la ausencia relativa de mecanismos de defensa en el sistema nervioso central implica que la tasa de muerte

microbiana ha de tener un perfil más bien bactericida que bacteriostático y, por tanto, el IQ ha de ser algo mayor para mejorar la actividad (32).

PARAMETROS FARMACODINAMICOS

1.- Cuantificación de la actividad microbicida en el tiempo. Curvas de letalidad

La curva de letalidad es una herramienta experimental que permite apreciar la actividad de un antibiótico mediante un seguimiento a lo largo del tiempo (33). Al igual que en la CMI, este efecto se cuantifica como resultado de la exposición continua del microorganismo a una concentración fija del antimicrobiano (27). La actividad letal se puede expresar como la tasa de muerte ocurrida bajo una concentración fija de fármaco en condiciones experimentales controladas (34,35). Dicha tasa se obtiene contando el número de microorganismos viables a varios intervalos de tiempo (33). La tasa de muerte bacteriana depende en parte del tipo de quimioterápico empleado, de la concentración empleada y del tiempo de exposición (24,25). Para un mejor conocimiento de la correlación entre las pruebas de cinética de muerte *in vitro* y los resultados terapéuticos, la limitación de la viabilidad microbiana causada por el fármaco se debe interpretar a partir del conocimiento de las concentraciones activas del compuesto antimicrobiano y su distribución sérica tras su administración (36).

Basándose en esto, algunos autores han propuesto una clasificación en dos grupos de los antimicrobianos, según su actuación (3,32):

- Concentración dependientes. Aquéllas sustancias capaces de incrementar marcadamente la actividad microbicida a medida que se aumenta la concentración. En este caso, podemos decir que la muerte microbiana depende de la diferencia entre la concentración máxima del fármaco y la CMI del patógeno.
- Concentración independientes (o tiempo dependientes). Aparentemente cuando la concentración de fármaco supera un determinado valor (bien sea CMI o valores superiores), la muerte bacteriana se produce a una tasa de orden 0, y el incrementar dicha concentración no conduce a un cambio proporcional en la tasa de muerte microbiana. Bajo estas condiciones, no es predecible la correlación con concentración pico sérica.

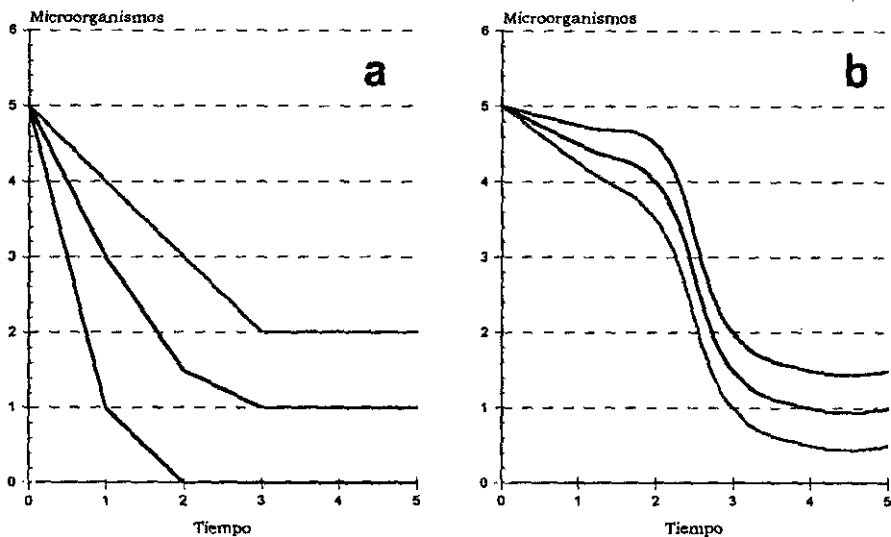


Figura 2. Cinética de muerte de un microorganismo frente a un fármaco con comportamiento concentración dependiente (a) y otro tiempo dependiente (b).

Cuando se usa como herramienta la curva de letalidad para valorar un antimicrobiano, generalmente se emplean concentraciones superiores a la CMI. A intervalos fijos de tiempo, se cuentan las células viables y se registran en una escala semilogarítmica frente al tiempo.

A veces el recuento celular puede incrementarse tras el descenso inicial. Este fenómeno puede atribuirse a la selección de mutantes resistentes, inactivación del antimicrobiano o recrecimiento de las células que hayan escapado a la actividad del fármaco (37).

Cuando se expone el microorganismo a la acción del fármaco el efecto que se obtiene es dependiente de muchos condicionantes. Estos pueden ser de origen biológico o de origen técnico, pero en cualquier caso son todos importantes a la hora de generar unos resultados no sesgados.

1.1.- Factores biológicos que influyen en la cinética de muerte microbiana.

Tolerancia. Se produce cuando el microorganismo es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de antimicrobiano de forma que la acción microbicida del fármaco es eludible (33) y, por tanto, no se produce variación en los resultados de las pruebas de sensibilidad.

Se han descrito al menos 3 mecanismos capaces de generar supervivencia en los aislados clínicos durante la terapia con agentes de actuación a nivel de membrana (33,37,38):

- Persistencia.** Un número reducido de bacterias (generalmente $< 0,1\%$) es capaz de sobrevivir al efecto letal de un antimicrobiano. Si estas células persistentes son de nuevo incubadas junto con el fármaco, encontramos que son exactamente igual de sensibles que la cepa de la que proceden.
- Efecto paradójico.** Ocurre cuando la supervivencia celular se incrementa significativamente, al tiempo que se aumenta la concentración del agente antimicrobiano por encima de la CMB.
- Tolerancia fenotípica.** Es una propiedad que presentan prácticamente todas las cepas bacterianas y se define como un descenso en la sensibilidad al agente antimicrobiano, el cual se manifiesta sólo en determinadas condiciones de crecimiento.

Resistencia fenotípica. Es posible que un microorganismo desarrolle resistencia durante la realización de una prueba de sensibilidad, y esta resistencia, que en la mayoría de las ocasiones es fenotípica, es una característica inherente al microorganismo. Las pruebas de sensibilidad microbiana son especialmente proclives a seleccionar cepas fenotípicamente resistentes de la población. A diferencia de las cepas persistentes, estos supervivientes pueden demostrar un descenso en la sensibilidad cuando se vuelven a ensayar.

1.2.- Factores Metodológicos que interfieren en la realización de las curvas de letalidad

Aparte de las características fisiológicas y genéticas inherentes al microorganismo, existen otros motivos por los cuales la obtención de resultados en la sensibilidad del microorganismo a un fármaco pueden verse modificados.

En muchas ocasiones, los métodos experimentales son una pieza clave a la hora de asegurar una fiabilidad elevada en las conclusiones de un estudio de investigación.

Fase de crecimiento del inóculo. Cuando se emplea un cultivo de microorganismos para comprobar el grado de sensibilidad a un quimioterápico, se ha de conocer con el mayor grado de exactitud posible cuál es la fase de crecimiento en la que se encuentra el microorganismo para iniciar la prueba. Un error muy frecuente en los laboratorios es realizar pruebas de sensibilidad con microorganismos en fase estacionaria. En este momento del ciclo de vida del microorganismo, se incluyen una gran cantidad de células latentes dentro de la población que

no son tan sensibles a la acción del fármaco y, por tanto, producen tasas de muerte menores (39,40).

Tamaño de inóculo. La cantidad de microbios presentes en una prueba de sensibilidad es muy importante. El fenómeno por el cual se observa un incremento significativo en la CMI cuando se sube la concentración microbiana del inóculo, se denomina Efecto Inóculo (27,41). En general, se considera que un incremento de la CMI es significativo cuando el valor de inhibición asciende 2 diluciones o más con un cambio en el tamaño de inóculo de $+ 0,5 \log_{10}$ UFC/ml (42). A menudo este efecto es atribuible al incremento de las enzimas inactivantes del antibiótico, como ocurre con las β -lactamasas (43,44). Existe en cambio, otro fenómeno relacionado con el incremento del inóculo y que se ha citado ya previamente; la tolerancia. Cuando se trabaja con tamaños de inóculo elevados la tolerancia aumenta, mientras que cuando se emplea un tamaño de inóculo reducido el descenso en la tolerancia es inmediato (45).

Contacto insuficiente. En ocasiones el microorganismo no contacta lo suficiente con el fármaco como para poder percibir una actividad del 100%. Esto es, en gran medida, debido a la presencia o ausencia de agitación continua durante el proceso experimental. En muchas ocasiones, la adhesión del microorganismo a la parte inmediatamente superior del menisco del tubo de ensayo es la causa de que el antimicrobiano no actúe sobre la totalidad de los microbios (46-48).

Arrastre de antimicrobiano. Este fenómeno se encuentra en los casos en que se emplean mucha concentración de antimicrobiano (supra CMI). Cuando se transfiere un volumen del cultivo a otro con medio fresco, además de arrastrar los microorganismos, se produce un paso de una cantidad de antimicrobiano no deseado (49). En aquellas pruebas en que se emplea dilución y siembra en placa es muy común dejar restos de fármaco sobre el agar que pueda influir *a posteriori* en el recuento de las unidades formadoras de colonias.

Medio de cultivo. La elección de un medio de cultivo es esencial para ver la eficacia de un fármaco sobre un microorganismo. Son muchos los factores existentes en un medio de cultivo que pueden afectar al crecimiento del microorganismo o a la acción del antimicrobiano. Por ello, algunas de las variables del medio como proteínas (50,51), pH (52), fosfatos (53),

osmolaridad, concentración salina y cationes disolventes (53,54), son importantes a la hora de seleccionar un medio de cultivo apropiado.

2.- Área Bajo la Curva de Muerte (AUKC)

Este parámetro nos permite comparar el efecto encontrado en la interacción microorganismo-quimioterápico a lo largo del tiempo en que ambos están en contacto (55,56)

El AUKC puede cuantificarse de forma particular o global, es decir, podemos obtener cada una de las AUKC de cada hora de muestreo en la curva de letalidad, o si no obtener la suma de todas ellas que nos ofrece un AUKC completa, a lo largo de todo el experimento.

Este parámetro nos permite saber cómo se comporta un antimicrobiano a lo largo de la exposición con el microorganismo, pudiendo comparar con diferentes concentraciones.

3.- Persistencia de la actividad antimicrobiana tras la actuación del fármaco. Efecto Postantibiótico

El efecto postantibiótico (PAE) es el término utilizado para describir la persistencia en la supresión del crecimiento bacteriano que sigue tras una corta exposición del microorganismo a los agentes antimicrobianos (11). Es un fenómeno asociado a la actividad inhibitoria de la mayor parte de los agentes antimicrobianos, y se produce cuando éstos se ensayan a concentraciones iguales o superiores a la CMI (14).

Aunque este fenómeno fue descrito en los años 40 su relevancia terapéutica no se ha estudiado verdaderamente hasta mediados los años 70. La demostración de que no se trata tan sólo de un fenómeno *in vitro*, sino que puede hallarse también en modelos experimentales (57-60) y sobre todo, su ratificación como factor a considerar en los regímenes de dosificación (13,61), han dado a este efecto una importancia clara, que se transmite en una gran cantidad de estudios (62-70).

3.1.- Determinación del PAE *in vitro*.

La determinación y cuantificación del PAE han sido realizadas por una amplia variedad de métodos (10). En general, estas técnicas conllevan a la medición de la cinética de crecimiento de los microorganismos tras la eliminación completa de del fármaco existente en el medio. Para medir el crecimiento microbiano, la técnica más empleada por los investigadores es la de recuento de viables en placa (71).

El método estándar para calcular el PAE está fundado en la diferencia entre el tiempo requerido para los cultivos control y el tiempo requerido por los cultivos tratados en aumentar un logaritmo decimal por encima del número de microorganismos presentes tras la eliminación del quimioterápico (11). Su expresión matemática es la siguiente:

$$\text{PAE} = T - C;$$

donde T es el tiempo requerido para que el cultivo tratado con antimicrobiano incremente su población bacteriana en 1 logaritmo decimal después de haber retirado el fármaco, y C es el tiempo requerido para que la población bacteriana del cultivo control se incremente en 1 logaritmo decimal por encima de su valor después de la eliminación del agente antimicrobiano de los cultivos tratados.

Existen otras técnicas aparte del recuento de viables, que cuantifican el efecto postantibiótico. Así por ejemplo existen métodos morfológicos (72), de densidad óptica (73), recuento de partículas electrónicas (63,74), generación de CO₂ (75), tasa de incorporación de timidina tritiada (76), y medida del ATP intracelular (77,78), entre otros. Aunque en general el PAE observado para ellos es el mismo o muy similar al que se obtiene por recuento de viables, en el caso de la medición por densidad óptica y de presencia de ATP intracelular, se ha demostrado la generación de tiempos de PAE mayores (75,79).

3.2.- Factores que influyen en el PAE

Hay una serie de factores que pueden alterar la presencia y/o duración del PAE. Estos están relacionados con el fármaco, el microorganismo y/o con las condiciones experimentales (80).

3.2.1.- Tipo de microorganismo. No todos los microorganismos presentan el mismo PAE, incluso este valor es diferente dentro de la misma especie y distinta cepa. Normalmente los Gram-positivos y las levaduras son los que muestran tiempos de PAE más largos (64,81,82,83). En cambio, los Gram-negativos suelen no tener PAE o éste es más corto (84,85). También es importante considerar algunos factores intrínsecos al microorganismo como la fase de crecimiento, capacidad de crear resistencia, tiempo de generación, etc (14).

3.2.2.- Clase de antimicrobiano. Los fármacos influyen principalmente en la determinación del PAE por dos motivos, según sea su mecanismo de acción o según la relación concentración/tiempo de exposición. En los Gram-positivos, los antimicrobianos en general producen PAE largo, siendo los inhibidores de proteínas y de ácidos nucleicos los que inducen mayores tiempos (62,86,87), mientras que los inhibidores de la pared celular son los que generan los tiempos de PAE más cortos. En los Gram-negativos se ha encontrado que los inhibidores de síntesis proteica y de ácidos nucleicos producen PAE de varias horas (70,88), mientras que los β -lactámicos producen PAE nulo o no significativo (excepto el grupo de carbapenemes) (89,90).

3.2.3.- Condiciones experimentales. Son varios los factores que pueden influir en la cuantificación del PAE (pH, medio, temperatura), pero sin duda uno de los pasos que claramente es determinante en el desarrollo del experimento y cualquier variación en su ejecución modificará los resultados, es el lavado o eliminación del fármaco (10). Estudios sobre la eliminación del antimicrobiano del medio de cultivo han puesto de manifiesto que existen variaciones en la duración del PAE, dependiendo del método empleado. Las formas más comunes de eliminación del fármaco son la centrifugación, filtración, dilución y la inactivación (14). La centrifugación es el método estandarizado y más fiable, aunque presente el inconveniente de producir una elevada letalidad (especialmente en Gram-negativos), debido a efectos mecánicos y osmóticos (91).

4.- Efecto de concentraciones subinhibitorias

En el tratamiento de infecciones bacterianas con dosificación intermitente, las concentraciones del fármaco en tejido y suero decrecen paulatinamente hasta que alcanzan niveles que se encuentran por debajo del umbral de actividad inhibitoria. Existen una serie de estudios que demuestran que la acción de una dosis en dicha fase es más activa que cuando no hay pretratamiento, y que incluso con concentraciones subinhibitorias se puede llegar a conseguir un efecto microbicida (65,92,93).

El efecto farmacodinámico de las concentraciones subinhibitorias de antibióticos (Sub-CMI) puede ser evaluado de múltiples formas. El término CMA, referido a la concentración mínima de antibiótico, fue descrito por Lorian (96) para explicar el fenómeno relativo a la variación en la estructura celular bacteriana observada por microscopía electrónica o por descenso en 1 logaritmo decimal de células viables al emplear concentraciones por debajo de la

CMI. Se producen en los microorganismos cambios como elongación, engrosamiento de la pared celular o formación de largos filamentos (94,96). La CMA, cuando se define como producción de un descenso en la viabilidad de los microorganismos en 1 logaritmo decimal, varía según el antibiótico y entonces se emplea la relación CMI/CMA para indicar la magnitud del efecto de concentraciones Sub-CMI (94).

Otro efecto de las concentraciones Sub-CMI se puede ver cuando el microorganismo ha sido pretratado con concentraciones supra-CMI durante un tiempo, es decir, la aplicación de bajas concentraciones sobre microorganismos en fase postantibiótica (77,93,97,98). En este caso las concentraciones subinhibitorias pueden producir un letargo prolongado en la replicación microbiana, o incluso un efecto microbicida antes del recrecimiento, sobre todo en el caso de las combinaciones antibiótico/bacteria con presencia de PAE (94). Se ha descrito un método de cuantificación de dicho efecto a partir de dos parámetros (99):

- 1) El efecto de concentraciones Sub-CMI representado en la figura 3, se define según la fórmula:

$$PASE = S' - S;$$

donde S representa la diferencia entre el tiempo de crecimiento (requerido para incrementar la población de células viables en 1 logaritmo) a cada Sub-CMI de antibiótico sin pretratamiento (sin inducción de PAE), y el tiempo de crecimiento de los cultivos control no tratados y S' es la diferencia entre el tiempo de crecimiento de los microorganismos expuestos a cada sub-MIC de antibiótico con tratamiento (previa inducción de PAE) y el tiempo de crecimiento de los controles pretratados únicamente (inducción de PAE).

- 2) Se define como cambio en el recuento de viables a las 4 horas la diferencia entre el recuento de viables en la hora 4 respecto a la 0.

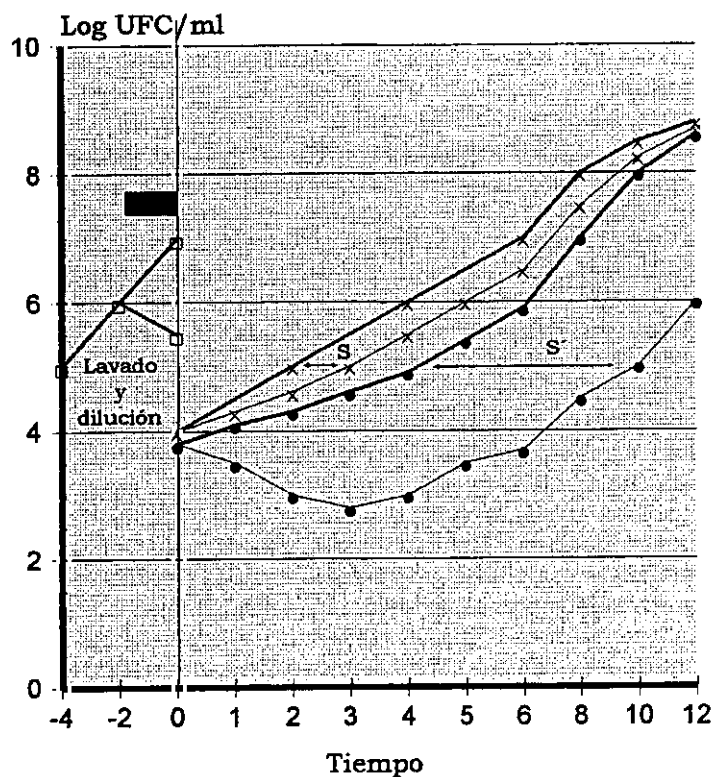


Figura 3

Representación esquemática de las concentraciones subinhibitorias en fase postantibiótica definido por Kikuchi et al (99). ■ Tratamiento previo con antibiótico; × línea gruesa, control sin tratamiento previo; × línea fina, antibiótico Sub-CMI sin pretratamiento; • línea gruesa, control con tratamiento previo; • línea fina, antibiótico Sub-CMI con pretratamiento.

Todos estos resultados presentan una relación directa con los estudios realizados *in vivo* al respecto. Así, existen varios modelos experimentales en animales en los cuales las concentraciones subinhibitorias son capaces de erradicar por sí mismas la infección (100,101).

Es, por tanto, de vital importancia considerar el efecto de concentraciones Sub-CMI, ya sea en fase postantibiótica o no, puesto que va a soportar un papel decisivo en el recrecimiento bacteriano entre dosis (94).

5.- Tiempo de recrecimiento (ERT)

Este parámetro farmacodinámico sirve para medir de forma aproximada el tiempo esperado en el que un cultivo bacteriano se recupera en su crecimiento normal tras la exposición a una dosis determinada de fármaco siendo, por tanto, la suma del descenso inicial en la viabilidad celular causada por el poder bactericida del antimicrobiano, más el PAE (77,90,102).

FACTORES PROPIOS DEL HUÉSPED.

Al igual que a las bacterias no las conocemos en su estado natural sino como se nos presentan en los cultivos artificialmente, la actividad *in vitro* de un antimicrobiano la extrapolamos al organismo vivo, y deducimos que actuará igual, lo que en muchos casos se confirma por la eficacia terapéutica demostrada en los ensayos clínicos. Al binomio antes citado (germen-fármaco), en el que el ambiente (medio de cultivo) es siempre el mismo, al hacer la extrapolación, hay que añadir un tercer factor: el huésped parasitado, ya que el medio ambiente no es el mismo. El microorganismo infectante puede estar localizado en varias partes o diferentes tejidos, en los que el antimicrobiano no puede alcanzar idéntica concentración. Antes de llegar a la zona infectada puede sufrir cambios químicos que reduzcan su actividad, la bacteria agresora *in vivo* está expuesta a una concentración más variable, ya que éste se diluye en los líquidos orgánicos de manera menos uniforme y constante que *in vitro* (9). Además, hay que considerar la capacidad de resistencia del huésped frente al microorganismo patógeno mediante los mecanismos de inmunidad. En muchas ocasiones se ha simulado *in vitro* parte de la actuación de los sistemas inmunológicos de defensa frente a una invasión bacteriana, la forma más común de estudiar el fenómeno es la utilización de células fagocíticas en cultivo junto a bacterias y antimicrobianos (103-106). Muchos parámetros farmacodinámicos pueden así ser estudiados incluyendo un factor más: la actividad fagocítica del huésped. También es importante considerar la existencia de proteínas séricas con capacidad antimicrobiana. El sistema del complemento, que consta de al menos 25 proteínas plasmáticas y de membrana, actúa siguiendo una secuencia ordenada; una proteína divide a la siguiente en varios fragmentos de los cuales el mayor actúa como una enzima proteolítica activada, dividiendo y con ello activando a la proteína siguiente hasta que alcanza el complejo MAC (Membrane Attack Complex), capaz de lisar las bacterias por interacción con sus membranas (107)

Se ha visto que tanto la actividad microbicida como el efecto PAE pueden ser prolongados con la presencia de suero con algunos antimicrobianos (fluorquinolonas y fluconazol entre otros) (108,109).

La presencia de proteínas en suero no es exclusivamente potenciadora del efecto de los fármacos; al contrario, puede inhibir su actividad. Esto es debido al fenómeno conocido como adherencia a proteínas séricas, que se emplea como parámetro farmacocinético, y mide la asociación irreversible de un fármaco con proteínas por medio de enlaces iónicos, pudiendo ser

afectada por la naturaleza de la proteína, por la concentración de la misma y por la del fármaco (110,111).

La proteína que se asocia más a menudo en la interacción con el fármaco es la albúmina. La reacción con albúmina es rápidamente reversible, y las partículas del fármaco están uniéndose y separándose continuamente, manteniendo un equilibrio entre el lugar de unión y la fracción libre (110). En un momento determinado, únicamente las partículas libres son capaces de interaccionar con los lugares diana del microorganismo. Muchos estudios han demostrado que la reducción de la actividad de antibióticos *in vitro* cuando existe suero en el medio, se puede predecir a partir de la unión a proteínas que presentan (7). En un estudio sobre la influencia de la unión a proteínas de los antibióticos en la cinética de muerte de *Staphylococcus aureus*, se ha demostrado que es la porción libre de antibiótico la que es activa biológicamente, y que la unión a proteínas por sí misma no tiene ningún efecto inhibitorio sobre la actividad microbicida (112). Sin embargo, uno de los factores más importantes que contribuyen a la confusión acerca de la unión a proteínas es que no siempre se reconoce que la fracción ligada a proteínas disminuye la actividad antimicrobiana. Por tanto, los niveles totales en vez de los libres, se emplean a menudo para relacionar concentraciones de antibiótico en suero o tejido con la CMI (medida en medio carente de proteínas), o para comparar el potencial terapéutico de diferentes fármacos (113,114). Es obvio que las conclusiones obtenidas de estas pruebas son erróneas (7).

AGENTES ANTIFÚNGICOS

1.-Pruebas de sensibilidad. Situación actual.

Al igual que para las bacterias, la NCCLS ha formado un subcomité que pretende estandarizar las pruebas de sensibilidad a antifúngicos (24,25). Como resultado de una serie de estudios realizados por este subcomité, se propuso el método de referencia de macrodilución en caldo para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos con levaduras (115). Esto fue debido en parte a que las pruebas de sensibilidad frente a hongos estaban tradicionalmente valoradas desde una perspectiva claramente bacteriológica, pero la adaptación de técnicas empleadas para bacterias ha sido útil sólo en un número reducido de antifúngicos y de forma cuestionable (23,116). El estudio de organismos eucariotas con estructuras y requerimientos nutricionales diferentes a las bacterias implica una serie de factores, que raramente son tenidos

en cuenta a la hora de trasladar los fundamentos de las técnicas bacteriológicas a la micología, para elaborar métodos muy sensibles a variables experimentales (117).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, las pruebas existentes *in vitro* para evaluar la sensibilidad de los hongos a los antifúngicos o la monitorización de las concentraciones de éstas *in vivo* dista mucho de alcanzar los mínimos necesarios para su utilización satisfactoria (118). Es importante conseguir una valoración cualitativa adecuada como la CMI que permita predecir si un aislamiento clínico es o no resistente *in vitro* a un antifúngico, así como una certera valoración cualitativa (utilidad pronóstica) que sirva de predicción de la respuesta clínica.

En la lucha por la búsqueda de un método generalizado en estas pruebas, se han encontrado una serie de obstáculos o factores que pueden influir en la determinación de la CMI. Estos factores son aplicables tanto para las pruebas de laboratorio clínico como para aquellas determinaciones empíricas enfocadas a estudiar científicamente la sensibilidad de los microorganismos a los antifúngicos (119-121).

Definición del punto de corte (“BreakPoint”). Este es quizá el aspecto que introduce mayor variabilidad en las pruebas interlaboratorio, especialmente en el caso de los azoles y la 5-fluorocitosina (esta última bajo determinadas condiciones) (122). Esto se debe a que, tras un notable efecto del fármaco en un principio, puede persistir una pequeña turbidez para todas o casi todas las concentraciones ensayadas. Por tanto, aquellos investigadores que consideren estrictamente el punto de corte donde se localiza la transparencia del cultivo, generarán CMI superiores a aquellos que consideren que la aparición de una leve turbidez, que indica crecimiento microbiano, es el punto de inhibición (25,123).

Se han desarrollado métodos alternativos para poder evitar estos problemas y definir lo más precisamente posible el valor de inhibición. Una de las vías para ello ha sido la descripción metódica del punto de corte, ayudándose para ello de términos concretos. Podemos determinar un punto de corte como:

- (0) Ópticamente claro
- (1+) Ligeramente turbio
- (2+) Descenso considerable en la turbidez en comparación con el control.

El problema que presenta este procedimiento estriba en la imprecisión del establecimiento de un cultivo como (2+), puesto que persiste el criterio subjetivo del evaluador (124,125).

Otra posibilidad para salvar el problema consiste en la obtención del punto de corte por medio de monitorización espectrofotométrica de los cultivos. Con esta técnica se consigue una manipulación numérica, que permite una objetivización mayor de los resultados. En este caso se define la turbidez del control libre de quimioterápico como 100%, y los demás cultivos con las diferentes concentraciones de fármacos son referidos a éste según el porcentaje de inhibición (126). Con este método, además, es posible definir un concepto nuevo, la concentración a la cual la turbidez se reduce a un porcentaje específico, generalmente el 50% o el 25% del control, el cual se toma como "breakpoint" y se denomina concentración inhibitoria del 50% o del 25% (IC_{50} y IC_{25} respectivamente) (123,127-129).

Tamaño de inóculo. Han sido ya ensayados varios tamaños de inóculo para las pruebas de laboratorio, en las que se encuentran involucradas las levaduras patógenas más comunes (130-132). Extrapolando resultados de varios estudios y moviéndose en un rango de población celular desde 10^2 UFC/ml hasta 10^6 UFC/ml, se ha comprobado que la CMI de la mayoría de los antifúngicos incrementa significativamente al aumentar la carga celular del inóculo experimental (133). La mayoría de las pruebas son realizadas con poblaciones celulares iniciales bajas, encontrándose los valores entre $0,5 \times 10^3$ y $2,5 \times 10^3$ UFC/ml (25). Sin embargo, no está del todo claro que un inóculo bajo sea el apropiado para la interpretación de los resultados en todos los microorganismos (118).

Tiempo y condiciones de incubación. Aunque como norma siempre se ha seguido el criterio de la utilización de ámbitos lo más parecidos a los encontrados en un organismo, la necesidad de obtener los valores de inhibición lo más rápido posible, ha conducido a una variación en las condiciones generales de incubación. Así, como las levaduras crecen más rápidamente en temperaturas por debajo de los 37°C , se opta por emplear los 35°C como temperatura idónea de cultivo (121-134). Igualmente, la duración de la incubación depende mucho de los microorganismos y puede variar una lectura a las 24 horas hasta una lectura a las 72 horas, o incluso más tarde (135).

Medio de cultivo. Este es un punto muy importante en la realización de las pruebas de sensibilidad y, por tanto, en la interpretación de los valores de inhibición del crecimiento. Existen una serie de medios de cultivo que son frecuentemente empleados en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos, pero que producen variación en los resultados dependiendo del microorganismo o fármaco utilizado. Hoy en día, los dos medios de cultivo más empleados para estas pruebas son el RPMI 1640 y el b-YNBG (25). Es importante a la hora de emplear cualquiera de estos medios el considerar las condiciones de tamponado (136). Está demostrado que las condiciones de acidez en un medio tienden a aumentar los valores de CMI de los antifúngicos anfotericina B, fluconazol, ketoconazol, miconazol y cilofungina, mientras que 5-fluorocitosina tiende a presentar valores inhibitorios menores (123,137,138).

2- Estudios farmacodinámicos.

En micología a, diferencia de lo que sucede en bacteriología, los estudios relativos a la farmacodinamia de antifúngicos son muy escasos. Son múltiples las causas que hacen que estos estudios se realicen tan esporádicamente. Así, por ejemplo, un hongo presenta un ciclo de vida diferente al de una bacteria (eucariota frente a procariota respectivamente), lo que hace que sus condiciones sean distintas y particularmente más complicadas, ya que son organismos filogenéticamente más complejos (139,140). También influye indirectamente el haber enfocado la mayor parte de los estudios a la obtención de un método estándar de sensibilidad, dejando un poco de lado los subsiguientes estudios farmacodinámicos.

El seguimiento del efecto de los antifúngicos sobre estos microorganismos a lo largo del tiempo ha sido estudiado de forma intensiva, si bien el hecho de presentar uno ciclos reproductivos largos (con tiempos de generación de más de 2 horas) ha conducido a que el esfuerzo en cada experimento sea mayor. Existen por tanto múltiples estudios en los que se pone de manifiesto la actividad fungistática o fungicida de los agentes antifúngicos sobre las diferentes clases de hongos patógenos, y que demuestran que la tasa de muerte o de inhibición del crecimiento se produce de manera muy diferente según la especie, y dependiente del antimicrobiano empleado (141,142).

El efecto postantifúngico también se ha estudiado en el campo de la micología aunque de forma ocasional y siempre con los mismos microorganismos y agentes antifúngicos (10,64,83,109). Este parámetro farmacodinámico ha sido ensayado con metodología muy similar a la definida con bacterias, y sin considerar los aspectos fisio-morfológicos de los microorganismos, que pueden afectar a los resultados si no se emplean modificaciones

metodológicas. Concretamente se ha definido como efecto postantifúngico o PAFE la modificación en la cinética de crecimiento encontrada en las células fúngicas tras la exposición a concentraciones de antifúngico y posterior eliminación de éste (83,143).

Menos considerado aún se encuentra el efecto de las concentraciones subinhibitorias en el campo de la investigación micológica. Sin embargo, parece ser que el empleo de bajas concentraciones de fluconazol frente a *Candida albicans* en fase postantifúngica, induce un tiempo mayor de PAFE (109,143).

3.- Estudios de interacción con procesos inmunológicos.

La aplicación inmediata de la actuación de las células fagocíticas es el arma principal en la defensa del hospedador frente a cualquier ataque de un hongo patógeno (144,145,146). En muchos casos se ha estudiado el efecto de la incorporación de los antifúngicos en las funciones leucocitarias (103,147). También la interacción entre los antifúngicos y otros elementos del sistema inmune puede conducir a resultados diferentes a los encontrados en la actividad antimicrobiana de cada uno de ellos medida por separado (148-151). Así por ejemplo, la presencia de suero humano en cultivos de *Candida albicans* favorece la actividad de anfotericina B, ya que parece ser que dicha molécula tiene mayor preferencia por las formas miceliales de la levadura que por los blastoconidios (152).

4.- Anfotericina B.

Desde su aprobación para el uso clínico (años 1955-1956), anfotericina B ha permanecido como el agente antifúngico de elección para muchos de los tratamientos de micosis invasivas (153), y aún habiendo desarrollado compuestos de otras familias con actividad antimicótica importante, sigue siendo prescrito en muchas enfermedades infecciosas (154-157).

4.1.- Estructura, propiedades químicas y mecanismo de acción.

La estructura química y propiedades de anfotericina B se pueden ver en el anexo I.

Su actividad antifúngica se basa principalmente en la capacidad de unión a esteroides de membrana de las células eucarióticas. Una mayor especificidad por el ergosterol, esteroide típico de la membrana fúngica, es la causa de su mayor actividad frente a los hongos (158). Pero a partir de determinadas concentraciones anfotericina B puede unirse también a esteroides de las

células eucarióticas de animales superiores (el colesterol principalmente) (159,160), siendo ésta la causa principal de su toxicidad.

La desestabilización de la función de membrana se manifiesta por la pérdida de cationes si el daño infligido por anfotericina B es pequeño y reversible, pero la pérdida de macromoléculas como nucleoproteínas conduce a una lesión letal e irreversible (154). La desorganización de la membrana se produce probablemente por la formación de determinados poros compuestos por agregados de anfotericina B y moléculas de esterol, lo que despolariza la membrana y produce un incremento en la permeabilidad a protones y cationes monovalentes (160).

4.2.- Actividad microbiológica

Anfotericina B ha mostrado una amplia actividad antifúngica (161). Varias clases de hongos como *Torulopsis glabrata*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, y *Sporotrix* spp, son sensibles a anfotericina B (162,163). Mientras que *Candida albicans* es altamente sensible a la acción de este polieno, las demás especies del género *Candida* lo son en menor grado (164,165). En los hongos filamentosos la eficacia de anfotericina B es variable, aunque en general presenta una actividad baja frente a casi todos ellos (153).

4.3.- Farmacocinética

Anfotericina B es escasamente absorbida tras la administración oral (118). Los niveles recogidos en suero tras la exposición a la molécula, en dosis diarias recomendadas (1,5 a 5 g día), oscilan entre 0,04 y 0,5 mg/ml (166,167), aunque en determinados casos con dosis superiores se haya logrado una concentración sérica no tóxica de 4 mg/l (149). La administración de anfotericina B vía intramuscular es poco eficiente, ya que su absorción es pobre y su efecto bastante irritante. Es por esto por lo que la vía más utilizada para la administración de la anfotericina B es la intravenosa. Tras su infusión intravenosa (168), se puede encontrar en el suero o en los líquidos intracelulares, un 40% o menos de la dosis administrada (169).

Quizá la lenta difusión sea debida a la alta unión a proteínas (90%, especialmente a lipoproteínas, eritrocitos y colesterol). Estas concentraciones séricas, normalmente no exceden 2 µg/ml aún con dosis superiores a 50 mg (170).

La vía excretora principal del metabolismo de anfotericina B es desconocida, ya que no se han detectado metabolitos. Sólo una pequeña cantidad (aproximadamente un 3%), se encuentra en orina a las 24 horas, y otra cantidad variable (0,8 a 14%) en la bilis (171).

4.4.- Dosificación

En general todas las infecciones fúngicas sistémicas son tratadas con anfotericina B como primera opción (162). La dosis diaria definida para anfotericina B oscila entre 0,5 y 1,5 mg/kg dependiendo de la severidad de la infección, naturaleza del patógeno, función renal y tolerancia del fármaco. Las dosis empleadas para hongos filamentosos (particularmente Aspergilosis y Zigomicosis) y en pacientes neutropénicos han de ser mayores (170). Lo más común es emplear dosis de iniciación para tantear la tolerancia al fármaco. Se recomienda utilizar antipiréticos, antihistamínicos e incluso hidrocortisonas concomitantemente, para evitar reacciones adversas (172,173).

5.- 5 Fluorocitosina

5-fluorocitosina es un compuesto análogo pirimidínico fluorado, soluble en agua y que se descubrió en la investigación de agentes antineoplásicos. Su estructura química se relaciona con el 5-fluorouracilo y floxuridina (174).

5.1.- Estructura y propiedades químicas. Mecanismo de acción

Tanto la estructura de la 5-fluorocitosina como algunas de sus propiedades químicas se encuentran en el anexo I. Una vez que la 5-fluorocitosina penetra en la célula por medio de la enzima fúngica específica citosín-permeasa, se pueden dar dos mecanismos de acción:

- a) conversión a 5 fluorouracilo mediante una citosin deaminasa y posterior conversión a 5-fluorouridina trifosfato tras actuación de varios intermediarios que se incorpora al RNA consiguiendo así la inhibición de la síntesis de proteínas (175,176).
- b) conversión a 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, que es un potente inhibidor de la timidilato sintetasa causando un desajuste en la síntesis del DNA (177,176).

No se sabe todavía si estos dos mecanismos se encuentran ligados o actúan de manera independiente. La formación de 5-fluorodeoxiuridina monofosfato y descenso en la actividad del timidilato pueden explicar la actividad de 5-fluorocitosina siendo la incorporación de 5-fluorouridina trifosfato casual o bien al contrario (178,179).

5.2.- Actividad microbiológica

5-fluorocitosina es clínicamente útil frente a las diferentes de *Candida*, *Cr. neoformans*, *T. glabrata*, los agentes etiológicos de las cromomicosis, y algunas especies de *Aspergillus* (162,180,181). No se ha encontrado actividad frente a otros hongos como *Histoplasma capsulatum* o *Blastomyces dermatitidis* (161,163). La determinación de la sensibilidad *in vitro* de todas estas especies está completamente supeditada al método empleado, la prueba de sensibilidad realizada sobre los aislados con anterioridad al tratamiento no se ha correlacionado siempre con las consecuencias clínicas (162).

La pérdida de la actividad microbiológica de 5-fluorocitosina *in vitro* es debido a que los medios que contienen materiales biológicos parcialmente degradados como peptonas, extractos de levadura o proteínas digeridas (122,182). La resistencia al fármaco que se incrementa durante la terapia (resistencia secundaria) es una causa importante en el fracaso terapéutico con 5-fluorocitosina cuando se emplea sola (183). En aislados de *C. albicans* y *Cr. neoformans*, la resistencia al fármaco ha venido acompañada de un cambio en la CMI desde 25µg/ml hasta 360µg/ml. El mecanismo de esta resistencia puede deberse a la pérdida de la citosina o el descenso en la actividad de la UMP pirofosforilasa o la citosín deaminasa (162).

5.3.- Farmacocinética

5-fluorocitosina se absorbe en más de un 90% tras la dosis oral (184). Los niveles séricos pico (entono a los 100 mg/l), en pacientes con funcionamiento renal normal, y de otros fluidos (como LCR), se obtienen en un periodo de 1 a 2 horas (185). Su unión a proteínas es escasa obteniéndose niveles de fármaco en suero claramente dependientes de la dosis. La eliminación se produce a nivel glomerular principalmente (80-91%) y su vida media puede ser de 3-4 horas en pacientes con función renal normal, o de varios días si hay presente alguna insuficiencia renal (186).

6.- Ketoconazol

Ketoconazol es un imidazol sintético de amplio espectro antifúngico. Su descubrimiento supuso un gran avance, puesto que la posología oral le daba ventaja sobre otros miembros de la misma familia de antifúngicos (miconazol, clotrimazol) (187). La mejora de los compuestos azólicos ha marginado ligeramente al ketoconazol, aunque permanece como fármaco antimicótico de indicación para algunas infecciones fúngicas superficiales y además, se estudia como posible agente sinérgico en combinación con otros compuestos (188,189).

6.1.- Estructura y propiedades químicas. Mecanismo de acción

La estructura química y alguna de las propiedades de ketoconazol se pueden observar en el anexo I. Los imidazoles muestran su actividad antifúngica mediante mecanismos que causan un aumento en la permeabilidad de membrana, una inhibición de la penetración de moléculas precursoras del RNA-DNA y síntesis de enzimas oxidativas y peroxidativas (188). Los derivados imidazólicos inhiben la biosíntesis de ergosterol. Una razón para la selectividad de ketoconazol puede ser la dependencia de levaduras y hongos en la biosíntesis de su propio ergosterol, mientras que las células de mamífero pueden capturar el colesterol de forma exógena y compensar así el posible efecto temporal de ketoconazol (190,191). Los cambios en las actividades de las enzimas oxidativas y peroxidativas conducen a un crecimiento intracelular de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, contribuyendo a la degradación de los orgánulos celulares, lo que conduce a una necrosis celular.

6.2.- Espectro de acción y actividad antifúngica.

Tiene un amplio espectro de actividad inhibitoria *in vitro*, exceptuando a *Aspergillus spp.* y *Zigomicetes* (161,162). *In vivo* se ha demostrado su eficacia en micosis profundas (principalmente en paracoccidioidomicosis, coccidioidomicosis, blastomicosis e histoplasmosis), dermatofitosis pitiriasis versicolor, onicomosis y la mayoría de las formas de candidiasis (particularmente candidiasis mucocutánea, crónica, aftas bucales y vaginitis) (192). Las recidivas tras la terapia, aparentemente eficaz, son frecuentes en las micosis profundas (89,193).

6.3.- Farmacocinética

Tras la ingesta de 200 mg de ketoconazol se alcanza una concentración máxima media de 2 µg/ml en las 2-4 primeras horas (194). Existe evidencia de una dependencia de dosis con respecto a la eficacia (187).

La absorción de ketoconazol debe estar mediada por la acidez gástrica (195). El fármaco, que es una base libre, se transforma en el estómago en sal clohidratada. El tratamiento con otros fármacos que reducen la secreción gástrica (como los anticolinérgicos, antiparkinsonianos, antiácidos, cimetidina, o ranitidina), o la ingesta de comida previos a la dosis, disminuyen la biodisponibilidad de ketoconazol (196,197). La mayor parte del ketoconazol se metaboliza, y es muy poca la cantidad de fármaco que se excreta por cualquier

ruta. La vía más importante de excreción parece ser la biliar, vertiendo metabolitos inactivos al tracto intestinal (198,199).

7.- Fluconazol

Se trata también de un agente antifúngico de la familia de los azóles, aunque con modificaciones en su estructura de anillos (triazólico). Gracias a su amplio espectro de actividad, a sus escasos efectos secundarios y su buena tolerancia, se ha establecido como parte de la terapia de pacientes inmunocomprometidos (200,201).

7.1.- Estructura y propiedades químicas. Mecanismo de acción.

En el anexo I se pueden ver algunas de las características más importantes de fluconazol, así como su estructura química.

El mecanismo de acción básico de la fungistásis de fluconazol es el mismo que en los demás agentes azólicos (89,202). Esta molécula se une e inhibe perfectamente la enzima fúngica ligada al citocromo P₄₅₀, lanosterol 14 α dimetilasa. Mediante la interrupción del paso de lanosterol a ergosterol (un componente esencial de la membrana fúngica), fluconazol altera la fluidez y permeabilidad, interrumpe la actividad de las enzimas ligadas a las membranas e impide la replicación celular (188,203). A diferencia de ketoconazol, fluconazol no parece inhibir la biosíntesis de esteroides y no muestra un efecto claro en el metabolismo del cortisol (201).

7.2.- Espectro de acción y actividad antifúngica

Como se ha mencionado ya, fluconazol presenta actividad sobre un número considerable de especies fúngicas, aunque es fungistático frente a la mayoría de ellas (162,163). Uno de los motivos de este fenómeno es su extremada dependencia de los factores experimentales *in vitro*, tales como el medio de cultivo, pH, tamaño de inóculo, o tiempo de incubación, lo que hace que los resultados obtenidos *in vivo* difieran enormemente de los realizados en el laboratorio (204,205). Hasta hace relativamente poco tiempo no existían métodos estandarizados para las pruebas de sensibilidad de los hongos frente a fluconazol, y aún hoy en día existe discrepancia en la determinación de la CMI *in vitro* y su actividad *in vivo*.

Los hongos que han demostrado ser sensibles frente a fluconazol incluyen a las diferentes especies de *Candida* (excepto *C. krusei* y algunas cepas de *C. glabrata*),

Cryptococcus neoformans, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus spp.* y algunos dermatofitos (203).

7.3.- Farmacocinética

Desde los primeros ensayos clínicos con fluconazol se han estudiado formas diversas de rutas de administración, como las soluciones intravenosas (por infusión o bolus rápido), y la administración oral (por medio de cápsulas, pastillas o solución/suspensión)(206).

Como resultado de su baja lipofilia, y de su escasa afinidad a proteínas del suero, fluconazol presenta una penetración a tejidos/fluidos muy buena. Esta penetración seguramente es por difusión pasiva. La prolongada vida media de eliminación plasmática y su rápida fase de distribución indican que las proporciones de penetración podrían ser una guía razonable para la disponibilidad de fluconazol en lugares específicos de la infección durante el curso terapéutico (203).

Una de las características más notables de fluconazol es su extensa penetración en el LCR, pudiendo alcanzar concentraciones a veces muy próximas a las encontradas en suero (202,207-209). Algo similar ocurre con las concentraciones de éste fármaco en otros fluidos/tejidos como la saliva, esputo, tejido vaginal o piel, donde los niveles de fluconazol encontrados pueden ser iguales o incluso superiores a los séricos (201). La eliminación del fármaco sin transformar es por vía renal principalmente (90%) (206).

7.4.- Aplicación terapéutica

Se ha demostrado que fluconazol es eficaz para el tratamiento de meningitis criptocócica, candidiasis orofaríngea-esofágica e infección del tracto urinario, peritonitis y neumonía por *Candida* (162).

En la candidiasis oral se necesita una dosis de 50 a 100 mg diarios con respuesta eficaz a corto plazo. Si el paciente es inmunocomprometido, el periodo de tratamiento ha de prolongarse algo más (2-3 semanas). En esofagitis la dosis es algo mayor (100-200 mg / día) para el tratamiento agudo, y siempre seguido de terapia de mantenimiento en pacientes con SIDA (162). La meningitis criptocócica es tratada en la mayoría de los casos con anfotericina B (sola o asociada a 5-fluorocitosina), pero en algunos caso se ha tratado con fluconazol a dosis elevadas como terapia de choque, aunque los resultados no son concluyentes (210,211). La terapia de mantenimiento de fluconazol en meningitis por *Cr.*

neoformans se ha establecido ya frente a la anfotericina B semanal previa (211). También se administra en la criptococosis no meningítica (212).

Otros usos de fluconazol son los tratamientos de la candidiasis diseminada, profilaxis de pacientes neutropénicos por cáncer y otros tipos de micosis sistémicas (coccidiomicosis) (213,214).

8.- UK 109,496

Se trata de un antifúngico azólico de amplio espectro desarrollado por los laboratorios PFIZER Inc. y que presenta actividad frente a los patógenos levaduriformes más comunes y sobre algunos hongos filamentosos. Al tratarse de un compuesto en fase de investigación clínica todavía no se encuentra disponible para su utilización en humanos fuera de ensayos clínicos o del uso compasivo.

8.1.- Estructura, propiedades químicas y mecanismo de acción.

La estructura química y alguna de sus propiedades se encuentran reflejadas en el anexo II. Su estructura se obtiene a partir de modificaciones a partir de fluconazol. La introducción de un grupo metilo adicional en la estructura propanólica de fluconazol, sustituyendo el anillo triazólico adyacente al punto de bifurcación por otro heterociclo, como una pirimidina, mejora tanto la actividad antifúngica como la potencia enzimática de esta sustancia. Si, además, se introduce en la posición 5 del anillo pirimidínico un grupo fluorado, la actividad es mayor aún (215).

El mecanismo de acción de UK 109,496 es el de un antifúngico azólico. Actúa inhibiendo la enzima fúngica 14α -esterol dimetilasa citocromo P450-dependiente (P_{450DM}), esencial para la biosíntesis del ergosterol. Al igual que otros azoles (como ketoconazol, fluconazol, itraconazol), es un potente inhibidor de la biosíntesis de ergosterol en preparados de membrana celular de *Candida albicans* ($IC_{50}=0,03\mu M$). Se ha comprobado que UK 109,496 es más selectivo que otros agentes azólicos, pero menos que fluconazol (216).

8.2.- Espectro de acción y actividad antifúngica

En experimentación animal se ha demostrado que UK 109,496 es un antifúngico con una actividad fungicida frente a *Aspergillus* (217). También muestra actividad similar la de fluconazol frente a *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* en ratas y cobayas respectivamente. Mediante tests de sensibilidad ajustados a las normas de la NCCLS (218) se

ha visto que UK 109,496 es activo frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, *T. glabrata*, *Cr. neoformans*, *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Exophiala spp*, *Bipolaria spp* y *Blastomyces dermatitides*.

Es interesante resaltar la alta actividad frente a las cepas de *C. krusei*, y *C. glabrata*, datados como resistentes en muchos casos frente a otros azoles (fluconazol) (218,219).

8.3.- Farmacocinética

La farmacocinética de UK 109,496 se ha estudiado en ratas, perros y humanos por métodos específicos de HPCL, determinando los valores de la sustancia en fluidos corporales. El metabolismo y la excreción se ha investigado en ratas y perros usando el fármaco marcado con ^{14}C . Además, se ha definido la distribución de en tejidos y la unión a proteínas (60% en humanos) (216,217).

En monodosis UK 109,496 es dependiente del sexo en ratas y presenta una farmacocinética lineal en todos los individuos investigados. Tras la dosis oral (en rango de 0,06-0,125 mg/kg), UK 109,496 es rápidamente absorbido ($T_{\text{máx}} = 0,5-2$ horas) y las concentraciones se encuentran generalmente por debajo del límite inferior de cuantificación. Un incremento en el nivel de dosis se asocia con un aumento en la biodisponibilidad aparente y un incremento no lineal de $C_{\text{máx}}$ y AUC_t . Esa no linealidad parece ser debida a la saturación de uno de los componentes del proceso de eliminación, tanto sistémicamente como en el primer paso. La medida de las concentraciones plasmáticas a bajas dosis (0,6 mg/kg - 0,9 mg/kg) muestra un rápido descenso monofásico con una vida media aparente de aproximadamente 1,7 horas. A altas dosis, este valor es de 6,6 horas. Menos del 1% de la dosis se excreta como fármaco puro en orina (216).

Cuando la monodosis es intravenosa, los valores en AUC_t aparecen como lineales hasta dosis de 4 mg/kg, pero en dosis de 6 y 8 mg/kg se asocia con un aumento desproporcionado en el AUC_t , indicativo de la farmacocinética no lineal como en monodosis oral.

Las dosis múltiples orales/intravenosas en humanos (1,5 mg/kg tid, 2 mg/kg bid, 2 mg/kg tid, 3 mg/kg bid, 4 mg/kg od durante 10 días), condujeron a una acumulación de UK 109,496. La fase estable se alcanza en los 2 a 7 días de dosificación, y la acumulación es mayor que la esperada a partir de datos obtenidos en monodosis. Esto probablemente será debido a la saturación de un componente de eliminación, como sucedía en monodosis.

Extrapolando de los datos procedentes de los modelos experimentales con animales se considera que concentraciones plasmáticas de 12 µg/ml son seguras, recomendándose no superar los 6-8µg/ml en humanos (220,221).

Cryptococcus neoformans

Cryptococcus neoformans es una levadura encapsulada capaz de causar enfermedades en el hombre. La infección producida por *Cr neoformans* (criptococosis), ha sido considerada como peligrosa aunque poco frecuente, debido a que puede ser erradicada en sus inicios por el sistema inmune sin problemas, siempre y cuando el afectado sea inmunocompetente (222).

La criptococosis afecta principalmente a enfermos con las defensas inmunológicas disminuidas o que padecen enfermedades tales como hepatopatías malignas, linfoma de Hodgkin, colagenosis, diabetes, o que han sido transplantados (transplantes renales principalmente) (223).

Hoy en día la importancia del tratamiento de la enfermedad por *Cr. neoformans* se basa en la afección a pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (224). Dentro de las infecciones causadas por hongos en estos enfermos, *Cr. neoformans* ocupa el cuarto lugar en frecuencia (el primero entre los hongos) (225). Por ello, se ha retomado el curso de la investigación en busca de nuevos fármacos más eficientes en el tratamiento de esta enfermedad, principalmente en pacientes con alteraciones en el sistema inmune.

1.- Patogenicidad.

Cr.neoformans es único entre los hongos patógenos en cuanto a la presencia de una cápsula polisacárida; lo que por otro lado es el principal determinante de virulencia *in vivo* (226). Por ello el enfoque dado para los estudios de *Cr. neoformans* por la mayoría de los autores va preferentemente dirigido hacia la cápsula.

Estudios pioneros en la determinación de la composición de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*, realizados con técnicas de cromatografía de papel, mostraron la existencia de un complejo polisacárido en la estructura capsular. Investigaciones posteriores aportaron los componentes principales del complejo, siendo estos manosa, xilosa, ácido glucurónico y galactosa (227,228).

Hoy en día se sabe que el polisacárido capsular en mayor abundancia es el glucuronoxilomanano ($G_A XM$). Esta estructura polisacáridica, además, determina el serotipo del hongo (A,B,C o D)(229-232).

El eje principal, constituido por tres residuos de manosil a los que se incorporan un número de residuos de xilosil y de ácido glucurónico, está unido uniformemente por enlaces $\alpha(1-3)$, y los restos de xilosa se unen a la estructura principal de manano:

- $\beta(1-2)$; si es un resto de manosil sencillo
- $\beta(1-4)$; si es un resto de manosil doble.

El ácido glucurónico se une siempre $\beta(1-2)$ a una mitad de manosil (229).

A partir de esta estructura base se dan varias combinaciones en las sustituciones de las cadenas, lo que propicia la variedad en los serotipos de *Cr. neoformans*:

Serotipo	Estructura		
D	$\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow$		
	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D GlcpA}$
A	$\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow$		
	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D GlcpA}$
B	$\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow$		
	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D GlcpA}$
C	$\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-DManp}(1\rightarrow$		
	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D Xylp}$	2 ↑ 1 $\beta\text{-D GlcpA}$

Unido a estas estructuras, todos los polisacáridos G_AXM tienen parte de sus grupos hidroxilo esterificados con grupos acetil. La localización de los grupos O-acetil aún no se ha determinado. Es posible que el grado de O-acetilación pueda contribuir en la interacción del anticuerpo y también en la virulencia. En relación con esta última, se ha visto que dos especies no virulentas de *Cryptococcus* llamadas *Cr. albidus* y *Cr. laurentii* no presentan grupos acetil (233).

Kozel y Hermeraz (234) han demostrado la existencia de un receptor saturable de polisacárido de *Cr. neoformans* en cepas acapsuladas que reversiblemente une dicho polisacárido. El punto de saturación se sitúa en 82 ng de polisacárido para un tamaño de inóculo de 10⁶ células de levadura. En cepas capsuladas se demuestra una escasa especificidad de unión, tal vez debido a que el lugar de unión de polisacárido en este microorganismo ya está saturado.

La inhibición de fagocitosis por polisacáridos de la cápsula de *Cr. neoformans* está directamente relacionado con la cantidad de polisacárido unido a las levaduras. La fijación de 50 ng de polisacárido de *Cr. neoformans* a concentraciones de 10⁶ levaduras no encapsuladas, es suficiente para inhibir por completo la fagocitosis por PMN. Se ha visto que polisacáridos producidos por la degradación de Smith, se unen efectivamente a *Cr. neoformans* por ese receptor saturable, pero en ese caso la fagocitosis no es inhibida.

Actualmente se están realizando estudios referidos a la fijación del complemento a *Cr. neoformans*, pues parece ser que la adhesión de los factores que componen el sistema se produce por la vía alternativa (235,236).

2.- Clínica

La enfermedad causada por *Cr. neoformans* llega principalmente tras la inhalación de levaduras, aunque pueden penetrar en el hospedador por otras vías (222). La enfermedad es más común en mujeres que en hombres. Puede presentarse un cuadro clínico de criptococosis de cuatro formas (202).

2.1.- Criptococosis pulmonar. Parece ser que la infección más común producida por *Cr. neoformans* es la pulmonar. En la infección sintomática aguda no existen rasgos claros. Las lesiones pueden tomar forma de pequeños nódulos discretos, que pueden curar simplemente dejando una pequeña señal, o pueden convertirse en una forma mayor encapsulada y crónica

(forma criptococómica o criptococoma). También se ha descrito la enfermedad como forma de neumonía aguda (237).

El diagnóstico de la criptococosis pulmonar se puede conseguir mediante la demostración en muestras procedentes de aspirados o lavados bronquiales de criptococos, y eventualmente, por la evidencia del antígeno soluble criptococócico.

2.2.- Criptococosis neuromeningea. En ausencia de diagnóstico y tratamiento, *Cr. neoformans* puede invadir el SNC (vía hematogena). Esta colonización se ve favorecida sobre todo por la ausencia en el LCR de anticuerpos anticriptococócicos. La enfermedad puede transcurrir desde unos meses hasta varios años, pero el desenlace es siempre fatal si no existe tratamiento. Los pacientes con SIDA y que han sido infectados por *Cr. neoformans*, generalmente evolucionan a un cuadro meningítico crónico con síntomas menores. En dichos enfermos la meningitis es la manifestación más común de criptococosis, y puede ocurrir en cualquier momento durante el transcurso de la infección del HIV.

2.3.- Criptococosis cutánea. Se produce por inoculación traumática de la levadura, produciendo pápulas acneiformes o nódulos indoloros. Tardíamente, se presenta una zona central úlcero-necrótica recubierta de una costra negra.

2.4.- Criptococosis diseminada. Se han descrito casos en sujetos afectados de SIDA con formas septicémicas y ganglionares,

OBJETIVOS

En el desarrollo de un antimicrobiano, se pueden distinguir varias etapas necesarias para garantizar, tanto la eficacia, como la seguridad del compuesto en la aplicación clínica. Una primera división dentro de este proceso, diferencia los ensayos preclínicos de los clínicos. Los primeros aluden a todos los estudios que se realizan dentro del ámbito de un laboratorio, sin utilizar en ningún momento personas como fuente de información para la investigación. Dentro de los estudios preclínicos se puede a su vez distinguir dos grupos encaminados a investigar diferentes efectos del compuesto, nos referimos a la toxicología y los estudios de actividad. Cualquier compuesto en desarrollo, además de ser eficaz en la erradicación de la enfermedad que se quiere tratar, debe ser inocuo, es decir, no presentar ningún efecto colateral indeseado en la persona que lo esté recibiendo. De ahí la importancia de que los estudios preclínicos aseguren una eficacia y una seguridad previa (demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*), para poder pasar al tratamiento a personas con una garantía suficiente (20). Dentro de los ensayos clínicos nos encontramos con un sistema perfectamente estructurado para el estudio tanto de seguridad y tolerancia del fármaco, como de su eficacia en personas (238).

Nuestro trabajo ha sido enfocado hacia el estudio preclínico de cinco moléculas con actividad antifúngica, centrándonos principalmente en los estudios de eficacia microbiológica (*in vitro*) posttoxicológicos y preclínicos. Según las normas generales para la evaluación de nuevos compuestos antifúngicos para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas (230), los objetivos de los ensayos preclínicos en lo referente a eficacia son: a) demostrar la eficacia del agente antiinfeccioso *in vitro* frente a los microorganismos diana, determinando las CMI y CMB, b) comprobar la existencia de la presencia de un efecto inóculo así como la unión a proteínas, c) determinar las interacciones entre antimicrobianos, y finalmente d) obtener información de los posibles mecanismos de acción y potencial desarrollo de resistencias.

Desde un punto de vista microbiológico, es importante conocer la actividad que presenta un fármaco frente a un microorganismo, puesto que a partir de este dato se va a poder extraer una gran cantidad de información, necesaria a la hora de la elección del fármaco adecuado para el tratamiento, o la presencia de resistencias al tratamiento. Sin embargo, careciendo de datos farmacológicos experimentales no se podrá garantizar la eficacia terapéutica, al no disponer de datos suficientes que relacionen la actividad microbiológica con la farmacocinética.

Partiendo de estas premisas, e intentando acercarnos lo máximo posible a las normas que acabamos de citar nos planteamos para el presente trabajo los siguientes objetivos:

1. Valorar la actividad microbiológica de los cinco agentes antifúngicos (anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496) frente a *Cryptococcus neoformans*, mediante pruebas de sensibilidad con diferentes inóculos y metodología adaptada a los requerimientos fisiológicos de la levadura.
2. Estudiar el comportamiento y mecanismo de acción de los cinco antifúngicos frente a *Cryptococcus neoformans*, haciendo uso para ello de los siguientes parámetros farmacodinámicos:
 - 1) Tasas de inhibición de crecimiento, actividad fungicida y área bajo la curva de muerte (AUKC), obtenidos a partir de las curvas de letalidad.
 - 2) Efecto postantifúngico, efecto de concentraciones subinhibitorias en fase postantifúngica y tiempo de recrecimiento.
 - 3) Influencia del suero humano como factor extrínseco en los parámetros arriba citados.
3. Correlacionar el comportamiento presentado *in vitro* por concentraciones fisiológicas de antifúngicos, con la eficacia terapéutica producida *in vivo* de dichas concentraciones, considerando para ello todos los parámetros previamente citados.

*MATERIAL
Y METODOS*

MICROORGANISMO

Se emplearon dos cepas de la levadura *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans*. Una de ellas procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (*Cryptococcus neoformans* CECT 1078), y la otra de un aislado clínico encontrado en un paciente del Hospital San Carlos con criptococosis diseminada (Hemocultivo positivo).

Para su conservación los microorganismos se congelaron a - 40 °C en viales con 1 ml de leche descremada. A partir de estos viales, las cepas se descongelaron y sembraron en agar de Saboureaud (OXOID) para tener los microorganismos viables y poder trabajar con ellos. Las placas se mantuvieron en la nevera a 4°C y se atemperaron en la estufa (Heraeus) a 37 °C cada vez que se fueron a emplear en una prueba. La misma placa no fue utilizada por un periodo de tiempo superior a 1 mes.

ANTIFUNGICOS

Las cinco moléculas antifúngicas empleadas en este trabajo fueron: anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496. Las principales características fármaco-químicas y el modo de mantenimiento/preparación, de estas sustancias se resumen en el apéndice I.

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

En el apéndice II se muestran los medios de cultivo empleados en la realización de las diferentes pruebas de laboratorio, así como su forma de preparación.

El medio de cultivo líquido que se empleó para todas las pruebas fue el bYNB-G (DIFCO) y el medio sólido fue el agar de Saboureaud con cloranfenicol (OXOID). La conservación del bYNB-G fue siempre en nevera a 4 °C y para su utilización se atemperó en estufa hasta que alcanzase la temperatura de 37 °C.

Para los estudios de influencia de los factores del huésped sobre la relación entre microorganismo y fármaco, el suero utilizado procedía de sangre venosa (sin heparinizar) de individuos voluntarios sanos. Dicha sangre se mantuvo a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad hasta que coaguló. Una vez retirado el coágulo se centrifugó a 2000

r.p.m. descartando la fracción sedimentaria. Posteriormente se mezclaron todos los sueros procedentes de los diferentes individuos para formar una solución común que se distribuyó en alícuotas de 0,5 ml y se congeló a -20°C hasta su uso.

CONDICIONES GENERALES DE EXPERIMENTACION

Durante el desarrollo de los métodos para la obtención de los valores de sensibilidad y de las diversas parámetros farmacodinámicos de los antifúngicos frente a las levaduras, se emplearon determinados modelos o pautas experimentales comunes a todos ellos. Por tanto, para evitar la reiteración de estos procedimientos durante la descripción de los métodos de este estudio se han recogido en este apartado las condiciones comunes a varias de las pruebas y a las que se hará alusión cuando proceda.

Incubación en medio líquido. Las condiciones generales para desarrollar cultivos (con o sin quimioterápico), fueron aquellas que experimentalmente resultaron más prácticas, y que mantuviesen una cierta aproximación a las situaciones encontradas *in vivo*. Por ello la incubación fue siempre en agitación orbital a 150 r.p.m. y a una temperatura constante de 37°C . El tiempo de incubación se definió para cada una de las pruebas y dependió en cada caso del tamaño de inóculo.

Preparación de inóculos en fase exponencial. Se tomaron 5 colonias de *Cr. neoformans* (con un tamaño superior a 1 mm de diámetro) de una placa de agar con 48 horas de incubación y se disolvieron en 10 ml de bYNB-G atemperado. La incubación de este cultivo durante 22 a 25 horas bajo las condiciones descritas en el apartado anterior condujo a la obtención de una población de levaduras en fase de crecimiento logarítmico (24,25).

Obtención de un tamaño poblacional predefinido. El ajuste del número de células contenidas en un cultivo a una concentración deseada se realizó por medio de dilución/concentración y posterior medida de la absorbancia en espectrofotómetro (HITACHI U-1100) a 530 nm de longitud de onda.

La relación absorbancia/UFC se obtuvo a partir de las correspondientes rectas de regresión.

Recuento de viables en placa. Esta técnica se aplicó para averiguar el número de levaduras existentes en un cultivo a partir de muestras de volumen reducido tomadas directamente de dicho cultivo (240). Para ello se redujo en primer lugar la cantidad de células mediante un banco de diluciones. Una vez obtenido un número de levaduras por mililitro lo suficientemente pequeño, se sembraron alicuotas por extensión con asa de Digrandski en placas de agar. Estas placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 48 horas y entonces se procedió al recuento de colonias crecidas. El número de colonias contadas hubo de estar comprendido entre 50 y 200 por placa descartando cualquier valor inferior o superior.

CURVAS DE CRECIMIENTO

La determinación del crecimiento libre (en ausencia de antifúngico) de *Cryptococcus neoformans* en caldo de cultivo se llevó a cabo por métodos espectrofotométricos y de recuento de viables en placa.

En ambos métodos se partió de un inóculo de levadura suspendida en caldo bYNB-G ajustado a una concentración de 5×10^5 UFC/ml. En las curvas se ensayó primero con un tampón fosfato y posteriormente con tampón bicarbonato (ver apéndice II). Desde la hora 0 hasta la 48 del experimento se tomaron muestras de los cultivos a intervalos de tiempo regulares midiéndose en el espectrofotómetro y también se sembraron en agar. Con cada uno de los valores obtenidos se creó una curva de crecimiento, representada por la absorbancia (a 540 nm de longitud de onda) en el eje de ordenadas y por el tiempo (en horas) en el eje de abscisas. Para conocer la relación existente entre la absorbancia y las UFC/ml se realizaron las correspondientes curvas de regresión lineal.

Los valores del tiempo de generación y las constantes μ y k , se determinaron a partir de los valores obtenidos en UFC/ml a cada tiempo de muestreo (241).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

Las pruebas de sensibilidad de las levaduras a los 5 antifúngicos se realizaron de acuerdo con las normas dictadas por la NCCLS (25), aunque incorporando algunas modificaciones.

1.- Medio de cultivo. El medio de cultivo recomendado por la NCCLS para las pruebas de sensibilidad de antifúngicos es el RPMI 1640. En este trabajo se ha empleado el medio para crecimiento de levaduras bYNB-G.

2.- Preparación y almacenamiento de los antifúngicos. Para la preparación y conservación de los antifúngicos se utilizaron las instrucciones de la NCCLS. Cualquier modificación en el color de los antifúngicos o variación en la densidad de la solución, hizo que se descartase el empleo de la sustancia (ver apéndice I).

3.- Inóculo Inicial. El inóculo de la prueba de sensibilidad se preparó a partir de un cultivo en fase exponencial de *Cr. neoformans*, como se explicó en el apartado de condiciones generales.

4.- Inóculo final. El inóculo en fase de crecimiento logarítmico que acabamos de mencionar, se ajustó por espectrofotometría a dos tamaños de población celular (uno elevado de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml y otro más bajo $1-5 \times 10^3$ UFC/ml). Paralelamente se realizaron series de diluciones de los antifúngicos a probar, oscilando éstas desde 256 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0.03 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se expuso cada tamaño de inóculo a cada una de las diferentes concentraciones de antifúngico. Al cultivo que permaneció como control de crecimiento, en vez de incorporarle los volúmenes portadores de las concentraciones de antifúngico, se le añadió el volumen equivalente de bYNB-G.

5.- Incubación. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital durante 48 horas para el inóculo más alto y de 72 horas para el de menor número de células.

6.- Lectura de los resultados. Se consideró la CMI como la concentración de antifúngico más baja capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos (29). Para facilitar la lectura y determinar con mayor precisión el punto de corte del antifúngico, se empleó el método espectrofotométrico (126). Ayudándose de la transmitancia y la absorbancia, se determinaron las concentraciones que inhibieron el 90% del crecimiento para cada cultivo de la serie con inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml y los que inhibieron el 25%, 50% y 90% del crecimiento de la serie con inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml.

Los valores de inhibición se consideraron como aquellas lecturas espectrofotométricas más bajas que cumplieron el criterio (126):

$$\%T > (\%T_{\text{control}} + N (100 - \%T_{\text{control}}))$$

donde:

- $\%T_{\text{control}}$ es el porcentaje de transmisión para el cultivo control (libre de quimioterápico)
- N es una constante que puede tomar los valores 1/4 (IC_{25}), 1/2 (IC_{50}) y 1/1,1 (IC_{90})

Esta fórmula fue diseñada para definir la fracción de inhibición (N) como una función de turbidez en los tubos control libres de quimioterápico (126,129).

Todas las pruebas se repitieron un mínimo de 3 veces. Con los datos de absorbancia obtenidos en cada toma (24, 48 y 72 según procediese), se realizaron curvas de crecimiento para cada antifúngico y las diferentes concentraciones. También se calcularon los valores de inhibición del crecimiento a partir de las lecturas espectrofotométricas basadas en la absorbancia y comparando cultivos en presencia de antifúngico con cultivos control (libres de quimioterápico).

A partir de los valores obtenidos en las pruebas de sensibilidad se hallaron los coeficientes terapéuticos para cada antifúngico. Se emplearon los valores de IC_{25} para 10^5 UFC/ml e IC_{90} para 10^3 UFC/ml para ser relacionados con los valores séricos de los antifúngicos recogidos de la literatura al respecto (149). Los valores de inhibición escogidos para esta relación fueron los más tardíos, es decir, los de las horas 48 para $IC_{25}-10^5$ UFC/ml y los de 72 horas para $IC_{90}-10^3$ UFC/ml.

CINETICA DE MUERTE FUNGICA

Para estudiar el efecto que producen los antifúngicos sobre la viabilidad de las levaduras a lo largo del tiempo se siguieron las pautas generales definidas para experimentación bacteriológica descritas por la NCCLS (242). A causa de las grandes diferencias existentes entre la fisiología de los hongos y las bacterias, se realizaron varias modificaciones para la realización de la prueba.

Los tamaños de inóculo empleados y los procedimientos para su preparación, fueron los previamente definidos. Los cultivos fueron expuestos a diversas concentraciones de

antifúngicos y se incubaron bajo las condiciones de experimentación que ya hemos explicado. El periodo de tiempo para la incubación fue de 48 horas cuando la población celular de partida era $1-5 \times 10^5$ UFC/ml y de 72 horas cuando el inóculo inicial era $1-5 \times 10^3$ UFC/ml. A intervalos regulares de 12 horas, se tomaron alícuotas de los cultivos, se sembraron en placas de agar y se incubaron en estufa. Cuando el número de células por mililitro fue suficientemente alto, se realizaron bancos de diluciones en solución salina tamponada (PBS). El recuento de las colonias se realizó tras 48 horas de incubación en estufa.

Los resultados obtenidos se registraron en una gráfica donde el eje de abscisas representa el tiempo y el de ordenadas la cantidad de microorganismos medida en logaritmos decimales de las UFC/ml. Todas las pruebas se realizaron al menos 6 veces y siempre bajo las mismas condiciones experimentales.

A partir de las curvas de letalidad se trató de cuantificar el efecto que produjo cada antifúngico en la viabilidad de las levaduras. Para ello se emplearon 2 parámetros, la capacidad inhibitoria y la actividad fungicida (243).

Capacidad Inhibitoria. Mide el porcentaje de inhibición a diferentes tiempos de la multiplicación de la población de levaduras como consecuencia de la presencia de concentraciones de antifúngico. Su expresión matemática es:

$$CI_{(T)} = (1 - \text{UFC/ml}_{(Trat.)} / \text{UFC/ml}_{(Cont.)}) \times 100$$

donde;

- $CI_{(T)}$ es la capacidad inhibitoria a cada tiempo T
- $\text{UFC/ml}_{(Trat.)}$, representa las células existentes por mililitro de cultivo que ha estado expuesto al antifúngico
- $\text{UFC/ml}_{(Cont.)}$, son las células por mililitro en los cultivos libres de quimioterápico.

Actividad fungicida. Este fenómeno se puede medir cuando el número de UFC/ml tratadas desciende por debajo del valor en UFC/ml del inóculo inicial y por tanto nos encontramos con valores de fungistasis superiores al 100%. La ecuación matemática que calcula la actividad fungicida es:

$$AF_{(T)} = (1 - \text{UFC/ml}_{(Trat.)} / \text{UFC/ml}_{(Inóc.)}) \times 100$$

donde;

- $AF_{(T)}$ es la actividad fungicida del antifúngico en el tiempo T
- $UFC/ml_{(Trat.)}$ representa las células existentes por mililitro de cultivo que ha estado expuesto al antifúngico
- $UFC/ml_{(Inoc.)}$, son las células por mililitro en los cultivos en el tiempo 0.

Area -Bajo la Curva de Letalidad (AUKC).

A partir de los valores puntuales obtenidos en la prueba de letalidad, se calculó la superficie subyacente a la curva descrita por medio de la regla trapezoidal. El valor de esta área coincide con el valor obtenido a partir de la suma de cada una de las áreas individuales durante el periodo completo de muestreo (48 ó 72 horas según el tamaño de inóculo) (244).

EFECTO POSTANTIFUNGICO

La técnica empleada para la determinación del Efecto Postantifúngico (PAFE) fue la misma que la descrita por Mínguez *et al* (109), aunque se introdujeron algunas modificaciones. La base teórica en la que se fundamenta esta prueba se tomó de la bibliografía relacionada con el efecto postantibiótico para bacterias.

Para las pruebas de PAFE el microorganismo siempre se encontró en fase de crecimiento exponencial siguiendo el método descrito previamente. Este inóculo de *Cr. neoformans* se ajustó a una concentración de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml y se dividió en varios subcultivos los cuales se expusieron a las diferentes concentraciones del antifúngico a ensayar. Como norma general las concentraciones utilizadas fueron las IC_{25} (para inóculo de 5×10^5 UFC/ml) y valores superiores, siempre y cuando no excediesen aquellas concentraciones posiblemente tóxicas en una dosis terapéutica (149). Se realizó la prueba empleando dos periodos de exposición a los antifúngicos: uno corto de 2 horas y otro largo de 12 horas.

Una vez finalizada la exposición, se procedió a retirar el antifúngico del medio de cultivo, y por tanto, los elementos residuales de su acción y del metabolismo de los microorganismos. Para ello se centrifugaron todos los cultivos (incluyendo los controles libres de quimioterápico) a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en

un mismo volumen de medio bYNB-G atemperado. Este proceso de centrifugación se repitió una segunda vez. Inmediatamente después se realizó una dilución de los cultivos a la décima parte, para reducir la población microbiana.

A partir de este momento los cultivos se volvieron a incubar durante 24 horas bajo las mismas condiciones de cultivo en que se realizó el tratamiento con antifúngico. A intervalos regulares de tiempo (2 horas), se tomaron muestras de todos los cultivos y se sembraron en placas de agar de Saboureaud con cloranfenicol. Tras el recuento de viables, se expresaron los resultados en forma de logaritmos decimales de las UFC/ml respecto al tiempo, obteniendo así las curvas de recrecimiento para cada antifúngico.

La cuantificación del PAFE se realizó siguiendo la fórmula (11):

$$\text{PAFE} = T - C$$

donde T y C son los tiempos en horas requeridos para el recuento de viables de los cultivos tratados y los controles respectivamente en incrementar un logaritmo decimal por encima del observado inmediatamente tras la eliminación del quimioterápico.

También se determinó (empleando la misma fórmula) el efecto PAFE calculando los tiempos requeridos para que los cultivos incrementaran medio logaritmo decimal. Todos los experimentos se repitieron al menos 6 veces.

EFFECTO DE CONCENTRACIONES SUB-CMI EN FASE POSTANTIFUNGICA

El estudio de la actividad de las concentraciones inferiores a la de inhibición (Sub-CMI) en fase de crecimiento postantifúngica (es decir tras la exposición y eliminación al agente antimicrobiano) sobre *Cr. neoformans*, se realizó siguiendo el método descrito por Odenholt *et al* (94) y modificado por Kikuchi *et al* (99).

El transcurso del experimento coincidió con el de la determinación del efecto PAFE hasta el momento de la eliminación del antifúngico. En este instante los cultivos se expusieron a concentraciones de antifúngico correspondientes a 1/4 el valor de la IC₉₀ para el inóculo de 5×10^5 UFC/ml. Los cultivos se reincubaron y se sembraron muestras en agar cada 2 horas. Al igual que en los estudios previos se cuantificó el efecto por recuento de viables en placa.

El efecto de las concentraciones Sub-CMI tras la exposición a concentraciones terapéuticas y posterior lavado del antifúngico, se define como la diferencia entre los retrasos

en el crecimiento producidos por la incorporación de concentraciones subinhibitorias en fase postantifúngica entre los cultivos pretratados y los no pretratados al recrecer todos 1 logaritmo decimal.

TIEMPO DE RECRECIMIENTO

Este parámetro se obtuvo a partir de las curvas de PAFE. Se definió el Tiempo de Recrecimiento (ERT) como el intervalo de tiempo requerido por las células de los cultivos en recuperar el tamaño de inóculo inicial del experimento, es decir $1-5 \times 10^5$ UFC/ml (90).

ACTIVIDAD DEL SUERO

Para ver la actividad del suero sobre la interacción entre *Cr. neoformans* y los diferentes antifúngicos, se emplearon las curvas de letalidad a lo largo del tiempo. También se realizaron curvas de crecimiento con suero en ausencia de antifúngico y curvas de recrecimiento PAFE.

1.- Curvas de Crecimiento. Se incubaron los cultivos de *Cr. neoformans* en fase exponencial en inóculo de $1-5 \times 10^5$ y que contenían, además, un 10% de suero procedente de voluntarios sanos. La cuantificación del crecimiento de los microorganismos se realizó por recuento de viales en placa.

Para estudiar la influencia de proteínas séricas y la limitación de nutrientes en el medio, paralelamente se prepararon otros cultivos en idénticas condiciones, excepto en la sustitución de la cantidad del 10% de suero normal humano por una equivalente de:

- Suero Termoinactivado. Se obtuvo por calentamiento a 56°C, en baño con agitación, de un volumen de suero normal humano durante un periodo de tiempo de 30 minutos.
- Solución salina (PBS).
- bYNB-G. Los controles de crecimiento sólo contenían levadura y medio de cultivo bYNB-G.

Con los valores obtenidos, se determinó la capacidad inhibitoria del suero normal, suero termoinactivado y solución salina (PBS), sobre el crecimiento de la levadura en fase logarítmica de crecimiento.

También se registró la variación del pH en cada uno de los cultivos arriba citados, midiendo los valores electrolíticos al inicio y final de las pruebas, utilizando un medidor electrónico de pH (GIRALT).

2.- Curvas de letalidad. La metodología para realizar estas curvas es la misma que la descrita previamente, con la salvedad de la incorporación de un 10% de suero en todos los cultivos y que el inóculo empleado sólo fue el de 5×10^3 UFC/ml (108).

Con los valores obtenidos se construyeron las curvas de cinética de muerte correspondientes, y se calcularon los parámetros que determinan el poder microbicida (capacidad inhibitoria y actividad fungicida) así como el área bajo la curva de letalidad para cada concentración ensayada.

3.-Efecto Postantifúngico. Se siguió el mismo desarrollo experimental que en la prueba de PAFE sin suero, descrita previamente, pero con la diferencia de que todos los cultivos contenían un 10% de suero en el proceso del ensayo, tanto en el periodo de exposición como después durante el recrecimiento de las levaduras.

El suero utilizado durante el periodo de exposición de las levaduras a los antifúngicos, fue renovado con suero normal humano durante el proceso de eliminación del antifúngico.

ANALISIS ESTADISTICO

Para el estudio de la magnitud de la actividad microbicida, velocidad de consecución, y el efecto del suero humano sobre la misma, se empleó el logaritmo decimal (Log_{10}) del recuento de viables para los cálculos matemáticos.

La significación estadística de los resultados se comprobó por análisis de la varianza (ANOVA). Se consideraron diferencias significativas en aquellos casos en que la probabilidad de que las diferencias se deban al azar fue de $p < 0,01$.

Todos los datos fueron introducidos y analizados automáticamente con el programa estadístico informático SYSTAT® (v.5) bajo entorno Windows 3.11.

RESULTADOS

CURVAS DE CRECIMIENTO

En las curvas para comprobar la velocidad de crecimiento de las dos cepas de *Cr. neoformans*, así como su comportamiento en el mismo medio pero tamponado de diferente modo (fosfatado o bicarbonatado), no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente entre las 2 cepas cuando el tampón usado contenía bicarbonato, siendo el perfil de las dos curvas prácticamente idéntico (de ahí que sólo se refleje en el figura 1 la curva correspondiente a una de las cepas) En el caso del tampón fosfatado, se manifestó un ligero retraso en el crecimiento en la cepa CECT 1078 respecto al aislado clínico, como muestra también el figura 1.

Los tiempos de generación encontrados fueron muy similares en ambas cepas (6,3 y 6 horas), sin embargo, son muy diferentes a cuando se utiliza como tampón para el medio de cultivo una solución bicarbonatada. En este caso se obtienen tiempos de generación de hasta 3 veces el valor conseguido con el tampón fosfato. Este fenómeno lo podemos ver claramente en las tasas de crecimiento medio e instantánea (k y μ respectivamente), que ven reducidos sus valores de forma drástica al ser comparados con los cultivos tamponados con solución fosfatada (tabla I).

La correlación encontrada entre las medidas espectrofotométricas y las de recuento de viables en placa fue baja, por lo que se utilizó preferentemente esta última técnica para los demás estudios (Figura 1).

SENSIBILIDAD

Los valores de inhibición del crecimiento (IC) de las diferentes concentraciones de antifúngicos frente a 2 cepas de *Cr. neoformans* se muestran en las tablas III y IV. De todas las concentraciones de antifúngicos evaluadas, fueron empleadas para la representación de los resultados aquellas que están comprendidas en los intervalos recomendados por la NCCLS para las pruebas de sensibilidad. En el caso concreto de UK 109,496, al no encontrarse entre los antimicrobianos relacionados en el documento de dicho comité por encontrarse todavía en periodo de investigación, se tomaron márgenes de concentraciones basadas en datos farmacocinéticos y seguridad, obtenidos de la documentación cedida por Pfizer Inc.. Las densidades ópticas obtenidas muestran que en todo momento los cultivos se encontraban en

fase exponencial. Se encontraron diferencias significativas en los resultados de todos los antifúngicos al emplear los dos tamaños de inóculo. Cuando el inóculo fue de 10^5 UFC/ml, el tiempo de lectura fue a las 24 y 48 horas. La inhibición obtenida fue baja, y por tanto se emplearon valores de IC_{25} y IC_{50} , además del de inhibición del 90% de la población (definido como concentración mínima inhibitoria por la NCCLS). Estos valores se mantuvieron constantes en el tiempo o presentaron un ligero descenso (como ocurrió en el caso del ketoconazol, que redujo su IC_{50} de la hora 24 a la 48 en ambas cepas). También UK 109,496 presentó una fuerte reducción en la inhibición de la masa microbiana respecto al tiempo, descendiendo de 8 a 16 veces su valor, dependiendo de la cepa.

Cuando se empleó un tamaño de inóculo de *Cr. neoformans* inferior, 10^3 UFC/ml, se obtuvo mayor efectividad en la reducción de la población fúngica, por lo que el valor de inhibición que se empleó fue de IC_{90} . En cambio, la lectura de los resultados con este inóculo se prolongó más en el tiempo, teniendo que realizarse a las 48 y 72 horas. No se ha encontrado una diferencia significativa en la inhibición comparando los resultados de las horas 48 y 72, con la excepción de anfotericina B, que vio reducida su IC_{90} de 1 μ g/ml a 0,125 μ g/ml. En el caso concreto de fluconazol, tanto para inóculo de 10^5 UFC/ml como para 10^3 UFC/ml, las concentraciones inhibitorias no se pudieron fijar en un valor correspondiente con las diluciones seriadas que se emplearon para la prueba de sensibilidad, ya que en cada repetición de la misma salía un valor distinto alternándose entre 8 y 16 μ g/ml. Por tanto se ha dejado el valor inhibitorio de este antifúngico acotado entre esas dos concentraciones.

La diferencia en la sensibilidad observada entre las 2 cepas ensayadas no fue especialmente llamativa, excepto en el caso de 5-fluorocitosina, donde el aislado clínico de *Cr. neoformans* presentó valores de inhibición inferiores que la cepa de colección. Con anfotericina B se produjo en cambio una diferencia leve entre ambas cepas, siendo el aislado clínico más sensible al polieno (1 punto en la mayoría de las IC y 4 en IC_{90} 10^3 UFC/ml).

Los valores correspondientes a relacionar la concentración inhibitoria de cada antifúngico con los niveles séricos en humanos (cociente inhibitorio, IQ), están representados en la Tabla II. En general se observó una clara relación del IQ para 10^5 UFC/ml- IC_{25} y las IQ de 10^3 UFC/ml- IC_{90} . Tan sólo anfotericina B y ketoconazol tuvieron valores distintos para distinto inóculo, presentando mejor resultado para inóculo bajo el primer antifúngico y al contrario para el segundo. Prácticamente todos los resultados de IQ que se obtuvieron estuvieron en una clara línea de buena predicción de la eficacia clínica de los antifúngicos (valores superiores a 4), con la excepción de 5-fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* CECT

1078 y fluconazol con ambas cepas. Este último dependió del valor inhibitorio seleccionado (8 ó 16 µg/ml) para tener un valor IQ más próximo a 4.

CURVAS DE LETALIDAD

Los resultados muestran en general que la cinética de crecimiento de las levaduras en presencia de diferentes concentraciones de los antifúngicos fue similar para los dos tamaños de inóculo, aunque en algunos casos se vio que la mayor presencia de levadura disminuyó la eficacia de los fármacos.

Los parámetros empleados para ver la actividad de los antifúngicos a lo largo del tiempo fueron la inhibición del crecimiento, actividad fungicida y AUKC (tablas V-XXVI). En las figuras se puede ver el desarrollo de los experimentos gráficamente.

1.- Anfotericina B.

Este antifúngico presentó actividad fungicida (es decir, descendió los niveles celulares por debajo del tamaño poblacional inicial) de forma tiempo dependiente en las dos concentraciones empleadas cuando el tamaño de inóculo fue de 10^3 UFC/ml (tabla VI y figura 9). En cambio, cuando se aumentó el tamaño de inóculo hasta 10^5 UFC/ml, la actividad fungicida se vio reducida a la concentración de 4 µg/ml (tabla VIII y figura 9), que presentó un descenso inicial en la viabilidad y un posterior recrecimiento (a partir de la hora 24). En este caso el comportamiento del fármaco fue concentración dependiente.

Los resultados obtenidos en las AUKC (tablas XXV y XXVI), mostraron una diferencia clara entre los valores generados por la concentración inhibitoria y las supra-inhibitorias, y especialmente con inóculo elevado, siendo en cualquier caso siempre menor cuanto mayor fue la concentración empleada.

2.- 5-fluorocitosina.

Los resultados de la actividad de 5-fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* a lo largo del tiempo se muestran en las tablas XIX - XII y figura 10. En ningún momento las diferentes concentraciones de 5-fluorocitosina mostraron actividad fungicida frente a las levaduras a tamaño de inóculo de 10^5 UFC/ml. Todo el tiempo hubo una inhibición del crecimiento de forma concentración dependiente, que no obtuvo diferencias en UFC/ml mayores a 1,5 logaritmos respecto al control.

Cuando el inóculo de partida fue de 10^3 UFC/ml, el efecto de 5-fluorocitosina sobre las levaduras se vio incrementado, mostrando una leve actividad microbicida tiempo dependiente, que se pronunció más a concentraciones de 100 μ g/ml y desde la hora 24 hasta el final del experimento, aunque con un ligero recrecimiento a partir de la hora 48. Las diferencias mayores observadas en el recuento celular entre cultivos tratados respecto a su control fueron de 4 logaritmos.

Las AUKC (Tablas XXV y XXVI) fueron menores a medida que la concentración empleada ascendió y las diferencias entre ellas fueron prácticamente nulas.

3.- Ketoconazol.

En las tablas XIII – XVI, se muestran los valores de actividad fungicida e inhibición del crecimiento para ketoconazol obtenidos a partir de las curvas de cinética de muerte (figura 11). Este antifúngico presentó una clara actividad microbicida tiempo dependiente, y comportamiento muy similar en su actividad cuando se ensayó con diferentes tamaños de inóculo (10^3 UFC/ml frente a 10^5 UFC/ml). Con un inóculo de 10^3 UFC/ml, ketoconazol fue letal para las levaduras a partir de la hora 24 a las concentraciones ensayadas. Este efecto se proyectó hasta el final del experimento, logrando alcanzar una diferencia de los cultivos tratados con respecto al control de crecimiento de hasta 6 logaritmos.

Cuando el inóculo ensayado fue de 10^5 UFC/ml, el efecto fungicida se produjo también a partir de la hora 24 aproximadamente, y de manera muy similar a como se desarrolló en 10^3 UFC/ml, siendo la máxima diferencia con el control de crecimiento algo menos de 4 logaritmos.

4.- Fluconazol.

El efecto producido por las concentraciones de fluconazol sobre *Cr. neoformans* a lo largo del tiempo se puede ver en las tablas XVII - XX así como en la figura 12.

El modo de acción de fluconazol fue muy similar al de ketoconazol, aunque presentando un claro perfil bifásico. Las levaduras crecieron de forma similar al control en las 12 primeras horas, para posteriormente sufrir un descenso en la viabilidad desde la hora 24 hasta el final del ensayo. Esta estructura bifásica se pudo ver más claramente en el caso de inóculo inicial de 10^5 UFC/ml. La actuación del fármaco fue también concentración independiente en el caso de partir desde un inóculo bajo, mientras que con una mayor carga microbiana la actuación del fármaco fue concentración dependiente. La mayor diferencia

encontrada entre los cultivos tratados respecto al control de tratamiento fue de 5,5, logaritmos y 3 logaritmos para los inóculos de 10^3 y 10^5 UFC/ml respectivamente.

5.- UK 109,496.

La actividad del fármaco UK 109, 496 frente a *Cr. neoformans* se refleja en la figura 13 y las tablas XXI - XXVI. Cuando el inóculo empleado fue de 10^3 UFC/ml, la actividad antifúngica fue concentración dependiente y microbicida sólo para la concentración de 4 μ g/ml a partir de la hora 24 y para 1 μ g/ml al final del experimento (horas 60-72). La diferencia máxima observada en los cultivos tratados con respecto al control de crecimiento fue de 7 logaritmos.

Para el inóculo de 10^5 UFC/ml se observó un claro comportamiento bifásico para la concentración de 0,125 μ g/ml, que tan sólo presentó actividad fungicida al final de la prueba. El comportamiento encontrado fue concentración dependiente y marcadamente fungicida a partir de la hora 12, alcanzando una diferencia máxima de 4 logaritmos al final de la prueba, comparando cultivos tratados con su control.

Los valores obtenidos en las AUKC (tablas XXV y XXVI), mostraron una considerable diferencia entre los valores generados por la concentración inhibitoria y las supra-inhibitorias, y especialmente al partir de un inóculo elevado.

EFEECTO POSTANTIFUNGICO

Los resultados del estudio del PAFE y el efecto de concentraciones sub-CMI muestran la dependencia de las variables experimentales en la obtención de concordancia en los valores finales encontrados. Se valoraron estos efectos teniendo en cuenta el tiempo de exposición, la concentración del fármaco, la unidad de referencia para cuantificar el PAFE (1/2 o 1 logaritmo) y la variabilidad interespecífica.

1.- Anfotericina B.

Este antifúngico presentó efecto PAFE negativo cuando la exposición al fármaco fue de 2 horas (tabla XXXII). Cuando se amplió el tiempo de exposición hasta 12 horas, se generaron valores de PAFE positivos y crecientes con el aumento de la concentración (tabla XXVII). Al considerar medio logaritmo como unidad de cuantificación del efecto, también se obtuvieron valores positivos.

Incorporando concentraciones subinhibitorias (efecto sub-CMI), el retraso en el crecimiento producido fue también significativo con todas las concentraciones cuando la exposición fue de 12 horas a anfotericina B aunque el efecto de sub-CMI cuando la exposición fue de 4 $\mu\text{g/ml}$ se supone mayor con 1 logaritmo que con medio, aunque no se pudo medir a causa de su prolongación en el tiempo (superior a las 24 horas de muestreo).

El PAFE mostrado por el aislado clínico fue menor, aunque en cualquier caso también con valores significativamente positivos.

El tiempo de recrecimiento o de estimación de la recuperación de las levaduras tras el efecto fungicida inicial más el efecto PAFE, fue muy extenso, llegando a alcanzar hasta las 24 horas en el caso de 4 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B.

2.- 5-fluorocitosina.

Los parámetros farmacodinámicos PAFE, sub-CMI y ERT de 5-fluorocitosina están expresados en las tablas XXVIII, XXXII, XXXIII y representados en la figura 15.

Los valores de PAFE para 12 horas de exposición fueron los mayores observados para todos los antifúngicos, y siempre de forma creciente con mayores concentraciones. La diferencia encontrada entre la cuantificación a diferente escala logarítmica fue favorable a 1 logaritmo, siendo siempre superior a los valores de medio logaritmo. Cuando la exposición previa a 5-fluorocitosina fue de 2 horas, los valores de PAFE fueron menores e incluso negativos, como en el caso de 32 $\mu\text{g/ml}$. Los valores obtenidos para el aislado clínico fueron muy similares a los de la cepa estándar, a pesar de la diferencia en los valores de sensibilidad.

El efecto de concentraciones sub-CMI con 5-fluorocitosina no pudo ser determinado con las condiciones experimentales del ensayo para 1 logaritmo, puesto que el crecimiento de las levaduras se vio enlentecido demasiado, y no alcanzó el número mínimo necesario de UFC/ml para poder realizar el cálculo de este parámetro farmacodinámico. Para medio logaritmo, pudo verse el efecto de sub-CMI con las concentraciones más bajas, generando valores considerablemente elevados.

Al igual que ocurrió con anfotericina B, el ERT mostró valores muy altos, extendiéndose mucho en el tiempo la capacidad de recuperación de las levaduras en cualquiera de las concentraciones ensayadas.

3.- Ketoconazol

Los diferentes parámetros farmacodinámicos de ketoconazol se ven en las tablas XXIX, XXXII, XXXIII y figura 16.

Los valores de PAFE para este antifúngico fueron positivos cuando el tiempo de exposición fue de 12 horas, tanto para la cepa estándar como para el aislado clínico, aunque en este último caso los tiempos fueron mayores. El PAFE fue concentración dependiente en ambas cepas. Se obtuvieron tiempos de PAFE menos largos cuando se utilizó medio logaritmo como medida unitaria en vez de 1 logaritmo.

Cuando la exposición fue de 2 horas, los valores bajaron, siendo negativos para la concentración de 1 µg/ml.

El estudio del efecto de concentraciones sub-CMI no se pudo realizar, pues el empleo de $\frac{1}{4}$ la IC 90 es suficiente para producir inhibición del crecimiento en fase postantifúngica e impedir, por tanto, la cuantificación de este fenómeno. En el caso de las levaduras que además estuvieron pretratadas con ketoconazol no sólo hubo inhibición sino que además la viabilidad se vio reducida a valores inferiores a los del inóculo de partida (tras el lavado).

Los valores de ERT fueron largos, aunque parecidos para las diferentes concentraciones.

4.- Fluconazol

El PAFE de fluconazol con 12 horas de exposición (tabla XXX y figura 17) presentó valores negativos para la concentración de 8 µg/ml, tanto si se consideró 1 logaritmo como medio logaritmo como unidad de medida. En el caso del aislado clínico (tabla XXXIII) estos valores fueron ligeramente superiores aunque no en todas las concentraciones. Cuando la exposición fue durante 2 horas (tabla XXXII), todos los valores fueron negativos.

El efecto de sub-CMI produjo una prolongación en el tiempo de PAFE, de forma más o menos regular, aunque los valores no fueron excesivamente altos.

Curiosamente, los valores de medio logaritmo fueron superiores a los de un logaritmo.

Los ERT fueron también muy largos, llegando a alcanzar valores de hasta 21 horas.

5.- UK 109,496

El comportamiento de UK 109,496 en fase PAFE y su ERT se pueden ver en las tablas XXXI – XXXIII y figura 18.

Los PAFE, cuando el tiempo de exposición previa fue de 12 horas, mostraron valores positivos y concentración dependientes, tanto para *Cr. neoformans* CECT 1078 como para el aislado clínico (aunque ligeramente inferiores en éste último). Curiosamente el PAFE fue mayor cuando se consideró medio logaritmo como unidad de cuantificación en vez de 1 logaritmo.

La exposición previa durante sólo 2 horas condujo a valores de PAFE negativos.

Los valores de sub-CMI fueron muy altos, siendo prácticamente los mismos que los obtenidos en PAFE. Cuando se consideró medio logaritmo como unidad de medida el sub-CMI fue menor.

ERT fue alto, aunque comparativamente con los demás antifúngicos fue de los más bajos.

EFECTO DEL SUERO

Cr. neoformans se vio influido en su crecimiento al incorporar a los cultivos suero humano procedente de una mezcla homogénea de individuos sanos. En la gráfica 19 se representa el efecto producido por un 10% y un 50% de suero normal, suero termoinactivado y solución salina en el crecimiento de un cultivo de levaduras durante 48 horas.

La incorporación del suero en los cultivos hizo que el crecimiento de las levaduras se viese reducido significativamente en comparación con el control del experimento. Dicho descenso en el crecimiento se observó a partir de la hora 24 incrementándose hasta el final de la prueba de forma paulatina. Cuando el suero añadido fue del 50% del volumen de cultivo la inhibición también fue significativa respecto al control pero no respecto a la curva obtenida con el 10% de suero.

Cuando se empleó suero termoinactivado por calentamiento constante a 56°C durante 30 minutos, el efecto inhibitorio obtenido fue también significativo aunque en menor grado que el producido por el suero normal. Esta diferencia, tendió además a compensarse a lo largo del tiempo siendo las diferencias entre la actividad del suero termoinactivado y el suero normal más pequeñas al final de la prueba.

1.- Curvas de letalidad.

El efecto producido por el suero en la actividad fungicida de los antifúngicos se estudió empleando el método de las curvas de letalidad con recuento de viables en placa con un

inóculo de 10^3 UFC/ml durante un tiempo de 72 horas. En las curvas control a las que se incorporó un 10% de suero humano, se observó siempre un retraso en el crecimiento estadísticamente significativo cuando se comparó con el control de crecimiento sin dicha cantidad de suero. El crecimiento de estos cultivos fue prácticamente de 1 logaritmo decimal en todos los experimentos quedando muy por debajo el número de UFC/ml del cultivo control.

A continuación se describe el efecto producido por el suero cuando estaba presente el antifúngico en el cultivo.

1.1.- Anfotericina B. Un 10 % de suero humano añadido al cultivo de *Cr. neoformans* tratado con 0,125 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B anuló por completo la actividad del fármaco quedando los valores de UFC/ml prácticamente idénticos al control de crecimiento en presencia de suero (Figura 9 tablas V, VI).

Cuando la concentración de anfotericina B aumentó hasta 4 $\mu\text{g/ml}$ se apreció un descenso claro en la viabilidad de las levaduras que fue significativo respecto al control (con suero) de crecimiento a partir de la hora 36. En ningún momento y con ninguna de las concentraciones ensayadas anfotericina B fue fungicida en presencia de suero.

1.2.- 5-Fluorocitosina. Con la concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$, la adición de un 10 % de suero indujo un descenso en la velocidad del crecimiento de *Cr. neoformans* comparada con el control de crecimiento (tablas IX, X y figura 10). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas desde prácticamente el comienzo de la prueba (hora 12) extendiéndose hasta el final de la misma.

El aumento de la concentración de 5-fluorocitosina hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ reflejó un aumento del retraso del crecimiento de las levaduras consiguiendo valores por debajo del inóculo inicial a partir de la hora 24 efecto que no fue observado en la concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$.

1.3.- Ketoconazol. El comportamiento de las concentraciones de ketoconazol con un 10% de suero frente a *Cr. neoformans* comparado con el control de crecimiento, fue muy similar, sin presentar diferencias significativas en ningún momento (tablas XIII, XIV y figura 11). La inhibición del crecimiento fue progresiva a lo largo del tiempo y tan solo descendió por debajo del valor del inóculo inicial en la hora 60 para la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ y en la hora 72 para 1 y 4 $\mu\text{g/ml}$ aunque con valores de actividad fungicida muy reducidos.

1.4.- Fluconazol. Este fármaco fue el que presentó mayor actividad frente a *Cr. neoformans* cuando estuvo en presencia de un 10% de suero humano en los cultivos (Figura 12 y tablas XVII, XVIII). La inhibición del crecimiento respecto al control fue efectiva y estadísticamente significativa desde la hora 36 del experimento para todas las concentraciones ensayadas. Las diferencias encontradas, en cambio, entre los cultivos con suero y fluconazol no fueron llamativas. Se lograron alcanzar diferencias de 2 logaritmos entre el control y el cultivo con mayor concentración de fluconazol en la hora 72 del experimento. La actividad fungicida pudo observarse en los cultivos a partir de la hora 60 aunque para 32 µg/ml hubo ya inhibición desde la hora 36.

1.5.- UK 109,496. El desarrollo de la incubación de *Cr. neoformans* con diferentes concentraciones de este fármaco y un 10% de suero se puede ver en las figura 13 y las tablas XXI, XXII La concentración 0,125 µg/ml de fármaco no presentó actividad inhibitoria significativa comparada con el control de suero, mientras que la concentraciones de 4 µg/ml si lo presentó a partir de la hora 48 del experimento. Igualmente la actividad fungicida o descenso en la viabilidad respecto al inóculo inicial fue muy pobre dándose tan sólo en la concentración mayor de UK 109,496 y al final del experimento (horas 60 y 72)

2.- Efecto postantifúngico.

El efecto postantifúngico en presencia de suero no pudo ser cuantificado para ninguno de los antifúngicos ya que la inhibición ejercida por la presencia del suero impidió que se alcanzase ni siquiera 1/2 logaritmo de crecimiento, incluso en los controles (Figura 20).

Cepa/Tampón	Parámetros de Crecimiento		
	T.gen. (horas)	μ	k
CECT/(HPO ₄) ²⁻	6,3 ± 0,36	0,1 ± 0,003	0,156 ± 0,005
AC/(HPO ₄) ²⁻	6 ± 0,4	0,1 ± 0,003	0,16 ± 0,006
CECT/ (HCO ₃) ⁻	18,36 ± 0,76	0,036 ± 0,001	0,03 ± 0,002

TABLA I

Tiempo de generación (Tgen), tasa instantánea de crecimiento (μ) y tasa media de crecimiento (k) para las cepas de *Cr. neoformans* en medio de crecimiento bYNB-G con diferentes tampones (fosfato y bicarbonato). Los resultados se obtuvieron a partir de los datos recogidos en las curvas de crecimiento por recuento de viables en placa y se expresan como la media aritmética de 3 experimentos \pm la desviación estándar.

Antifúngico	IQ			
	<i>Cr. neoformans</i> CECT 1078		<i>Cr. neoformans</i> AC	
	IC ₉₀ 10 ³ UFC/ml	IC ₂₅ 10 ⁵ UFC/ml	IC ₉₀ 10 ³ UFC/ml	IC ₂₅ 10 ⁵ UFC/ml
Anfotericina B	32	4	4	2
5-Fluorocitosina	1,56	<1,56	12,5	12,5
Ketoconazol	5	20	10	20
Fluconazol	3,125-1,56	3,125-1,56	3,125-1,56	3,125-1,56
UK 109,496	64-96	64-96	64-96	64-96

TABLA II

Valores del cociente inhibitorio (IQ) de los 5 antifúngicos del estudio frente a las dos cepas de *Cr. neoformans*. Las concentraciones límite no tóxicas alcanzables en suero que se han utilizado para la obtención del IQ se han extraído de información cedida por Pfizer Inc. (216) en el caso de UK 109,496 y de Roilides et al 1990 (149) para los demás antifúngicos.

ANTIFUNGICO	Inóculo (UFC/ml)	Horas de Incubación	IC ($\mu\text{g/ml}$)		
			IC 25	IC 50	IC 90
Anfotericina B (0,0313-16 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	1	16	>16
		48	1	16	>16
	10^3	48	-	-	1
		72	-	-	0,125
5 Fluorocitosina (0,125-64 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	>64	>64	>64
		48	>64	>64	>64
	10^3	48	-	-	64
		72	-	-	64
Ketoconazol (0,0313-16 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	0,25	>16	>16
		48	0,25	16	>16
	10^3	48	-	-	1
		72	-	-	1
Fluconazol (0,125-64 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	8-16	>64	>64
		48	8-16	64	>64
	10^3	48	-	-	8-16
		72	-	-	8-16
UK 109,496 (0,0313-8 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	0,125	>8	>8
		48	0,125	1	>8
	10^3	48	-	-	0,125
		72	-	-	0,125

TABLA III

Valores de inhibición del crecimiento (IC) de anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496 frente a *Cr. neoformans* CECT 1078. Los resultados están expresados como inhibición del 25, 50 y 90% del crecimiento de los cultivos que partían de un tamaño de inóculo de 10^5 UFC/ml y la inhibición del 90% cuando dicho inóculo era de 10^3 UFC/ml. Los tiempos de lectura espectrofotométrica fueron a las 24, 48 y 72 horas. Debajo de cada antifúngico se especifica el intervalo de concentraciones al que se ajustan los resultados, que además coincide con el recomendado por la NCCLS para las pruebas de sensibilidad (25) excepto en el caso de UK 109,496, que se ha obtenido a partir de documentación cedida por Pfizer Inc. (216).

ANTIFUNGICO	Inóculo (UFC/ml)	Horas de Incubación	IC ($\mu\text{g/ml}$)		
			IC 25	IC 50	IC 90
Anfotericina B (0,0313-16 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	2	>16	>16
		48	2	>16	>16
	10^3	48	-	-	2
		72	-	-	1
5 Fluorocitosina (0,125-64 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	8	16	64
		48	8	16	64
	10^3	48	-	-	8
		72	-	-	8
Ketoconazol (0,0313-16 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	0,25	32	>64
		48	0,25	8	>64
	10^3	48	-	-	0,5
		72	-	-	0,5
Fluconazol (0,125-64 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	8-16	>64	>64
		48	8-16	>64	>64
	10^3	48	-	-	8-16
		72	-	-	8-16
UK 109,496 (0,0313-64 $\mu\text{g/ml}$)	10^5	24	0,125	8	>8
		48	0,125	1	>8
	10^3	48	-	-	0,125
		72	-	-	0,125

TABLA IV

Valores de inhibición del crecimiento (IC) de un aislado clínico de *Cr. neoformans* frente a anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496. Los resultados están expresados como inhibición del 25, 50 y 90% del crecimiento de los cultivos que partían de un tamaño de inóculo de 10^5 UFC/ml y la inhibición del 90% cuando dicho inóculo era de 10^3 UFC/ml. Los tiempos de lectura espectrofotométrica fueron a las 24, 48 y 72 horas. Debajo de cada antifúngico se especifica el intervalo de concentraciones al que se ajustan los resultados, que además coincide con el recomendado por la NCCLS para las pruebas de sensibilidad (25) excepto en el caso de UK 109,496, que se ha obtenido a partir de documentación cedida por Pfizer Inc. (216).

AMB ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del crecimiento (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
0,125	69,8 \pm 2,4*	78,6 \pm 2,2*	99,6 \pm 0,2*	99,9 \pm 0,1*	99,9 \pm 0,2*	99,9 \pm 0*
0,125 + S	0	16,8 \pm 4,4*	0*	27,5 \pm 3,9*	25,8 \pm 3,3*	25,8 \pm 3,5*
4	76,5 \pm 4,3*	98 \pm 0,5*	99,6 \pm 0,1*	99,9 \pm 0,2*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
4 + S	22,3 \pm 4,1	58,3 \pm 3,2	64,5 \pm 3,5*	82,2 \pm 2,8*	82,2 \pm 2,1*	86,1 \pm 2,3*

TABLA V.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de anfotericina B y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa. ° Indica que la diferencia en el crecimiento para el caso de las levaduras tratadas y con suero respecto a las tratadas pero en ausencia de suero, es significativa.

AMB ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad fungicida (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
0,125	0	6,6 \pm 4,2	43,7 \pm 4,4	52,1 \pm 3,8	30,8 \pm 3,4	0
0,125 + S	0	0	0	0	0	0
4	10,8 \pm 5,3	18,7 \pm 4,7	59,2 \pm 3,6	61,1 \pm 3,2	72,7 \pm 3,4	80,9 \pm 2,8
4 + S	0	0	0	0	0	0

TABLA VI.

Actividad fungicida de anfotericina B frente a *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fármaco y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

AMB ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del Crecimiento (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
0,125	22,3 \pm 6,8	58,3 \pm 4,9*	89,5 \pm 5,7*	94,3 \pm 2,2*
1	29,2 \pm 8,5	73,1 \pm 4*	92,9 \pm 2,4*	96,8 \pm 1,1*
4	38,3 \pm 9,5*	81,3 \pm 3,6*	97,7 \pm 1,7*	98,8 \pm 0,5*

TABLA VII.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^5 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de anfotericina B. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa.

AMB ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad Fungicida (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
0,125	0	0	0	0
1	0	0	0	0
4	0	12,9 \pm 2,3	25,8 \pm 6,9	0

TABLA VIII.

Actividad Fungicida de anfotericina B frente a *Cr. neoformans* con un tamaño de inóculo de 5×10^5 tratado con diferentes concentraciones de fármaco. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

5FC($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del crecimiento (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
64	83,4 \pm 4,1*	96,9 \pm 1,2*	99,2 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
64 + S	64,5 \pm 3,9*	69,1 \pm 3,2*	80 \pm 2,3*	78,1 \pm 3,1*	77,6 \pm 3,3*	76,5 \pm 4,1*
100	82,6 \pm 2,8*	98,6 \pm 0,2*	99,6 \pm 0,1*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
100 + S	61,1 \pm 3,7*	82,6 \pm 2,9*	87,1 \pm 2,5*	88,7 \pm 2,6*	92,4 \pm 1,3*	94,5 \pm 1,6*

TABLA IX

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de 5-fluorocitosina y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa. ° Indica que la diferencia en el crecimiento para el caso de las levaduras tratadas y con suero respecto a las tratadas pero en ausencia de suero, es significativa.

5FC($\mu\text{g/ml}$)	Actividad fungicida (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
64	0	0	0	0	0	0
64 + S	0	0	0	0	0	0
100	0	42,4 \pm 3,1	36,9 \pm 3,5	48,7 \pm 2,5	27,5 \pm 3,7	6,6 \pm 2,1
100 + S	0	27,5 \pm 4,2	39,7 \pm 2,6	29,2 \pm 3,1	36,9 \pm 2,4	45 \pm 3,4

TABLA X.

Actividad fungicida de 5-fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fármaco y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

5FC ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del Crecimiento (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
32	0	0,4 \pm 0,1	86,8 \pm 5,3*	79,1 \pm 5,3*
64	29,2 \pm 5,9	35,4 \pm 8,3*	91,2 \pm 6,9*	90,8 \pm 6,8*
100	41,1 \pm 9,5*	52,1 \pm 8,6*	94,8 \pm 3,1*	96,6 \pm 2*

TABLA XI.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^5 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de 5-fluorocitosina. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa.

5FC ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad Fungicida (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
32	0	0	0	0
64	0	0	0	0
100	0	0	0	0

TABLA XII.

Actividad Fungicida de 5 fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* con un tamaño de inóculo de 5×10^5 tratado con diferentes concentraciones de fármaco. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

KTZ ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del crecimiento (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
1	67,6 \pm 3,5*	96,3 \pm 1,1*	99,8 \pm 0,1*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
1 + S	46,2 \pm 3,5	47,6 \pm 3,1*	59,2 \pm 2,7*	66,1 \pm 3,3*	76,5 \pm 2,7*	85,8 \pm 2,1*
4	69 \pm 3,8*	98,2 \pm 0,1*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
4 + S	46,2 \pm 4,1	49,8 \pm 3,5*	59,2 \pm 3,5*	70,4 \pm 2,9*	86,1 \pm 2,3*	93,9 \pm 1,6*

TABLA XIII.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de ketoconazol y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa. ° Indica que la diferencia en el crecimiento para el caso de las levaduras tratadas y con suero respecto a las tratadas pero en ausencia de suero, es significativa.

KTZ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad fungicida (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
1	0	25,8 \pm 3,9	83,7 \pm 1,5	96 \pm 0,04	97,4 \pm 0,06	98,5 \pm 0,04
1 + S	0	0	0	0	0	16,8 \pm 2,3
4	0	64,5 \pm 2,3	91,8 \pm 0,9	97,7 \pm 0,06	98,6 \pm 0,1	99,2 \pm 0,03
4 + S	0	0	0	0	22,3 \pm 2,2	64,5 \pm 2,7

TABLA XIV.

Actividad fungicida de ketoconazol frente a *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fármaco y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

KTZ ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del Crecimiento (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
1	53,2 \pm 11,7*	70,4 \pm 8,2*	95,4 \pm 3,9*	99,9*
4	59,2 \pm 13,2*	72,4 \pm 12,6*	97,1 \pm 0,9*	99,9*

TABLA XV.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^5 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de ketoconazol. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa.

KTZ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad Fungicida (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
1	0	0	0	94,8 \pm 2,1
4	0	0	12,9 \pm 9,6	97,9 \pm 0,9

TABLA XVI.

Actividad Fungicida de ketoconazol frente a *Cr. neoformans* con un tamaño de inóculo de 5×10^5 tratado con diferentes concentraciones de fármaco. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

FLU($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del crecimiento (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
16	27,5 \pm 3,9	99,9 \pm 0,04*	99,8 \pm 0,04*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
16 + S	10,8 \pm 2,7	52,1 \pm 3,5	73,1 \pm 2,6**	85,2 \pm 3,1**	93,6 \pm 1,3**	97,4 \pm 2,1**
32	43,7 \pm 3,6	97,1 \pm 1,2*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
32 + S	0	57,3 \pm 3,4	88,5 \pm 1,9**	87,9 \pm 1,9**	95,6 \pm 1,2**	98,3 \pm 0,3**

TABLA XVII.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fluconazol y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa. * Indica que la diferencia en el crecimiento para el caso de las levaduras tratadas y con suero respecto a las tratadas pero en ausencia de suero, es significativa.

FLU ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad fungicida (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
16	0	0	51 \pm 3,1	57,3 \pm 2,6	86,5 \pm 2,3	95,8 \pm 1,7
16 + S	0	0	0	0	25,8 \pm 3,4	63,6 \pm 2,7
32	0	0	77,6 \pm 2,8	84,8 \pm 1,6	92,4 \pm 0,8	96,2 \pm 0,6
32 + S	0	0	6,6 \pm 1,5	0	48,7 \pm 3,2	76 \pm 2,5

TABLA XVIII.

Actividad fungicida de fluconazol frente a *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fármaco y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

FLU ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del Crecimiento (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
8	0	16,9 \pm 2,9	71,2 \pm 5,1*	97,5 \pm 2,5*
16	46 \pm 6,7	45,1 \pm 3,4	88,3 \pm 3,2*	99,9*
32	41 \pm 7,2	48,8 \pm 2,6	93,6 \pm 1,9*	99,9*

TABLA XIX

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^5 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fluconazol. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa.

FLU ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad Fungicida (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
8	0	0	0	0
16	0	0	52 \pm 9,3	90 \pm 2,5
32	0	0	0	0

TABLA XX.

Actividad Fungicida de fluconazol frente a *Cr. neoformans* con un tamaño de inóculo de 5×10^5 tratado con diferentes concentraciones de fármaco. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

UK ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del crecimiento (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
0,125	42,4 \pm 4,2	88,2 \pm 2,3*	96,2 \pm 1,1*	99,8 \pm 0,1*	99,9 \pm 0,1*	99,9 \pm 0*
0,125 + S	25,8 \pm 2,4	33,9 \pm 1,6	22,3 \pm 3,2	24,1 \pm 2,6	42,4 \pm 4,2	61,1 \pm 3,2°
4	68,3 \pm 3,1*	99,9 \pm 0*	99,7 \pm 0,1*	99,9 \pm 0,3*	99,9 \pm 0*	99,9 \pm 0*
4 + S	29,2 \pm 2,5	53,2 \pm 3,3°	62,8 \pm 2,8°	80 \pm 1,9*°	93,6 \pm 1,8*°	97,7 \pm 0,7*°

TABLA XXI.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de UK 109,496 y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa. ° Indica que la diferencia en el crecimiento para el caso de las levaduras tratadas y con suero respecto a las tratadas pero en ausencia de suero, es significativa.

UK ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad fungicida (%)					
	12 (h)	24 (h)	36 (h)	48 (h)	60 (h)	72 (h)
0,125	0	0	0	0	0	39,7 \pm 2,3
0,125 + S	0	0	0	0	0	0
4	0	12,9 \pm 3,4	62,8 \pm 3,2	82,6 \pm 1,5	97,8 \pm 0,4	99,6 \pm 0
4 + S	0	0	0	0	14,8 \pm 3,7	52,1 \pm 4,1

TABLA XXII.

Actividad fungicida de UK 109,496 frente a *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de fármaco y en presencia o no de un 10% de suero humano completo. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

UK ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibición del Crecimiento (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
0,125	10,8 \pm 5,2	65,3 \pm 9,6*	42,4 \pm 12*	99,2 \pm 0,3*
1	25,8 \pm 14,1	87,1 \pm 6,4*	98,2 \pm 1,2*	99,9*
4	14,8 \pm 7,8	94,3 \pm 4,3*	99,1 \pm 0,9*	99,9*

TABLA XXIII.

Inhibición del crecimiento de *Cr. neoformans* (10^3 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de UK 109,496. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar. * Indica que la diferencia en el crecimiento de las levaduras tratadas comparadas con su control fue estadísticamente significativa.

UK ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad Fungicida (%)			
	6 (h)	12 (h)	24 (h)	48 (h)
0,125	0	0	0	46,2 \pm 4,2
1	0	18,7 \pm 2,2	71,1 \pm 8,6	99,1 \pm 0,7
4	0	64,5 \pm 3,9	84,8 \pm 8,4	99,3 \pm 0,3

TABLA XXIV.

Actividad Fungicida de UK 109,496 frente a *Cr. neoformans* con un tamaño de inóculo de 5×10^5 tratado con diferentes concentraciones de fármaco. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

AUKC (UFC/ml × hora × 10 ⁵)					
µg/ml	AMB	5-FC	KTZ	FLU	UK 109,496
0	23.470 ± 1.990	19.290 ± 2.470	16.388 ± 1.860	20.270 ± 2.310	18.818 ± 1.750
0 + S	18,5 ± 3,4	23,3 ± 4,2	20 ± 5,3	29 ± 4,5	30,4 ± 5,1
0,125	2,7 ± 1,3	-	-	-	10,7 ± 2,1
0,125 + S	15,2 ± 4,2	-	-	-	19,4 ± 6,1
1	-	-	2,6 ± 1,1	-	-
1 + S	-	-	7,5 ± 2,4	-	-
4	1,8 ± 0,6	-	2,1 ± 0,9	-	1,7 ± 0,2
4 + S	5,3 ± 1,6	-	6,6 ± 2,1	-	7,2 ± 2,1
16	-	-	-	4 ± 0,9	-
16 + S	-	-	-	6,4 ± 2,3	-
32	-	-	-	2,6 ± 1,1	-
32 + S	-	-	-	5,4 ± 0,7	-
64	-	5,5 ± 1,9	-	-	-
64 + S	-	6,01 ± 1,1	-	-	-
100	-	3,2 ± 1,6	-	-	-
100 + S	-	3,4 ± 1,2	-	-	-

TABLA XXV.

Valores del área bajo la curva de letalidad (AUKC) para las diferentes concentraciones de antifúngicos en presencia o ausencia de suero, cuando el tamaño de inóculo inicial de *Cr. neoformans* es de 5×10^3 UFC/ml. Los valores del área se obtuvieron por aproximación mediante la regla trapezoidal para intervalos regulares.

AUKC (UFC/ml × hora × 10 ⁵)					
µg/ml	AMB	5-FC	KTZ	FLU	UK 109,496
0	11.322 ± 1.450	10.424 ± 1.242	8.971 ± 1.160	7.780 ± 1.310	7.822 ± 1.550
0,125	9.508 ± 803	-	-	-	1.335 ± 421
1	608 ± 167	-	254 ± 110	-	154 ± 135
4	262 ± 89	-	198 ± 90	-	121 ± 122
8	-	-	-	1.037 ± 367	-
16	-	-	-	481 ± 96	-
32	-	2.061 ± 300	-	350 ± 31	-
64	-	1.167 ± 390	-	-	-
100	-	654 ± 109	-	-	-

TABLA XXVI.

Valores del área bajo la curva de letalidad (AUKC) para las diferentes concentraciones de antifúngicos en presencia o ausencia de suero, cuando el tamaño de inóculo inicial de *Cr. neoformans* es de 5×10^5 UFC/ml. Los valores del área se obtuvieron por aproximación mediante la regla trapezoidal para intervalos regulares.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	PAFE (Horas)		SUB-CMI(Horas)		ERT (Horas)
	1 LOG	1/2 LOG	1 LOG	1/2 LOG	
0,125	$3 \pm 3,2$	$4,5 \pm 5$	$1,8 \pm 1,5$	$2,2 \pm 2$	$16,5 \pm 4$
1	$2,9 \pm 1,5$	$4 \pm 2,2$	$1,6 \pm 1,9$	$1,5 \pm 1,1$	$13 \pm 2,7$
4	$6 \pm 2,1$	$4,25 \pm 1,7$	>2	$6,75 \pm 2,6$	$24 \pm 0,3$

TABLA XXVII.

Valores del efecto postantifúngico (PAFE), de concentraciones Sub-CMI y tiempo de recrecimiento (ERT) de anfotericina B (1 y 4 $\mu\text{g/ml}$) frente a *Cr. neoformans* CECT 1078. Los resultados vienen expresados como la media de 6 experimentos \pm la desviación estándar. La cuantificación del PAFE y el efecto SUB-CMI se realiza considerando 1/2 y 1 logaritmo decimal en el crecimiento.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	PAFE (Horas)		SUB-CMI(Horas)		ERT (Horas)
	1 LOG	1/2 LOG	1 LOG	1/2 LOG	
32	$5,3 \pm 1,4$	$3,4 \pm 0,8$	ND	$5 \pm 0,9$	13 ± 4
64	$8,3 \pm 1,9$	$6,5 \pm 2$	ND	$2,9 \pm 1,3$	$17,5 \pm 1,7$
100	>8,5	$7 \pm 0,4$	ND	ND	$23 \pm 0,4$

TABLA XXVIII.

Valores del efecto postantifúngico (PAFE), de concentraciones Sub-CMI y tiempo de recrecimiento (ERT) de 5-fluorocitosina (32 64 y 100 $\mu\text{g/ml}$) frente a *Cr. neoformans* CECT 1078. Los resultados vienen expresados como la media de 6 experimentos \pm la desviación estándar. La cuantificación del PAFE y el efecto SUB-CMI se realiza considerando 1/2 y 1 logaritmo decimal en el crecimiento.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	PAFE (Horas)		SUB-CMI(Horas)		ERT (Horas)
	1 LOG	1/2 LOG	1 LOG	1/2 LOG	
1	$2,5 \pm 1,3$	$2,3 \pm 0,8$	ND	ND	$12,5 \pm 3,2$
4	$5,25 \pm 2,7$	$2,8 \pm 1,6$	ND	ND	$16,5 \pm 3,3$

TABLA XXIX.

Valores del efecto postantifúngico (PAFE), de concentraciones Sub-CMI y tiempo de recrecimiento (ERT) de ketoconazol (1 y 4 $\mu\text{g/ml}$) frente a *Cr. neoformans* CECT 1078. Los resultados vienen expresados como la media de 6 experimentos \pm la desviación estándar. La cuantificación del PAFE y el efecto SUB-CMI se realiza considerando 1/2 y 1 logaritmo decimal en el crecimiento.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	PAFE (Horas)		SUB-CMI(Horas)		ERT (Horas)
	1 LOG	1/2 LOG	1 LOG	1/2 LOG	
8	$-1,6 \pm 0,2$	$-1 \pm 2,1$	$0,15 \pm 0,5$	$1,7 \pm 1,5$	$10,8 \pm 6$
16	$0,8 \pm 0,4$	$1,5 \pm 1,3$	$0,15 \pm 0,4$	$1,7 \pm 1,2$	$14,4 \pm 3,5$
32	$4,6 \pm 0,2$	$5 \pm 0,8$	$>2,5$	$2,9 \pm 0,8$	$21,5 \pm 3,4$

TABLA XXX.

Valores del efecto postantifúngico (PAFE), de concentraciones Sub-CMI y tiempo de recrecimiento (ERT) de fluconazol (8, 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$) frente a *Cr. neoformans* CECT 1078. Los resultados vienen expresados como la media de 6 experimentos \pm la desviación estándar. La cuantificación del PAFE y el efecto SUB-CMI se realiza considerando 1/2 y 1 logaritmo decimal en el crecimiento.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	PAFE (Horas)		SUB-CMI(Horas)		ERT (Horas)
	1 LOG	1/2 LOG	1 LOG	1/2 LOG	
0,125	$2 \pm 2,3$	$3,25 \pm 1,6$	$2 \pm 0,8$	$0,25 \pm 1,5$	$7,5 \pm 6,2$
1	$4,25 \pm 2,1$	$5,5 \pm 1,2$	$4,5 \pm 2,2$	$3,6 \pm 1,7$	$13,8 \pm 3,9$
4	$4,7 \pm 0,7$	$5,65 \pm 0,8$	$4,5 \pm 1,8$	$3,25 \pm 2,1$	$14,2 \pm 5$

TABLA XXXI.

Valores del efecto postantifúngico (PAFE), de concentraciones Sub-CMI y tiempo de recrecimiento (ERT) de UK 109,496 (0,125 y 1 $\mu\text{g/ml}$) frente a *Cr. neoformans* CECT 1078. Los resultados vienen expresados como la media de 6 experimentos \pm la desviación estándar. La cuantificación del PAFE y el efecto SUB-CMI se realiza considerando 1/2 y 1 logaritmo decimal en el crecimiento.

$\mu\text{g/ml}$	PAFE (Horas)				
	AMB	5-FC	KTZ	FLU	UK 109,496
0,125	$-1 \pm 0,9$	-	-	-	$-0,4 \pm 0,2$
1	$-1,25 \pm 0,7$	-	$-0,5 \pm 0,4$	-	$-0,25 \pm 0,15$
4	$-2 \pm 1,1$	-	$1 \pm 0,3$	-	0
8	-	-	-	$-1,3 \pm 0,8$	-
16	-	-	-	$-1,4 \pm 0,6$	-
32	-	$-0,5 \pm 0,3$	-	$-1 \pm 0,7$	-
64	-	$1 \pm 0,5$	-	-	-
100	-	$3,25 \pm 1,2$	-	-	-

TABLA XXXII.

Efecto postantifúngico mostrado tras la exposición durante 2 horas de *Cr. neoformans* CECT 1078 a varias concentraciones de los antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

$\mu\text{g/ml}$	PAFE (Horas)				
	AMB	5-FC	KTZ	FLU	UK 109,496
0,125	$1,3 \pm 2,1$	-	-	-	$1,4 \pm 0,7$
1	$1 \pm 0,6$	-	$4,25 \pm 1,4$	-	$3 \pm 1,3$
4	$2,25 \pm 1,4$	-	$7,8 \pm 2,1$	-	$3,1 \pm 2,9$
8	-	-	-	$0,7 \pm 0,4$	-
16	-	-	-	2 ± 1	-
32	-	$4 \pm 2,3$	-	$2,4 \pm 1,5$	-
64	-	$8 \pm 1,2$	-	-	-
100	-	8,5	-	-	-

TABLA XXXIII.

Efecto postantifúngico mostrado tras la exposición durante 12 horas de un aislado clínico de *Cr. neoformans* a varias concentraciones de los antifúngicos anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol y UK 109,496. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos \pm la desviación estándar.

Horas	% Inhibición del crecimiento					
	S ₁₀	S ₅₀	T ₁₀	T ₅₀	PBS ₁₀	PBS ₅₀
6	9 ± 1,7	18 ± 3,2	15 ± 2,5	36 ± 8,8	0	0
24	70 ± 5,9	76 ± 4	56 ± 11	58 ± 4,6	0	0
48	89,7 ± 4,6	92 ± 2,6	87 ± 3,5	92,5 ± 6,4	0	0

TABLA XXXIV.

Inhibición del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* a lo largo del tiempo cultivado en presencia de diferentes factores a diferentes concentraciones. S₁₀: suero al 10%, S₅₀: suero al 50%, T₁₀: Suero termoinactivado al 10%, T₅₀: Suero termoinactivado al 50%, PBS₁₀: 10% de solución salina tamponada presente, PBS₅₀: 50% de solución salina tamponada presente.

	Control	S ₁₀	S ₅₀	T ₁₀	T ₅₀	PBS ₁₀	PBS ₅₀
pH	5,3 ± 0,4	6,75 ± 0,1	7,25 ± 0,1	6,75 ± 0,5	7,2 ± 0,2	5 ± 0,5	5,3 ± 0,5

TABLA XXXV.

Valores de pH obtenidos tras la incubación durante 48 horas de *Cryptococcus neoformans* en presencia de diferentes factores a diferentes concentraciones. S₁₀: suero al 10%, S₅₀: suero al 50%, T₁₀: Suero termoinactivado al 10%, T₅₀: Suero termoinactivado al 50%, PBS₁₀: 10% de solución salina tamponada presente, PBS₅₀: 50% de solución salina tamponada presente. Los resultados se expresan como la media aritmética de 6 experimentos ± la desviación estándar.

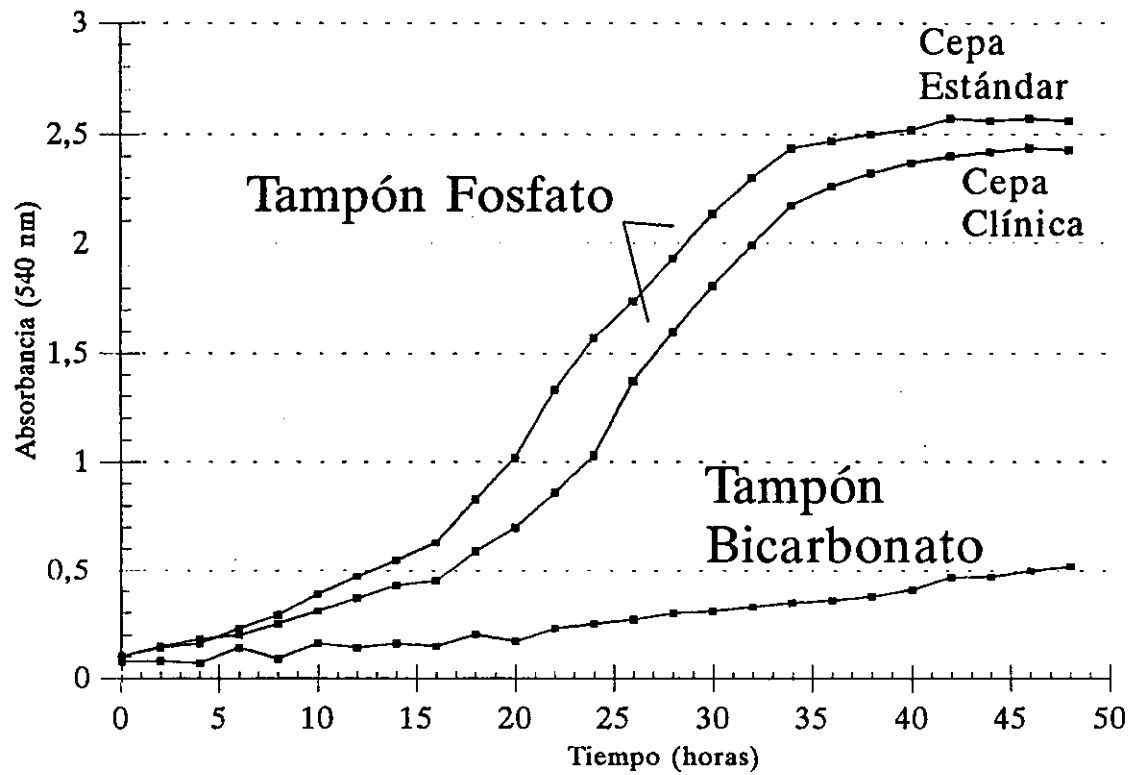
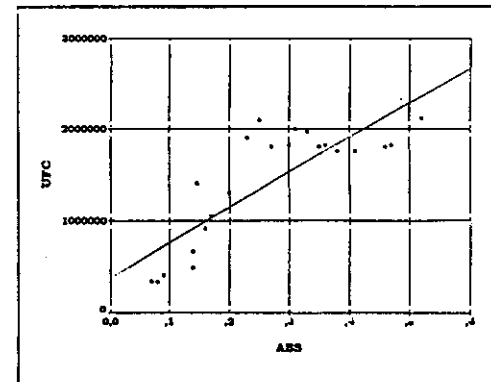
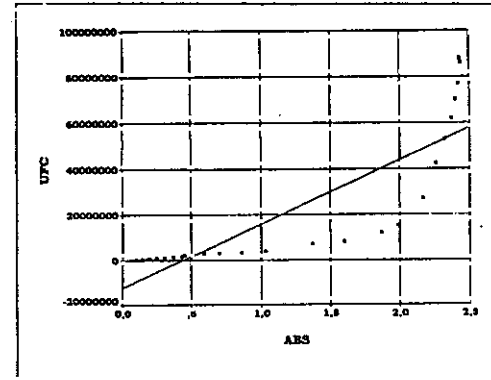
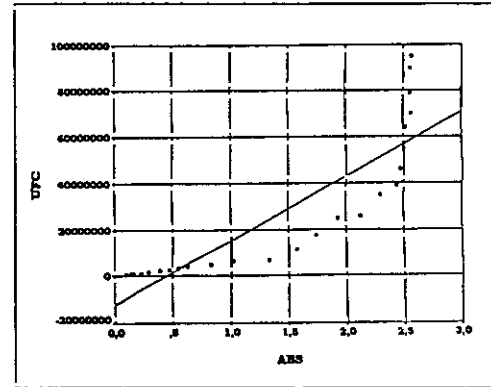


FIGURA 1.
Curvas de crecimiento de las cepas de *Cr. neoformans* CECT 1078 y AC en medio bYNB-G tamponado con fosfato o bicarbonato (Arriba). Rectas de regresión entre valores obtenidos tras medir las absorbancias y las CFU/ml recogidas por siembra en placa (Derecha).



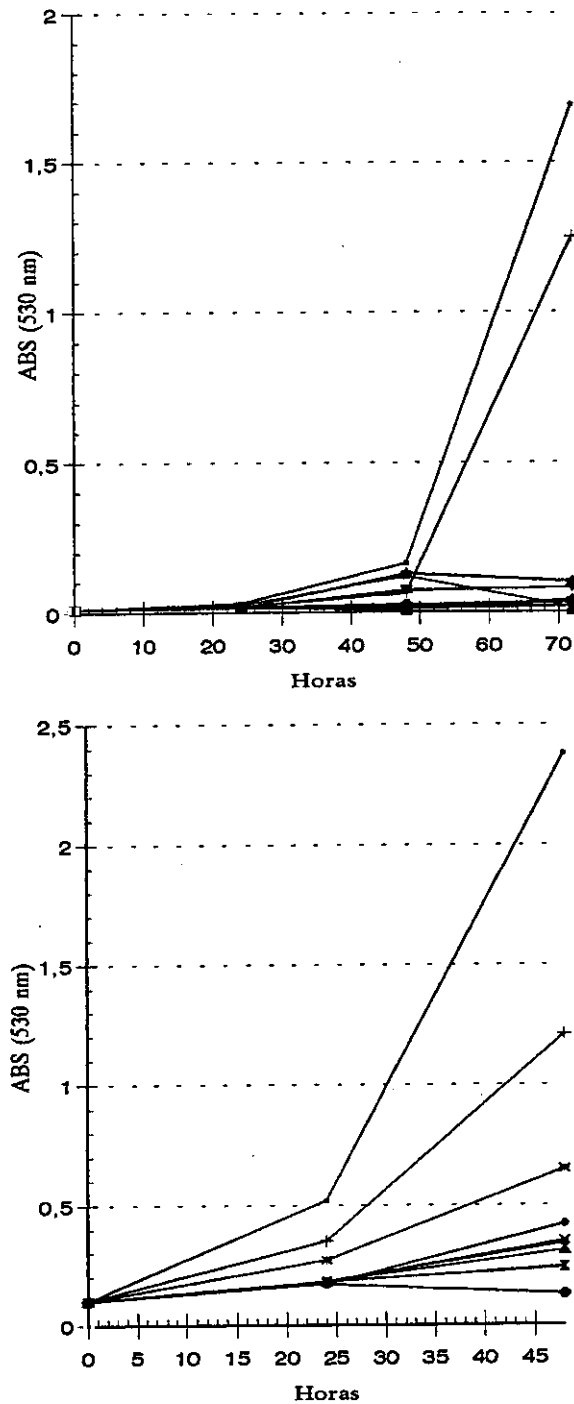


FIGURA 2.

Efecto de diferentes concentraciones de anfotericina B sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* CECT 1078, arriba para tamaños de inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml, (en $\mu\text{g/ml}$: 0,06 (+); 0,125 (*); 0,25 (■); 0,5 (×); 1 (◆); 2 (▲); 4 (♣); 8 (●); 16 (▼); 32 (+)), y abajo para inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml (en $\mu\text{g/ml}$: 0,25 (+); 0,5 (*); 1 (■); 2 (×); 4 (◆); 8 (▲); 16 (♣); 32 (●)).

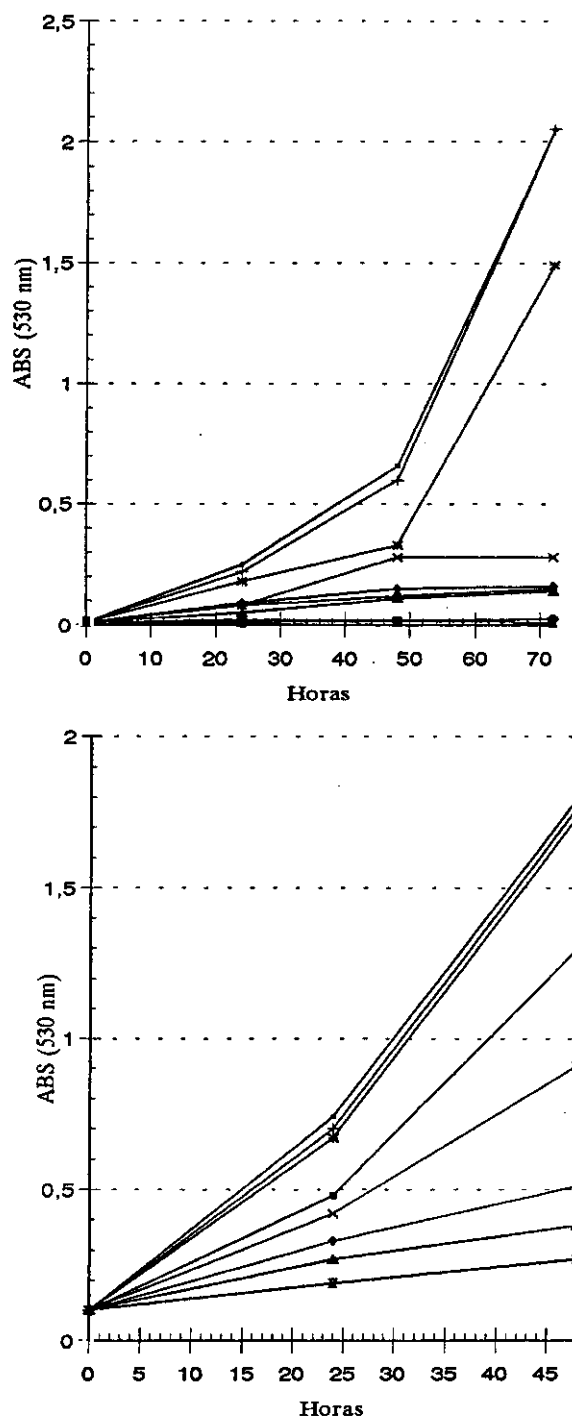


FIGURA 3.

Efecto de diferentes concentraciones de 5-fluorocitosina sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* CECT 1078, arriba para tamaño de inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml (en $\mu\text{g/ml}$: 1 (+); 2 (*); 4 (■); 8 (×); 16 (◆); 32 (▲); 64 (♣); 128 (●)) y abajo para inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml (en $\mu\text{g/ml}$: 8 (+); 16 (*); 32 (■); 64 (×); 128 (◆); 256 (▲); 512 (♣)).

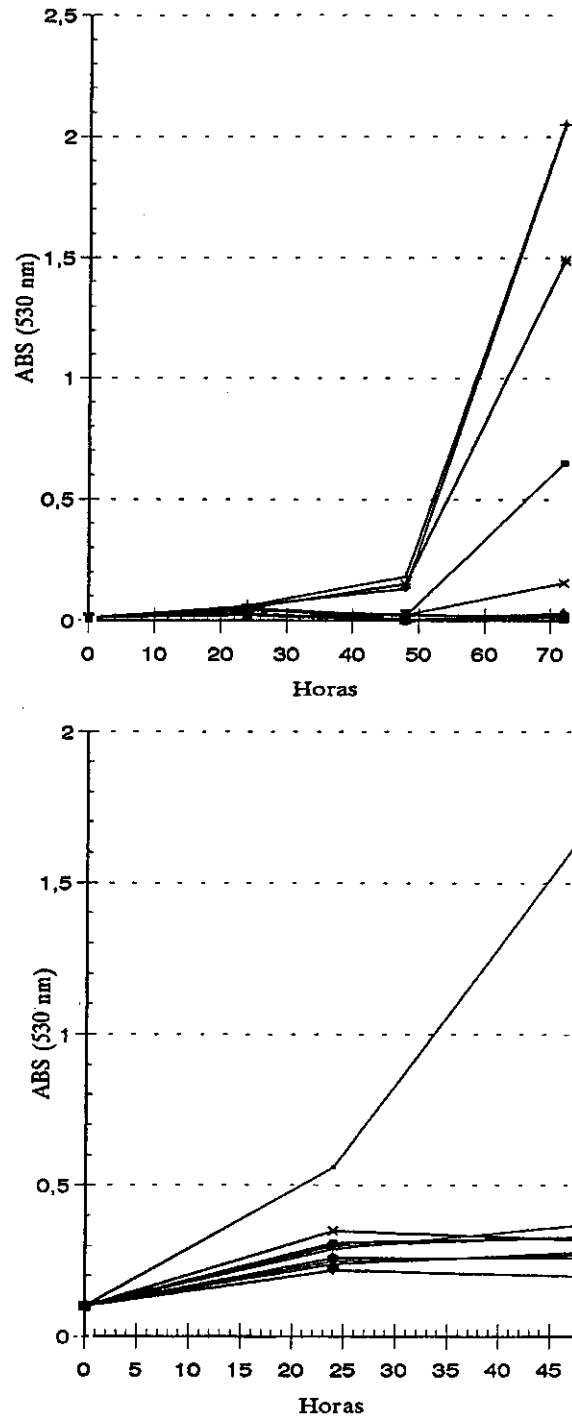


FIGURA 4.

Efecto de diferentes concentraciones de ketoconazol sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* CECT 1078, arriba para tamaños de inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml, (en $\mu\text{g/ml}$: 0,06 (+); 0,125 (*); 0,25 (■); 0,5 (×); 1 (◆); 2 (▲); 4 (♣); 8 (●); 16 (▼); 32 (⊕)), y abajo para inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml (en $\mu\text{g/ml}$: 0,25 (+); 0,5 (*); 1 (■); 2 (×); 4 (◆); 8 (▲); 16 (♣); 32 (●)).

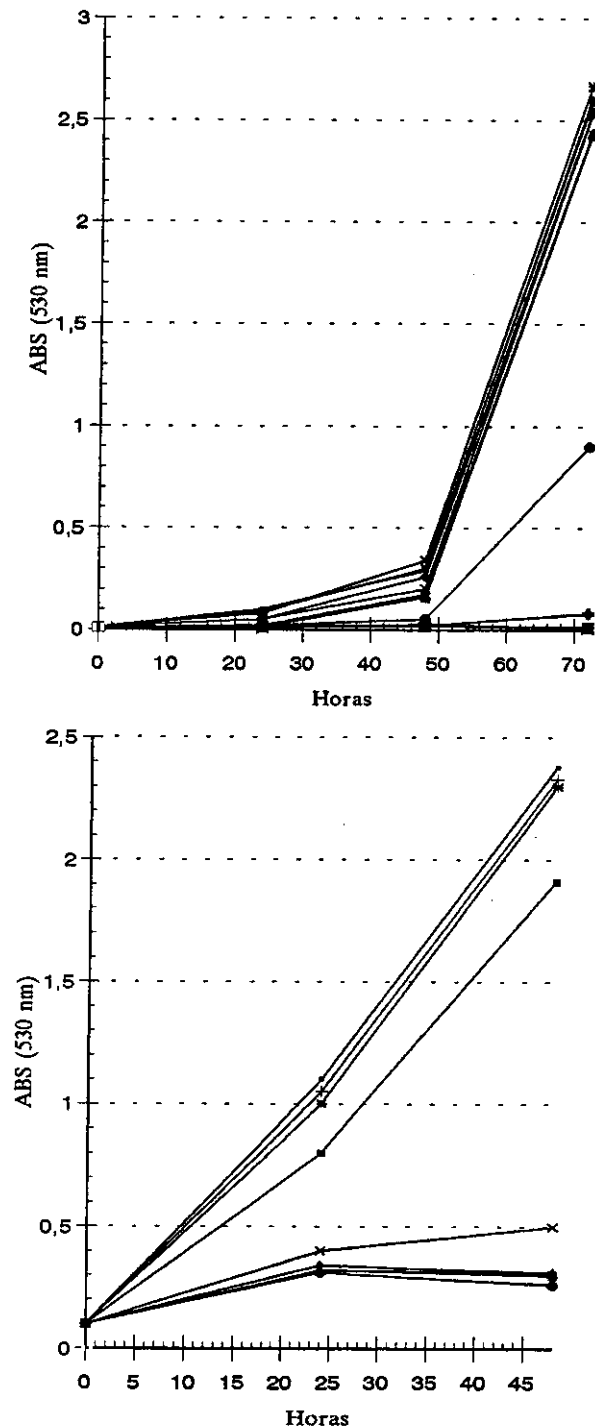


FIGURA 5.

Efecto de diferentes concentraciones de fluconazol sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* CECT 1078, arriba para tamaños de inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml, (en $\mu\text{g/ml}$: 0,125 (+); 0,25 (*); 0,5 (■); 1 (×); 2 (◆); 4 (▲); 8 (♣); 16 (●); 32 (▼); 64 (+); 128 (*)), y abajo para inóculo de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml (en $\mu\text{g/ml}$: 0,5 (+); 1 (*); 2 (■); 4 (×); 8 (◆); 16 (▲); 32 (♣); 64 (●)).

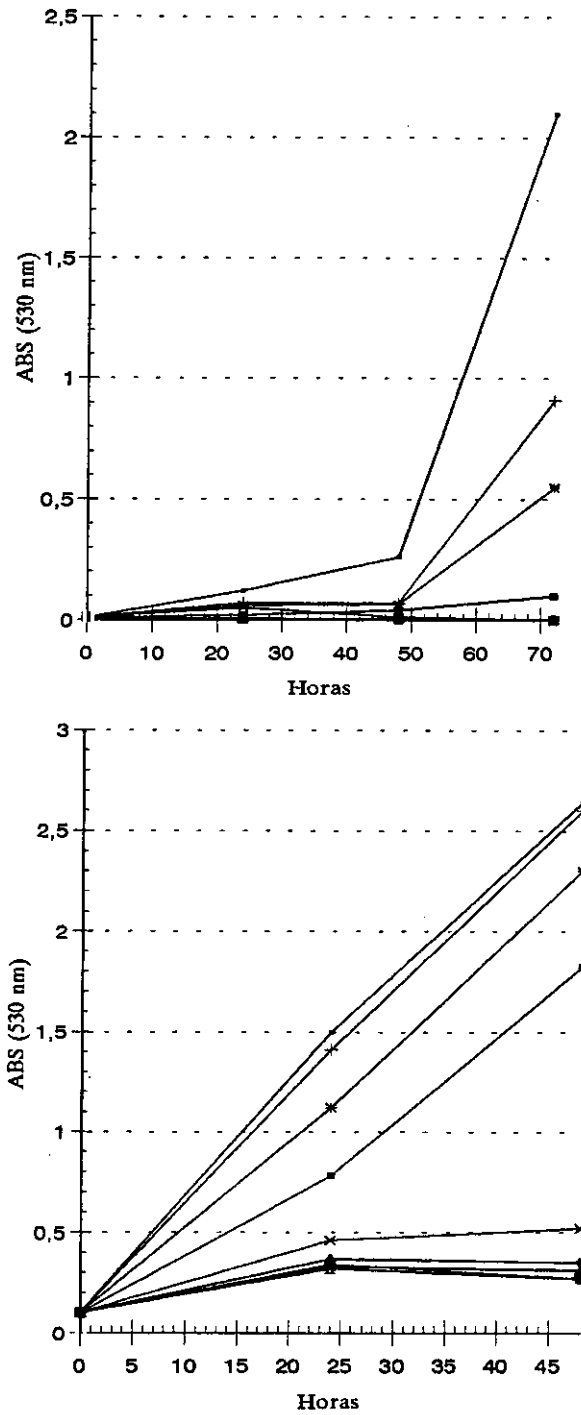


FIGURA 6.

Efecto de diferentes concentraciones de UK 109,496 sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* CECT 1078, para tamaños de inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml (arriba) y $1-5 \times 10^5$ UFC/ml (abajo). Concentraciones de UK 109,496 expresadas en $\mu\text{g/ml}$ como: 0,015 (+); 0,03 (*): 0,06 (■); 0,125 (×); 0,25 (◆); 0,5 (▲); 1 (♣); 2 (●); 4 (▼).

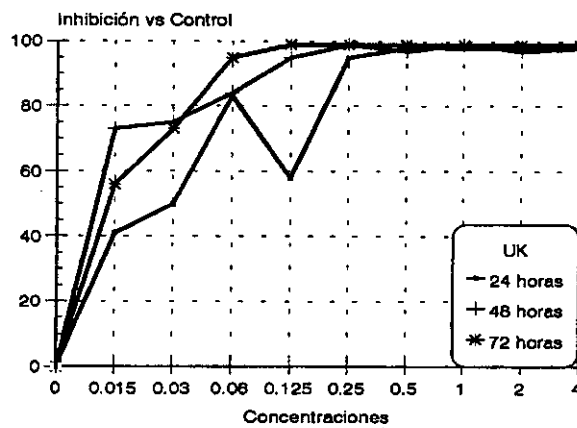
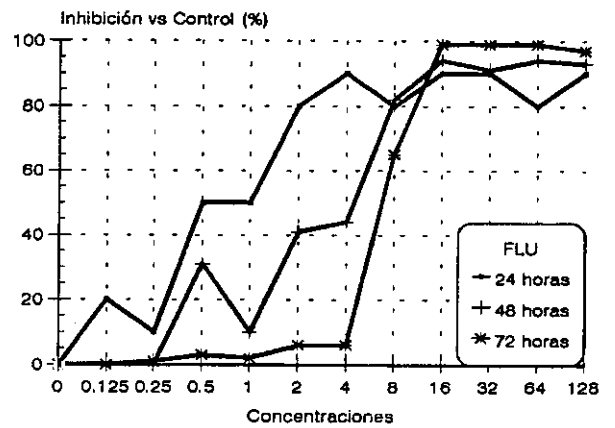
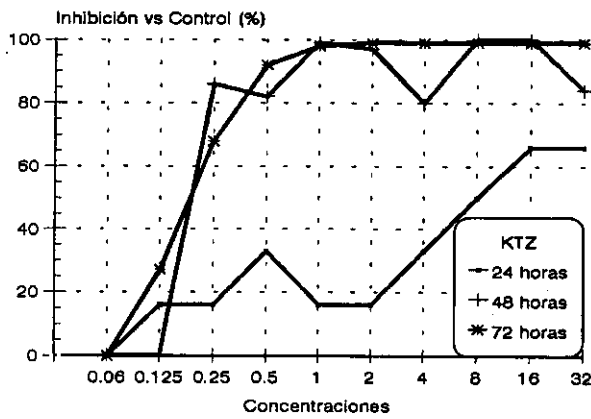
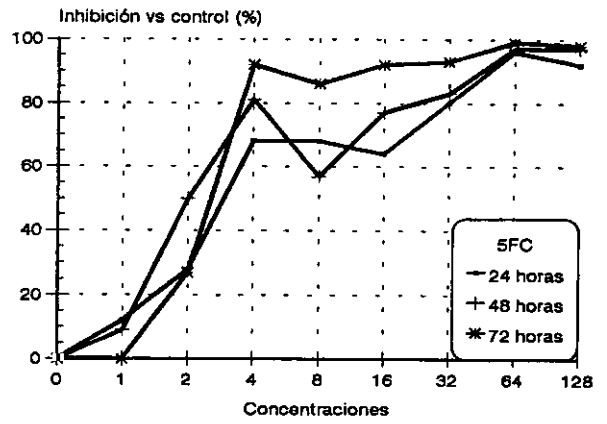
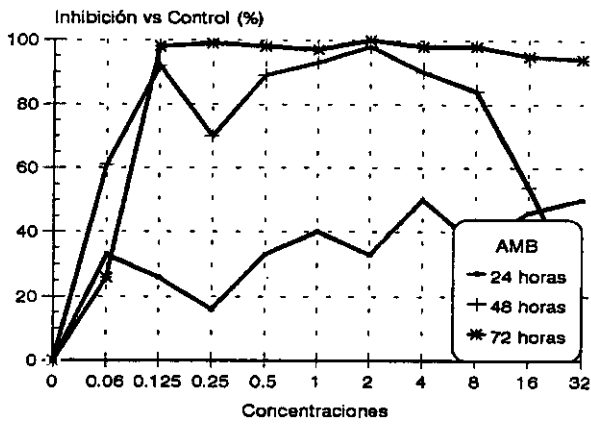


FIGURA 7.

Porcentajes de la inhibición del crecimiento basados en las lecturas espectrofotométricas de los cultivos de *Cr. neoformans* CECT 1078 ajustado a $1-5 \times 10^3$ UFC/ml frente a varias concentraciones seriadas de antifúngicos.

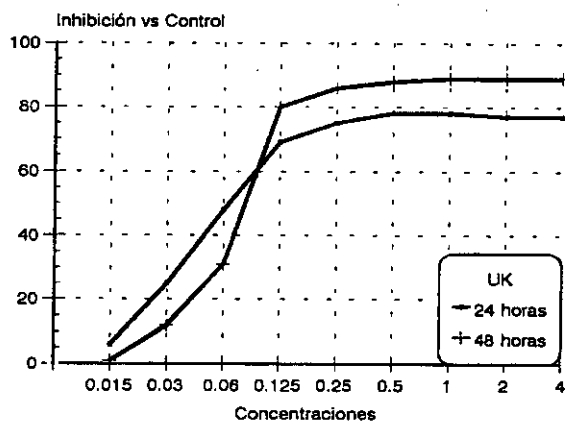
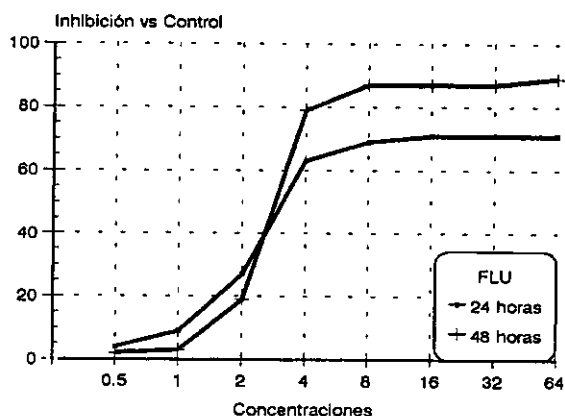
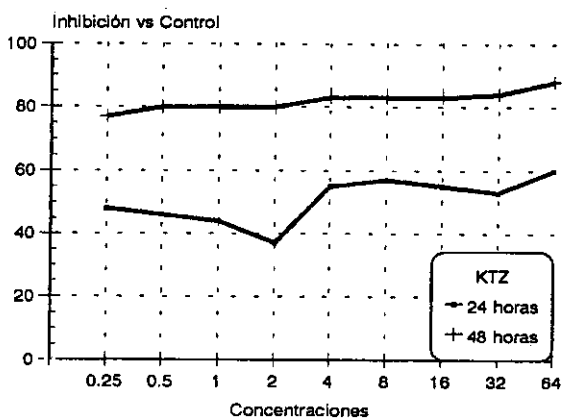
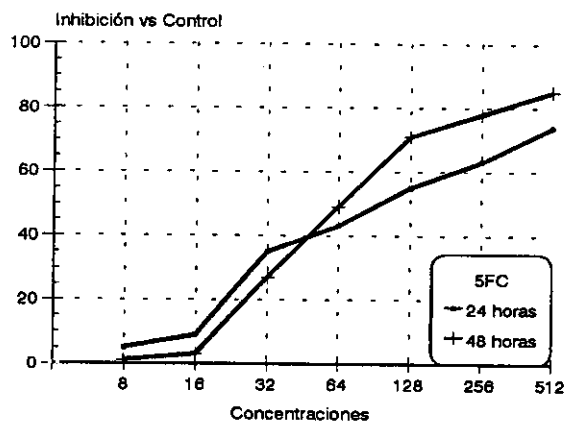
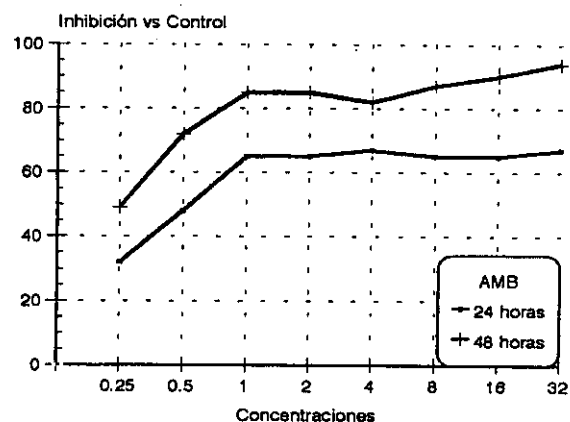


FIGURA 8. Porcentajes de la inhibición del crecimiento basados en las lecturas espectrofotométricas de los cultivos de *Cr. neoformans* CECT 1078 ajustado a $1-5 \times 10^5$ UFC/ml frente a varias concentraciones seriadas de antifúngicos.

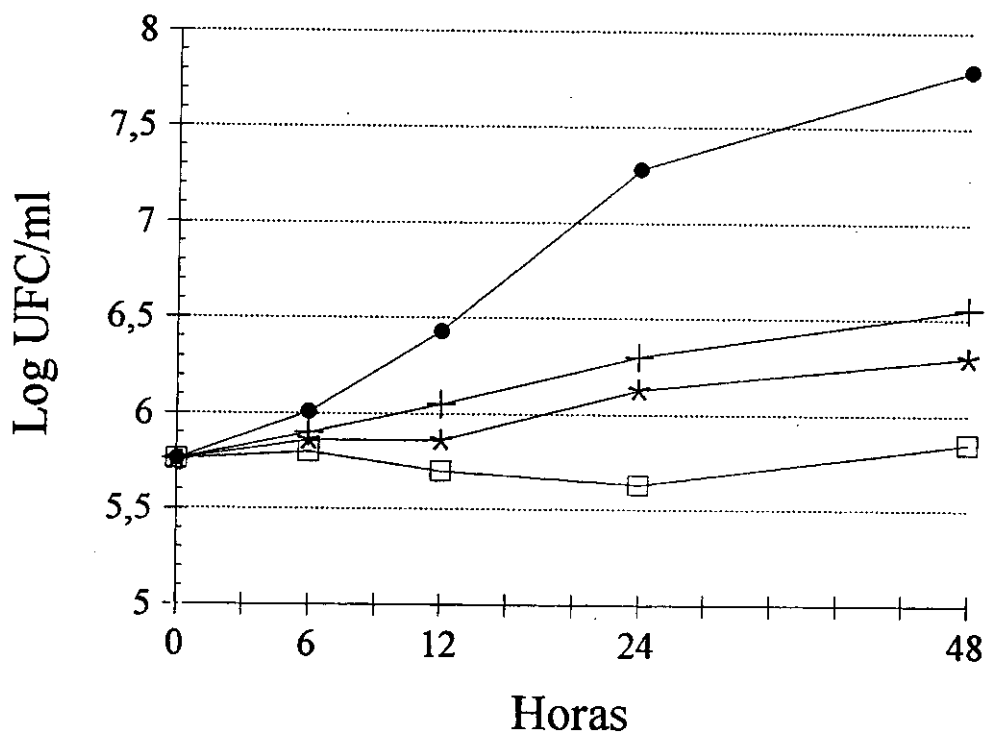
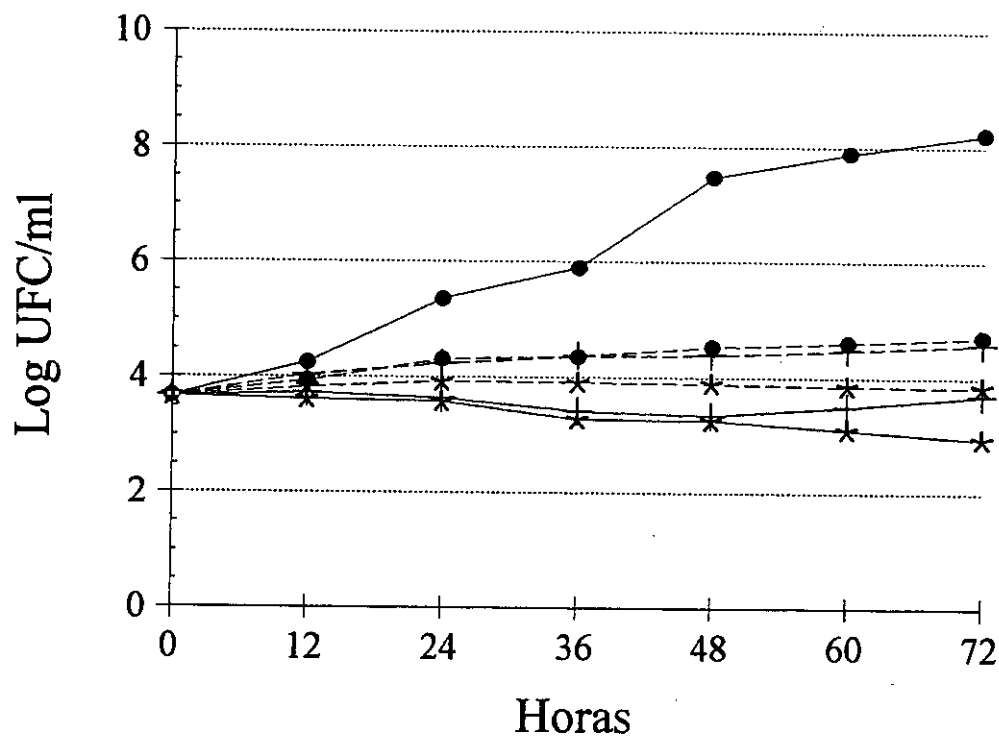


FIGURA 9.

Cinética de muerte de *Cr. neoformans* CECT 1078 inducida por anfotericina B a concentraciones de 0,125 $\mu\text{g/ml}$ y (+) 4 $\mu\text{g/ml}$ (*), en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10% de suero humano y con un inóculo de 10^3 UFC/ml así como 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (+) 1 $\mu\text{g/ml}$ (*) y 4 $\mu\text{g/ml}$ (□) para un inóculo de 10^5 UFC/ml. Los cultivos control libres de quimioterápico se representan como: (●) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10 % de suero.

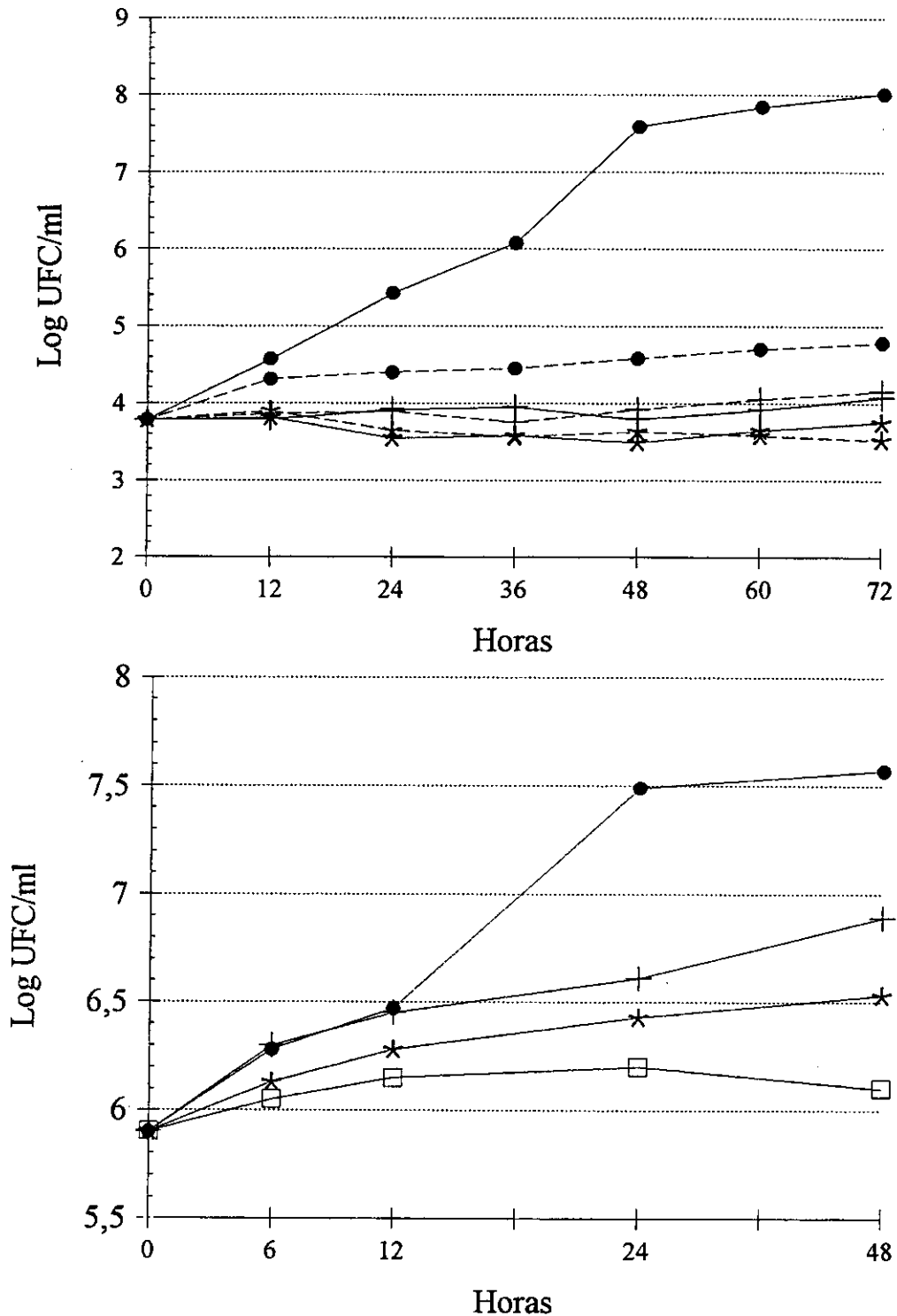


FIGURA 10.

Cinética de muerte de *Cr. neoformans* CECT 1078 inducida por 5-fluorocitosina a concentraciones de 64 μ g/ml (+) y 100 μ g/ml (*), en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10% de suero humano y con un inóculo de 10^3 UFC/ml así como 32 μ g/ml (+), 64 μ g/ml (*) y 100 μ g/ml (\square) para un inóculo de 10^5 UFC/ml. Los cultivos control libres de quimioterápico se representan como: (●) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10 % de suero.

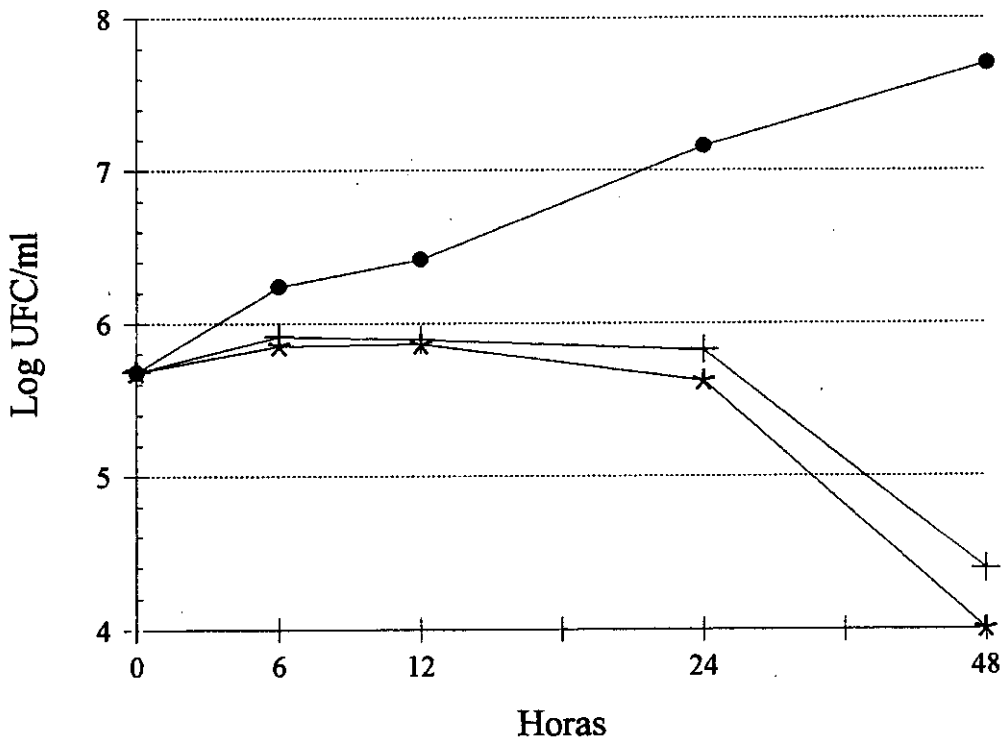
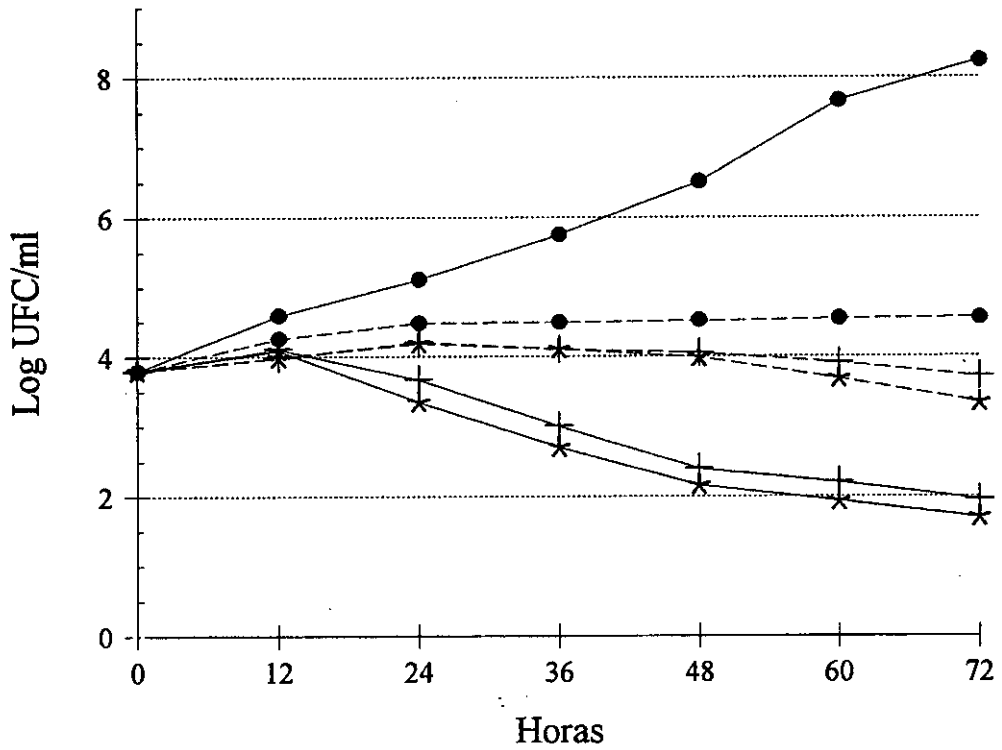


FIGURA 11. Cinética de muerte de *Cr. neoformans* CECT 1078 inducida por ketoconazol a concentraciones de 1 µg/ml (+) y 4 µg/ml (*), en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10% de suero humano y con un inóculo de 10³ UFC/ml así como 1 µg/ml (+) y 4 µg/ml (*) para un inóculo de 10⁵ UFC/ml. Los cultivos control libres de quimioterápico se representan como: (●) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10 % de suero.

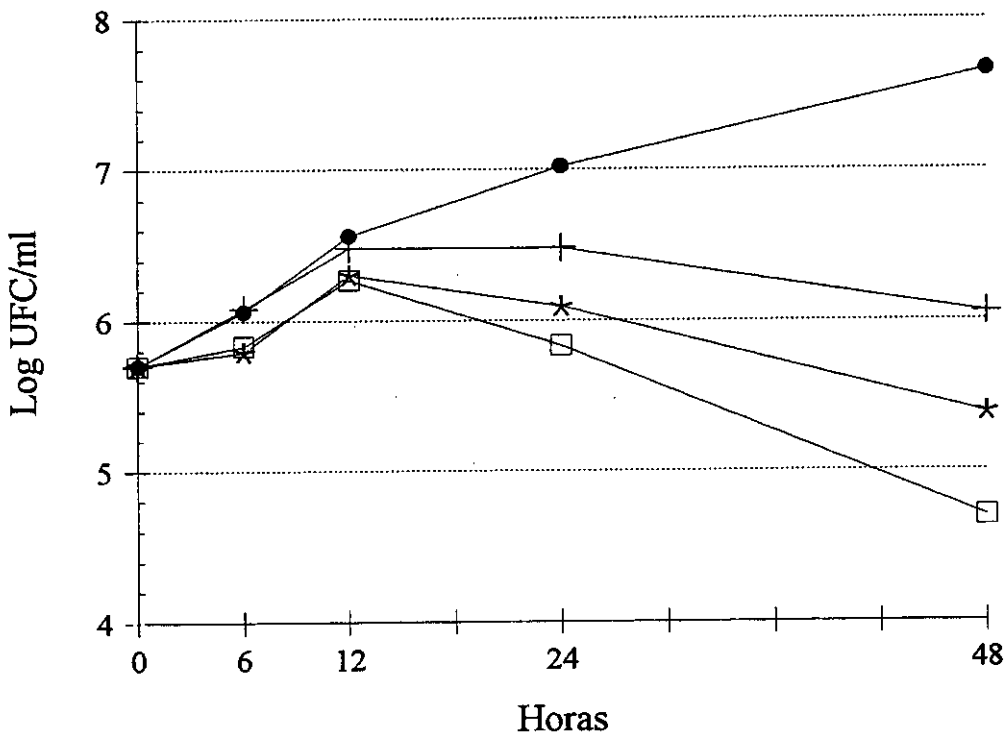
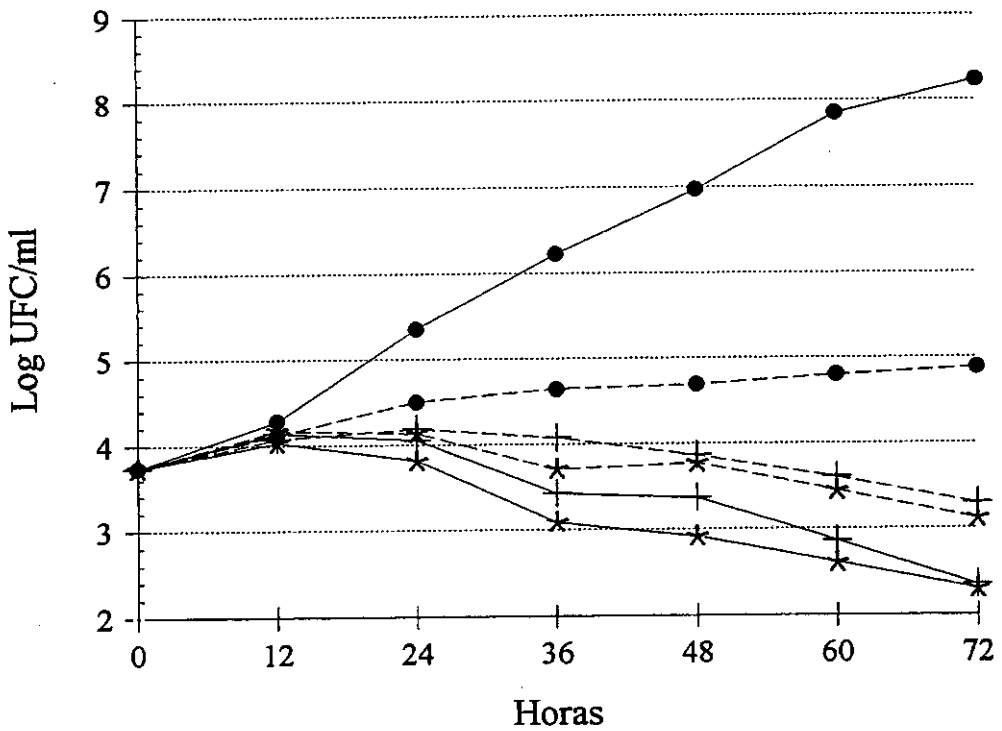


FIGURA 12.

Cinética de muerte de *Cr. neoformans* CECT 1078 inducida por fluconazol a concentraciones de 16 µg/ml (+) y 32 µg/ml (*), en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10% de suero humano y con un inóculo de 10^3 UFC/ml así como 8 µg/ml (+), 16 µg/ml (*) y 32 µg/ml (□) para un inóculo de 10^5 UFC/ml. Los cultivos control libres de quimioterápico se representan como: (●) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10 % de suero.

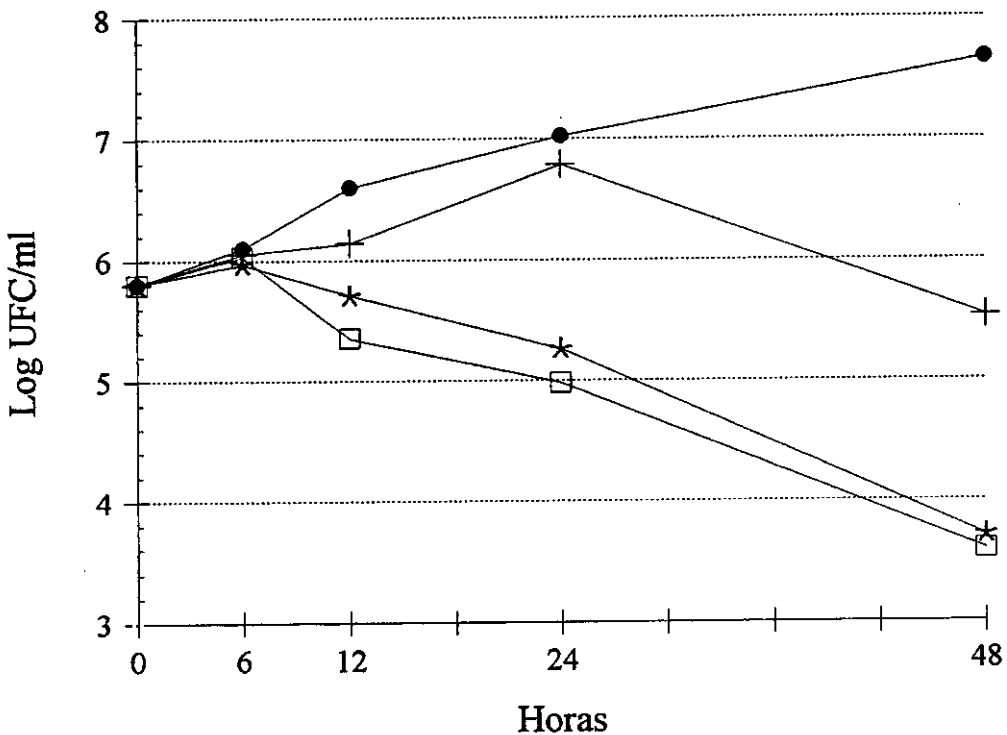
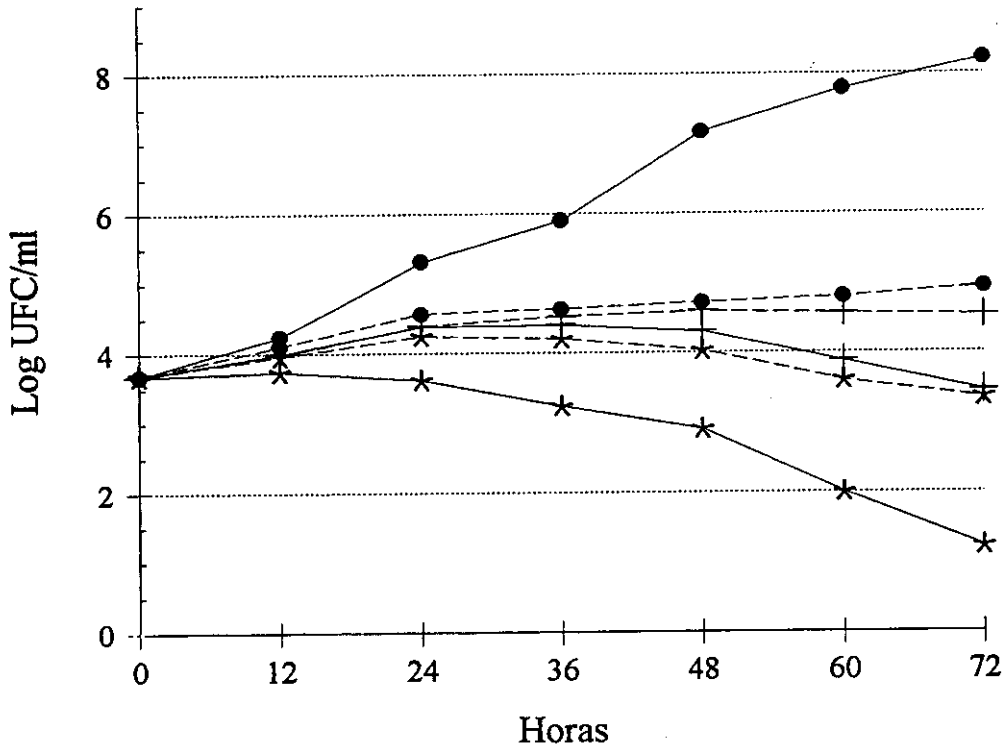


FIGURA 13.

Cinética de muerte de *Cr. neoformans* CECT 1078 inducida por UK 109,496 a concentraciones de 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (+) y 4 $\mu\text{g/ml}$ (*), en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10% de suero humano y con un inóculo de 10^3 UFC/ml así como 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (+), 1 $\mu\text{g/ml}$ (*) y 4 $\mu\text{g/ml}$ (□) para un inóculo de 10^5 UFC/ml. Los cultivos control libres de quimioterápico se representan como: (●) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 10 % de suero.

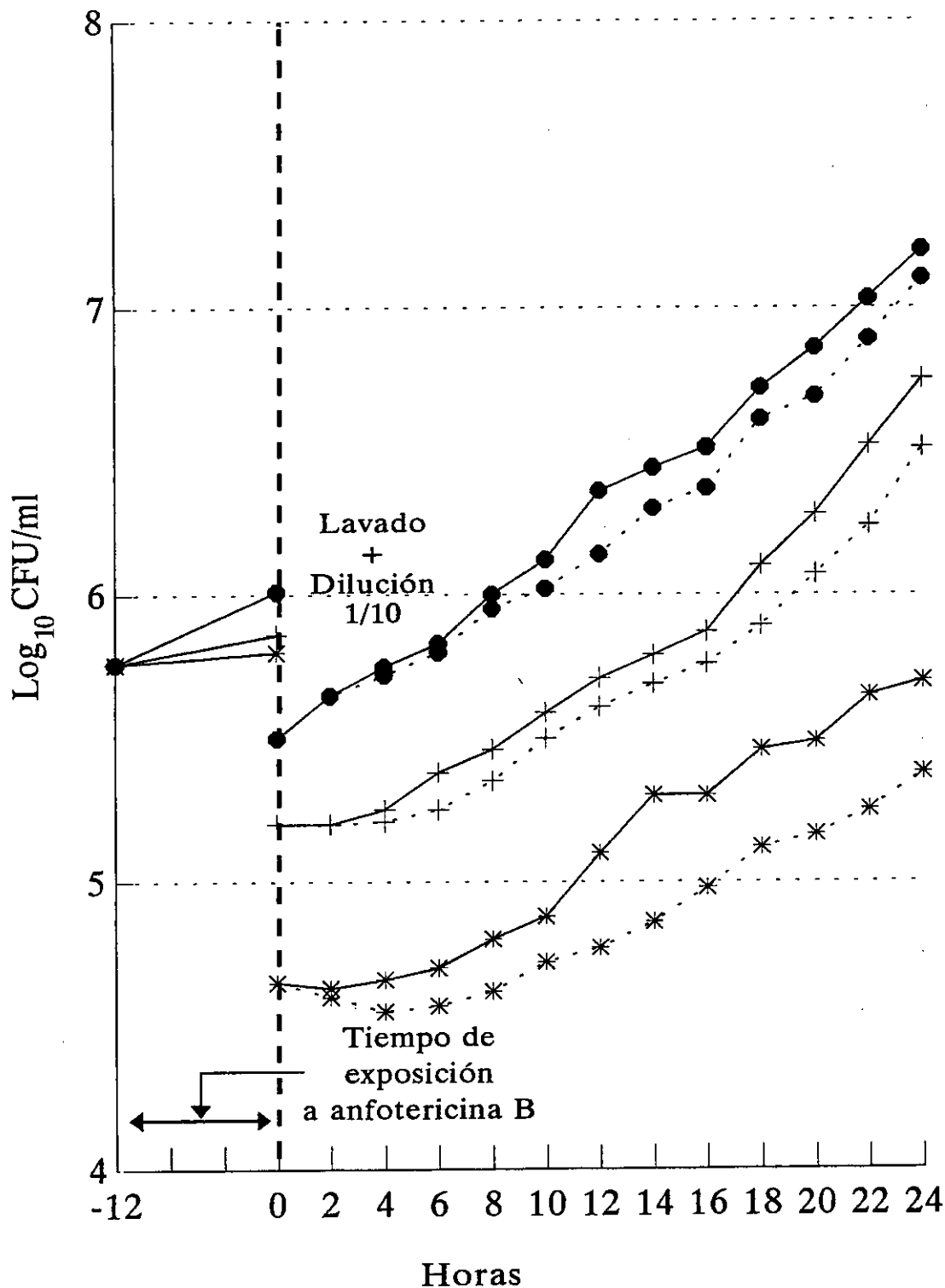


FIGURA 14. Efecto postantifúngico (línea continua) y de concentraciones subinhibitorias (línea discontinua) de anfotericina B frente a *Cr. neoformans* CECT 1078 tras 12 horas de exposición al fármaco. Las concentraciones empleadas fueron: Control (●), 1 µg/ml (+) y 4 µg/ml (*).

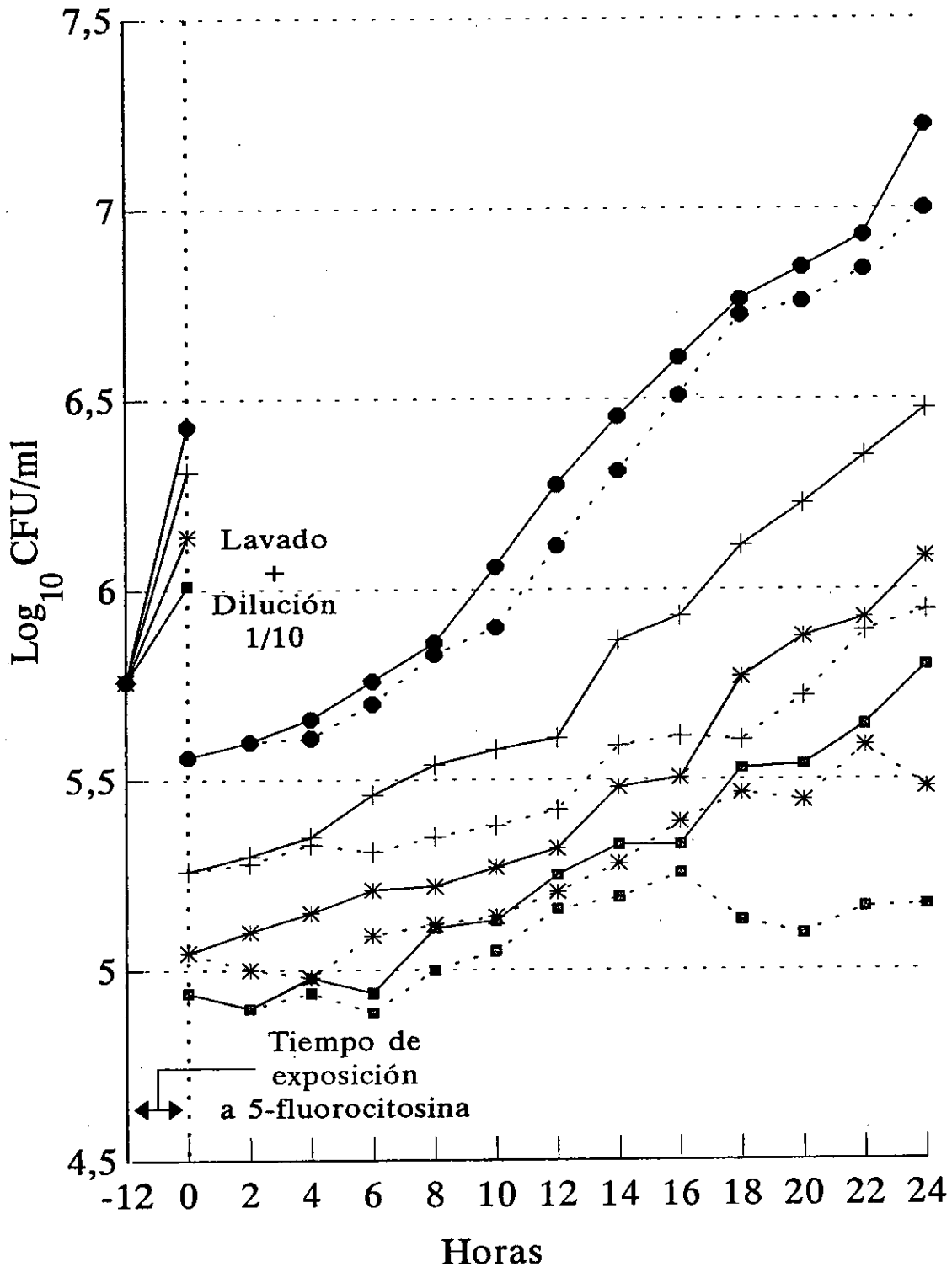


FIGURA 15. Efecto Postantifúngico (línea continua) y de concentraciones subinhibitorias (línea discontinua) de 5-fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* CECT 1078 tras 12 horas de exposición al fármaco. Las concentraciones empleadas fueron: Control (●), 32 $\mu\text{g/ml}$ (+), 64 $\mu\text{g/ml}$ (*) y 100 $\mu\text{g/ml}$ (□).

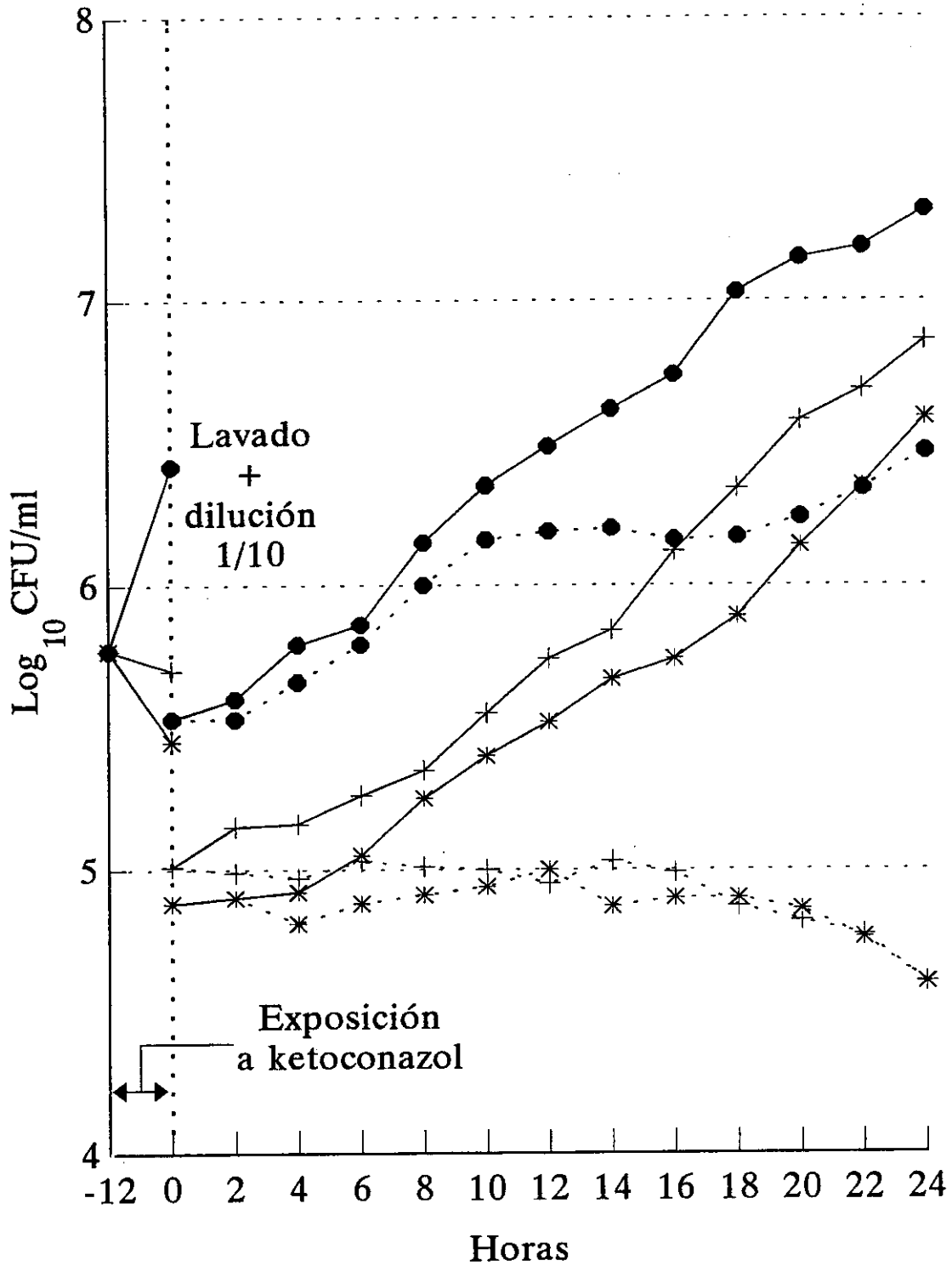


FIGURA 16.

Efecto postantifúngico (línea continua) y de concentraciones subinhibitorias (línea discontinua) de ketoconazol frente a *Cr. neoformans* CECT 1078 tras 12 horas de exposición al fármaco. Las concentraciones empleadas fueron: Control (●), 1 $\mu\text{g/ml}$ (+) y 4 $\mu\text{g/ml}$ (*).

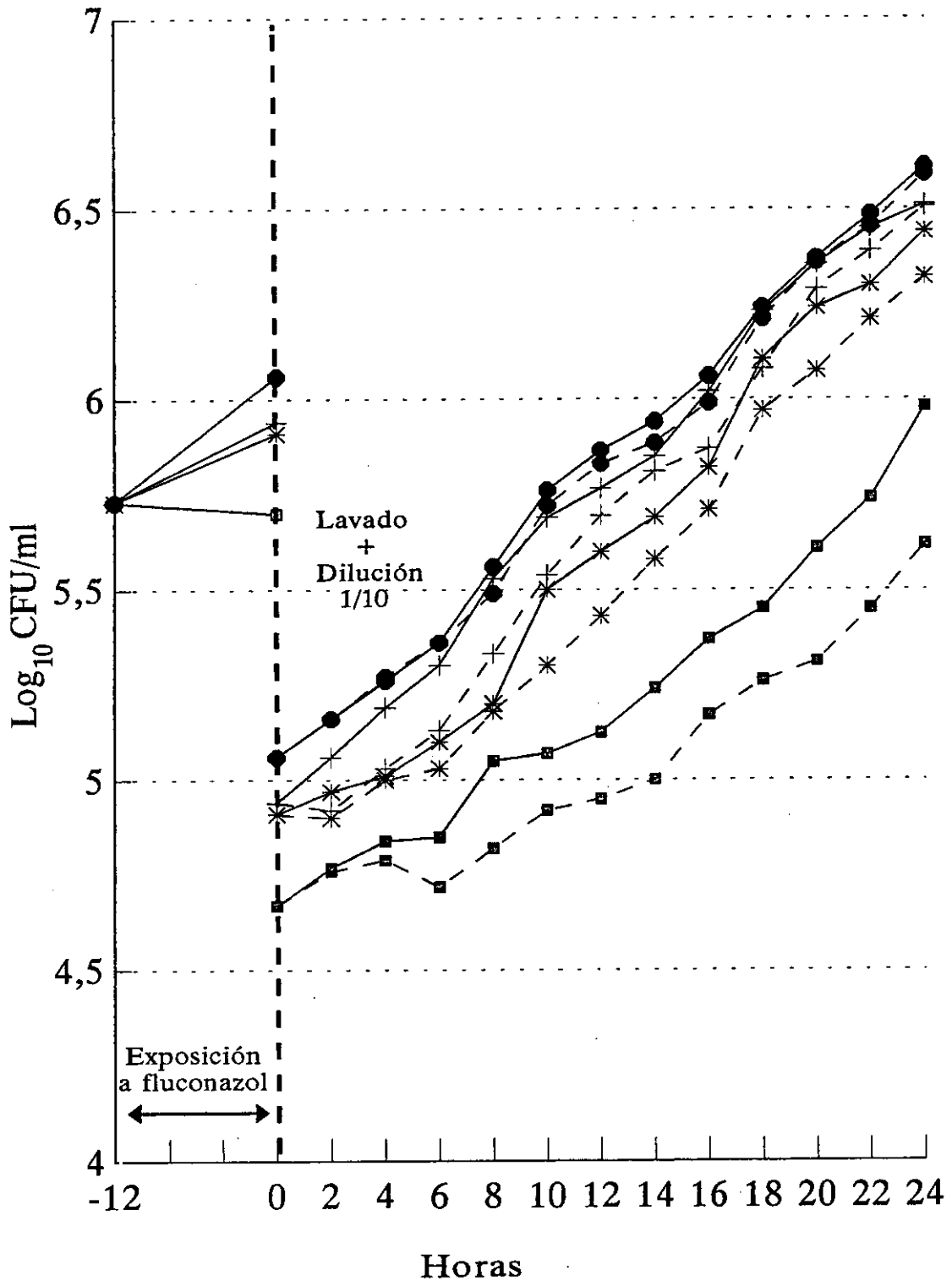


FIGURA 17.

Efecto postantifúngico (línea continua) y de concentraciones subinhibitorias (línea discontinua) de fluconazol frente a *Cr. neoformans* CECT 1078 tras 12 horas de exposición al fármaco. Las concentraciones empleadas fueron: Control (●), 8 $\mu\text{g/ml}$ (+), 16 $\mu\text{g/ml}$ (*) y 32 $\mu\text{g/ml}$ (□).

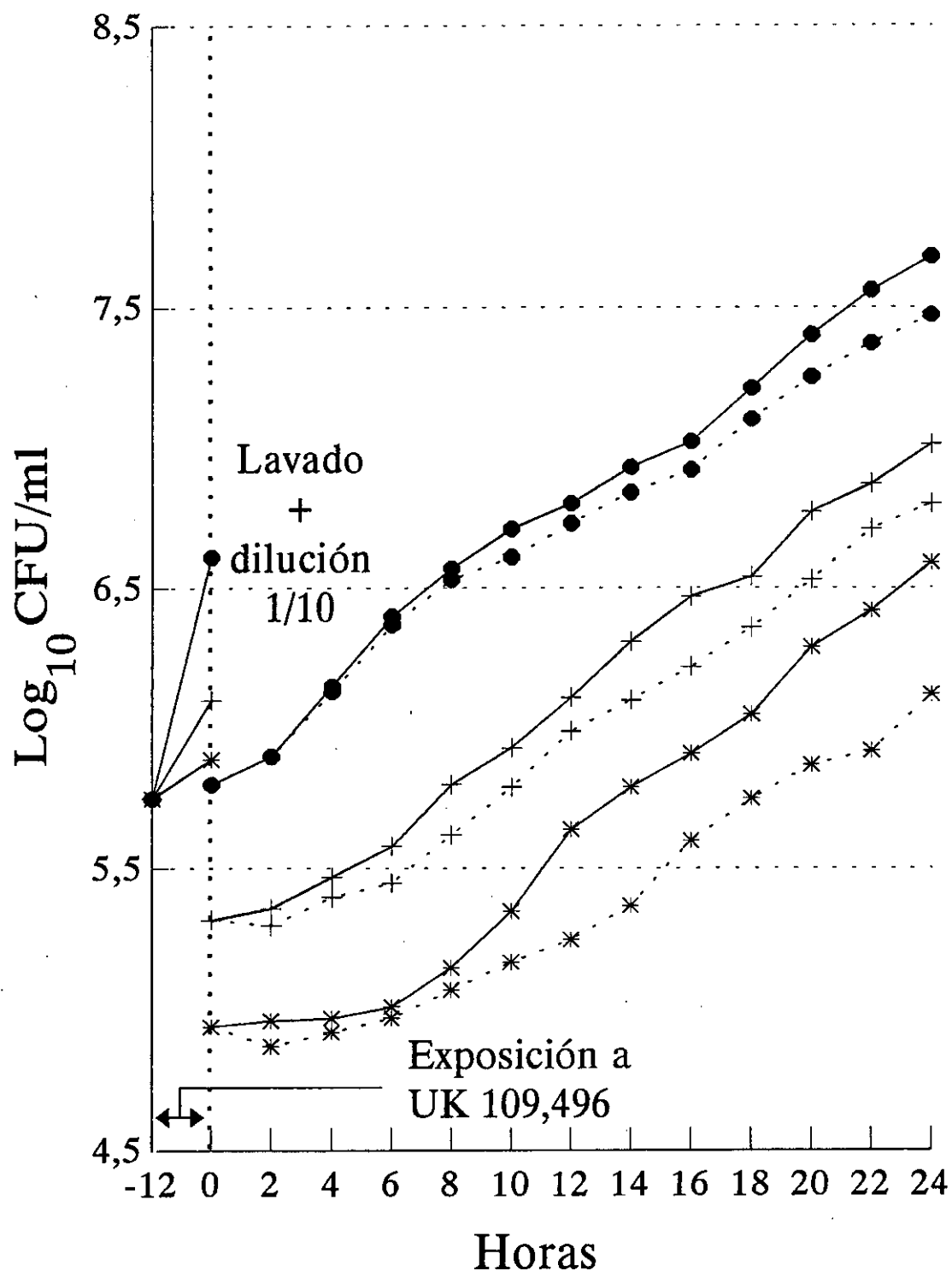


FIGURA 18.

Efecto postantifúngico (línea continua) y de concentraciones subinhibitorias (línea discontinua) de UK 109,496 frente a *Cr. neoformans* CECT 1078 tras 12 horas de exposición al fármaco. Las concentraciones empleadas fueron: Control (●), 1 µg/ml (+) y 4 µg/ml (*).

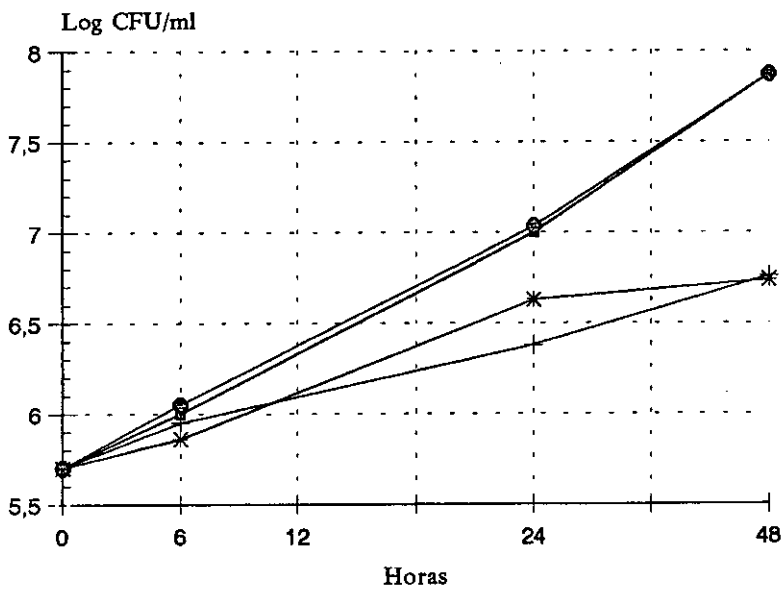
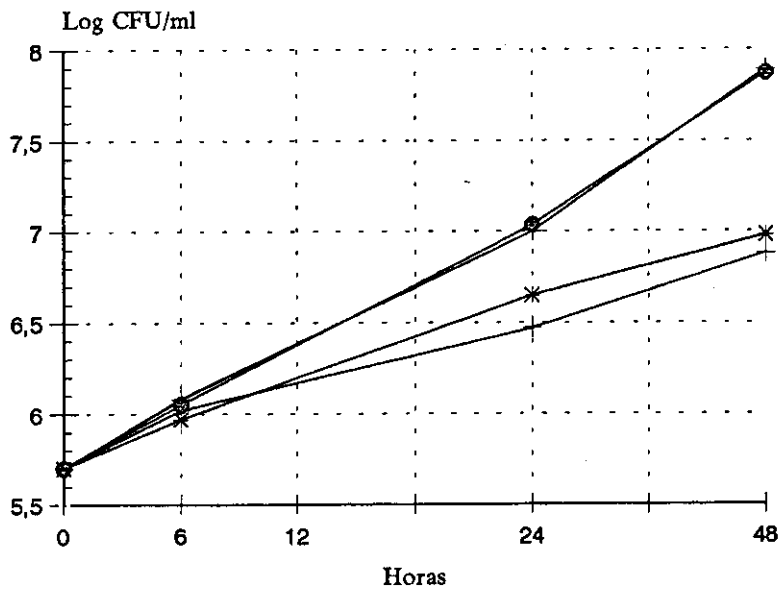


FIGURA 19.
Influencia del suero humano normal (+), suero termoinactivado (*) y PBS (□) en proporciones del 10% (arriba) y 50% (abajo) sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* CECT 1078. Control (●).

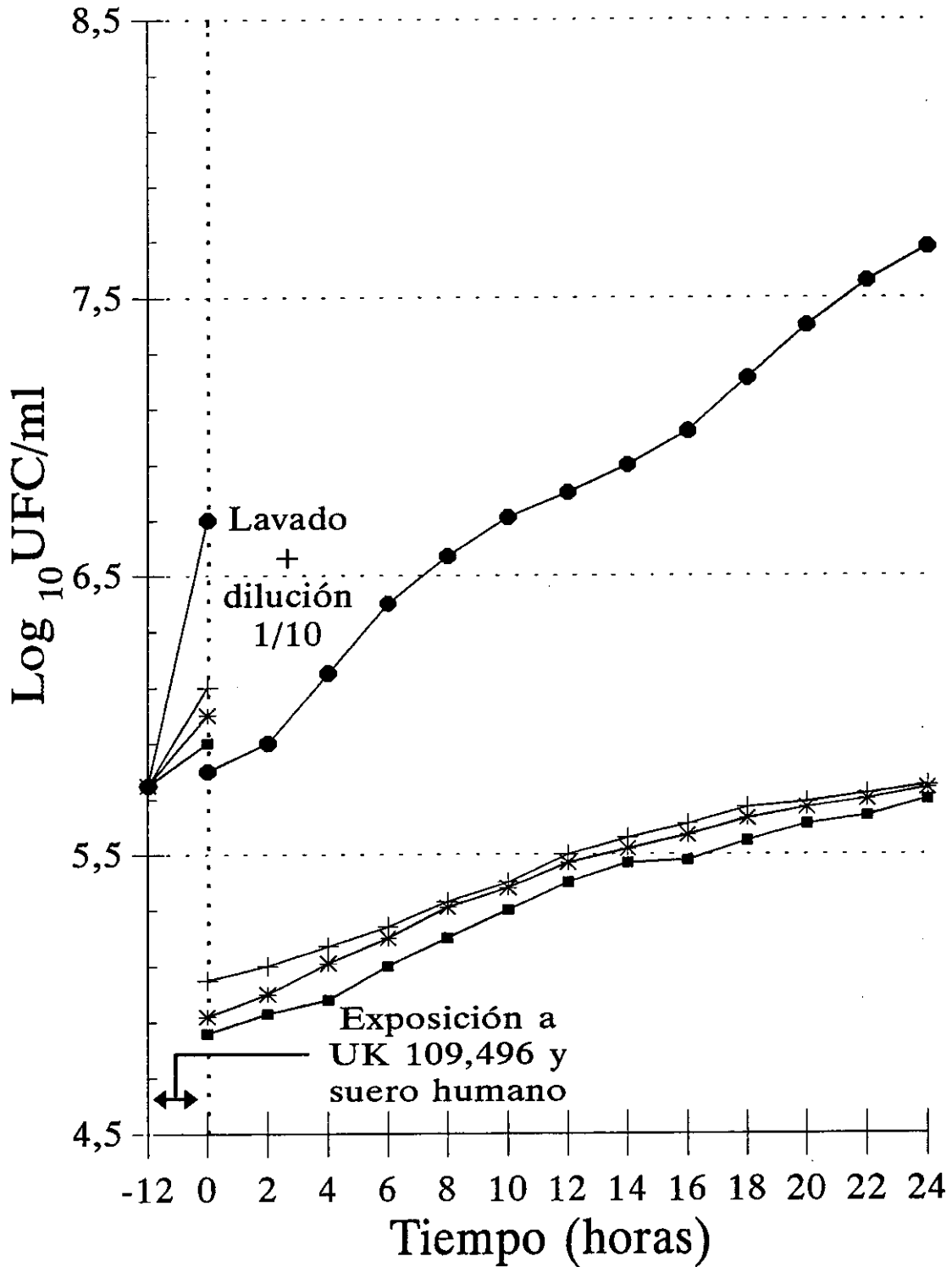


FIGURA 20.

Efecto postantifúngico de UK 109,496 frente a *Cr. neoformans* CECT 1078 tras 12 horas de exposición al fármaco y en presencia de un 10% de suero humano. Las concentraciones empleadas fueron: Control (●), 0,125 µg/ml (+) 1 µg/ml (*) y 4 µg/ml (□).

DISCUSSION

Una de las ventajas de los agentes antiinfecciosos frente al resto de los fármacos es que su diana, el microorganismo, puede ser aislado del foco de infección y ser estudiado en el laboratorio. De este modo, podemos averiguar la sensibilidad del patógeno a un fármaco por medio de las pruebas de sensibilidad. Así, también es posible comprobar qué concentraciones inducen un daño suficiente al microorganismo como para inhibir (CMI) o erradicar (CMB) su crecimiento (19).

Otra posibilidad que permite el trabajar con microorganismos, es que se puede determinar cuáles son capaces de resistir la acción del fármaco y convertirse, por tanto, en un patógeno “peligroso” o al menos complicado que erradicar.

Sin embargo, esta información es insuficiente si queremos conocer cuál es la actividad del fármaco durante el proceso de infección. Para ello, podemos emplear los parámetros farmacodinámicos, que nos proporcionan una base racional para la determinación de los regímenes de dosificación, en cuanto a tamaño de dosis e intervalo de dosificación (18,245).

En farmacodinamia hemos de considerar la concentración de antibiótico, tanto en suero como en el lugar de infección, obtenida tras su administración, para poder compararla con la presencia de masa microbiana en el foco infeccioso; así se establece una relación dosis/actividad a lo largo del tiempo (3).

En este caso, es muy importante tener en cuenta la farmacocinética del compuesto antimicrobiano puesto que las concentraciones de fármaco no son constantes a lo largo del tiempo. De esta manera, podremos dividir la farmacodinamia del antimicrobiano en 4 etapas (2):

1. Tiempo en el que el fármaco se encuentra a concentraciones superiores a la CMB.
2. Tiempo en el que el fármaco se encuentra a concentraciones inferiores a la CMB, pero superiores a la CMI.
3. Efecto persistente del antimicrobiano con concentraciones inferiores a la CMI (PAE).
4. Recrecimiento de la población microbiana.

En la presente discusión veremos, para todos los antifúngicos, la actividad microbiológica por medio de los tests de sensibilidad antifúngica, y posteriormente, los procesos farmacodinámicos que pueden explicar el comportamiento de los compuestos antifúngicos *in vitro*. No obstante, para poder entender todos estos pasos, primeramente discutiremos la metodología empleada, ya que en el caso de los antifúngicos no se encuentra del todo estandarizada.

METODOLOGIA EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y FARMACODINAMIA ANTIFUNGICA

Las pruebas de sensibilidad en antifúngicos presentan muchos aspectos de controversia y dificultad a la hora de interpretar y emitir los resultados. Es esta razón suficiente para que dichas pruebas se realicen con métodos lo más estandarizados posibles (24,25,115). Pero, aún así, no siempre se puede alcanzar un criterio único por medio del cual los resultados sean homogéneos interlaboratorio, problema que existe desde que se comenzaron a realizar estos ensayos con los hongos. (115,124,132,205,246-248).

Son numerosos los factores que pueden influir en el estudio de la sensibilidad de los microorganismos a un fármaco (pH, atmósfera, composición del medio, temperatura, tiempo de incubación, estabilidad del antimicrobiano, inóculo, etc.) y, por tanto, muchas las posibles vías de desviación de un resultado estándar. En nuestro estudio las pruebas de sensibilidad se realizaron ajustándonos en la medida de lo posible a las normas dictadas por la NCCLS, a no ser que alguna variable de experimentación requiriese alguna modificación, por ajuste con otro parámetro farmacodinámico, o por aproximación a condiciones fisiológicas humanas.

Como hemos visto, los inóculos empleados fueron dos; uno elevado de $1-5 \times 10^5$ UFC/ml y otro de menor número de microorganismos $1-5 \times 10^3$ UFC/ml, siempre preparados por métodos de ajuste espectrofotométrico (a 530 nm de longitud de onda) como recomiendan estudios multicéntricos de estandarización previamente realizados (133). La NCCLS (24,25) especifica que el número de células incluidas en el inóculo inicial de las pruebas de sensibilidad, han de ser lo más bajas posibles, sobre todo en aquellos casos en los que la determinación del valor de inhibición se realiza espectrofotométricamente. Los valores señalados por este comité actualmente han de incluirse entre $0,5 \times 10^3$ UFC/ml y $2,5 \times 10^3$ UFC/ml para técnicas de macrodilución en medio líquido (24,118). Si se emplea el inóculo de 10^3 UFC/ml, el punto de corte o inhibición se puede encontrar con más facilidad (249), por eso es por lo que las pruebas de laboratorio clínico lo recomiendan. Sin embargo, no todos los microorganismos crecen bien bajo estas condiciones. En este caso se encuentra incluido *Cr. neoformans*, cuyo crecimiento es demasiado lento, y la reducción de inóculo no mejora la rapidez en la lectura. Como sugerencia procedente de algunos autores, en el documento M27-T de la NCCLS de 1995 (25), ya se ha introducido como modificación al anterior documento M27-P de 1992 (24) la posibilidad de aumentar el inóculo de partida en las pruebas de sensibilidad con

Cr. neoformans. Esta modificación implica que al no poder eliminar la totalidad de la masa microbiana (o al menos el 90%) por ser demasiado elevada, se ha de referir la CMI como el valor de inhibición del 50% (IC₅₀). Además, en los experimentos realizados en un laboratorio de investigación de microbiología, se suelen utilizar tamaños de inóculo mayores (27). Esto se explica asumiendo la necesidad de una masa microbiana (fúngica en este caso) elevada, que pueda sobrevivir en parte a lo largo del proceso de actividad del fármaco, permitiendo estudiar así el desarrollo farmacodinámico. Es por esto por lo que en nuestro trabajo hemos incluido también los dos tamaños de inóculo. Considerando que las curvas de letalidad puedan inducir un descenso en la viabilidad importante en los microorganismos, o que la eliminación del antimicrobiano en la prueba del PAFE requiere un lavado del antimicrobiano por dilución del volumen, que oscila de 10 a 1000 veces según el estudio (11,71,250), hace necesario la utilización de estos tamaños de inóculo. También es importante en las pruebas de sensibilidad, el estudio del comportamiento de diferentes tamaños poblacionales frente a los fármacos ya que pueden mostrarnos la existencia de un efecto inóculo. Así por ejemplo, en el caso concreto de los antifúngicos que no presentan una actividad totalmente fungicida a concentraciones por encima de la CMI y tamaño de inóculo bajo, es muy probable que su CMI se vea aumentada frente a un tamaño de inóculo alto donde los microorganismos se reproducen más rápidamente (41).

El medio de cultivo es otro punto de interés a la hora de considerar la sensibilidad de los antifúngicos y de los antimicrobianos en general. Un medio de cultivo para estas pruebas no debe incluir ningún componente que potencie o inhiba la actuación del antifúngico, así como que interfiera en el desarrollo normal del microorganismo (20). El número de medios existentes para el cultivo de hongos es muy elevado, y son coincidentes siempre en la riqueza que presentan en su composición. La tendencia actual es de utilizar medios de composición conocida que en ocasiones son empleados en cultivos celulares, como el caso del RPMI o el HR (High Resolution Medium), los cuales posibilitan una excelente reproductibilidad y consistencia en los resultados. Sin embargo, el medio RPMI 1640 (que es el recomendado por la NCCLS para las determinaciones clínicas), no favorece el desarrollo adecuado de determinados hongos, como es el caso de *Cr. neoformans* (132). Por el contrario otros medios como el bYNB-G permiten que esta levadura se reproduzca más rápidamente, aunque como contraposición puede elevar en determinadas ocasiones los valores de inhibición (251).

Cuando la determinación del valor de inhibición del antimicrobiano se realiza visualmente, la claridad del medio es muy importante. Un problema añadido en este aspecto

con anfotericina B es la interferencia del antifúngico con la lectura espectrofotométrica. La densidad colorimétrica que el fármaco induce en el medio a altas concentraciones puede aumentar el valor de inhibición verdadero, introduciendo un error en la lectura. Por este motivo, además de la acotación de valores de resistencia, la NCCLS fija de antemano unos intervalos en las pruebas de sensibilidad, en las cuales la lectura espectrofotométrica sea visible (25).

Tanto la temperatura como la acidez del medio son puntos de discrepancia a la hora de elegir las condiciones óptimas de cultivo para un microorganismo. Normalmente las levaduras se desarrollan mejor en un medio a pH ligeramente ácido (252), lo que podría acelerar la determinación del punto de corte del antifúngico. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos son más estables a pH cercano al fisiológico (pH 7 a 7,4) aunque existen algunas excepciones (bifonazol pH 6; fluconazol y cilofungina pH 8) (118).

Para que el equilibrio ácido básico del cultivo se mantenga homogéneo a lo largo de la prueba de sensibilidad, ha de emplearse un tampón salino, que en general no influye directamente en la actividad antifúngica (136). Para nuestro estudio, el pH de los cultivos fue siempre ajustado a 7,2, lo que permitió que el antifúngico actuase óptimamente aunque el hongo no creciera a la mayor velocidad que pueda desarrollar. Por ello, las lecturas de los cultivos se tuvieron que realizar a las 48 y 72 horas de experimento (según el inóculo empleado). El tampón elegido fue el fosfato (descrita su composición en el anexo II), puesto que, como hemos visto, la presencia de bicarbonato en el cultivo de crecimiento de *Cr. neoformans* influye directa y significativamente en el crecimiento de dicha levadura, lo que implica a su vez modificación en el tiempo de lectura y resultado del test.

La temperatura idónea para los cultivos de levaduras se establece entre 35°C y 37°C, si bien hay mayor equivalencia entre los resultados interlaboratorio con 35°C (24). El caso de *Cr. neoformans* es algo especial pues algunos autores afirman que con 28-30°C es cuando el hongo se desarrolla mejor (253,254). Otros autores en cambio aseguran que 35°C es la temperatura óptima a la que puede crecer la levadura, si bien debe prolongarse el tiempo de incubación. Para nuestro estudio, empleamos la temperatura constante de 37°C, ya que las diferencias en el crecimiento no eran especialmente significativas, y así se considera de manera más fidedigna un parámetro importante en la infección, la temperatura corpórea.

El tiempo de incubación se define como el mínimo necesario para que se manifieste el efecto del antifúngico, tratando de evitar así datos que nos induzcan a la interpretación de falsas resistencias al fármaco, ya que extender el periodo de incubación eleva o reduce los

valores de la CMI de algunos antifúngicos (130). Este parámetro está claramente influido por el tamaño de inóculo, necesitando intervalos de tiempo de lectura mayores cuanto más grande sea la cantidad de microorganismos presentes en el cultivo al inicio de la prueba. Así nosotros empleamos tiempos de lectura de 24 y 48 horas cuando el inóculo fue de 10^5 UFC/ml y de 48 y 72 horas cuando el inóculo fue de 10^3 UFC/ml siendo los de referencia para nosotros los más tardíos.

Todos los cultivos se mantuvieron siempre en agitación orbital de 150 rpm para evitar la sedimentación del hongo. Cuando *Cr. neoformans* se incubaba en condiciones estáticas, las levaduras se depositan en el fondo del cultivo formando una capa celular que modifica la actividad del antifúngico, ya que éste no alcanza de igual manera a todas las células. El contacto insuficiente del antifúngico con las levaduras es uno de los puntos a tener en cuenta, ya que influye directamente en la resolución de una CMI. Se ha descrito ya que en muchos casos cuando las células se acumulan (sobre todo en los meniscos del tubo), la CMI varía (33,37). Esta es entre otras una de las razones por las que se decidió utilizar el método de macrodilución frente a la microdilución.

La lectura de los resultados es quizá uno de los puntos más discutidos en lo relativo a pruebas de sensibilidad con hongos. Son varios los métodos definidos para la determinación del valor de inhibición. Nosotros hemos empleado el de la lectura espectrofotométrica de los diferentes porcentajes de inhibición (25%, 50% y 90%). Este método se ha considerado como un valor poco susceptible a factores como la temperatura tiempo de incubación, agitación y técnica empleada, además de que presenta buena correlación con modelos experimentales en animales (255).

Al hablar de coeficiente terapéutico siempre hemos reseñado 4 como referencia; sin embargo, no podemos fijar este valor como estándar, ya que por definición este parámetro depende de la eficacia terapéutica y, por tanto, estará influido por parámetros farmacocinéticos presentes en modelos experimentales que no poseemos. Sin embargo, y a modo de información, es interesante el utilizar este parámetro con los valores especificados por Neu (30) para bacterias.

**ACTIVIDAD DE LOS AGENTES ANTIFÚNGICOS FRENTE A
Cr. neoformans. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD**

Por definición de CMI podemos averiguar cuál es la concentración que inhibe el crecimiento de los microorganismos en un medio de cultivo, pudiendo aplicar inmediatamente este concepto a un antifúngico. El problema que surge en este paso es la escasez de métodos estandarizados, asociados a la complejidad de la determinación de los valores inhibitorios con dichos compuestos. Sin embargo, el fármaco que presenta una homogeneidad más clara en los resultados interlaboratorio en pruebas de sensibilidad antifúngica es anfotericina B. Una vez elegida la técnica y medios, los resultados para este fármaco son más estables que para otros antifúngicos (115). Han de vigilarse especialmente las variaciones de pH y exposición a la luz, que pueden alterar la actividad del fármaco (256,257). Sin embargo, la lectura de los resultados, que es uno de los puntos controvertidos en las pruebas de sensibilidad a antifúngicos, suele ser clara y se determina visualmente (sin necesidad de lectores ópticos). En general, se considera que una concentración de anfotericina B es inhibitoria cuando el cultivo se presenta ópticamente claro (o transparente) en comparación con un control de crecimiento libre de antifúngico. En este punto hemos de tener en cuenta un factor importante, que es el tamaño de inóculo (132,248).

En nuestro estudio, la transparencia de los cultivos solamente ha podido obtenerse cuando el inóculo de partida utilizado era de 10^3 UFC/ml. La inhibición total del crecimiento expresada como transparencia del cultivo, coincide con la IC_{90} de los antifúngicos, es decir, con valores de inhibición del 90% de la población. Estos valores sólo se encuentran dentro de los límites determinados por la NCCLS (0,0313-16) en el caso de 10^3 UFC/ml. Si consideramos el inóculo inicial elevado (10^5 UFC/ml), los valores de IC_{90} son superiores a 16 μ g/ml. Estos resultados no nos sorprenden, ya que están dentro de la línea de los obtenidos por otros autores. Así, Turnidge *et. al.* 1994 (64), bajo las mismas condiciones de cultivo (medio, temperatura, pH) y un inóculo de 10^5 UFC/ml, obtuvieron valores de CMI muy elevados (25 μ g/ml para anfotericina B). La única diferencia con nuestros experimentos fue la forma de determinar el punto de corte, que fue visual, mientras que nosotros lo realizamos espectrofotométricamente, aunque a priori, esto no debe suponer mucha discrepancia puesto que anfotericina B es de los fármacos antifúngicos que produce un corte de crecimiento claro.

Estos valores tan elevados presentan un gran inconveniente, ya que se hallan claramente sobre los límites de toxicidad (149). Así, haciendo uso del concepto del cociente inhibitorio (30), obtenemos unos valores de IQ de 0,16 y <0,25 para el estudio de Turnidge y nuestro respectivamente. Teniendo en cuenta que los valores de IQ que hemos considerado son los que superan 4, éstos se encuentran lejos de ser unos datos de utilidad a la hora de ser empleados como predictores de la eficacia del fármaco.

Se ha de acudir a valores de IC₂₅ para que las concentraciones de anfotericina B se vean dentro de los límites de toxicidad, siendo referidos éstos como 2-4 µg/ml (39 y 59 naranja).

Al utilizar las concentraciones inhibitorias del 50 y 25% de la población fúngica, ya operamos con valores inhibitorios dentro de los límites de referencia de la NCCLS, aunque continúan siendo tóxicos para la administración en humanos en el caso de la IC 50% (16 µg/ml de IQ = 0,25). Para la IC₂₅, tanto a las 24 como a las 48 horas, el valor inhibitorio fue de 1 µg/ml, lo que ya está dentro del intervalo de no toxicidad del fármaco; esto garantiza un acercamiento al éxito terapéutico (IQ superior a 4). Otros autores como Dernoumi *et. al.* (258), trabajando con *Cr. neoformans* a tamaño de inóculo de 10⁵UFC/ml y considerando la inhibición parcial del 30% (IC₃₀) obtuvieron un valor para anfotericina B de 0,5 µg/ml, la cual se encuentra en una clara linealidad con nuestros resultados. Cuando nos fijamos en los valores de la cepa de *Cr. neoformans* procedente de una muestra clínica, ya sí que es clara la baja sensibilidad de este microorganismo a anfotericina B. Un valor de IC₉₀ a inóculo bajo y en presencia de 1 µg/ml de antifúngico genera un IQ de 4 µg/ml, que está en el límite de la eficacia terapéutica, aunque próximo aún al margen de toxicidad estandarizado (tolerancia relativa hasta 4 µg/ml)

La mayoría de los estudios en los últimos años han optado por el tamaño de inóculo más reducido para la determinación de sensibilidad (136,259). Nuestros resultados están en relación con los encontrados en la literatura, aunque los métodos no siempre coincidan.

Tanto es así, que como ya mencionamos previamente, la CMI para la mayoría de las levaduras, actualmente está definida para este tamaño de inóculo, ya que la reproductibilidad de los resultados es mayor. Sin embargo, los valores no son los mismos que para 10⁵UFC/ml, sino inferiores. Esto se puede describir como un efecto inóculo de anfotericina B. Si al reducir el inóculo obtenemos valores de inhibición menores, habremos aumentado la eficacia, lo cual no es una ventaja en términos terapéuticos, pues de lo que se trata es de aumentar la eficacia sin reducir el inóculo (32). Por tanto, el hecho de que 10³UFC/ml sea un inóculo estándar es

exclusivamente un mecanismo o herramienta de trabajo para determinar cuál es el punto de sensibilidad para una levadura, pero no nos va a aportar ninguna información relevante respecto a la eficacia terapéutica del fármaco. Es, por tanto, necesario aumentar la información que suministran las pruebas de sensibilidad con otros estudios farmacológicos más exhaustivos.

Los valores de inhibición del 90% fueron diferentes dependiendo del tiempo de medición. Según algunos autores (135) la CMI tiende a aumentar con el tiempo de incubación. Pfaller *et. al.* (260) afirman que el crecimiento óptimo de las levaduras se alcanza tras 24 horas en cultivo y en ese momento la inhibición existente refleja el grado de sensibilidad del microorganismo al fármaco. Nosotros hemos encontrado un descenso en la actividad de anfotericina B frente a *Cr. neoformans* a partir de las muestras obtenidas en las horas 48 y 72. Debido a la fisiología del microorganismo (con tiempos de generación muy largos), resulta imposible considerar los resultados de las horas 24 ó 48 como óptimos para la obtención del valor de inhibición aunque estos tiempos se aproximan más a los intervalos de dosificación reales del fármaco. En el caso de *Cr. neoformans* se necesita un periodo de exposición al fármaco de al menos 72 horas para que el resultado sea fiable (referido siempre claro está, a un inóculo bajo como el recomendado por la NCCLS).

En el caso de 5-fluorocitosina y al igual que los demás antifúngicos, la determinación del punto de corte (o inhibitorio) es difícil de determinar. Para anfotericina B, hemos visto que éste se puede definir como la concentración a partir de la cual los cultivos aparecen como ópticamente claros. Para 5-fluorocitosina (y azoles), sin embargo, se considera como valor de CMI aquel que inhiba un 80% del crecimiento (25,116). Para nuestro estudio, se consideró la $IC_{80} = IC_{90}$, pues coincidieron ambas en valor de inhibición para las 2 cepas de *Cr. neoformans* empleadas. El modificar el tamaño de inóculo hizo que los valores inhibitorios variasen. Con 10^5 UFC/ml, las dos cepas mostraron valores muy altos (considerados siempre dentro de los límites de la NCCLS), y bajaron cuando se empleó 10^3 UFC/ml, aunque de forma más clara en el caso del aislado clínico. Considerando los valores de inhibición a las 72 horas, y 10^3 UFC/ml, la cepa estándar mostró una sensibilidad reducida a 5-fluorocitosina, mientras que el aislado clínico fue bastante más sensible.

En general, se puede considerar como resistente una cepa que presente una CMI de 64 μ g/ml o superior para 5-fluorocitosina (162,182). De hecho, la NCCLS (en sus documentos M-27 P y T) indica que dos cepas control deben emplearse una sensible con CMI 2-8 μ g/ml, y otra resistente con CMI igual o superior a 64 μ g/ml. Estas diferencias en la inhibición son

frecuentes en la bibliografía. Así, Shadomy *et.al.* (167,182,261), pioneros en los estudios con 5-fluorocitosina, vieron que podían encontrar cepas con valores de sensibilidad muy dispares. En general, estos valores eran altos, puesto que empleaba inóculos de 10^5 UFC/ml, pero en ocasiones podían encontrarse con valores próximos a $4 \mu\text{g/ml}$ en la mayoría de las cepas estudiadas. En trabajos ya más recientes, vemos que la CMI continúa estableciéndose entre márgenes muy concretos ($0,25\text{-}8 \mu\text{g/ml}$) en cepas de origen clínico (259).

Aparentemente, la causa de los valores de sensibilidad tan altos de 5-fluorocitosina pueden deberse a la facilidad para generar mutaciones en las enzimas del hongo en los procesos de tratamiento. La principal mutación posiblemente se origina a nivel de citosin desaminasa, que es la encargada de convertir la 5-fluorocitosina en 5-fluoruracilo, el cual a su vez es el agente directo del efecto antifúngico por interferir en la síntesis de RNA al incorporarse en esta cadena (262,263). Otros enzimas no vitales para la supervivencia del hongo y que pueden mutar son la citosín permeasa, que permite la entrada de la 5-fluorocitosina en el hongo y la uridin monofosfato pirofosforilasa, que convierte a la 5-fluorocitosina en 5-fluorodesoxiuridin monofosfato, inhibidor directo del timidilato sintetasa, y, por tanto, de la síntesis de DNA (177).

Otro sistema que podría estar relacionado con la aparición de resistencia es la mayor producción de bases pirimidínicas por el hongo, lo que reduciría la actividad de la 5-fluorocitosina (263).

Se han definido 2 tipos de resistencia a 5-fluorocitosina: en una de ellas los hongos son siempre resistentes a altas concentraciones del antifúngico y otras que, en un primer contacto son sensibles a bajas concentraciones del fármaco pero tras el tratamiento la resistencia incrementa (264). Este tipo de resistencia progresiva con el tratamiento ya fue descrita por Shadomy (181) quién observó que cepas aisladas de pacientes antes del tratamiento con 5-fluorocitosina tenían una CMI de $4\mu\text{g/ml}$, y tras el tratamiento los valores superaban los $1000 \mu\text{g/ml}$. Nuestro caso a priori podría inducir a pensar que la cepa estándar presenta una resistencia del primer tipo que hemos descrito. Teniendo en cuenta la recomendación de que las concentraciones de 5-fluorocitosina no superen valores de $100 \mu\text{g/ml}$ en suero (265,266), estaríamos ante un caso, en el que en aquellos pacientes enfermos por esta cepa, el emplear un fármaco tan próximo a los niveles de toxicidad es comprometido. Si consideramos el cociente inhibitorio (IQ) como guía para esta valoración la cepa de *Cr. neoformans* CECT 1078 tendría un valor de 1,5, lo que no es aconsejable para el tratamiento. Sin embargo, con la cepa

procedente de un aislado clínico, dicho cociente es de 12,5, valor que nos permite considerar en mejor grado el tratamiento con 5-fluorocitosina para esta cepa.

En este caso vemos claramente cómo, a partir de valores puntuales como la CMI, se puede extrapolar información de utilidad a la hora de emplear un fármaco en terapia. Clásicamente, 5-fluorocitosina ha sido asociada a casos de resistencia, por lo que la tendencia ha sido siempre a utilizarla como terapia conjunta con anfotericina B (161,261,267,268). Sin embargo, descartando resistencias iniciales y controlando tanto la CMI como las concentraciones séricas durante el tratamiento, podría ser una buena herramienta en terapia de criptococosis.

Cr. neoformans es muy sensible a la actividad de ketoconazol medido en pruebas de sensibilidad, aunque claramente dependiente de la técnica empleada (124,269). Así en nuestro estudio, valores inhibitorios de 1 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa estándar y el aislado clínico respectivamente, fueron capaces de inhibir el crecimiento. Estos valores son normales tendiendo a ligeramente altos cuando se comparan con los encontrados en la literatura, que oscilan entre 0,125 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (24,259). Sin embargo, y al igual que hemos visto para los demás antifúngicos, cuando variamos el inóculo incrementándolo hasta 10^5 UFC/ml, se observa un aumento en los valores de sensibilidad, tanto es así que tan sólo se puede obtener una inhibición del 25% de la población de levaduras con concentraciones que sean no tóxicas para el tratamiento de enfermos, identificando claramente la existencia de un efecto inóculo. Por tanto, con estos datos podemos obtener una información que nos permite emitir un juicio acerca de la posible utilidad de ketoconazol en meningitis criptocócica. Si las concentraciones que podemos alcanzar en el líquido cefalorraquídeo son de un máximo de 1,65 $\mu\text{g/ml}$ (187) (cuando empleamos 1200 mg/kg como dosis), entonces sabremos que la infección podría ser erradicada si la cepa existente en el huésped tiene una CMI como las de nuestro estudio. Algunos autores han demostrado que en algún paciente han surtido efecto concentraciones de ketoconazol en meningitis. Así Fibbe *et.al.* (87 naranja pg.119), describió un caso de un paciente recuperado de meningitis por *Candida albicans* con 800 mg/día de ketoconazol, alcanzando concentraciones en LCR entre 1,9 y 3 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, la pauta general es evitar el uso de ketoconazol en estos casos de meningitis, puesto que el riesgo de que la concentración en líquido cefalorraquídeo sea insuficiente a las cepas poco sensibles es muy elevada.

Quizá una de las desventajas de fluconazol es la escasez de correspondencia entre los resultados in vitro respecto a la respuesta clínica (204,247). En nuestro estudio, encontramos unos valores de sensibilidad especialmente elevados (8-16 $\mu\text{g/ml}$), tanto para el aislado clínico como para la cepa estándar. Este valor, no fijo, además, corrobora la variabilidad en los resultados obtenidos en pruebas de sensibilidad de otros estudios realizados para intentar estandarizar las pruebas de sensibilidad con fluconazol (203,205,270).

Por tanto, no es de extrañar la imprecisión en el punto de corte, que también puede ser atribuida a un valor intermedio y que, según la precisión en las diluciones del antifúngico, se decante por un valor inhibitorio u otro. Se ha descrito la facilidad para variar en los resultados en pruebas de sensibilidad con fluconazol, con tan sólo leves diferencias en el medio de cultivo. Espinel-Ingroff (271) ha encontrado que tres formulaciones diferentes del medio RPMI pueden hacer variar el resultado en una prueba de sensibilidad para fluconazol en hasta 2 puntos.

Nosotros hemos empleado el medio bYNB-G, que como ya vimos es estable para la determinación de las CMI con 5-fluorocitosina y, además, presenta una buena correlación en las pruebas interlaboratorio con fluconazol (270), siendo de un 96% en algunos casos. Dermoumi (258), estudiando la sensibilidad de *Cr. neoformans*, a fluconazol, ha encontrado valores de inhibición del 30% (IC_{30}) para un inóculo de 10^5 UFC/ml y en medio de cultivo bYNB-G (condiciones idénticas a las nuestras) de 8,8 $\mu\text{g/ml}$, correlacionándose directamente con nuestros resultados. Sin embargo, también se ha de tener en cuenta que bYNB-G presenta una tendencia a elevar los valores del CMI, siendo los puntos de cortes algo mayores (132,251). No podemos descartar, por tanto, que 8-16 $\mu\text{g/ml}$ sean valores de inhibición elevados por influencia del medio de cultivo. No obstante, este fenómeno también puede encontrarse en otros medios de cultivo como el RPMI, donde los valores de sensibilidad descritos por Franzot (80 naranja) para aislados clínicos de *Cr. neoformans* frente a fluconazol oscilaron de 0,5 a 16 $\mu\text{g/ml}$, situándose el 90% de las cepas con un valor de inhibición de 8 $\mu\text{g/ml}$.

Si atendemos a estos valores de inhibición y nos basamos en el criterio de resistencia para cepas con $\text{CMI} \geq 8 \mu\text{g/ml}$, nos encontraríamos frente a microorganismos no sensibles a la acción de fluconazol con concentraciones de la CMI. Sin embargo, la farmacocinética de fluconazol nos muestra que es posible obtener concentraciones del mismo en suero de hasta 60-70 $\mu\text{g/ml}$ en dosis repetidas (207). Aunque la dosis límite en suero descrita para este fármaco sea de 25 $\mu\text{g/ml}$ (149,202,203,206), en muchos casos es tolerada a mayores concentraciones, sin presentar toxicidad. Tendremos, por tanto, valores de IQ de 3,125 y 1,5

para 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$ de CMI respectivamente, cifras que en principio no son buenas predictoras de la eficacia terapéutica del fármaco.

El hecho de encontrar valores elevados en pruebas de sensibilidad in vitro no es significativo a la hora de la aplicación clínica de fluconazol, puesto que los buenos resultados en la práctica clínica demuestran su eficacia ante *Cr. neoformans* in vivo (201,213,214,272). Algunos autores atribuyen esta eficacia a la facilidad de concentrar fluconazol en fluido cerebroespinal (273,274), así como a la posibilidad de ser utilizado a dosis elevadas como terapia agresiva que incrementa los niveles plasmáticos a concentraciones fungicidas (207). Sin embargo, esto puede ser un arma de doble filo, puesto que al igual que sucede con *C.albicans*, (275,276) ya se están encontrando casos de resistencia post-tratamiento tras administrar dosis de mantenimiento con fluconazol (277,278).

La sensibilidad de *Cr. neoformans* a UK 109,496 estuvo influida por el tamaño de inóculo, como el resto de los antifúngicos de que hemos hablado. Para 10^3UFC/ml , la sensibilidad al fármaco se situó en valores de $0,125\ \mu\text{g/ml}$, tanto para el aislado clínico como la cepa estándar. Estas concentraciones inhibitorias produjeron transparencia en los tubos (IC_{90}), y coincidieron con los valores de IC_{80} . Comparando con otras fuentes, la CMI está en un valor aceptable. El sumario preclínico del fármaco (216) muestra como media geométrica de UK 109,496 frente a 107 cepas de *Cr. neoformans* un valor $0,24\ \mu\text{g/ml}$. Barchiesi *et.al.* (218), ensayando con 10 cepas, ha dado como inhibitorios valores inferiores a $0,03\ \mu\text{g/ml}$. Estos, son realmente bajos en cualquier caso, si se comparan con otros antifúngicos. Tiene aquí importancia el parámetro IQ, que relaciona niveles séricos y CMI. Para UK 109,496, se considera entre 8 y $12\ \mu\text{g/ml}$ el límite de concentraciones séricas de fármaco no tóxicas, preferentemente más próximo a 8 que a 12. Considerando finalmente este valor, obtenemos un IQ de 64, es decir, que teóricamente alcanzaría una concentración de 64 veces la CMI en el foco infeccioso, lo que puede predecir un éxito casi seguro del fármaco.

Si se aumenta el tamaño de inóculo, el efecto que encontramos es que no hay eliminación total de las levaduras a las concentraciones ensayadas, pudiéndose eliminar un 25% de la población infectante con concentraciones de $0,125\ \mu\text{g/ml}$. Con concentraciones ligeramente superiores ($1\ \mu\text{g/ml}$ a las 48 horas), UK 109,496 es capaz de eliminar un 50% de la población, lo que indica una actividad bastante alta, considerando que el inóculo empleado también lo es.

Esto le confiere cierta ventaja frente a los otros antifúngicos azólicos, donde el efecto inóculo es más marcado todavía (279).

CINÉTICA DE MUERTE DE LOS ANTIFÚNGICOS. CURVAS DE LETALIDAD

Aunque la diana y el mecanismo de acción sean el mismo para dos antimicrobianos, su efecto no tiene por qué ser igual. A veces, ligeras modificaciones en la estructura de un fármaco pueden hacer que su actividad se vea aumentada o disminuida significativamente frente al microorganismo al que se enfrenta. Estas modificaciones no siempre se perciben en el ámbito de sensibilidad o desde el punto de vista de la eficacia, sino que requieren un estudio más exhaustivo del comportamiento del agente antimicrobiano.

La monitorización del efecto del antimicrobiano a lo largo del tiempo nos proporciona una información muy importante de la actuación cronológica del fármaco, y de cómo afecta al microorganismo en su ciclo de vida. Las formas de estudiar este fenómeno son múltiples aunque como ya hemos mencionado, el más común y sencillo es la curva de letalidad (27,37,242,280). En ella la pérdida de viabilidad es expresada como la proporción de inóculo transformado en no viable a lo largo del tiempo (33). Con esto se nos informa de la actividad de una concentración fija a lo largo de intervalos de tiempo, para poder así cuantificar la velocidad de acción o persistencia del fármaco. Es importante, en cualquier caso, tener datos precisos sobre la sensibilidad del microorganismo al fármaco, puesto que en las curvas de letalidad se van a manejar concentraciones que estén relacionadas con los valores inhibitorios, además de las concentraciones séricas del antifúngico. Además, con vistas a establecer un modelo de predicción de eficacia y conociendo un efecto inóculo positivo en pruebas de sensibilidad, es importante conocer el comportamiento de los antifúngicos frente a la levadura a lo largo del tiempo, indicándonos la dependencia de la concentración con respecto a la actividad microbicida.

Con *Cr. neoformans* y anfotericina B, como vimos en las pruebas de sensibilidad (a inóculo bajo), la actividad inhibitoria se manifiesta a partir de 0,125 µg/ml en la CECT 1078 y 1 µg/ml para el aislado clínico. Simplemente con el valor de inhibición no somos capaces de predecir si el comportamiento del fármaco ha sido fungicida o no, puesto que no podemos averiguar si el inóculo de partida se vio reducido o permaneció a niveles similares al de comienzo. Sin embargo, en la curva de letalidad comprobamos que, a lo largo del tiempo, la actividad del antifúngico puede ser fungicida (es decir, que las concentraciones inhibitorias o

supra inhibitorias del antifúngico son capaces de eliminar la masa microbiana hasta niveles por debajo del inóculo inicial) o fungistático (cuando la actividad de la concentración del fármaco no es capaz de rebajar la masa microbiana inicial hasta niveles por debajo del inóculo inicial)(33,243). Así podemos ver que con anfotericina B, cuando se parte de un inóculo de 10^5 UFC/ml, las concentraciones menores de fármaco (0,125 y 1 μ g/ml) son fungistáticas; mientras que la mayor (4 μ g/ml) consigue un efecto ligeramente fungicida. Estos datos resultan sorprendentes a la hora de pensar en el concepto generalizado de que este fármaco es fungicida y capaz de eliminar aquellas infecciones más profundas (153,154,281). La idea de que anfotericina B es más activa en el laboratorio que en la clínica está muy extendida y es cierta, aunque no universalizable, puesto que como vemos en este trabajo ambas cepas fueron eliminadas sólo a la máxima concentración. Sin embargo, ya se apuntó por algunos autores que estudiaron en la curva de letalidad la actividad de anfotericina B frente a *Cr. neoformans*, que dicho fármaco no es fungicida *in vitro* a concentraciones no tóxicas (170). Shadomy et. al. (261), en un estudio para comprobar el efecto aditivo de 5-fluorocitosina y anfotericina B por medio de curvas de letalidad, observó que las concentraciones por debajo de los límites de toxicidad no presentan actividad fungicida frente a *Cr. neoformans*. Este autor vio que con dos cepas de *Cr. neoformans*, y bajo condiciones de estudio muy similares a las nuestras (medio bYNB-G, inóculo inicial de 10^5 UFC/ml y tiempo de incubación de 48 horas), presentaban un perfil claramente fungistático a concentraciones inhibitorias de 0,5 μ g/ml de anfotericina B. Dicha concentración mantuvo el inóculo inicial durante 24 horas, y a partir de este momento se produjo un recrecimiento claro. Las diferentes concentraciones de anfotericina B en nuestro estudio también mostraron recrecimiento en algún momento de la prueba. Este fenómeno es perfectamente justificable una vez conocida la actividad y disponibilidad de anfotericina B *in vitro*. Rhoades (282) encontró que anfotericina B permanece con actividad antifúngica en el medio de cultivo durante al menos 20 horas, pero a partir de éste momento la actividad ya es variable. Un posible consumo del fármaco tras unión a la diana, añadido a la degradación de la molécula explica esa baja actividad en cultivos de larga duración, como es el caso de *Cr. neoformans* (160).

La fácil desestabilización del compuesto por las oscilaciones del pH o la exposición a la luz (283), son factores que pueden hacer que en un momento determinado la actividad se reduzca y dé lugar a un recrecimiento de la población superviviente del cultivo.

Otro punto a considerar en la actividad de anfotericina B es el disolvente empleado. La mayoría de los investigadores utilizan DMSO (116,124,132,248,284) como disolvente para el

antifúngico. Nosotros, en cambio, hemos empleado desoxicolato sódico para disolver anfotericina B, ya que es una de las formas empleadas para la comercialización del fármaco (Fungizone[®]), y está más cerca de las condiciones de administración del fármaco en humanos (142,154,267,285).

En la mayoría de los estudios, anfotericina B es fungicida al principio de contactar con el hongo de forma muy rápida, para luego disminuir su actividad e incluso llegar a perderla por completo (286). Nosotros hemos obtenido un descenso en la viabilidad de *Cr. neoformans* en todas sus concentraciones e independientemente del inóculo, pero cuando este descenso se considera a niveles por debajo del inóculo de partida, la eficacia de anfotericina B se reduce. En los estudios en los que el tamaño de inóculo es menor, el efecto de anfotericina B es más fungicida que en los que el inóculo es elevado, aunque de forma concentración no dependiente. Así por ejemplo, Smith *et. al.* (286) encontraron una acusada actividad fungicida de la CMI de anfotericina B en las primeras fases de la curva de letalidad empleando inóculos de 10^4 UFC/ml, mientras que Sneller *et. al.* (287) encontraron un descenso mínimo en la viabilidad celular partiendo de inóculos de 10^6 UFC/ml y a concentraciones de la CMI. Un efecto que podríamos llamar “paradójico” es que, al aumentar la concentración de anfotericina B de 0,125 a 4 μ g/ml con inóculo de 10^5 UFC/ml, hay un aumento significativo en la actividad, mientras que al repetir esta misma operación en la curva de 10^3 UFC/ml vemos que las diferencias entre ambas son mínimas por no decir que prácticamente iguales.

Cuando utilizamos el muestreo de los cultivos de forma puntual en las curvas de letalidad, obtenemos información útil para averiguar en que forma el fármaco inhibe el crecimiento del microorganismo al que se enfrenta en determinados momentos del experimento (2,56,242). En cambio, si lo que queremos es extraer una conclusión global de lo ocurrido durante el tiempo que ha durado la prueba, es decir, la acumulación del efecto del fármaco a lo largo del tiempo, un parámetro que nos resulta apropiado es el área bajo la curva de letalidad (AUKC) (55).

En el caso de anfotericina B, el AUKC desciende proporcionalmente a medida que sube la concentración de antifúngico ensayado. La mayor diferencia encontrada entre AUKC con ambas concentraciones (0,125 y 4 μ g/ml) cuando los inóculos fueron de 10^5 UFC/ml y 10^3 UFC/ml ratifica el hecho del falso efecto inóculo, del cual ya hablamos previamente. Aunque numéricamente no son comparables las AUKC a diferente inóculo, puesto que presentan una duración de experimento diferente, sí que nos sirve para hacernos una idea de la densidad poblacional presente en las pruebas. Por tanto, si empleamos conjuntamente los parámetros de

actividad fungicida, inhibición del crecimiento y AUKC, podemos saber si un inóculo microbiano que presenta un recrecimiento ha sido previamente dañado con mayor o menor eficacia, o si por el contrario un fármaco presenta una escasa actividad inicial y posterior efecto antimicrobiano.

Los efectos sobre las levaduras son complejos y dependen de múltiples factores como son la fase de crecimiento del microorganismo, la concentración del fármaco, el inóculo etc (23,132,134). Bratburg *et. al.* (160) han propuesto que en los cultivos celulares logarítmicos la actividad de anfotericina B pueda clasificarse en tres grupos dependiendo de la dosis: estimulación, permeabilización y letalidad. La estimulación se ha observado con concentraciones inferiores a las inhibitorias en las que anfotericina B puede inducir el recrecimiento de las levaduras (160,286). Un efecto similar puede ocurrir si con concentraciones semejantes de anfotericina B, aumentamos el inóculo. Con ello conseguimos que el efecto del fármaco sea menor y parezca que existe un falso "efecto inóculo", atribuible tal vez a esta capacidad estimuladora de anfotericina B. Cuando se supera esta etapa se alcanza la permeabilización que deja el paso de sustancias a través de la membrana celular. En el momento en que las concentraciones de anfotericina B dejan atrás esta fase entra en función la fase de letalidad, comenzando a descender la viabilidad de los cultivos (160). Las dos últimas fases (permeabilidad y letalidad) se alcanzan con mayor rapidez si el inóculo empleado es reducido y, por tanto, las diferencias entre las concentraciones, en lo que a efecto se refiere, serán menores.

Cuando hablamos de curvas de letalidad, hay que asumir que 5-fluorocitosina no es un fármaco muy activo por sí sólo frente a *Cr. neoformans* (182). Pero como ya hemos dicho que el parámetro que mide la actividad microbiológica (CMI) no es un buen predictor de la eficacia terapéutica, necesitamos, por tanto, apoyarnos en otros índices farmacodinámicos, como la inhibición del crecimiento y la actividad fungicida, obtenidos directamente de la curva de letalidad, para que nos muestren una información más completa del proceso infeccioso.

Una de las ventajas a la hora de estudiar las curvas de letalidad de las levaduras con 5-fluorocitosina es que se aproximan de forma más similar a lo que sucede en tratamiento in vivo en lo que se refiere a concentraciones del fármaco. Esto es debido a que el control de las concentraciones plasmáticas del antifúngico tienen que ser muy estrictas, y deben mantener los niveles plasmáticos lo más constantes posible y entre los márgenes de 25-100 µg/ml que marcan los límites de resistencias y toxicidad respectivamente (179,266,288). De esta manera

nos aproximamos más a lo que sucede in vivo a partir de los experimentos in vitro, donde las concentraciones de antifúngicos permanecen constantes al no estar expuestos a la acción de agentes externo que los metabolicen, y asumiendo que no existe consumo del mismo en el cultivo (289).

Sin embargo, este margen terapéutico tan estrecho presenta un inconveniente, que es la posibilidad de una CMI elevada que es lo que sucede en nuestro caso con *Cr. neoformans* CECT 1078. Cuando se pretenden utilizar concentraciones por encima de la inhibitoria (2 x CMI), ya se sobrepasa el margen de tratamiento entrando en concentraciones potencialmente tóxicas, y, por tanto, teniendo que dejar como valor límite terapéutico los 100 µg/ml.

A concentraciones terapéuticas e inóculo reducido (10^3 UFC/ml), 5-fluorocitosina inhibió el crecimiento de forma concentración no dependiente, consiguiendo mantener la población celular al mismo nivel que el inóculo de partida; sin embargo en ningún momento se produjo un descenso por debajo de este valor, lo que viene indicado por una actividad fungicida nula a lo largo de todo el experimento. A concentraciones supra-CMI este fenómeno se vio aumentado y consiguió alcanzar valores fungicidas a partir de la hora 24 con un pico de actividad máxima a las 48 horas, momento a partir del cual comienza un leve recrecimiento.

En general, la 5-fluorocitosina se ha definido como un antifúngico de perfil fungistático como de hecho se corrobora en nuestros resultados. Además, el hecho de aumentar las concentraciones por encima de la CMI no nos garantiza una mayor actividad significativa pues como vemos, los valores de muerte fúngica (actividad fungicida) son bastante reducidos. Si, además, aumentamos el tamaño de inóculo a 10^5 UFC/ml entonces los valores de muerte quedan completamente anulados, limitándonos a ligeros indicios de inhibición del crecimiento aunque curiosamente de forma concentración dependiente. Podría ser que la incapacidad de producir actividad fungicida de 5-fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* fuese debida a una resistencia individual. Sin embargo, este fenómeno se repite en varias publicaciones. Así, Sneller *et. al.* (287) describen la actividad de 5-fluorocitosina frente a *Cr. neoformans* con una CMI de 5µg/ml que en cambio fue incapaz de eliminar la población fúngica inicial produciéndose un recrecimiento a las 48 horas que casi alcanzaba las UFC/ml del control a las 72 horas.

Por tanto, es fácil asumir que 5-fluorocitosina puede ser un compuesto que no actúe de forma fungicida sino que limite el crecimiento durante un periodo de tiempo. Sin embargo, no se puede excluir del todo la posibilidad de la generación de resistencias de alguna clase que impidan la actuación del fármaco. Una simple hiperproducción de uracilo por las células

fúngicas sería a priori capaz de soportar un ataque del antifúngico, pudiendo regenerarse más adelante de nuevo la población.

El AUKC nos muestra de nuevo la proporcionalidad existente entre concentraciones de 5-fluorocitosina y la actividad antifúngica. Tanto para inóculos de 10^3 UFC/ml como de 10^5 UFC/ml, el AUKC fue cada vez menor a medida que la concentración de antifúngico fue ascendiendo. Sin embargo, las proporciones de las áreas de cultivos tratados con respecto a su control en el caso de 10^5 UFC/ml, fueron menores que para 10^3 UFC/ml, lo que de nuevo nos ratifica el aumento en el efecto fungistático con inóculos de mayor tamaño.

En nuestro estudio, la capacidad inhibitoria de ketoconazol sobre *Cr. neoformans* a lo largo de los experimentos de curva de letalidad ha demostrado un efecto siempre positivo que ha conducido en la mayoría de los casos a una marcada actividad fungicida. Este parámetro fue tiempo dependiente, encontrando valores cada vez mayores a medida que transcurre el tiempo. Esto se aprecia claramente en las AUKC, donde los valores tanto para 10^3 UFC/ml como para 10^5 UFC/ml son altamente parecidos entre ellos, descartando la posibilidad de una concentración dependencia. Esto implica que ambas concentraciones de fármaco (1 y 4 μ g/ml) son similares en actividad, y que por aumentar el inóculo no encontramos una diferencia especialmente mayor entre ambas concentraciones.

También Graybill *et al.* (290), aunque de forma menos precisa, describieron este efecto, ya que con concentraciones obtenidas en suero de ratón transcurridas 2 horas después de un tratamiento con 50 mg/kg de ketoconazol, se observó un crecimiento fungistático aproximadamente durante 10-15 horas, para posteriormente descender de forma drástica (1 logaritmo en 10-15 horas). Por tanto, parece ser éste crecimiento bifásico un fenómeno que se repite en los experimentos y que puede contener importancia en la aplicación del fármaco. Si consideramos que ketoconazol puede distribuirse en plasma alcanzando concentraciones máximas tras 2 horas de dosis de 4 μ g/ml para unos autores o hasta 6 para otros (187), descendiendo hasta niveles casi inapreciables de fármaco (0,01 μ g/ml) desde las 5 horas hasta las 24, podemos observar que la mayor concentración de fármaco en plasma coincide con el periodo de tiempo en el que hay recremento microbiano en la curva de letalidad a concentración fija de la CMI. Esto nos podría inducir a pensar que en suero, al haber concentraciones mayores de la CMI, este periodo fungistático podría ser resuelto fácilmente, puesto que las concentraciones plasmáticas son de hasta 5 veces la CMI. Sin embargo, al ver la curva de letalidad con 4 μ g/ml, vemos de nuevo este efecto de fungistasis se repite. Esto

complica la situación, puesto que a concentraciones que ya son límites en suero, la actividad del fármaco continúa siendo incapaz de reducir el inóculo inicial.

Este fenómeno lo encontramos tan sólo a inóculos de 10^5 UFC/ml. En tamaños de población menores (10^3 UFC/ml), este crecimiento bifásico desaparece, siendo el fármaco activo de forma fungicida en todo momento y con cualquier concentración.

Toda esta información nos puede dar idea de que el desarrollo de una infección por *Cr. neoformans* y su tratamiento potencial con ketoconazol está condicionado por múltiples factores, como la concentración empleada, el tiempo de actividad del fármaco o la masa microbiana infectante. Esto explica en parte la discrepancia que existe en la literatura al respecto. Algunos autores (291) afirman poder tratar infecciones fúngicas meníngeas (criptococosis, histoplasmosis, candidiasis, etc.) con ketoconazol, mientras que otros muchos lo descartan de antemano por su baja actividad en estos procesos infecciosos (292).

El estudio del efecto del fluconazol frente a *Cr. neoformans* a lo largo del tiempo (curvas de letalidad) está poco estudiado (293). En general, se extiende la idea de que fluconazol es fungistático, al igual que los demás antifúngicos azoles (203,294,295). Prueba de ello es, como ya referimos en su momento, que para la CMI se emplea la inhibición del 80% de la población y no el 90%. Además, en la mayoría de los trabajos que estudian este efecto de fluconazol sobre *Cr. neoformans*, se observa una actividad fungistática a concentraciones inhibitorias y supra inhibitorias (243). Sin embargo, esta afirmación es totalmente dependiente de las condiciones experimentales empleadas. En nuestro trabajo hemos hallado un efecto inóculo importante a la hora de hablar de la reducción de masa microbiana por las diferentes concentraciones de fármaco empleadas. Con inóculo de 10^5 UFC/ml, se observó una inactividad durante las 12 primeras horas, momento a partir del cual desciende la viabilidad de las levaduras. Nos encontramos con un comportamiento bifásico que ya vimos previamente en ketoconazol. Este fenómeno es lógico que sea más pronunciado en fluconazol, puesto que está relacionado con su mecanismo de acción. Las moléculas de fluconazol interfieren con el proceso de 14- α -demetilación del lanosterol por su unión a la enzima demetilasa correspondiente. Esto hace que se acumulen las moléculas 14- α -metilesteroles no funcionales, y decaiga la síntesis de esteroides de membrana, como en ergosterol. Los sucesos posteriores como la funcionalidad anormal de la permeabilidad de membrana, descoordinación en la actividad de enzimas de unión a membrana o la inducción anormal de la formación del septo y estructura apical de la pared, dependen directamente de la especificidad del anillo triazólico del

antifúngico, por la porción hemo del citocromo p-450 del hongo (202,296,297), y aparecerán antes o después según la unión más o menos rápida de las moléculas. Esto se encuentra también ligado al efecto inóculo previamente mencionado. Cuando reducimos el tamaño de inóculo a 10^3 UFC/ml, este efecto de retraso desaparece debido a la saturación más rápida de las moléculas diana, por ser éstas más escasas (menos microorganismo) (41,42).

En este caso vemos que la actividad bactericida es significativa desde la hora 36, aunque previamente la inhibición del crecimiento está muy próxima al 99%, lo que indica que las levaduras no aumentan su crecimiento en comparación con el inóculo inicial.

El efecto final encontrado para las concentraciones ensayadas tiene un claro perfil fungicida, lo que contrasta claramente con la idea generalizada de la actividad de los azoles. El hecho de reducir casi dos logaritmos el inóculo inicial es suficiente para ratificar este hecho. Sin embargo, y en comparación con lo sucedido en el caso de ketoconazol, la independencia de la concentración hallada con inóculo de 10^3 UFC/ml se transforma en concentración dependencia a incrementar el inóculo, como también sucedió con anfotericina B y 5-fluorocitosina.

A partir de las pruebas in vivo, sabemos que la actividad de fluconazol es a largo plazo, puesto que tras varias dosis estándar las concentraciones del fármaco se van convirtiendo en activas (fungicidas) en el organismo. Comparando hipotéticamente las curvas de letalidad con las de distribución del fármaco en suero podemos ver que cuando más concentración de fármaco existe en suero, mayor es el número de UFC que hay en la curva de letalidad, y cuando las UFC van descendiendo, las concentraciones se van reduciendo a la vez. Vemos con esto que las concentraciones de fluconazol van a estar siempre en proporción suficiente para poder mantener su actividad en todo momento frente al microorganismo.

La letalidad infligida sobre las células de *Cr. neoformans* por UK 109,496 y medido en el tiempo, mostró un perfil muy similar para los dos inóculos empleados. En la concentración inhibitoria se apreció un leve retraso en el crecimiento con el inóculo elevado (10^5 UFC/ml), que se vio incrementado a las 24 horas. Este lapso de tiempo de baja actividad que genera este tipo de curva bimodal, es debido como ya vimos en fluconazol, al mecanismo de acción del fármaco. En el caso de UK 109,496, tiene una actividad más tardía, ya que es ligeramente menos selectivo que fluconazol por las partículas de ergosterol (Fluconazol- IC_{50} = 0,05; UK 109,496- IC_{50} = 0,03). Sin embargo, esta actividad fungistática en principio no impide que aparezca una actividad fungicida al final del experimento (48 horas). Este efecto fungistático

no queda resuelto cuando reducimos el inóculo, pero sí se incrementa considerablemente la actividad del fármaco, generando un AUKC mucho menor que en el caso de 10^5 UFC/ml (siempre comparado respecto al control).

Una vez que empleamos concentraciones superiores a la de la CMI, podemos observar que la actividad fungicida es concentración dependiente. Este fenómeno es algo realmente interesante, tratándose de un antifúngico azol, que a priori no tiene por qué presentar un perfil de actividad fungicida. Sin embargo, las concentraciones mayores, que son por otra parte terapéuticas, consiguen reducir en hasta 2 logaritmos el inóculo inicial, tanto para 10^3 como para 10^5 UFC/ml.

La actividad fungicida obtenida a las 48 horas para concentraciones de 1 μ g/ml y 4 μ g/ml frente a un inóculo de 10^5 UFC/ml consigue eliminar al 99,1 y 99,3% de la población inicial. Esto garantiza que prácticamente se ha reducido el inóculo, puesto que hay que considerar un error experimental procedente de las diluciones.

La unión de esta actividad junto con las bajas concentraciones de fármaco necesarias para inhibir su crecimiento sitúan a este compuesto entre los más efectivos frente a este microorganismo. Pero para poder extraer alguna conclusión farmacodinámica hemos de comparar la actividad microbiológica con la farmacocinética. Lo que hasta ahora se sabe es que UK 109,496 concentra en poco tiempo ($t_{max} = 0,5-1$ hora), alcanzando concentraciones séricas sobradamente activas (de 2-8 μ g/ml) frente a la mayoría de los microorganismos testados in vitro. En conejos se ha visto que tiene una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) muy corta, aunque suficiente para poder eliminar en modelos animales un inóculo fúngico letal (257). En las primeras fases de ensayos clínicos parece haberse repetido este fenómeno, siendo la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de 7 horas.

Al no seguir un modelo lineal, el fármaco puede acumularse en suero y tejidos presentando concentraciones suficientemente elevadas capaces de eliminar al hongo, como demuestra la curva de letalidad con concentraciones menores.

DISCUSIÓN DEL EFECTO POSTANTIFÚNGICO Y DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS EN FASE POSTANTIFÚNGICA

El efecto PAFE es un parámetro farmacodinámico que se ha empleado en múltiples ocasiones para el reajuste de los regímenes de dosificación (8,18,245,298). Como vimos, este parámetro está influido por muchos factores experimentales, como por ejemplo tiempo de

exposición al fármaco, concentración empleada, inóculo, etcétera (14). En nuestro estudio, hemos cuantificado el efecto postantifúngico (PAFE) para anfotericina B, al igual que para los demás antifúngicos, aplicando criterios metodológicos que intenten aproximar las condiciones experimentales lo máximo a los procesos biológicos en los seres vivos.

De forma general, anfotericina B mostró tiempos de PAFE positivos con todas las concentraciones ensayadas cuando el tiempo de exposición fue de 12 horas, y el valor fue prácticamente dependiente de la concentración empleada (a mayor concentración, mayor tiempo de PAFE). Cuando se consideró medio logaritmo como unidad para cuantificar el PAFE, vimos que se mantuvo en torno a las 4 horas el efecto remanente del antifúngico para las diferentes concentraciones ensayadas; sin embargo, con un logaritmo vimos el efecto concentración dependiente. Esto nos indica que el efecto PAFE con anfotericina B se manifiesta con mayor intensidad a mayores concentraciones, aunque en el tiempo suele mostrar un mayor efecto remanente en las primeras horas del experimento. Esto no es de extrañar, asumiendo que se trata de un fármaco cuyo mecanismo de acción se basa en la permeabilidad de membrana, primer lugar de contacto con el fármaco (299).

Entrando en mayor detalle, sin embargo, anfotericina B a bajas concentraciones ($CMI=0,25\mu g/ml$) obtuvo PAFE y ERT ligeramente superiores que con las concentraciones por encima de la CMI. Esto puede deberse a la existencia de un margen de concentraciones activas pero inapreciable por medio de las técnicas experimentales, necesitando aumentar la concentración del fármaco para encontrar mayor efecto. Esto se ve claramente en el ERT, donde los valores de 0,125 son mayores que $1\mu g/ml$ pero inferiores a 4.

Cuando el tiempo de exposición previa al fármaco se reduce a 2 horas, se ve que anfotericina B genera PAFE negativo, es decir, tiene un efecto sobre las células que no demora su crecimiento (como vimos con exposiciones de 12 horas), sino que por el contrario la tasa de crecimiento de los cultivos es mayor en tratados que en controles, y de forma significativa (intervalo de ausencia de significación $[-0,5, 0,5]$). Esto es debido a que las concentraciones empleadas (0,125, 1 y 4) son demasiado bajas para un tiempo de exposición tan corto en un ámbito micológico. La mayoría de estudios de PAE existentes, han sido realizados con bacterias (66,68,73,93,250), y en éstas el tiempo de generación es mucho menor, por lo que uno de los parámetros varía con respecto a los realizados con levaduras (300).

Cuando trabajamos con concentraciones de fármaco bajas o que estén en relación con los límites de toxicidad, hemos de ajustar la exposición al microorganismo según la necesidad de contacto entre ambas (2).

Si queremos hacer una estimación más fiable de los fenómenos "in vivo", hemos de acudir a los niveles del fármaco en suero o tejidos (7,301). Para los antibióticos estos niveles suelen ser altos durante unas 2-3 horas (pico sérico C_{max} : fases α y β), y posteriormente, las concentraciones decaen hasta situarse por debajo de la CMI. Con antifúngicos en cambio, la farmacocinética es algo diferente, y en ocasiones presentan tiempos de eliminación mayores por lo que el fármaco permanece en suero durante más tiempo que en caso de los antibióticos (171,179,187,192,203,206,216,302).

Por ello, si queremos ver el efecto PAFE, es más útil emplear las concentraciones séricas durante exposiciones que se estiman similares a los intervalos de dosificación y no extrapolar metodología bacteriológica, que por motivos de diferencias fisiológicas nos induzca a errores en la interpretación de los resultados.

Con anfotericina B (y antifúngicos en general), los trabajos existentes al respecto son escasísimos (64,83,143). Además, la metodología empleada ha sido la misma que en bacteriología, considerando tiempos de exposición cortos y concentraciones de fármaco de 4-8 veces la CMI. Siguiendo estas pautas, Turnidge *et.al.* (64) obtuvieron, al igual que nosotros, PAFE positivo para *Cr. neoformans*, pero con 2 horas de exposición y concentraciones supra-CMI. La discrepancia con nuestro estudio (en concentración y tiempo de exposición) estriba claramente en los resultados de la CMI. Mientras que nuestros valores de CMI son de 0,125 $\mu\text{g/ml}$, los suyos están situados en 25 $\mu\text{g/ml}$ para el mismo medio de cultivo, y empleando inóculo de mayor de 10^6 UFC/ml. Al obtener una CMI tan elevada, la concentración de fármaco a 4-8 veces la CMI, se coloca a niveles muy por encima de la toxicidad ($25 \times 4 = 100$; $25 \times 8 = 200$ $\mu\text{g/ml}$; límite = 4). Éstas concentraciones son inviables a la hora de obtener un dato con relevancia o interés clínico, puesto que ningún paciente obtendrá dichas concentraciones nunca en suero (171,169).

Si son escasas las publicaciones con PAFE en levaduras, menos aún son los datos a obtener de la literatura referente al efecto sub-CMI en dicha fase (143). Este parámetro con una considerable importancia clínica nos muestra como anfotericina B, tras ser expuesta a concentraciones terapéuticas, puede ser re-expuesta a menores cantidades de fármaco y observar un mayor efecto sobre las levaduras que en el caso de no existir pre-exposición. Concretamente, para una exposición de 4 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B, con posterior lavado del fármaco y re-exposición a $\frac{1}{4}$ de la CMI (ie. 0,03 $\mu\text{g/ml}$), se obtiene un retraso en la recuperación del crecimiento normal de la población celular de hasta 6,75 horas, un valor que

es prácticamente la tercera parte del tiempo transcurrido entre dosis de anfotericina B en pacientes enfermos de criptococosis (170).

Aunque estos resultados sean realmente impactantes, no podemos hacer una extrapolación directa a los procesos in vivo, pues como sabemos la farmacocinética de anfotericina B representa un papel importante en los procesos farmacodinámicos, y sobre todo cuando se habla de concentraciones subinhibitorias que son más susceptibles a ser afectados por el metabolismo y eliminación del fármaco.

Quizá sea 5-fluorocitosina el antifúngico más estudiado en cuanto a efecto PAFE se refiere. Tal vez sea por las características farmacocinéticas del antifúngico, que como ya hemos dicho es muy estable en concentraciones séricas, no presenta adherencia a proteínas y su vida media es muy corta (6 horas), donde la existencia de un efecto PAFE favorecería la modificación del régimen de dosificación actual (184).

Pero a pesar de esta posición favorable, la metodología hasta ahora descrita continúa caracterizándose por una falta de estandarización, claramente influida por las técnicas experimentales de bacteriología (10,64,83).

Nuestros resultados muestran que 5-fluorocitosina tiene una capacidad muy elevada de generar PAFE. Todos los experimentos realizados nos mostraron efecto PAFE positivo, excepto en el caso aislado de la concentración 32 $\mu\text{g/ml}$, lo que por otro lado no es de extrañar, pues se trata de concentración subinhibitoria para la cepa *Cr. neoformans* CECT 1078. Otro punto interesante a considerar es que la mayoría de los tiempos de PAFE estuvieron en valores próximos o superiores al tiempo de vida media del fármaco en suero, lo que tiene implicaciones prácticas considerables.

Cuando utilizamos medio logaritmo como unidad para cuantificar el crecimiento microbiano y determinar el PAFE, comprobamos que los valores son también positivos, aunque ligeramente inferiores a los obtenidos con un logaritmo. Este fenómeno ya fue referido por *Scalarone et.al.* (83) para *Candida albicans* y 5-fluorocitosina, quien considerando diferentes valores crecientes para determinar el PAFE (0,25, 0,5, 0,75 y 1 logaritmo), obtenía generalmente valores en tiempo de PAFE mayores cuanto más alta era la diferencia logarítmica. Este fenómeno nos deja clara una cuestión, y es que 5-fluorocitosina actúa progresivamente en el tiempo, siendo su efecto mayor a medida que transcurre el experimento. Al considerar medio logaritmo, el tiempo transcurrido de PAFE es menor que si consideramos un logaritmo. Este efecto se ha visto en bacteriología con los antibióticos que actúan a nivel de

inhibición de síntesis de proteínas o ácidos nucleicos, los cuales presentan PAE largos en gram positivos y de varias horas en gram negativos (14,15). Una de las críticas que se realizan a este fenómeno y en general al PAE es que los antibióticos que actúan a nivel interno en las bacterias sean los que muestran PAE mayor, dejando sin embargo a los que inhiben la formación de la pared celular los PAE más cortos (13,71). Tal vez esto pueda ser debido a que el fármaco a que han estado expuestas las bacterias no se pueda eliminar tan fácilmente del interior de las células y, por tanto, el lavado no sea total. El efecto de estas partículas podría dar mayores tiempo de PAE. Este argumento no es fácil de discutir, puesto que es un hecho que realmente ocurre, pero precisamente al suceder in vitro podemos esperar que suceda in vivo.

Cuando un fármaco actúa a nivel tisular y penetra además en las bacterias o microorganismos infectantes, no se va a eliminar de igual manera en el exterior celular que en el interior, al igual que ocurre en el tubo de ensayo; es decir, la farmacocinética del antibiótico no es a nivel interno de los microorganismos, y por tanto, aquellos antibióticos que actúan a nivel de síntesis de proteínas o de DNA cuando las concentraciones de fármaco en el exterior bajen por debajo de la CMI (PAE in vivo), no tienen porqué descender en el interior del microorganismo, prolongando por tanto de la misma manera el PAE.

Al considerar el tiempo de exposición como factor influyente en el PAFE, observamos que, cuando es de 12 horas frente a 2 horas, las diferencias son claramente favorables al mayor pretratamiento. En cambio, los valores de exposición corta no son del todo negativos, puesto que a concentraciones a partir de la CMI todos los PAFE son positivos de forma significativa.

En el trabajo de Turnidge *et.al.* (64), obtuvieron igualmente PAE positivos con 2 horas de exposición a concentraciones supra CMI (4-8 x CMI). Sin embargo, al igual que sucedía con anfotericina B, el emplear concentraciones de 4 a 8 veces la CMI cuando ésta es de 50 µg/ml, implica usar niveles tóxicos de fármaco, que carecen de interés o aplicación clínica. En cambio, en nuestro estudio hemos empleado concentraciones que en ningún momento superan la barrera de toxicidad, obteniendo tiempos de PAFE positivos. Si, además, prolongamos el tiempo de exposición de 2 a 12 horas, incrementamos la duración de este efecto sin superar tampoco los niveles de toxicidad.

El efecto de concentraciones sub-CMI de 5-fluorocitosina en fase PAFE tan sólo se pudo cuantificar con medio logaritmo, y a concentraciones de la CMI o inferiores. La existencia de un efecto PAFE muy elevado junto con concentraciones subinhibitorias (1/4 de la CMI), indujo un retraso en el crecimiento muy grande, que en ocasiones incluso presentó perfil fungicida. Este fenómeno tiene una trascendencia importante a la hora de entender el efecto de

concentraciones sub-CMI como aplicación clínica. Por un lado, la reexposición a concentraciones de 5-fluorocitosina puede ser, bien en dosis menores o bien en dosis más espaciadas, ya que el efecto que obtengamos será igual que la primera dosis. El hecho de que en una segunda dosis el efecto sea mayor con concentraciones menores implica que vamos a poder obtener una mayor actividad con una toxicidad menor.

Como ya hemos mencionado, con 5-fluorocitosina es importante el control de las concentraciones séricas, y si sabemos que con el PAFE + sub-CMI se pueden mantener durante el periodo de interdosificación, concentraciones por debajo de los niveles tóxicos en suero con actividad microbicida eficiente, podemos predecir un tratamiento eficaz y sobre todo reducir el riesgo de toxicidad.

El ERT es un parámetro que en general nos indica que 5-fluorocitosina presenta un retraso en el efecto infectante de *Cr. neoformans* (90). Ayudados de este parámetro podemos afirmar que teóricamente se necesita más tiempo para que los microorganismos recuperen su actividad infectante tras ser tratados con concentraciones de la CMI que el transcurrido para dar una nueva dosis de 5-fluorocitosina a un paciente con criptococosis.

En el estudio del PAFE con ketoconazol vimos otra vez que las condiciones iniciales del experimento son muy importantes a la hora de obtener los resultados. El tiempo de exposición fue de nuevo primordial para la valoración del PAFE. Con dos horas de tratamiento, los tiempos de PAFE recogidos fueron de valor negativo, cuando se empleó la CMI como concentración de choque (-0,5 horas), mientras que son positivos (1 hora) cuando la concentración ensayada fue de 4 x CMI. Cuando empleamos 12 horas de exposición, los PAFE obtenidos ascendieron a valores mucho mayores (2,5 y 5,25 horas para 1 y 4 µg/ml respectivamente). Encontramos de nuevo que concentraciones de fármaco en dosis terapéuticas (encontradas en suero) indujeron valores de PAFE positivos cuando el periodo de contacto entre microorganismo-fármaco fue mayor. Turnidge *et.al* (46) encontraron que con 2 horas de tratamiento, a concentraciones de 4 a 8 veces la CMI, los valores de PAFE no eran significativos. A pesar de que estos experimentos están realizados en medio de cultivo Sabouraud, coinciden con los nuestros (bYNB-G), puesto que tampoco nosotros con 1 µg/ml y 2 horas de exposición obtuvimos PAFE positivo (-0,5 horas). El hecho de que los PAFE con baja exposición no sean significativos no es información suficiente para considerar a ketoconazol como agente no generador de efecto PAFE. Como hemos visto en nuestros

resultados, 12 horas de exposición a concentraciones de CMI (1 µg/ml), indujeron PAFE de 2,5 horas, y si hablamos de 4 x CMI (4 µg/ml), este fue de 5,25 horas.

Esta misma situación también la encontramos con la cepa aislado clínico, donde los PAFE llegaron a ser de 4,25 y 7,8 horas con 2 y 8 veces la CMI, respectivamente. Además, este retraso en el crecimiento inducido por la exposición previa a ketoconazol es tiempo dependiente. Cuando consideramos medio logaritmo como unidad de cuantificación, los valores de PAFE son menores que con un logaritmo completo, lo que nos dice claramente que el valor será mayor cuanto más tiempo consideremos. Este argumento queda ratificado además con el parámetro ERT, el cual es mayor con concentraciones mayores.

Un aspecto interesante de la farmacodinamia de ketoconazol por su posible relevancia clínica es la clara supresión de la tasa de crecimiento que mostraron concentraciones subinhibitorias. Cuando en fase postantifúngica añadimos a los cultivos una cantidad de fármaco en concentraciones de la CMI (0,25 µg/ml), el retraso en el crecimiento fue tan grande que no se pudo determinar por el método descrito por Kikuchi (99). Fue tan elevado el retraso en el crecimiento observado en los cultivos controles, que no permitió apenas crecer medio logaritmo a los cultivos celulares. En este caso vemos, además, que de nuevo aparece ese crecimiento bifásico, que ya vimos en las curvas de letalidad, en el cual comienza tardíamente la actividad microbicida del fármaco.

La actividad de las concentraciones subinhibitorias en cultivos *in vitro* tiene importancia siempre y cuando nos permita realizar una extrapolación a los fenómenos que ocurren *in vivo*. Ketoconazol es un fármaco con una vida terminal muy prolongada (187), lo cual permite que la presencia de concentraciones residuales del antifúngico en suero o tejidos sean un factor constante durante el tiempo que dura el tratamiento. Por tanto, si consideramos que el fármaco va a permanecer en concentraciones subinhibitorias durante periodos largos, podemos intuir que este efecto de actividad a bajas concentraciones se podrá repetir en el tratamiento con ketoconazol.

Por tanto, si unimos una alta actividad fungicida con un PAFE de varias horas y un efecto altamente significativo de concentraciones sub-CMI, tenemos el perfil idóneo para un fármaco que pueda presentar una dosificación muy espaciada. Desgraciadamente, no sólo debemos contar con estas conclusiones para determinar las dosis del antifúngico; en este caso una traba muy importante, como ya vimos, es la penetración del ketoconazol en el líquido cefalorraquídeo, que está muy limitada y presenta un perfil farmacocinético muy pobre para el tipo de infecciones como las meningitis (303). No obstante, queda abierto al estudio la posible

utilización de ketoconazol en infecciones criptocócicas diseminadas, donde las zonas o tejidos afectados pueden ser más fáciles de alcanzar por éste fármaco. Es también interesante aquí el estudio *in vitro* de las interacciones entre fármacos para la aplicación en terapia combinada en esta patología.

La referencia al efecto PAFE *in vitro* con fluconazol está muy limitada en la literatura. Mínguez *et.al.* (109) han descrito PAFE negativo para fluconazol con *C.albicans*, 12 horas de exposición y concentraciones séricas terapéuticas. Este resultado se encuentra en la línea de los obtenidos para los demás azoles, como ketoconazol, que algunos autores han descrito con PAFE negativos (64).

En nuestro trabajo, fluconazol ha mostrado poca eficacia a la hora de generar retraso en el crecimiento tras la exposición al fármaco durante 2 horas. En este caso, todas las concentraciones empleadas dieron tiempos de PAFE negativos, aun siendo supra CMI. La concentración de 32 µg/ml es un valor relativamente alto en comparación con los valores séricos encontrados en pacientes tras dosis repetidas de fluconazol y, aún así, no generó valores de PAFE positivos (207). Sin embargo, y como ya hemos discutido previamente, la farmacocinética de los antifúngicos es en ocasiones diferente a la de los antibióticos, teniendo que descartar el uso de técnicas bacteriológicas en estudios micológicos. De hecho, las propiedades farmacocinéticas de fluconazol hacen que se concentre en suero en altas proporciones en poco tiempo ($C_{max} = 30$ mg/l, $t_{max} = 3,3$ horas tras dosis de 400 mg/IV), y en cambio su eliminación sea muy lenta ($t_{1/2 \beta} = 37$ horas) (202). Por tanto, hemos de considerar que la exposición al fármaco será a altas concentraciones y durante tiempos prolongados. Así, es de mayor utilidad un tratamiento previo de 12 ó 24 horas, que es el espaciamiento que ocurre entre las dosis suministradas a paciente con criptococosis (204,272). Aun optando por las 12 horas de exposición, hemos encontrado que el PAFE fue negativo con concentraciones de 8 µg/ml, y nulo prácticamente con 16 µg/ml. Hemos de aumentar el tratamiento previo de las levaduras a 32 µg/ml para inducir PAFE positivo (4,6 horas). Como ya vimos en las curvas de letalidad, fluconazol es poco activo en los primeros compases de su acción frente a *Cr. neoformans*, y deja un margen de crecimiento hasta que definitivamente empieza a actuar. En el PAFE se puede aplicar este mismo mecanismo de acción y explicación correspondiente. Tras el lavado, el microorganismo no se ha visto suficientemente dañado por el antifúngico y, por tanto, genera estos PAFE negativo. Además, la exposición empleada para el PAFE (12 horas), es aproximadamente el tiempo en el que fluconazol fue menos activo en la curva de letalidad.

En cambio si nos fijamos en los valores de PAFE usando medio logaritmo como unidad de cuantificación, los valores arrojados son más elevados que para un logaritmo, lo que descarta la posibilidad de este periodo de letargo.

Por tanto, podremos afirmar que el efecto PAFE tan bajo es debido al mecanismo de acción del fármaco, que no genera suficiente daño como para que se refleje posteriormente tras la eliminación del mismo.

Al comparar con el aislado clínico, sin embargo, vemos que los valores de PAFE suben, siendo positivos para todas las concentraciones. Esto nos demuestra que de nuevo este fenómeno es dependiente además del microorganismo utilizado, e incluso de la cepa.

Al tratar en fase PAFE los cultivos con una dosis fluconazol sub-CMI, se obtuvo una leve prolongación del tiempo de crecimiento, pero que no fue significativa sino para concentraciones de 32 µg/ml. Al igual que en el PAFE, este fenómeno de concentraciones sub-CMI se vio incrementado al considerar medio logaritmo como unidad de medida. Este mayor efecto de fluconazol a corto plazo, junto con la escasa prolongación del efecto de concentraciones sub-CMI, hace a este fármaco poco susceptible de ser modificado en las pautas de dosificación actuales, cuestión que por otro lado tampoco sería muy necesaria asumiendo su baja incidencia de casos de toxicidad (305).

El PAFE predecible para UK 109,496 como agente monoazólico ha de ser a priori de escasa duración, como en los demás antifúngicos de su familia. Sin embargo, al presentar una actividad fungicida elevada durante el tratamiento, puede generar PAFE mayor. De hecho, los valores obtenidos son dependientes del periodo de exposición previa. Los cortos tratamientos fueron incapaces de inducir PAFE, y generalmente mostraron valores nulos o negativos. En cambio, cuando la exposición fue mayor vimos valores positivos. Este resultado es interesante, puesto que realmente las exposiciones al fármaco vienen definidas por los perfiles farmacocinéticos que influyen directamente en el posible efecto PAFE. Así, UK 109,496 presenta una fase inicial muy rápida y concentra en suero hasta valores de 1 µg/ml, pero estos niveles no se prolongan prácticamente en el tiempo, quedando reducidos en concentraciones sub-CMI (menores de 0,125) a las 10 horas (216). Por tanto, la prueba *in vitro* de PAFE con 2 horas de exposición con 1 µg/ml quizá se aproxime más a las situaciones *in vivo*. En este caso, podríamos afirmar que este antifúngico genera PAFE negativo y, por tanto, este parámetro farmacodinámico no puede servirnos para una posible modificación de dosis. Pero también es posible considerar que dosis de 0,125 µg/ml estén como mínimo presentes durante un periodo

de 12 horas de exposición, obteniendo así un efecto PAFE de 2 horas. Esta contradicción se debe a que cuando el perfil farmacocinético presenta una fase de eliminación del fármaco rápida, y las concentraciones descienden rápidamente en su fase β , la extrapolación de los datos obtenidos en curvas de letalidad a concentraciones fijas de antifúngico es pobre, y se debe acudir a modelos experimentales de dosis simuladas.

Cuando se considera medio logaritmo como la unidad de medida del PAFE, el efecto observado es un aumento en el efecto, debido principalmente a la mayor actividad inducida tras el lavado, perdiéndose dicho efecto con el transcurso del tiempo.

El efecto sub-CMI se aprecia de manera creciente, a medida que aumentan las concentraciones del pretratamiento. Este efecto es importante, puesto que los valores alcanzados son casi iguales a los vistos para el PAFE, lo que indica que concentraciones subinhibitorias pueden ser muy activas una vez que haya pasado el efecto primero del tratamiento. Además, este efecto es mayor cuanto más tiempo pasa, puesto que los valores para 1 logaritmo son superiores que para medio logaritmo, dejando claro que la actividad de concentraciones sub-CMI, junto a un PAFE prolongado sí podrían influir en la dosificación de UK 109,496.

INFLUENCIA DEL SUERO HUMANO EN EL COMPORTAMIENTO FARMACODINAMICO DE LOS ANTIFUNGICOS FRENTE A *Cr. neoformans*.

Además de los factores intrínsecos relacionados con la interacción antimicrobiano-microorganismo, existen factores propios del huésped o del patógeno que pueden influir en el resultado clínico (305). Dentro de estos factores podemos incluir el estado inmunológico del paciente, las características del lugar infectado y la virulencia del patógeno.

Los mecanismos normales de defensa que se enfrentan al agente infeccioso están constituidos por la respuesta inmunológica específica y no específica. Para el control satisfactorio de la infección, el huésped ha de mantener en equilibrio estas respuestas inmunoprotectoras e inmunorreguladoras. Cualquier defecto en algún aspecto individual de la respuesta inmune puede modificar significativamente el resultado de la infección, sin contar con la presencia de agentes antimicrobianos con actividad *in vitro* frente a los patógenos. Por otro lado, los antimicrobianos pueden interactuar con las células del huésped además de con los microorganismos diana, pudiendo potenciar o deprimir las defensas del huésped, alterando

así el resultado clínico, en especial en pacientes con anomalías inmunológicas preexistentes. (307,308).

En nuestro estudio hemos introducido el suero humano como factor individual del huésped para ver la influencia que ejerce sobre la interacción microorganismo-antifúngico, y aproximar así de forma más fiable los resultados al proceso biológico de las infecciones. Ya es conocido el efecto producido por el suero en muchos de los microorganismos infectantes (309,310). Se ha descrito desde hace tiempo la propiedad bacteriostática del suero desde bajas concentraciones (10%) sobre el crecimiento de *Cr. neoformans* (311,312); sin embargo, todavía hoy no se encuentra explicación clara a este fenómeno. Nosotros hemos visto igualmente que el incubar células de *Cr. neoformans* a inóculos de 5×10^5 UFC/ml en caldo bYNB-G en presencia de un 10% de suero humano deprime el crecimiento de las levaduras de forma significativa en comparación con un control de crecimiento sin suero. La inhibición del crecimiento observado cuando la cantidad de suero presente es del 50% es la misma prácticamente, lo que indica un efecto de saturación a partir de esta concentración del 10% de suero. Además queda descartado un descenso en la disponibilidad de los nutrientes en el medio al controlar el experimento con cultivos diluidos en la misma proporción con solución salina tamponada (PBS). A priori, este resultado puede conducirnos a pensar que se trata de un efecto letal sobre el microorganismo, inducido por un factor sérico que es capaz de eliminar a parte de la población. De hecho, existen trabajos en los que se confirma la tendencia a depositar fragmentos iC3b del complemento tanto en la superficie como en el interior de la cápsula de *Cr. neoformans* (235,236,313-315). También se ha indicado que las proteínas de bajo peso molecular (defensinas NP-1) presentan actividad fungicida frente a *Cr. neoformans* (316-318). Sin embargo, la capacidad de acumulación del complemento no presenta actividad lítica sobre las levaduras, y la concentración de defensinas en suero es demasiado escasa como para presentar efecto sobre estas células, ya que su mecanismo de acción es principalmente intracelular en los PMN (316,226). Además, como demostramos en nuestro estudio el efecto observado sobre *Cr. neoformans* persiste cuando el suero se ha incubado a 56°C durante 1 hora. Con ello, las proteínas séricas (incluidos complemento y NP-I) quedan desnaturalizadas, y el efecto que pudieran tener anulado. Por tanto, la fungistasis del suero ha de ser atribuida a otro factor, capaz de resistir la exposición hipertérmica.

Algunos autores han hablado de la posible influencia de factores químicos del suero posiblemente relacionados con la actividad inhibitoria de éste. Así el pH, la relación $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, la presencia de oxígeno en el medio, o el metabolismo del hierro son potenciales

inductores de este efecto (319-323). Se ha visto además, que el bicarbonato en proporciones del 0,5% ha influido en el crecimiento de las levaduras *Cr. neoformans* y *Candida parapsilopsis* (136).

En nuestro estudio, hemos demostrado que la incorporación al medio del cultivo de un tampón bicarbonatado en lugar del fosfatado, de uso común, induce un retraso en el crecimiento considerable. Este efecto había sido referido ya en otro estudio (319), donde el tiempo de generación de *Cr. neoformans* en ausencia de NaHCO_3 en el medio de cultivo fue de 2,1 horas, mientras que al incorporar esta solución el tiempo de generación aumentó hasta 6 horas. Nosotros obtuvimos un resultado similar, aunque con tiempos de generación superiores, atribuibles a la diferencia en el medio de cultivo base empleado (bYNB-G en lugar de DME). Asociado a este retraso en el crecimiento, se observa un aumento significativo en la cápsula, apreciable mediante microscopía óptica simplemente. Este mismo efecto se encuentra al incubar con suero, donde la cápsula de las levaduras aumenta considerablemente con el tiempo de incubación y su crecimiento se lentifica (324). Algunos autores han descrito la escasa presencia de cápsula en las levaduras cuando se encuentra en el medio ambiente y un tamaño enorme de los mismos aislados en pacientes enfermos de criptococosis (325-327).

Posiblemente, el cambio de medio hace que el ciclo de crecimiento del microorganismo se modifique, comenzando una mayor producción de cápsula, inducida posiblemente por la presencia de los tampones séricos y las presiones parciales de CO_2 pulmonares (319).

Este comportamiento diferente en el crecimiento al incorporar suero a los cultivos de *Cr. neoformans* puede hacerse comparable a las diferencias encontradas en algunos microorganismos al trabajar en distintas fases del crecimiento (logarítmica frente a estacionaria) (39,328,329). En los cultivos sin suero el crecimiento más rápido de los microorganismos hace que el medio se acidifique por los productos de los productos metabólicos y acelera el crecimiento del hongo, mientras que en los cultivos con suero el pH fue constante porque las levaduras crecen con tasa metabólica menor.

El estudio de los aspectos farmacodinámicos de los antifúngicos en presencia de suero mostró resultados muy diferentes a cuando no había suero presente. El ejemplo más claro está en el efecto postantifúngico, donde en ningún caso se pudo determinar el retraso en el crecimiento por efecto del pretratamiento, ya que la presencia de suero en el medio de cultivo reduce tanto la tasa de crecimiento que no se alcanza ni medio logaritmo en las 12 horas de experimento, incluso en los controles de crecimiento donde no existe antifúngico en el medio.

Este efecto es lógico, sabiendo que la tasa de muerte (o incidencia de un fármaco sobre un microorganismo) es proporcional a la tasa de crecimiento del microorganismo (37,39,40).

Las pruebas de sensibilidad no se realizaron en presencia de suero por motivos de tipo experimental. Al ser la lectura de los resultados espectrofotométrica, los resultados son poco fiables, puesto que la densidad del suero interfiere con la lectura del espectrofotómetro. Además, al incubar tiempos largos, el suero se deteriora con los productos de deshecho del microorganismo, que acidifican el medio, y forma agregados que interfieren con la lectura. En este sentido, el estudio de la actividad microbiológica queda incompleta, puesto que no podemos estimar la sensibilidad de *Cr. neoformans* cuando hay suero.

En cambio, si podemos ver el efecto de este parámetro del huésped por medio de las curvas de letalidad. En general, la incubación de *Cr. neoformans* en presencia de suero y con diferentes concentraciones de antifúngicos presentó un perfil fungistático, sufriendo ligeras modificaciones sujetas a las características específicas del mecanismo de acción de cada antifúngico. El AUKC nos mostró que la mayoría de los fármacos a concentraciones de CMI muestran un valor muy similar, con la excepción de anfotericina B.

Se ha descrito la alta unión a proteínas séricas de anfotericina B (90-95%) (330). Esta unión es específica sobre las β -globulinas plasmáticas (concretamente β_1 -lipoproteínas) encargadas del transporte de moléculas lipídicas. Los niveles plasmáticos de anfotericina B raramente superan 2 $\mu\text{g/ml}$ en plasma por saturación de estos sistemas proteicos (331). Análogamente podemos pensar que la presencia de proteínas del suero reacciona con las moléculas de anfotericina B de nuestros ensayos, reduciendo la cantidad de fármaco activo frente a las células de *Cr. neoformans*, lo que inmediatamente hace descender los valores de actividad fungicida. El caso opuesto lo encontramos en 5-fluorocitosina, donde la adherencia a proteínas es nula prácticamente, y la actividad del fármaco no resulta alterada por esta propiedad. En este antifúngico, tanto las concentraciones inhibitorias como suprainhibitorias en presencia o ausencia de suero se movieron en una franja muy estrecha de variación en la inhibición del crecimiento. Sin embargo, en nuestro estudio, tratar de explicar un descenso significativo en la actividad antifúngica de un fármaco con elevada unión a proteínas séricas no es factible, ya que las proporciones empleadas de suero son muy bajas (10%) y, por tanto, la influencia ejercida en cuanto a unión a proteínas es muy baja.

Esto explica que la presencia de suero no modificó la actividad de 5-fluorocitosina, sino que casualmente las concentraciones de 64 y 100 $\mu\text{g/ml}$ inhibieron el crecimiento de *Cr. neoformans* de un modo similar a como lo hizo con suero, pero al descender las

concentraciones, los valores de inhibición del crecimiento se aproximaron a los del control respectivo (con o sin suero). Esto se debe, como ya dijimos, a la variación en el tiempo de generación en las levaduras al entrar en contacto con el suero, ya que la mayor lentitud en la división implica mayor efecto microbicida (40). Este caso se ve más claramente con ketoconazol, donde la actividad fungicida demostrada sin suero, se ve reducida a tan sólo las últimas horas de la prueba y de forma menos acusada cuando incorporamos un 10% de éste.

También ha de tenerse en cuenta la alta capacidad de unión a la albúmina de ketoconazol que al igual que vimos con anfotericina B puede influir en la actividad microbicida (187). Odenholt *et al* (112) ya describió el efecto de la unión a proteínas como un factor influyente en la interpretación de la tasa de muerte de *S.aureus* con dioxocilina y ampicilina demostrando que la presencia de albúmina humana en los cultivos puede eliminar el efecto paradójico de concentraciones inhibitorias y supra-CMI con estos antibióticos. En nuestro caso no podemos atribuir un descenso en la actividad debido a la unión de ketoconazol a proteínas pues sólo trabajamos con 10% de suero presente en los cultivos, aunque si pudo ejercer una leve interferencia en la acción del fármaco.

La actividad del suero frente a *Cr. neoformans* cuando es tratamiento fue con fluconazol, resultó fungicida a partir de la hora 60 alcanzando con 36 µg/ml a las 72 horas la mayor eficacia comparada con los demás antifúngicos, aunque en ningún momento la presencia de suero sirviese para potenciar el efecto del fármaco.

Nassar *et al* (243) han descrito un efecto potenciador del suero sobre la actividad de fluconazol frente a *Cr. neoformans*. Este efecto lo han descrito en ensayos realizados con un 5% de suero y de forma independiente de la concentración de fluconazol empleada. Estos resultados opuestos a los nuestros pueden ser debidos a varias causas, como la diferencia en el medio de cultivo. En el estudio de Nassar *et al* emplean RPMI que, como ya dijimos en su momento, hace que crezca de forma menos rápida el microorganismo (132,136).

Un problema añadido a la pérdida de eficacia de fluconazol al incubarse con suero es que si ya poseía poca correlación entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica, ahora este fenómeno se va a acentuar más todavía. Para UK 109,496 no podemos decir lo mismo, puesto que la correlación *in vitro* vs *in vivo* se ha superado en este compuesto comparado con fluconazol.

Al incorporar suero a cultivos de *Cr. neoformans* tratados con concentraciones de la CMI de UK 109,496, los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los obtenidos con el control con suero, lo que contrasta claramente con la

exposición al fármaco sin suero, así como con los datos obtenidos con fluconazol, donde las concentraciones próximas a la CMI indujeron mayor retraso en el crecimiento. En cambio, con las concentraciones más altas el efecto se equipara y en presencia de suero tanto UK 109,496 como fluconazol presentan una ligera reacción y comienzan a ser fungicidas a partir de la hora 48. A priori, estos resultados ponen en clara ventaja a fluconazol frente a su derivado UK 109,496. Sin embargo, si consideramos que la concentración de fluconazol con la que hemos trabajado está prácticamente en los límites considerados como tóxicos (32 µg/ml) y UK 109,496 está a una dilución de alcanzar dicho límite, entonces la situación se invierte y deja a este nuevo fármaco con un mayor margen terapéutico de eficacia previo a las concentraciones de toxicidad, en comparación con fluconazol. A la hora de elegir un compuesto para tratar una enfermedad infecciosa siempre es mejor un fármaco que, a igualdad de condiciones de actividad, presente un rango mayor de concentraciones terapéuticas no tóxicas, eso sí, sin descartar, además, su perfil farmacocinético.

SUMARIO DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACODINÁMICA DE CINCO ANTIFÚNGICOS SOBRE LA LEVADURA *Cryptococcus neoformans*.

El método propuesto por la NCCLS para la estandarización de las pruebas de laboratorio, sugirió en su documento M27-P de diciembre de 1992 (24), que el tamaño de inóculo óptimo a emplear en las pruebas de sensibilidad antifúngica con levaduras debería ser de 0,5 a 2,5 x 10³UFC/ml. Transcurridos 3 años (en 1995), este comité emitió una nueva versión del citado documento M27-T (25), en el cual, la situación respecto al tamaño de inóculo a emplear es reconsiderada para determinados casos. Concretamente con *Cr. neoformans* se abre la posibilidad de utilizar un tamaño de inóculo mayor, considerando a la vez, un valor de inhibición inferior al del 90% (por ejemplo la IC₅₀).

El desarrollo de nuestro trabajo, coincidente en el tiempo con la publicación de estos dos documentos de la NCCLS, ha corroborado la importancia de los parámetros experimentales tales como, el medio de cultivo, el tamaño de inóculo, o los intervalos de medición en las pruebas de laboratorio para agentes antifúngicos. Al hablar de tamaño de inóculo cabe destacar que en nuestro estudio todos los antifúngicos, han mostrado una clara influencia en la sensibilidad al variar la masa microbiana inicial expuesta a los fármacos. Este suceso es importante, ya que, la densidad del inóculo infectante influye directamente sobre la significación clínica de concentraciones antifúngicas séricas, es decir, sobre la eficacia del

agente antiinfeccioso (96). Además, este efecto no solo implica una variación significativa en la actividad de antifúngico, sino que también muestra una cierta similitud entre los valores inhibitorios del 90 % (IC₉₀), con tamaño de inóculo de 10³UFC/ml y los del 25% (IC₂₅) con 10⁵UFC/ml en todos los antifúngicos.

Este fenómeno influye directamente sobre el tiempo de incubación de los cultivos. El mayor crecimiento de los microorganismos en las pruebas con un inóculo inicial de tamaño elevado, implican una lectura anterior de los resultado, siendo las 48 horas el momento óptimo de registro de los valores inhibitorios para un inóculo de 10⁵UFC/ml y 72 horas para 10³UFC/ml. Es lógico que esto suceda, puesto que cuantos más microorganismos hay presentes en el cultivo, hay más dianas del microorganismo para ocupar, lo que implica menor actividad y un consumo más rápido del fármaco.

El poder adelantar la lectura del valor inhibitorio de los agentes antifúngicos de 72 a las 48 horas de incubación, con tan sólo modificar el inóculo y sin interferir en el resultado, supone un avance importante para los laboratorios clínicos. Esta conclusión queda corroborada con la nueva sugerencia de la NCCLS para pruebas de sensibilidad con levaduras, donde para *Cr. neoformans* el inóculo estándar se ha aumentado (10⁴ UFC/ml), y el valor de sensibilidad se determina con fracciones inhibitorias menores (IC₅₀), como ya hemos dicho (25).

Sin embargo, y desde un punto de vista enfocado a la proyección clínica, los tiempos mencionados distan mucho de aproximarse a los verdaderos intervalos de dosificación empleados en la administración de estos fármacos a personas, ya que en terapia se acortan dichos periodos. Por tanto, hemos de comprobar lo que sucede antes de estas lecturas del valor de inhibición del crecimiento y valorar la actividad de estos antifúngicos a lo largo de esos periodos, por medio de las curvas de letalidad.

Curiosamente, al evaluar el desarrollo de la actividad en el tiempo con inóculo inicial de 10³UFC/ml, todos los antifúngicos estudiados excepto UK 109,496, y a concentraciones terapéuticas, mostraron un comportamiento tiempo dependiente (considerando este como la mínima variación encontrada en el recuento de la masa microbiana, al incrementar la concentración del fármaco), mientras que si partimos de un inóculo mayor (10⁵UFC/ml) todos los fármacos excepto ketoconazol presentaron un comportamiento dependiente de la concentración del fármaco.

Con este dato podemos afirmar que para diseñar un modelo o sistema de predicción de la eficacia terapéutica en hongos, se debe utilizar un tamaño de inóculo más elevado, puesto que así, la mayoría de los fármacos actuarán de manera concentración dependiente y, por

tanto, nos permite dar una mayor importancia al coeficiente terapéutico (IQ), que, como ya dijimos garantiza la eficacia de forma más fiable cuanto mayor es su valor. Además, las principales manifestaciones no meníngeas causadas por esta levadura presentan un tamaño de inóculo elevado (alta carga criptocócica en nódulos pulmonares o vesículas cutáneas) (223,332,333) mientras que las meníngeas están sometidas a concentraciones de antifúngico diferentes a las consideradas en suero debiéndose ajustar el IQ.

Aunque en muchos casos se obtenga un IQ razonablemente elevado, no podemos garantizar que sea el óptimo para estos antifúngicos, puesto que la limitación impuesta por la toxicidad en la administración de los mismos es muy grande. Además, el optar por un IQ de 4 como sugieren Elnor y Neu (30) no es del todo aplicable a la metodología con hongos, puesto que los intervalos de dosificación terapéutica son exageradamente menores que la lectura de los resultados de las pruebas hechas en el laboratorio, imposibles de realizar con períodos más cortos a causa de la fisiología de las levaduras.

Esto implica que ya que nunca tendremos un IQ adecuado que genere tasas óptimas de muerte fúngica, no podremos contrastar la actividad ejercida *in vitro* por el fármaco con los valores presentes en el suero durante la fase de mayor concentración (pico sérico) y debemos acudir a los parámetros farmacodinámicos que se basan en la fase de baja concentración de fármaco (o valle).

Así para explicar la eficacia *in vivo* se ha de acudir al efecto postantifúngico y de concentraciones sub-CMI en dicha fase. Con todos los fármacos se ha obtenido un efecto PAFE y de concentraciones subinhibitorias, suficiente como para poder compensar la carencia de actividad fungicida durante el periodo de actividad con altas concentraciones. Esto permite superar por completo la interdosificación sin que se produzca un recrecimiento de los microorganismos, hasta alcanzar concentraciones de nuevo potencialmente patógenas como define el parámetro ERT

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en nuestro trabajo "*Actividad y farmacodinamia de cinco antifúngicos frente a Cryptococcus neoformans*" podemos concluir que:

- 1) Las pruebas de sensibilidad de los antifúngicos frente a *Cr. neoformans* están claramente influidas por el tamaño de inóculo empleado. Se ha encontrado cierta correspondencia entre los valores inhibitorios del 90% e inóculo bajo (10^3 UFC/ml) y los de inhibición del 25% e inóculo elevado (10^5 UFC/ml). Este fenómeno es importante, puesto que los tiempos de lectura de los valores inhibitorios se pueden realizar antes cuando se emplea inóculo elevado.
- 2) Destacamos la clara actividad fungicida inducida por concentraciones terapéuticas de los agentes azólicos fluconazol, ketoconazol y UK 109,496, en contra del concepto generalizado de fungistasis de estas moléculas.
- 3) Igualmente que con las pruebas de sensibilidad el efecto inóculo es un factor determinante en las curvas de letalidad. Con la excepción de ketoconazol, todos los antifúngicos mostraron tendencia a un comportamiento concentración dependiente cuando se aumentó el inóculo de partida.
- 4) Hemos demostrado que el PAFE de los cinco antifúngicos frente a las dos cepas de *Cr. neoformans* depende claramente de la concentración empleada y la exposición a la que se someten las levaduras. Exposiciones cortas a concentraciones elevadas no generaron PAFE mientras que exposiciones largas con concentraciones terapéuticas sí. La relevancia de este hecho estriba en que los perfiles farmacocinéticos de los antifúngicos, a diferencia de lo que sucede con antibióticos, suelen presentar una fase de eliminación prolongada, por lo que para simular un periodo de tratamiento en pruebas de efecto postantifúngico conviene emplear tiempos de exposición largos y concentraciones terapéuticas.
- 5) Con todos los agentes se encontró una potenciación del efecto inhibitor del crecimiento en fase postantifúngica, al ser expuestas de nuevo a concentraciones de antifúngico inferiores a la inhibitoria. Es importante considerar en estudios farmacodinámicos la acción de concentraciones residuales o subinhibitorias en fase postantifúngica ya que, junto con el

PAFE, pueden reemplazar la carencia de actividad microbica de las concentraciones suprainhibitorias de estos fármacos y mantener la población microbiana por debajo del umbral potencialmente infectante en el periodo entre dosis.

6) El suero humano en una proporción del 10% interfiere con la actividad de los agentes antifúngicos estudiados a cualquier inóculo o concentración. Este fenómeno es posiblemente atribuible a la reducción de los tiempos de generación de las levaduras, inducidos por algún factor termorresistente (probablemente relacionado con el sistema de tamponado) presente en el suero.

BIBLIOGRAFIA

1. Ross EM. Pharmacodynamics. Mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and Effect. In Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE eds. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics -9th edition. New York, 1995:29-41.
2. Levison ME. Pharmacodynamics of antimicrobial agents. Bactericidal and postantibiotic effects. *Infect Dis Clin N Am* 1995; 9:483-95.
3. Nightingale CH, Quintiliani R, Nicolau DP. Intelligent dosing of antimicrobials. In Remington J, Swartz MN eds. Current clinical topics in infectious diseases. Oxford 1989. 252-265.
4. Clarck AJ. The mode of action of drugs on cells. Arnold & Co. Londres. 1933
5. Stephenson RP. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol.* 1956; 1:379-93.
6. Thonrsberry, C. 1983. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Tentative standar M7T. National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova PA.
7. Cars O. Pharmacokinetics of antibiotics in tissues and tissue fluids: a review. *Scand J Infect Dis* 1991; 74:23-33.
8. Proudfoot SG. Dosage regimens: Their influence on the concentration-time profile of a drug in the body. In Aulton ME eds. *Pharmaceutics: the science of dosage form design.* London 1988.191-211.
9. Bush LM, Levison ME. Antibiotic selection and pharmacokinetics in the critically ill. *Crit Care Clin* 1988; 4:299-325.
10. Craig WA, Guddmundson S. Postantibiotic effect. In Lorian V. eds. *Antibiotics in laboratory of medicine* (4th ed.). Baltimore.1996. 296-329.
11. Bundtzen RW, Gerber AU, Cohn DL, Craig WA. Postantibiotic suppression of bacterial growth. *Rev Infect Dis* 1981; 3:28-37.
12. Shibl AM, Pechère JC, Ramadan MA. Postantibiotic effect and host-bacteria interactions. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:885-90.
13. MacKenzie FM, Gould IM. The postantibiotic effect. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32:519-37.
14. Pastor A, Cantón E, Gobernado M. Efecto postantibiótico (EPA). I. Métodos de estudio y factores influyentes. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5(3):201-10.
15. Pastor A, Cantón E, Gobernado M. Efecto postantibiótico (EPA). II. Antimicrobianos en que se ha descrito EPA, con especial referencia a las quinolonas. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5(3):211-8.

16. Mínguez F, Aparicio P, Lurueña S, Cabronero MJ, Prieto J. Influencia de las asociaciones bacterianas en sobre el efecto postantibiótico. *Enf Infec Microbiol Clin* 1990; 4:30-4.
17. Vogelmann BS, Craig WA. Postantibiotics effects. *J Antimicrob Chemother* 1985; 15:37-46.
18. Rotschafer JC, Zabinski RA, Walker KJ. Pharmacodynamic factors of antibiotic efficacy. *Pharmacotherapy* 1992; 12:64s-70s
19. Amsterdam D. The MIC: myth and reality. *Antimicrob Newsl* 1992; 8(2):9-16.
20. Beam TR, Gilbert DN, Kunin CM. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. *Clin Infect Dis* 1992; 15(suppl 1):S5-32.
21. Soriano F. Actividad antimicrobiana, niveles séricos y eficacia clínica de los antibióticos. *Rev Esp Microbiol Clin* 1987; 2:5-9.
22. Hamilton-Miller JMT. Susceptibility testing methods: Why use the MIC?. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27:137-40.
23. Pemán J, Cantón E. Las pruebas de sensibilidad antifúngica en un laboratorio de microbiología clínica. *Rev Esp Quimioter* 1996; 9:17-20
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; proposed standard. Pennsylvania: NCCLS, 1992. NCCLS document M27-P.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; proposed standard. Pennsylvania: NCCLS, 1995. NCCLS document M27-T.
26. Barry AL Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In Lorian V. eds. *Antibiotics in laboratory of medicine* (3rd ed.). Baltimore.1991. 1-16.
27. Ackerman BH, Dello-Buono FA. In vitro testing of antibiotics. *Pharmacotherapy* 1996; 16:201-21.
28. Nichols WW, Towards a fundamental understanding of the MIC β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22:275-83.
29. Isenberg HD. Antimicrobial susceptibility testing: a critical evaluation. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22(suppl a):73-86.
30. Elnor PD, Neu HC. The inhibitory Quotient. A method for interpreting minimum inhibitory concentration data. *JAMA* 1981; 246:1575-8.

31. Mediavilla A, Flórez J. Farmacología de las enfermedades infecciosas: Principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. En Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A eds. Farmacología humana (2ª ed). Madrid 1992. 975-1002.
32. Johnson CC. In vitro testing: correlations of bacterial susceptibility, body fluid levels, and effectiveness of antibacterial therapy. In Lorian V. eds. Antibiotics in laboratory of medicine (4th ed.). Baltimore.1996.813-34.
33. Amsterdam D. Assessing cidal activity of antimicrobial agents: problems and pitfalls. Antimicrob Newsl 1990; 7(7)49-56.
34. Baraket V, Lesage D, Delisle F, Richard G, Petit JC. Bactericidal effect of sparfloxacin alone and in combination with amoxicillin against *Streptococcus pneumoniae* as determined by kill-kinetic studies. Infection 1996; 24:22-25.
35. Li RC. Simultaneous pharmacodynamic analysis of the lag and bactericidal phases exhibited by β -lactams against *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:2306-10.
36. Mattie H. Kinetics of antimicrobial action. Rev Infect Dis 1981; 3:19-27.
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Pennsylvania: NCCLS, 1992. NCCLS document M26-T.
38. Tuomanen E. Phenotypic tolerance: the search for β -lactam antibiotics that kill nongrowing bacteria. Rev Infect Dis 1986; 8(suppl.3):s279-91.
39. Svensson E, Hanberger H, Nilsson L. Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combinations on growing and nongrowing *Staphylococcus epidermidis* cells. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:107-11.
40. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. The rate of killing of *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bactericidal growth. J Gen Microbiol 1986; 132:1297-304.
41. Brook I. Inoculum effect. Rev Infect Dis 1989; 11:361-8.
42. Reports from the literature. The effect of inoculum. Antimicrob Newsl 1989; 6:49.
43. Chapman SW, Steigbigel RT. Sptaphylococcal betalactamase and efficacy of beta-lactam antibiotics: In vitro and in vivo evaluation. J Infect Dis 1983; 143:1078-89.
44. Corrado ML, Landesman SH, Cherubin C.. Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin and N-formimidoyls thienamycin (MK0787) against *Pseudomona aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18:893-6.

45. Handberg S, Tomaz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev Inf Dis* 1985; 7:368-9.
46. Ishida KP. Variables in demonstrating meticillin tolerance in *Staphylococcus aureus* strains *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21:688-90.
47. Taylor PC. Determination of minimal bactericidal concentration of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: influence and significance of technical factors *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:142-50.
48. Layte S, Harris P, Rolison GN. Factors affecting the apparent regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* following exposure to bactericidal concentrations of carbenicillin. *Chemotherapy* 1983; 30:26-30.
49. Dankert J. Importance of minimizing carry-over effect at subculture in the detection of penicillin-tolerant viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:614-16.
50. Glew RH, Moellerig RC. Effect of protein binding on the activity of penicillins in combination with gentamicin against enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 15:87-92.
51. Lam VFW. Effect of protein binding on serum bactericidal activities of ceftacide and cefoperazone in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:298-302.
52. Venglarcik JD, Blair LL, Dunkle LM. pH dependent oxacillin tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:232-5.
53. Medeiros AA. Effect of salt concentration on the apparent in vitro susceptibility of *Pseudomonas* and other gram negative bacilli to gentamicin. *J Infect Dis* 1971; 124 (suppl.1):S59-S64.
54. Madiraju MV, Brunner DP, Wilkinson BJ. Effects of temperature, NaCl, and meticillin on penicillin binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in meticillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:1727-33.
55. White R, Friedrich R, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:904-8.
56. Tisdale JE, Pasko MT, Mylotte JM. Antipseudomonal activity of simulated infusions of gentamicin alone or with piperacillin assessed by serum bactericidal rate and area under the killing curve. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1500-5.
57. Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. The in vivo postantibiotic effect of imipenem and other new antimicrobials. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18(suppl. E):67-73.

58. Vogelmann B, Gudmundsson S, Turnidge J, Leggett J, Craig WA. In vivo postantibiotic effect in a tight infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 1980; 12:307-9.
59. Rennenberg J, Walder M. Postantibiotic effect of imipenem, norfloxacin and amikac in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1714-1720.
60. Hessen MT, Pitsakis PG, Levison ME. Absence of postantibiotic effect in experimental *Pseudomonas* endocarditis treated with imipenem with or without gentamicin. *J Infect Dis* 1988; 158:542-8.
61. Xue IB, Davey PG, Phillips G. Variation in postantibiotic effect of clindamycin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for dosing of patients with osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1403-7.
62. Bush M, Boscia JA, Wendeler M, Pitsakis PG, Kalle D. In vitro Postantibiotic effect of daptomycin (LY146032) against *Enterococcus faecalis* and methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33:1198-200.
63. Bustamante CI, Drusano GL, Tatem BA, Standifor HC. Postantibiotic effect of imipenem on *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26:678-82.
64. Turnidge JD, Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:83-92.
65. Webster C, Ghazanfar K, Slack R. Sub-inhibitory and post-antibiotic effects of spiramycin and erythromycin on *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22(suppl B):33-9.
66. Mínguez F, Agra M, Lurueña S, Ramos C, Prieto J. Post-antibiotic effect of isepamicin compared to that of other aminoglycosides. *Drugs Exptl Clin Res* 1990; 16(5):231-5.
67. Jason AC, MacKenzie FM, Jason D, Gould IM. Automatic procedures for measuring post-antibiotic effect and determining random errors. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:669-78.
68. Pastor A, Pemán J, Cantón E. In-vitro postantibiotic effect of sparflloxacin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:679-85.
69. Alados JC, Gutierrez J, Liébana J, Piédrola G. Estudio del efecto postantibiótico de norfloxacin y ciprofloxacin en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae*. *Rev Esp Quimioterap* 1989; 2:49-52.

70. Alados JC, Maroto MC, Liébana J, Piédrola G. Efecto postantibiótico y cinética de letalidad de dos quinolonas frente a aislados clínicos de *Shigella sonnei*. Rev Esp Quimioter 1989; 2:245-8.
71. Craig WA. The postantibiotic effect. Clin Microbiol Newsl 1991; 13:121-4.
72. Lorian V, Ernst J, Amaral L. The postantibiotic effect defined by bacterial morphology. J Antimicrob Chemother 1989; 23:485-91.
73. Rescott DL, Nix DE, Holden P, Schentag JJ. Comparison of two methods for determining in vitro postantibiotic effects of three antibiotics on *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:450-3.
74. Isaksson B, Hanberger H, Maller R, Nilsson M, Nilsson LE. Synergic postantibiotic effect of amikacin in combination with β -lactam antibiotics on gram negative bacteria. J Antimicrob Chemother 1991; 28:25-34.
75. Gottfredsson M, Erlendsdottir H, Gudmundson S. Quantitation of postantibiotic effect by measuring CO₂ generation of bacteria with the bactec blood culture system. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:2658-61.
76. Odenholt -Tornqvist I, Holm SE, Cars O. Effects of benzylpenicillin on *Streptococcus pyogenes* during the postantibiotic phase in vitro. J Antimicrob Chemother 1989; 24:147-56.
77. Habberger H. Pharmacodynamic effects of antibiotics. Studies on bacterial morphology, initial killing, postantibiotic effect and effective regrowth time. Scand J Infect Dis 1992; 81:1-52.
78. Habberger H, Svensson E, Nilsson M, Nilsson E, Hornsten EG, Maller R. Effects of imipenem on *Escherichia coli* studied using bioluminescence, viable counting and microscopy. J Antimicrob Chemother 1993; 31:245-60.
79. Gerber AU, Holm S. Pharmacodynamics of antibiotics in vitro (Summary of a panel discussion). Scand J Infect Dis 1991; 37(suppl):1154-7.
80. Majcherczyk PA. The issue of the true postantibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1996; 37:188-9.
81. McDonald PJ, Craig WA, Kunin CM. Persistent effects of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. J Infect Dis 1977; 135(2):217-23.
82. Winstanley TG, Hastings JGM. Penicillin aminoglycoside synergy and postantibiotic effect for Enterococci. J Antimicrob Chemother 1989; 23:189-99.
83. Scalarone GM, Mikami Y, Kurita N, Yazawa K, Miyaji M. The postantifungal effect of 5-fluorocytosine on *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother 1992; 29:129-36.

84. Mínguez F, Gómez-Lus ML, Muro A, Cabronero MJ, Gómis M, Prieto J. Comparative study of the postantibiotic effect of cefotaxime, amoxicillin, ofloxacin and pefloxacin. *Rev Infect Dis* 1989; 2(suppl.5):955-7.
85. Mínguez F, Ramos C, Barrientos S, Loscos A, Prieto J. Postantibiotic effect of ciprofloxacin compared with that of five other quinolones. *Chemother* 1989; 33(10):1714-20.
86. Fursted K. Comparative killing activity and postantibiotic effect of streptomycin combined with ampicillin, ciprofloxacin, imipenem, piperacillin or vancomycin against strains of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium*. *Chemotherapy* 1988; 34:229-234.
87. Cooper MA, Jin YF, Ashby JP, Andrews JM, Wise R. In vitro comparison of the postantibiotic effect of vancomycin and teicoplanin. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26:203-7.
88. Chin NX, Neu HC. Postantibiotic suppressive effect of ciprofloxacin against gram positive and gram negative bacteria. *Am J Med* 1987; 82(suppl. 4a):58-61.
89. Willson DA, Rolinson GN. The recovery period after exposure of bacteria to penicillin. *Chemotherapy* 1979; 25:14-22.
90. Baquero F, Culebras E, Patrón C, Pérez-Díaz JC, Medrano JC, Vicente MC. Postantibiotic effect on Gram-positive and Gram-negative micro-organisms. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18:47-59.
91. Eng RHK, Smith SM, Cherubin CE, Tan EN. Evaluation of two methods for overcoming the antibiotic carryover effect. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:34-8.
92. Odenholt-Tornqvist I, Löwdin E, Cars O. Postantibiotic Sub-MIC effects of vancomycin, roxitromycin, sparfloxacin and amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1852-8.
93. Odenholt-Tornqvist I. Studies on postantibiotic effect and the postantibiotic sub-MIC effect of meropenem. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31:881-92.
94. Odenholt-Tornqvist I, Holm S, Cars O. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Scand J Inf Dis* 1991; 74(suppl):94-101.
95. Zhanel GG, Crampton J, Kim S, Nicole LE, Davidson RJ, Hoban DJ. Antimicrobial activity of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* as determined by the killing curve method and the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 1992; 38:388-94.
96. Genmel CG, Lorian V. Effect of low antibiotics on bacterial ultrastructure virulence and susceptibility to immunodefenses: Clinical significance. In Lorian V. eds. *Antibiotics in laboratory of medicine* (4th ed.). Baltimore. 1996.397-452.

97. Odenholt I, Holm SE, Cars O. Effects of bencilpenicillin on group A strptococci during the postantibiotic phase in vitro. *J Antimicrob Chemother* 24:147-156.
98. Odenholt-Tornqvist I, Bengtsson S. Postantibiotic effect and postantibiotic effect of subinhibitory concentrations of sparfloxacin on Gram-negative bacteria. *Chemotherapy* 1994; 40:30-6.
99. Kikuchi K, Enari T, Minami S, Haruki K, Shibata Y, Hasegawa H, Katahira J, Totsuka K, Shimizu K. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of bencylpenicillin on viridans streptococci isolated from patients with infective endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:687-96.
100. Tauber MG, Zak O, Scheld WM, Hengstler B, Sande MA. The postantibiotic effect in the treatment of experimental meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo. *J Infect Dis* 1984; 149:575-83.
101. Baker-Woundenberg IAJM, van den Berg JC, Fontinje P, Michel MF. Efficacy of continuous versus intermittent administration of pennicillin G on *Streptococcus pneumonie* pneumonia in normal and immunodeficient rats. *Eur J Clin Microbiol* 1984; 3:131-5.
102. Hanberger H, Svensson E, Nilsson LE, Nilsson M. Control-related efective regrowth time and postantibiotic effect of meropenem on Gram-negative bacteria studied by bioluminescence and viable counts. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:585-92.
103. McDonald PJ, Wetherall RL, Pruul H. Postantibiotic leukocyte enhancement: Increased susceptibility of Bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes. *Rev Infect Dis* 1981; 3:38-44.
104. Hand WL, King-Thompson NL. Contrast between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29:135-40.
105. Milatovic D. Antibiotics and phagocytosis. *Eur J Clin Microbiol* 1983; 2:414-25.
106. Forsgren A, Schemeling D. Effect of antibiotic on chemotaxis of human leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11:580-4.
107. Müller-Eberhard HJ. The membrane attack complex. *Springer Semin Immunopathol* 1984; 7:93-141.
108. Stanley D, McGrath BJ, Lamp KC, Rybak MJ. Effect of human serum on killing activity of vancomycin and teicoplanin against *Staphylococcus aureus*. *Pharmacotherapy* 1994; 14:35-9.
109. Mínguez F, Chiu ML, Lima NC, Ñique R, Prieto J. Activity of fluconazole: postantifungal effect, effects of low concentrations and of pretreatment on the

- susceptibility of *Candida albicans* to leucocytes. J Antimicrob Chemother 1994; 34:93-100.
110. Wise R. Protein binding and related properties of antibiotics and their pharmacological and clinical relevance. In: Prediction and assesment of antibiotic clinical efficacy. O'Grady F, Percival A eds. Academic press London. 1986. 75-95.
 111. Wise R. Protein binding of betalactams: the effects on activity and pharmacology, particularly tissue penetration. J Antimicrob Chemother 1983; 12:105-8.
 112. Odenholt I, Holm SE, Cars O. Effect of antibiotic protein binding on the killing rate of *Staphylococcus aureus* and on the paradoxical phenomenon. Chemotherapy 1987; 33:331-9.
 113. Craig WA, Kunin CM. Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. Annu Rev Med 1976; 27:287-300.
 114. Craig WA, Kunin CM. Protein binding of antimicrobials. Clinical pharmacokinetics and therapeutic implications. Clin Pharmacokinet 1977; 2:252-268.
 115. Espinel-Ingroff A. La estandarización de las pruebas de sensibilidad de antifúngicos y medios alternativos. Rev Esp Quimioterap 1994; 7:20-31.
 116. Cormican MG, Pfaller MA, Standarization of antifungal susceptibility testing. J Antimicrob Chemother 1996; 38:561-78.
 117. Amsterdam D. Instrumentation for antimicrobial susceptibility testing: yesterday, today and tomorrow. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 9:167-78.
 118. Carrillo Muñoz AJ, Abarca-Salat L, Quindós G. Pruebas de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. I. Factores y variables que influyen en su realización en el laboratorio. Rev Iberoam Micol 1994; 11:105-10.
 119. Espinel-Ingroff A. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Newsl 1996; 18:161-7.
 120. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: advances and potencial clinical applications. Clin Infect Dis 1997; 24:776-84.
 121. Cook RA, McIntire RA, Galgiani JN. Effects of incubation temperature, inoculum size and medium on agreement for macro and microdilution broth susceptibility test results for yeasts. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34:1542-5.
 122. Block ER, Jennings AE, Bennett JE. Variables influencing susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to 5-fluorocytosine. Antimicrob Agents Chemother 1973; 4:392-5.

123. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:367-81.
124. Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bartizal KF, Bartlet MS, Body BA, Frey C, Hall GS, Roberts GD, Nolte FB, Odds FC, Rinaldi MG, Sugar AM, Villareal K. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:39-45.
125. Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal KF, Galgiani JN, Villareal K, Pfaller MA, Gerarden T, Rinaldi MG, Fothergill A. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3138-45.
126. Galgiani JN, Stevens DA. Antimicrobial susceptibility testing of yeasts: a turbidimetric technique independent of inoculum size. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 10:721-6.
127. Korting HC, Ollert M, Georgill A Fröschl M. In vitro susceptibilities and biotypes of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2626-31.
128. Soothill JS, Girling AJ. The IC_{50} : an exactly defined measure of antibiotic sensitivity. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29:137-9.
129. Blanco MT, Pérez-Giraldo C, Blanco J, Morán FJ, Hurtado C, Gómez-García AC. In vitro studies of activities of some antifungal agents against *Candida albicans* ATCC 10231 by turbidimetric method. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:898-901.
130. British society for antimicrobial chemotherapy. Working party. Laboratory monitoring of antifungal chemotherapy. *Lancet* 1991; 337:1577-80.
131. LaRocco M. Recent advances in antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Newsl* 1991; 13:81-5.
132. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, Bartlet MS, Body BA, Espinel-Ingroff A, Fromtling RA, Hall GS, Hughes GE, Odds FC, Sugar AM. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1648-54.
133. Pfaller MA, Burmeister L, Bartlet MS, Rinaldi MG. Multicenter evaluation of four methods of yeasts inoculum preparation. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1437-41.
134. Odds FC. Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:685-91.
135. Carrillo-Muñoz AJ, Torres-Rodríguez JM. Influencia del tiempo de incubación en las concentraciones mínimas inhibitorias de cinco antifúngicos. *Rev Esp Quimoterap* 1993; 3(2):150-4.

136. Gadea I, Cuenca M, Gegúndez MI, Zapardiel J, Valero MI, Soriano F. Effect of pH and buffer system on the in vitro activity of five antifungals against yeasts. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:453-9.
137. Ellis D, Jarvinen A, Hansman D. Effect of pH on in vitro antifungal drug sensitivity testing. In: Ishigami J (ed.) *Recent advances in chemotherapy. Antimicrob Sec 3, Proceedings of the 14th international congress of chemotherapy.* 1985. University of Tokyo Press. Kyoto Japan.
138. Doern GV, Tubert TA, Chapin K, Rinaldi M. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J Clin Microbiol* 1986; 24:507-11.
139. Características de los Fungi. En: *Micología Médica.* McGraw-Hill eds. México 1986. 135-82.
140. Dixon DM, Fromtling RA. Morphology taxonomy and classification of the fungi. In: Murray PR (ed.). *Manual of clinical microbiology.* ASM press. Washington 1995.699-708
141. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. Characterization of the fungicidal dynamics of fluconazole and amphotericin B against *Candida albicans* via kill-curve methodologies, abstr. E 51, P.90. 1996. In: *Abstracts of the 36th interscience conference of antimicrobial agents and chemotherapy.* American Society for Microbiology, Washington DC.
142. Klepser ME, Wolfe EJ, Pfaller MA. Characterization of the fungicidal dynamics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* via kill curve methodologies. 1996. Abstr.77, P.50. In: *Programs and Abstracts of the 34th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America.*
143. Mfnguez F, García MT, Lima NC, Llorente MT, Prieto J. Postantifungal effect and effects of low concentrations of amphotericin B, and fluconazole on previously treated *Candida albicans*. *Scan J Infect Dis* 1996; 28: 503-6.
144. Wilson ME, Gencko RJ, Snyderman R. The phagocytic cell: summary. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 387-9.
145. Wright SD. Cellular strategies in receptor-mediated phagocytosis. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 395-7.
146. Spitznagel JK, William MS. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: a historical summary. *Rev Infect Dis* 1985; 7: 3998-403.
147. Lyman CA, Walsh TJ. Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1994; 62:1489-93.
148. Khardori N. Host-parasite interaction in fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 331-5.

149. Roilides E, Walsh TJ, Rubin M, Venzon D, Pizzo PA. Effects of antifungal agents on the function of human neutrophils in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 196-201.
150. Drummond DC, Wong CW, Whitman LM, McCormack JG. The effects of amphotericin B, fluconazole and miconazole on neutrophil and lymphocyte function in a guinea pig model. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 375-84.
151. Vago T, Baldi G, Colombo D, Barbareschi M, Norbiato G, Dallegri F, Bevilacqua M. Effects of naftifine and terbinafine, two allylamine antifungal drugs, on selected functions of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2605-11.
152. Nugent KM, Couchot KR, Gray LD. Effect of *Candida* morphology on amphotericin B susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987; 31: 335-6.
153. Gallis H, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990; 12:308-39.
154. Hoeprich PD. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. *Clin Infect Dis* 1992; 14(suppl 1):S114-9.
155. Meyer RD. Current role of therapy with amphotericin B. *Clin Infect Dis* 1992; 14(suppl 1):S154-60.
156. Ghannoum MA, Fu Y, Ibrahim AS, Mortara LA, Shafiq MC, Edwards JE, Criddle RS. In vitro determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2459-65.
157. Dismukes WE. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1988; 157: 624-8.
158. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28(suppl b):27-38.
159. Torres-Rodríguez JM. Estado actual de los antifúngicos de uso sistémico. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5:162-9.
160. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:183-8.
161. Graybill JR, Craven PC. Antifungal agents used in systemic micoses: activity and therapeutic use. *Drugs* 1983; 25:41-62.
162. Bennet JE. Antifungal agents. In Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE eds. *Goodman&Gilman's The pharmacological basis of therapeutics -9th edition*. New York, 1995:1175-90.

163. Walsh TJ, Pizzo A. Treatment of systemic fungal infections: recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7:460-75.
164. Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. Sensitivity of *Candida albicans* to amphotericin B administered as single or fractionated doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29; 701-2.
165. Stieritz DD, Law EJ, Holder IA. Speciation and amphotericin B sensitivity studies on blood isolates of *Candida* from burned patients. *J Clin Patho* 1973; 26: 405-8.
166. Louria DB. Some aspects of the absorption, distribution and excretion of amphotericin B in man. *Antibiotic Medicine and Clinical Therapy.* 1985; 5: 295-301.
167. Baley JE, Meyers C, Kliegman RM, Jacobs RM, Blumer RM. Pharmacokinetics, outcome of treatment and toxic effects of amphotericin B and 5-fluorocytosine in neonates. *J Pediatr* 1990; 116:791-7.
168. Fields BT, Bates JM, Abernathy RS. Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Appl Microbiol* 1970; 19: 955-9.
169. Christiansen KJ, Bernard EM, Gold JWM, Armstrong D. Distribution and activity of amphotericin B in humans. *J Infect Dis* 1985; 152:1037-43.
170. Khoo SH, Bond J, Denning DW. Administering amphotericin B - a practical approach. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:203-13.
171. Atkinson JR, Bennett JF. Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13:271-6.
172. Maddux MS, Barriere SL. A review of complications of amphotericin B therapy: recommendations for prevention and management. *Drug Intell Clin Pharm* 1980; 14: 177-81.
173. Gigliotti F, Shenep JL, Lott L, Thornton D. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. *J Infect Dis* 1987; 156:784-9.
174. Prober C. 5-Fluorocytosine. *J Pediatr* 1988; 4:555-61.
175. Polak A, Scholer HJ. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy* 1975; 21:113-30.
176. Chouini-Lalanne N, Malet-Martino MC, Martino R, Michel G. Study of the metabolism of flucytosine in *Aspergillus* species by ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 1939-45.
177. Diasio RB, Bennett JE, Myers CE. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 703-7.

178. Waldorf AR, Polak A. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:79-85.
179. Francis P, Walsh TJ. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 1992; 15:1003-18.
180. Grunberg E, Titsworth E, Bennett M. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 1964; 1963:566-8.
181. Shadomy S, Shadomy HJ, McCay JA, UTZ JP. In vitro susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, hamycin and 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 1968; 452-60.
182. Shadomy S. In vitro studies with 5-fluorocytosine. *Appl Microbiol* 1969; 17:871-7.
183. Utz JP, Tynes BS, Shadomy HJ, Duma RJ, Kannan MM, Mason KN. 5-Fluorocytosine in human cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1968; 344-6.
184. Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin Pharmacokinet* 1983; 8: 17-42.
185. Block ER, Bennett JE. Pharmacological studies with 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother*. 1972; 1: 476-82.
186. Cutler RE, Blair AD, Kelly MR. Flucytosine kinetics in subjects with normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 24: 33-42.
187. Daneshmend TK, Warnock DW. Clinical pharmacokinetics of ketoconazole. *Clin Pharmacokinet* 1988; 14:13-34.
188. Bodey GP. Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis* 1992; 14(suppl 1):S161-9.
189. Stevens DA, La nueva generación de antifúngicos. *Rev Esp Microbiol Clin* 1989; 269-72.
190. Borgers M. Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Rev Infect Dis* 1980; 2: 520-34.
191. Borgers M, Van den Bossche H. The mode of action of antifungal drugs, in Levine (de.) Ketoconazole in the management of fungal disease, pp.25-47. ADIS Press, Sydney 1982.
192. Bergoglio RM. Antifúngicos. En *Antibióticos* (5ª ed). Editorial Panamericana. Madrid. 1993. 357-75.

193. Graybill JR. New antifungal agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8:402-12.
194. Hawkins J, Tyle V. Ketoconazole. Mechanism of action, spectrum of activity, pharmacokinetics, drug interactions adverse reactions and therapeutic use. *Pharmacotherapy* 1984; 4:343-73.
195. Carlson JA, Mann HJ, Canafax DD. Effect of pH on disintegration and dissolution of ketoconazole tablets. *American Journal of Hospital Pharmacy* 1983; 1334-36.
196. Van der Meer JWM, Keuning JJ, Schejgrond HW, Heykants J, Van Cutsem J. Influence of gastric acidity on the bio-availability of ketoconazole. *J Antimicrob Chemother* 1980; 6: 522-4.
197. Daneshmend TK, Warnock DW, Ene MD, Johnson EM, Potten MR. Influence of food on the pharmacokinetics of ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25: 1-3.
198. Daneshmend TK, Mason AR, Lowe CH, Warnock DW, Johnson EM. Influence of formulation on ketoconazole pharmacokinetics in man: comparison of standard tablet versus capsule containing citric acid. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 289-91.
199. Heel RC. Pharmacokinetic properties. In Levine (ed.) *Ketoconazole in the management of fungal disease*, pp. 67-73. ADIS Press, Sydney, 1982.
200. Fluconazole (UK 49,858). Investigator's Reference Manual. 1988. Pfizer Central Research, Sandwich, Kent, UK.
201. Zervos M, Silverman J, Meunier F. Fluconazol en el tratamiento de infecciones fúngicas: revisión. *Infect Dis Clin Pract (Ed Esp)* 1994; 1:222-30.
202. Grant SM, Clissold SP. Fluconazole: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potencial in superficial and systemic mycoses. *Drugs* 1990; 39:877-916.
203. Goa KL, Barradel LB. Fluconazole. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in a major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. *Drugs* 1995; 50:658-90.
204. Ghannoum MA. Is antifungal susceptibility testing useful in guiding fluconazole therapy?. *Clin Infect Dis* 1996; 22(suppl 2):S161-5.
205. Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Müller J, Rinaldi MG, Espinel-Ingroff A, Shadomi S, Troke PF, Walsh TJ, Warnock DW. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1805-9.

206. Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev Infect Dis* 1990; 12(suppl 3):S318-26.
207. Chin T, Fong IW, Vandenbroucke A. Pharmacokinetics of fluconazole in serum and cerebrospinal fluid in a patient with AIDS and cryptococcal meningitis. *Pharmacotherapy* 1990; 10:305-7.
208. Foulds G, Brennan DR, Wajszczuk C. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid and serum in humans. *J Clin Pharmacol* 1988; 28: 363-6.
209. Tucker RM, Williams PL, Arathoon EG. Pharmacokinetics of fluconazole in cerebrospinal fluid and serum in human coccidioidal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32: 369-73.
210. Berry AJ, Rinaldi MG, Graybill JR. Use of high-dose fluconazole as salvage therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:690-2.
211. Fluconazole. Dollery C (ed.) In: *Therapeutic Drugs* (suppl. 1). London, 1992, Churchill Livingstone.
212. Meyohas MC, Meynard JL, Bollens D, Roux P, Deloul AM, Poirot JL, Rozembaum W, Mayaud C, Frottier J. Treatment of non-meningeal cryptococcosis in patients with AIDS. *J Infect* 1996; 33:7-10.
213. Quereda C, Polanco A, Ginés C, Sánchez-Sousa, Pereira E, Navas E, Fortún J, Baquero F. Uso del fluconazole en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Iberoamericana de Micología* 1993; 10: 120-123.
214. Chandrasekar PH, Gathy CM. Efecto de la profilaxis con fluconazol sobre la fiebre y la utilización de anfotericina, en pacientes neutropénicos con cáncer. *Chemotherapy* 1994; 40: 136-143.
215. Richardson K, Bell AS, Dickinson RP, Naryanaswami S, Ray SJ. UK 109,496, a novel wide spectrum triazole derivative for the treatment of fungal infections. Synthesis and SAR. (abstract F69). In Program and abstracts of the 35th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy; 1995 Washington DC.
216. UK 109,496. Investigator Brochure. Pfizer Central Research, 1995, Sandwich, UK.
217. George D, Minitier P, Andriole VT. Efficacy of UK 109,496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:86-91.
218. Barchiesi F, Restrepo M, McGough DA, Rinaldi MG. In vitro activity of a new antifungal triazole: UK 109,496 (abstract F71). In Program and Abstracts of the

- 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1995, Washington DC.
219. Hitchcock CA, Pye GW, Oliver GP, Troke PF. UK 109,496, a novel wide-spectrum triazole derivative for the treatment of fungal infections. antifungal activity and selectivity in vitro. (abstract F72). In Program and abstracts of the 35th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy; 1995 Washington DC.
 220. Martin MV, Yates J, Hitchcock CA. Comparison of Voriconazol (UK 109,496) and itraconazole in the prevention and treatment of *Aspergillus fumigatus* endocarditis in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:13-6.
 221. Troke PF, Bell AS, Dickinson RP, Hitchcock CA Jezequiel S, Naryanaswami S, Ray SJ, Dickinson K. UK 109,496, a novel wide spectrum triazole derivative for the treatment of fungal infections. Discovery and antifungal properties. (abstract F70). In Program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1995, Washington DC.
 222. Fariñas F, Garrido L. Cryptococcosis. *Rev Esp Microbiol Clin* 1992; 2:405-7.
 223. Yoshikawa TT. Management of central nervous system cryptococcosis. *West J Med* 1980; 132: 123-133.
 224. Clark R, Greer D, Atkinson W, Valainis GT, Hyslop N. Spectrum of *Cryptococcus neoformans* infection in 68 patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 768-77.
 225. Eng B, Bishburg A, Smith AA. Cryptococcal infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med* 1986; 81: 19-23.
 226. Deepe GS, Bullock WE. Immunological aspects of fungal pathogenesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:377-80.
 227. Evans EE, Mehl JW. A qualitative analysis of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* type B. *Biochem Biophys Acta* 1951; 117: 305-13.
 228. Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Theodore TS. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia* 1978; 16: 167-74.
 229. Bhattacharjee AK, Bennett JE, Glaudemans PJ. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Infect Dis* 1984; 6:619-24.
 230. Kwon-Chung KJ. A new species of *Fillobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycology* 1976; 68: 943-6.
 231. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 123-130.

232. Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Stockman L, Roberts GD, Ellis D, Howard DH. Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect Immun* 1992; 60: 1869-74.
233. Ross A, Taylor IEP. Extracellular glycoprotein from a virulent and avirulent *Cryptococcus* species. *Infect Immun* 1981; 31: 911-8.
234. Kozel TR, Hermerath CA. Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1984; 879-86.
235. Kozel TR, Highisohn B, Stratton CJ. Localization of encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 1984; 574-79.
236. Kozel TR, Wilson MA, Murphy JW. Early events in initiation of alternative complement pathway activation by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991; 3101-10.
237. Greenwood DR, Peutherer J. *Medical Microbiology*, 4th edition, Churchill-Livingstone, London 1992.
238. Friedman LM, Furberg CD, DeMets DL. *Fundamentals of clinical trials*. 2th edition, Littleton, 1985.
239. Medoff G, Dismukes WE, Pappagianis D, Diamond R, Gallis HA, Drutz D. Evaluation of new antifungal drugs for the treatment of systemic fungal infections. *Clin Infect Dis* 1992; 15 (Suppl. 1): S274-81.
240. Growth and its control. In: Brock TD, Madigan MT. (eds.) *Biology of microorganisms*. New Jersey, 1988, 315-55.
241. The mathematics of growth and chemostat operation (appendix 2). En: Brock TD, Madigan MT (eds). *Biology of microorganisms*. New Jersey 1988.793-5.
242. Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Study or comparative antipneumococcal activities of penicillin G, RP 59500, erithromycin, sparfloxacin, ciprofloxacin and vancomycin by using time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2065-72.
243. Nassar F, Brummer E, Stevens DA. Different components in human serum inhibit multiplication of *Cryptococcus neoformans* and enhance fluconazole activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 2490-3.
244. Assessment of area (appendix A). In Rowland M, Tozer TN eds. *Clinical Pharmacokinetics: concepts and applications* (2nd ed). Philadelphia . Lea-Febiger 1989. 459-63.
245. Craig W. Pharmacodynamics of antimicrobial agents as a basis for determining dosage regimens. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1993; 1(suppl):6-8.

246. Rinaldi MG. Laboratory evaluation of antifungal agents: a brief overview. Clin Infect Dis 1992; 14(suppl 1):S130-3.
247. Ghannoum MA, Rex JH, Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi: current status of in vitro data with clinical outcome. J Clin Microbiol 1996; 34:489-95.
248. Galgiani JN, Susceptibility testing of fungi: current status of the standarization process. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:2517-21.
249. Galgiani JN. Antifungal susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:1867-70.
250. Gudmundsson S, Vogelman B, Craig WA. Decreased bactericidal activity during the period of the postantibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1994; 34:921-30.
251. Hoepfich PD, Merry JM. Influence of culture medium on susceptibility testing with BAY n7133 and ketoconazole. Antimicrob Agents Chemother. 1986; 24: 269-271.
252. Aono R. Taxonomic distribution of alkali-tolerant yeasts. System Appl Microbiol 1990; 13: 394-7.
253. Zaror L, Oth L, Mutizabal I. Susceptibilidad in vitro de dermatofitos, *Candida* y otros hongos frente a tolclato. Estudio comparativo de dos inóculos. Rev Arg Micol 1988; 9: 18-22.
254. Odds FC. *Candida* and candidosis. A review and bibliography. Baillire Tindall. London, 1988.
255. Galgiani JN. The need for the improved standarization in antifungal susceptibility testing. En: Fromtling RA (de). International telesymposium on recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal drugs. JR Prous Science Publishers, Barcelona 1987: 15-24.
256. Espinel-Ingroff A, Shadomy S. In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8:352-61.
257. Zaror L, Espinel-Ingroff A. Pruebas de sensibilidad fúngica frente a antimicóticos. Boletín Micológico 1989; 4: 77-90.
258. Dermoumi H. In vitro susceptibility of yeast isolates from the blood to fluconazole and amphotericin B. Chemotherapy 1992; 38:112-7.
259. Franzot SP, Hamdan JS. In vitro susceptibilities of clinical and enviromental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:822-4.
260. Pfaller MA, Gerardem T, Yu M, Wenzel RP. Influence of in vitro susceptibility testing conditions on the anti-candidal activity of LY121019. Diagn Microbiol Infect Dis 1989; 11: 1-9.

261. Shadomy S, Wagner G, Espinel-Ingroff A, Davis BA. In vitro studies with combinations of 5-fluorocytosine and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8:117-21.
262. Fasoli M, Kerridge D. Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann NY Acad Sci* 1988; 544: 260-3.
263. Fasoli MOF, Kerridge D, Morris PG, Torosantucci A. ¹⁹F nuclear magnetic resonance study of fluoropyrimidine metabolism in strains of *Candida glabrata* with specific defects in pyrimidine metabolism. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34: 1996-2006.
264. Normark S, Schönebeck J. In vitro studies of 5-fluorocytosine resistance in *Candida albicans* and *Torulopsis glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972; 2: 114-21.
265. Kauffman CA, Frame PT. Bone marrow toxicity associated with 5-fluorocytosine therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977; 11: 244-7.
266. Gillum J, Johnson M, Lavoie S, Venitz J. Flucytosine dosing in an obese patient with extrameningeal cryptococcal infection. *Pharmacotherapy* 1995; 15:251-3.
267. Odds FC. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole and miconazole against pathogenic fungi in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 763-70.
268. Viviani MA. Flucytosine, What is its future?. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:241-4.
269. Heel RC, Brogden RN, Carmine A, Morley PA, Speight TM, Avery GS. Ketoconazole: a review of its therapeutic efficacy in superficial and systemic fungal infections. *Drugs* 1982; 23:1-36.
270. Sanati H, Messer SA, Pfaller M, Witt M, Larsen R, Espinel-Ingroff A, Ghannoum M. Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* against fluconazol. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1280-2.
271. Espinel-Ingroff A, Steele-Moore L. Comparison of fluconazole minimum inhibitory concentrations in three different formulations of RPMI-1640. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 28:87-91.
272. Kauffman CA. Role of azoles in antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 1996; 22(suppl 2):S148-53.
273. Mengoli C, Scarin M, Peracchi M, Tonin E, Berliato G. *Cryptococcus neoformans* meningitis in AIDS: in vitro susceptibility to antifungal drugs, abstr. M.B.2041, p.192. In: Abstracts of the 1991 International Conference on AIDS.

274. Morace G, Posteraro B, Sanguinetti M, Ammassari A, Tamburrini E. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to antifungal drugs. Relationship with clinical outcome of cryptococcosis, abstr. PoB3225, p.124. En: Abstracts of the 1992 International Conference on AIDS,
275. Warnock DW. Azole drug resistance in *Candida* species. J Med Microbiol 1992; 37:225-6.
276. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ, Dix S, Williams J, Gilmore C, Geller R, Wingard JR. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 44: 196-9.
277. Currie BP, Ghannoum M, Bessen L, Casadevall A. Decreased fluconazole susceptibility of a relapse *Cryptococcus neoformans* isolate after fluconazole treatment. Infect Dis Clin Pract 1995;4:318-9.
278. Venkaterwarlu K, Taylor M, maning NJ, Rinaldi MG, Kelly SL. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 748-51.
279. Graybill JR. The future of antifungal therapy. Clin Infect Dis 1996; 22(suppl 2):S116-78.
280. Craig WA, Evert SC. Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. Scand J Infect Dis 1991; 74:62-70.
281. Petrou MA, Rogers TR. A comparison of the activity of mepartricin and amphotericin B against yeasts. J Antimicrob Chemother 1985; 16:169-78.
282. Rhoades ER, Felton FG, Wilkus J, Muchmore HG. Susceptibility of human and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother. 1967; 736-8.
283. Hoepfich PD, Huston AC. Stability of four antifungal antimicrobics in vitro. J Infect Dis 1978; 137: 87-90.
284. Osaka K, Ritov VB, Bernardo JF, Branch RA, Kagan VB. Amphotericin B protects *cis*-parinaric acid against peroxy radical-induced oxidation: amphotericin B as an antioxidant. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 743-47.
285. Perfect JR, Wright KA. Amphotericin B lipid complex in the treatment of experimental cryptococcal meningitis and disseminated candidosis. J Antimicrob Chemother 1994; 73-81.
286. Smith D, McFadden HW, Miller NG. Effect of ketoconazole and amphotericin B on encapsulated and non-encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother. 1983; 24: 851-5.

287. Sneller MR, Hariri A, Sorenson WG, Larsh HW. Comparative study of trichothecin, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Cryptococcus neoformans* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977; 390-4.
288. Bennett JE. Flucytosine. *Ann Internal Med* 1977; 86:319-22.
289. Martín MM, Fuentes F, Izquierdo J, Mínguez F, Gómez-Lus ML. Consumo de Cefminox frente a *E. coli*, *B. fragilis* y la asociación *B. fragilis-E. coli*. *Rev Esp Quimioterap* 1992; 5:69-72.
290. Graybill JR, Williams DM, Van Cutsem E, Drutz DJ. Combination of experimental histoplasmosis and cryptococcosis with amphotericin B and ketoconazol. *Rev Inf Dis* 1980; 2:551-8.
291. Fibbe WE, VanderMeer JWM, Thompson J. CSF concentrations of ketoconazole. *J Antimicrob Chemother* 1980; 6: 681.
292. Craven PC, Graybill JR, Jorgenson JH. High-dose ketoconazole for treatment of fungal infections in the central nervous system. *Ann Int Med* 1983; 74(1B): 1-90.
293. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale C, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 1392-5.
294. Palou de Fernández E, Patino MM, Graybill JR, Tarbit MH. Treatment of cryptococcal meningitis in mice with fluconazole. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 261-70.
295. Richardson K, Brammer KW, Marriott MS. Activity of UK 49,858, a bis-triazole derivative, against experimental infections with *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 27: 832-5.
296. Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 1994; 330: 263-72.
297. Janssen PAJ, Van den Bossche H. Mode of action of cytochrome P-450 monooxygenase inhibitors. Focus on azole derivatives. *Arch Pharm Chem Sci Ed* 1987; 15: 23-40.
298. Turnidge JD. Prediction of antibiotic dosing intervals from in vitro susceptibility, pharmacokinetics and postantibiotic effect: theoretical considerations. *Scand J Infect Dis* 1991; (suppl)74:137-41.
299. Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28(suppl B):27-38.
300. Cabib E, Roberts R. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Ann Rev Biochem* 1982; 51: 763-93.

301. Ackerman BH, Vannier AM, Eudy EB. Analysis of vancomycin time-kill studies with *Staphylococci* species by using a curve stripping program to describe the relationship between concentration and pharmacodynamic response. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36: 1766-9.
302. Drutz DJ. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. *Rev Infect Dis* 1987; 9:392-7.
303. Brass C, Galgiani JN, Blachke TF, Defelice R, O'Reilly RA. Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 27: 151-8.
304. Zeind CS, Cleveland KO, Menon M, Brown JR, Solomon DK. Cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacotherapy* 1996; 16:547-61.
305. Van Delden C, Lew DP, Chapuis B, Rohner P, Hirschel B. Antifungal prophylaxis in severely neutropenic patients: how much fluconazole is necessary? *J Clin Microbiol Infect* 1994; 1: 24-8.
306. Van den Broek PJ. Antimicrobial drugs, microorganisms and phagocytes. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 213-27.
307. Hauser WE, Remington JS. Effect of antibiotics on the immune response. *Am J Med* 1982; 72: 711-16.
308. Korziesenowski OM. Effects of antibiotics on the mammalian immune system. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3: 469-78.
309. Dutcher BS, Reynard AM, Beck ME, Cunningham RK. Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978; 13: 820-6.
310. Petrou MA, Rogers TR. The inhibitory effect of serum on the growth of *Torulopsis glabrata*. *J Med Microbiol* 1988; 25:213-20.
311. Igel HI, Bolande RP. Humoral defense mechanisms in cryptococcosis: substances in normal human serum, saliva, and cerebrospinal fluid affecting the growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis* 1966; 116: 85-73.
312. Baum GL. Characterization of the growth inhibition factor for *Cryptococcus neoformans* (GIF_c) in human serum. *Am J Med Sci* 1963; 87-91.
313. Truelsen K, Young T, Kozel TR. In vivo complement activation and binding of C3 to encapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1992; 60: 3937-9.
314. Diamond RD, May JE, Kane MA, Frank MM, Bennett JE. The role of the classical and alternative complement pathways in host defenses against *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 1974; 112: 2260-70.

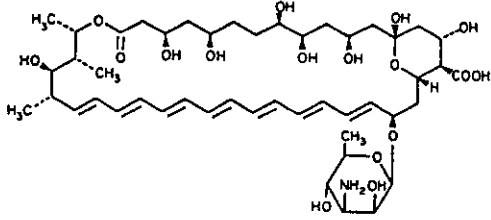
315. Kozel TR, Pfrommer GST. Activation of the complement system by *Cryptococcus neoformans* leads to binding of iC3b to the yeast. *Infect Immun* 1986; 52: 1-5.
316. Alcouloumre MS, Ghannoum MA, Ibrahim S, Selsted ME, Edwards JE. Fungicidal properties of defensin NP-1 and activity against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:2628-32.
317. Eisenhauer P, Harwig S, Szklarek D, Ganz T, Selsted M, Lehrer R. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect Immun* 1989; 57: 2021-7.
318. Ganz T, Selsted M, Szklarek D, Harwig S, Daher K, Bainton D, Lehrer R. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; 76: 1427-35.
319. Granger DL, Perfect JR, Durack DT. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* 1985; 508-16.
320. Odds FC, De Backer T, Dams G, Vrancx L, Woestenborghs F. Oxygen as limiting nutrient for growth of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 995-7.
321. Bullen JJ, Ward CG, Rogers HJ. The critical role of iron in some clinical infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:613-17.
322. Huahua T, Rudy J, Kunin CM. Effect of hydrogen peroxide on growth of *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts in simulated blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 328-32.
323. Vartivarian SE. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clin Infect Dis* 1992; 14(suppl 1):S30-6.
324. Anna EJ. Rapid in vitro capsule production by cryptococci. *Am J Med Tech* 1979; 45: 585-8.
325. Cherniak R, Sundstrom B. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994; 62: 1507-12.
326. Patterson TF, Andriole VT. Current concepts in cryptococcosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8:457-65.
327. Zuger A, Louie E, Holzman RS, Simberkoff MS, Rahal JJ. Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104: 234-40.
328. Eng RHK, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1824-8.

329. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vitro and in vivo efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis* 1990; 162:96-102.
330. Morgan DJ, Ching MS, Raymond K, Bury RW, Mashford ML, Kong B, Sabto J, Gurr FW, Somogyi AA. Elimination of amphotericin B in impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34: 248-53.
331. Bindschadler DD, Bennett JE. A pharmacologic guide to the clinical use of amphotericin B. *J Infect Dis* 1969; 120: 427-36.
332. Diamond RD. *Cryptococcus neoformans*. En: Mandell GL, Bennett JE; Dolin R (eds). *Principles and practice of infectious disease*. 4th edition, Churchill Livingstone, New York, 1996.
333. Cohen J. The pathogenesis of cryptococcosis. *J Infect* 1982; 5: 109-16.

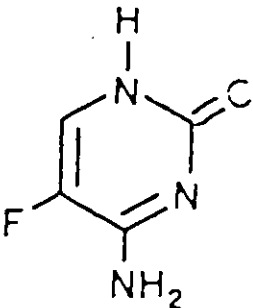
ANEXOS

ANEXO I

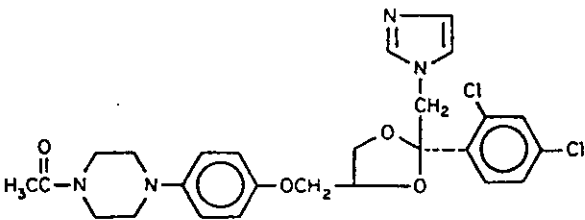
A continuación se detallan algunas de las características fisico-químicas más relevantes de las 5 moléculas antifúngicas empleadas en el presente estudio.

NOMBRE GENÉRICO: Anfotericina B		
ESTRUCTURA QUIMICA	PROCEDENCIA	Bristol-Myers Squibb
	FAMILIA DE ANTIFUNGICOS	Macrólido Poliénico
	PESO MOLECULAR	924,10
	DESCRIPCION FISICA	Polvo ocre, granulado
	DISOLVENTE	Desoxicolato Sódico
	MODO DE PREPARACIÓN	
Preparación de una solución de desoxicolato sódico tamponada con bicarbonato. Disolver la anfotericina B en la solución anterior considerando la pureza de la sustancia valorada. Permitir la autoesterilización durante 30 minutos. Congelar en lugar seco y oscuro.		

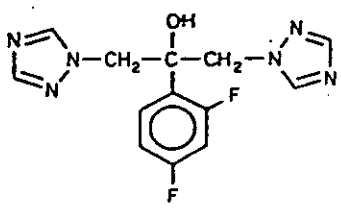
NOMBRE GENÉRICO: 5-Fluorocitosina

ESTRUCTURA QUIMICA	PROCEDENCIA	Hoffmann-LaRoche.
	FAMILIA DE ANTIFUNGICOS	Derivado Pirimidínico
	PESO MOLECULAR	129,09
	DESCRIPCION FISICA	Polvo blanco, cristalino.
	DISOLVENTE	Agua destilada
	MODO DE PREPARACIÓN	
Disolver el polvo valorado de 5-Fluorocitosina en agua destilada estéril. Disolver en baño caliente a 52°C durante 30 minutos. Esterilizar por filtración. Mantener en congelador (-20°C).		

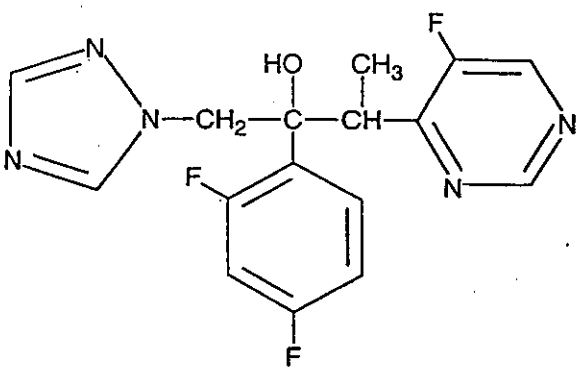
NOMBRE GENÉRICO: Ketoconazol

ESTRUCTURA QUIMICA	PROCEDENCIA	Janssen Pharmaceuticals
	FAMILIA DE ANTIFUNGICOS	Azoles
	PESO MOLECULAR	531,44
	DESCRIPCION FISICA	Polvo fino, blanco.
	DISOLVENTE	DMSO
	MODO DE PREPARACIÓN	
Disolver la sustancia valorada de ketoconazol en DiMetil SulfOxido (DMSO). Disolver en agitador Vortex y conservar en congelador (-20°C).		

NOMBRE GENÉRICO: Fluconazol

ESTRUCTURA QUIMICA	PROCEDENCIA	Mack (Div. Pfizer S.A.)
	FAMILIA DE ANTIFUNGICOS	Azoles
	PESO MOLECULAR	306,28
	DESCRIPCION FISICA	Polvo blanco, cristalino
	DISOLVENTE	Agua destilada.
	MODO DE PREPARACIÓN	
Disolver la sustancia valorada de Fluconazol en agua destilada estéril y disolver agitando energéticamente. Conservar a -20°C		

NOMBRE GENÉRICO: UK 109,496 (Voriconazol)

ESTRUCTURA QUIMICA	PROCEDENCIA	Pfizer S.A.
	FAMILIA DE ANTIFUNGICOS	Azoles
	PESO MOLECULAR	349,3
	DESCRIPCION FISICA	Polvo blanco
	DISOLVENTE	Agua ácida/DMSO
	MODO DE PREPARACIÓN	
Se puede disolver la molécula en CIH 0,1M o en DMSO. La conservación se realiza a -20°C.		

ANEXO II

bYNB-G (Base nitrogenada con tampón y glucosada para levaduras)

Para preparar este caldo se disuelve en medio litro de agua destilada el siguiente tampón:

Na₂HPO₂ 0.165 g
KH₂PO₄ 0.46g

Tras esterilizar en autoclave esta solución, se incorporan los siguientes componentes:

YNB 3.35 g
Glucosa 5 g

Se ajusta el pH de la solución a un valor de 7,2 acidificando con ClH 0.1M o basificando con NaOH 10M.

Como medida preventiva frente a posibles contaminaciones bacterianas durante los ensayos, se aconseja la incorporación de las siguientes cantidades de antibióticos:

Cloranfenicol 0.1 g
Gentamicina 0.02 g

Una vez incorporados todos los componentes y homogeneizada la solución se procede a la esterilización por filtración (tamaño de poro 22 μ)

Cuando se realizó la prueba para determinar el efecto del tampón con bicarbonato en el crecimiento de *Cr. neoformans* se utilizaron los compuestos correspondientes al tampón bicarbonatado que se emplea en la preparación del caldo de crecimiento de hongos RPMI:

Ca(NO₃)₂ 4 H₂O 100 mg/l
KCl 400 mg/l
MgSO₄ 7 H₂O 100 mg/l
NaCl 6000 mg/l
NaHCO₃ 2000 mg/l
Na₂HPO₄ 7 H₂O 1512 mg/l

Solución Salina Tamponada

En un litro de agua destilada estéril se disolvieron los siguientes reactivos:

CINa 8 g
KCl 0.12 g
Na₂HPO₂ 0.91 g
KH₂PO₄ 0.2 g

La mezcla se homogeiniza y esteriliza en autoclave.

Agar de Saboureaud con Cloranfenicol

Se disolvieron 45.5 g de medio en polvo en 1 litro de agua desionizada. Se calentó hasta ebullición y posteriormente se esterilizó en autoclave. Una vez enfriado suficientemente (a unos 50-60°C), se dispensa el medio en placas petri en una cantidad aproximada de 15 ml por placa.

Tinción con Tinta China.

Las células se observaron al microscopio óptico disolviendo en un portaobjetos una gota (20 μ l) de cultivo líquido con *Cr. neoformans* junto con una gota de tinta china, extendiendo la mezcla y fijándola con un cubreobjetos