

Original

Actividad fungicida y efecto paradójico de la caspofungina sobre levaduras. Influencia del medio de cultivo y el tiempo de incubación

E. Cantón, J. Pemán, M. Romero, A. Valentín y M. Gobernado

Unidad de Microbiología Experimental, Centro de Investigación y Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar nº 21, 46009 Valencia

RESUMEN

Se ha estudiado la influencia del medio de cultivo y el tiempo de incubación en la actividad fungistática y fungicida de la caspofungina, así como la frecuencia de aparición de efecto paradójico, en 144 levaduras aisladas en hemocultivo (42 *Candida tropicalis*, 32 *Candida glabrata*, 21 *Candida krusei*, 20 *Candida parapsilosis*, 11 *Candida guilliermondii*, 4 *Candida famata*, 3 *Candida lusitanae*, 3 *Blastoschizomyces capitatus*, 2 *Saccharomyces cerevisiae*, 2 *Yarrowia lipolytica*, 1 *Candida inconspicua*, 1 *Candida lambica*, 1 *Candida sake* y 1 *Pichia ohmeri*). Los medios ensayados fueron RPMI 1640, Medio Antibiótico #3 (AM#3) y AM#3 con un 2% de glucosa (AM#3-G). Se determinó la CMI_{50} ($\geq 50\%$ inhibición del crecimiento) y la CMI_0 (100% inhibición) a las 24 y 48 horas de incubación, y la concentración mínima fungicida (CMF). La actividad de la caspofungina fue mayor en AM#3, seguida de AM#3-G y RPMI; y la media geométrica de la CMI_2 a las 24/48 horas de incubación fue 0,06/0,12, 0,1/0,2 y 0,65/0,89 mg/l, respectivamente. La media geométrica de la CMI_0 fue 0,1/0,17 (AM#3), 0,16/0,25 (AM#3-G) y 1,06/1,7 mg/l (RPMI). La caspofungina fue fungicida en los tres medios de cultivo (media geométrica de la CMF 0,28, 0,38 y 3 mg/l en AM#3, AM#3-G y RPMI, respectivamente). El porcentaje de aislamientos tolerantes a la caspofungina ($CMF \geq 8 \times CMI_0$) fue 8,09% (AM#3), 8,3% (AM#3-G) y 13,9% (RPMI). El medio de cultivo en que menos influyó el tiempo de incubación fue RPMI, y en el que más influyó fue AM#3 (en el 93,7% y el 78,2% de los aislamientos la CMI_2 aumentó ≤ 2 log al prolongar el tiempo de incubación, respectivamente). La frecuencia de efecto paradójico es dependiente de la especie, el aislamiento y el medio. Se observa a ≥ 8 mg/l en RPMI, a ≥ 2 mg/l en AM#3 y a ≥ 4 mg/l en AM#3-G, es más frecuente en RPMI y en *C. tropicalis*, y menos habitual en *C. krusei* y *C. glabrata*.

Palabras clave: Caspofungina - Actividad fungicida - Efecto paradójico - CMF

The fungicidal activity and paradoxical effect of caspofungin on yeasts. Influence of culture medium and incubation time

SUMMARY

The effect of culture medium and incubation time on the fungicidal activity of caspofungin and on the frequency of paradoxical effect has been studied in 144 blood culture isolates (42 *Candida tropicalis*, 32 *Candida glabrata*, 21 *Candida krusei*, 20 *Candida parapsilosis*, 11 *Candida guilliermondii*, 4 *Candida famata*, 3 *Candida lusitanae*, 3 *Blastoschizomyces capitatus*, 2 *Saccharomyces cerevisiae*, 2 *Yarrowia li-*

polytica, 1 *Candida inconspicua*, 1 *Candida lambica*, 1 *Candida sake* y 1 *Pichia ohmeri*). The media assayed were standard RPMI 1640, Antibiotic Medium #3 (AM#3) and AM#3 with 2% of dextrose (AM#3-G). MIC₂ (≥50% growth inhibition) and MIC₀ (100% inhibition) at 24 and 48h and the minimum fungicidal concentration (MFC) were determined. The greatest activity of caspofungin was obtained in AM#3 medium followed by AM#3-G and RPMI. Geometric means (GM) MIC₂ at 24/48 h incubation were 0.06/0.12, 0.1/0.2 and 0.65/0.89 mg/l, respectively. GMMIC₀ was 0.1/0.17 (AM#3), 0.16/0.25 (AM#3-G) and 1.06/1.7 mg/l (RPMI). Caspofungin showed fungicidal activity in the three media (GM-MFC, 0.28, 0.38 and 3 mg/l in AM#3, AM#3-G and RPMI, respectively). The percentage of caspofungin tolerant isolates (MFC ≥ 8 × MIC₀) was 8.09% (AM#3), 8.3% (AM#3-G) and 13.9% (RPMI). RPMI was the medium less affected by the incubation time and AM#3 the most affected (93.7 and 78.2% of isolates the MIC₂ increased ≤ 2 Log from 24 to 48 h incubation, respectively). The frequency of paradoxical effect was species-, isolate- and medium- dependent. It is observed at ≤ 8 mg/l (RPMI), ≥ 2 mg/l (AM#3) and ≥ 4 mg/l (AM#3-G). The highest frequency was obtained in RPMI medium and *C. tropicalis* species and the lowest frequency for *C. krusei* y *C. glabrata*.

Key words: Caspofungin - Fungicidal activity - Paradoxical effect - CMF

INTRODUCCIÓN

En los primeros estudios realizados para determinar la actividad de las equinocandinas, concretamente en los realizados con caspofungina, se utilizaban indistintamente dos criterios para determinar el punto final de la CMI: la concentración más baja que inhibía el 80% o el 100% del crecimiento, en comparación con el crecimiento control (1). Ello contribuía a que los intervalos de la CMI para la misma especie tuvieran gran variabilidad dependiendo de los autores y del punto final elegido. Las mayores variaciones se obtenían cuando se utilizaba la CMI₀ como punto final (2), debido entre otras causas a la particularidad hoy conocida de las equinocandinas de perder actividad a concentraciones elevadas, lo que se conoce como efecto paradójico, descrito ya en 1948 por Eagle con la penicilina (3, 4). Este efecto puede detectarse visualmente y no debe confundirse con el *trailing* (crecimiento que sigue a concentraciones superiores a la CMI₂, 50% de inhibición del crecimiento). El efecto paradójico es una reaparición del crecimiento a concentraciones elevadas, después de sucesivas concentraciones sin crecimiento, o bien un crecimiento superior al obtenido en la CMI (5). En algunos aislamientos se pueden observar ambos fenómenos (*trailing* y efecto paradójico). Por otra parte, el miniefecto paradójico, no detectable visualmente, se puede observar al determinar la concentración mínima fungicida (CMF); en este caso se obtiene mayor número de células viables a concentraciones superiores a la CMF.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia del medio de cultivo y del tiempo de incubación en la aparición del efecto paradójico y en la actividad fungistática y fungicida de la caspofungina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

El efecto del medio de cultivo, el tiempo de incubación y el criterio de punto final en la actividad de la caspofun-

gina se determinaron en 144 aislamientos de levaduras obtenidas de hemocultivo: 42 *Candida tropicalis*, 32 *Candida glabrata*, 21 *Candida krusei*, 20 *Candida parapsilosis*, 11 *Candida guilliermondii*, 4 *Candida famata*, 3 *Candida lusitanae*, 3 *Blastoschizomyces capitatus*, 2 *Saccharomyces cerevisiae*, 2 *Yarrowia lipolytica*, 1 *Candida inconspicua*, 1 *Candida lambica*, 1 *Candida sake* y 1 *Pichia ohmeri*.

Todas las levaduras se identificaron mediante las tarjetas YEAST CARD[®] del sistema automático VITEK[®] (Bio-Merieux Inc., Francia), y se mantuvieron en suspensión acuosa a temperatura ambiente hasta su utilización para las pruebas de sensibilidad. Antes de realizar estas pruebas se resemebraron dos veces consecutivas en agar glucosado de Sabouraud (SDA) (Difco).

Medios de cultivo

La actividad de la caspofungina se ha estudiado en tres medios de cultivo: el medio estándar RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Madrid) con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M y ajustado a pH 7 ± 0,1 (RPMI); medio antibiótico #3 (AM#3) (Difco) y el mismo AM#3 suplementado con un 2% de glucosa (AM#3-G).

Preparación del antifúngico

A partir de caspofungina en forma de polvo valorado, obtenido por gentileza de los laboratorios Merck, Sharp & Dohme (Madrid), se pesó la cantidad suficiente para obtener una solución inicial de 1280 mg/l en agua destilada estéril.

De la solución madre de caspofungina se prepararon una serie de diluciones dobles aditivas a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente el medio de cultivo correspondiente. Las concentraciones finales ensayadas fueron de 64 a 0,12 mg/l en el medio RPMI y de 32 a 0,001 mg/l en AM#3 y AM#3-G.

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 24 horas a 35 °C en SDA, resuspendiendo las levaduras en agua destilada y ajustando con un espectrofotómetro (λ 530 nm) a una densidad óptica del 0,5 McFarland. De este modo se obtuvo una suspensión de entre 1×10^6 y 5×10^6 UFC/ml. A continuación se realizó una dilución 1:1000 en el medio de cultivo a ensayar (concentración final $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ UFC/ml). No obstante, en cada experiencia se comprobó el tamaño del inóculo y la pureza del cultivo mediante siembra de 10 μ l del pocillo control de crecimiento en CHROM-agar (Izasa, Barcelona) y recuento del número de colonias tras 24 a 48 horas de incubación.

Estudios de sensibilidad

Determinación de la CMI

Se siguieron las especificaciones del documento M27-A2 del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, antes NCCLS) (6) en los tres medios de cultivo. La CMI se definió como la concentración más baja de antifúngico que produjo una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ (CMI₂) y del 100% (CMI₀), con respecto al crecimiento en el pocillo control. En todos los ensayos se incluyó *C. krusei* ATCC 6258 como control de calidad.

Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

La actividad fungicida de la caspofungina se determinó según el método descrito por Cantón y cols. (7). Para ello se transfirieron, previa agitación con una micropipeta, 100 μ l de todos los pocillos sin crecimiento en las placas de microdilución de la CMI a placas de SDA. Para evitar el efecto del antifúngico arrastrado con la muestra, las alícuotas se depositaron sobre la placa y se dejaron secar antes de proceder a la separación de las células. El recuento del número de colonias se llevó a cabo tras incubación a 35 °C durante 48 horas. La CMF se definió como la concentración más baja de antifúngico que produjo una reducción del número de colonias viables $\geq 99\%$ con respecto al inóculo inicial (menos de dos colonias).

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura de los resultados se realizó por comparación entre el crecimiento (turbidez) observado en cada uno de los pocillos con antifúngico y el del pocillo control de crecimiento a las 24 y 48 horas de incubación. Esta compara-

ción se realizó de forma visual, con ayuda de un espejo invertido.

Análisis de los resultados

En cada medio de cultivo se calcularon los siguientes valores: la media geométrica de la CMI₂, la CMI₀ y la CMF; y la CMI₂, la CMI₀ y la CMF que inhibieron al 50% (CMI₂50, CMI₀50 y CMF50) y al 90% (CMI₂90, CMI₀90 y CMF90) de los aislamientos. Todos los valores fueron incluidos en los cálculos. Los valores fuera de escala, por ejemplo ≥ 64 , $\leq 0,12$ y $\leq 0,001$, se procesaron como 64, 0,12 y 0,001, respectivamente. Para el estudio de la concordancia de los resultados entre los medios y los tiempos de incubación ensayados, se consideró el mismo resultado cuando la diferencia entre las CMI o las CMF era ≤ 2 diluciones. La correlación entre los resultados obtenidos en los distintos medios y tiempos de incubación se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Influencia del medio de cultivo en la actividad de la caspofungina

La actividad *in vitro* de la caspofungina en los medios ensayados se resume en la Tabla 1. En RPMI, la CMI₂ y la CMI₀ fueron ≤ 2 mg/l para el 100% y el 93,06% de los aislamientos, respectivamente. Los aislamientos para los que la CMI₀ fue > 2 mg/l pertenecían a las especies *C. guilliermondii* (4), *C. parapsilosis* (2), *C. krusei* (1), *C. famata* (1), *B. capitatus* (1) y *Y. lipolytica* (1); en éstos, el valor más frecuente de la CMI₀ fue 64 mg/l. La CMF fue ≤ 2 mg/l para el 74,3% de los aislamientos. En el 93% de los aislamientos la CMI₂ fue igual o dos diluciones menor que la CMI₀. La CMF fue igual a la CMI₀ en el 75% de los casos. Un 13,9% de las levaduras fueron tolerantes a la caspofungina (CMF $\geq 8 \times$ CMI₀). Hay que destacar que para el 74,31% de los aislamientos tolerantes la CMF fue ≤ 2 mg/l, y sólo en el 16,6% fue ≥ 64 mg/l (37,5% *C. parapsilosis* y 29,2% *C. guilliermondii*).

En el medio AM#3, la CMI₂ fue $\leq 0,5$ mg/l para el 99,31% de los aislamientos (excepto uno de *C. parapsilosis* con CMI₂ de 1 mg/l) y la CMI₀ fue ≤ 1 mg/l en el 98,61%. Los aislamientos con CMI₀ > 1 mg/l pertenecían a las especies *C. guilliermondii* (≥ 32 mg/l) y *Y. lipolytica* (2 mg/l). En general, la CMI₀ fue igual o dos diluciones mayor que la CMI₂; sólo en el 0,7% de los aislamientos la diferencia fue mayor de tres diluciones. La CMF en el medio AM#3 fue ≤ 1 mg/l para el 92,65% de los aislamientos. Las especies

Tabla 1. Influencia del tiempo de lectura y del medio de cultivo en la actividad de la caspofungina.

Especie (n)	Medio	Lectura	CMI ₂			CMI ₀			CMF					
			MG	Intervalo	50	90	MG	Intervalo	50	90	MG	Intervalo	50	90
<i>C. tropicalis</i> (42)	RPMI	24 h	0,41	0,12-1	0,5	1	0,77	0,25-1	1	1	1,1	0,5-≥64	1	2
	AM#3-G	48 h	0,59	0,12-2	0,5	0,5	0,86	0,5-2	1	0,1	1,1	0,5-≥64	1	2
		24 h	0,05	0,03-0,12	0,03	0,06	0,07	0,03-0,5	0,06	0,1	0,18	0,06-≥16	0,12	0,5
<i>C. glabrata</i> (32)	AM#3	48 h	0,09	0,06-0,5	0,06	0,25	0,1	0,06-0,5	0,12	0,3	0,18	0,06-≥16	0,12	0,5
		24 h	0,03	0,004-0,12	0,03	0,06	0,05	0,015-0,12	0,06	0,1	0,1	0,03-1	0,12	0,5
	48 h	0,06	0,015-0,12	0,06	0,12	0,07	0,03-0,12	0,06	0,1	0,1	0,1	0,03-1	0,12	0,5
<i>C. krusei</i> (21)	RPMI	24 h	0,55	0,25-1	0,5	1	0,88	0,25-1	0,5	1	2,54	1-≥64	2	32
	AM#3-G	48 h	0,65	0,25-2	0,5	1	1,51	1-2	2	2	2,54	1-≥64	2	32
		24 h	0,08	0,03-0,25	0,06	0,12	0,19	0,06-0,5	0,25	0,5	0,33	0,12-1	0,25	0,5
<i>C. parapsilosis</i> (20)	AM#3	48 h	0,22	0,06-0,5	0,25	0,5	0,27	0,12-0,5	0,25	0,5	0,38	0,12-2	0,25	0,5
		24 h	0,05	0,03-0,12	0,06	0,12	0,07	0,03-0,25	0,06	0,1	0,48	0,25-≥8	0,25	0,5
	48 h	0,09	0,03-0,25	0,12	0,12	0,14	0,06-0,5	0,12	0,3	0,23	0,06-0,5	0,25	0,5	
<i>C. guilliermondii</i> (11)	RPMI	24 h	1,03	0,5-2	1	2	1,22	0,5-2	1	2	2,28	1-8	2	8
	AM#3-G	48 h	1,39	1-2	1	2	1,87	1-8	2	2	10,93	2-≥64	4	≥64
		24 h	0,11	0,03-0,5	0,12	0,25	0,19	0,06-0,5	0,25	0,5	0,73	0,25-≥32	0,5	1
Otras especies* (18)	AM#3	48 h	0,27	0,12-0,5	0,25	0,5	0,29	0,12-0,5	0,25	0,5	0,73	0,25-≥32	0,5	1
		24 h	0,11	0,03-0,5	0,12	0,25	0,18	0,06-0,5	0,25	0,3	0,5	0,25-1	0,5	1
	48 h	0,2	0,12-0,5	0,25	0,25	0,3	0,25-0,5	0,25	0,5	0,5	0,25-1	0,5	1	
Total (144)	RPMI	24 h	1,11	1-2	1	2	1,52	1-2	2	2	10,93	2-≥64	4	≥64
	AM#3-G	48 h	1,62	1-2	2	2	2,73	1-≥64	2	2	17,04	1-≥64	≥64	≥64
		24 h	0,23	0,06-0,5	0,25	0,5	0,26	0,12-1	0,25	0,5	1,87	0,12-≥32	0,5	≥32
Otras especies* (18)	AM#3	48 h	0,34	0,25-1	0,25	0,5	0,47	0,25-1	0,5	1	1,55	0,12-≥32	1	≥16
		24 h	0,17	0,12-0,5	0,12	0,25	0,24	0,12-1	0,25	0,5	1,55	0,12-≥32	1	≥16
	48 h	0,26	0,12-1	0,25	0,5	0,33	0,25-1	0,25	0,5	0,45	0,06-≥32	0,25	≥32	
Total (144)	RPMI	24 h	0,88	0,25-2	1	1	2,42	1-64	1	64	17,04	1-≥64	≥64	≥64
	AM#3-G	48 h	1,07	1-2	1	1	5,48	1-≥64	2	≥64	4,67	1-≥64	2	≥64
		24 h	0,23	0,03-0,5	0,25	0,5	0,5	0,06-32	0,25	1	0,5	0,12-≥32	0,25	≥32
Total (144)	AM#3	48 h	0,32	0,03-0,5	0,5	0,5	0,82	0,12-≥32	0,5	2	1,87	0,12-≥32	0,5	≥32
		24 h	0,14	0,001-0,5	0,25	0,25	0,27	0,03-1	0,25	1	1,55	0,12-≥32	1	≥16
	48 h	0,2	0,03-0,5	0,25	0,5	0,56	0,03-≥32	0,5	1	0,45	0,06-≥32	0,25	≥32	
Total (144)	RPMI	24 h	0,7	0,12-2	1	1	1,12	0,25-2	1	2	4,67	1-≥64	2	≥64
	AM#3-G	48 h	1,12	0,12-2	1	1	2,67	1-≥64	2	≥64	4,67	1-≥64	2	≥64
		24 h	0,15	0,03-0,5	0,12	0,5	0,23	0,06-1	0,25	0,5	0,5	0,12-≥32	0,25	≥32
Total (144)	AM#3	48 h	0,22	0,06-1	0,25	0,5	0,34	0,06-0,5	0,25	1	0,5	0,12-≥32	0,25	≥32
		24 h	0,09	0,015-0,5	0,06	0,5	0,16	0,03-0,5	0,12	0,5	0,45	0,06-≥32	0,25	≥32
	48 h	0,17	0,03-0,5	0,12	0,5	0,23	0,06-2	0,12	0,5	0,45	0,06-≥32	0,25	≥32	
Total (144)	RPMI	24 h	0,65	0,12-2	1	1	1,06	0,25-64	1	2	3	0,5-≥64	2	≥64
	AM#3-G	48 h	0,89	0,12-2	1	1	1,7	0,5-≥64	2	2	3	0,5-≥64	2	≥64
		24 h	0,1	0,03-0,5	0,12	0,25	0,16	0,02-32	0,12	0,5	0,38	0,06-≥32	0,25	1
Total (144)	AM#3	48 h	0,2	0,03-1	0,25	0,5	0,25	0,06-≥32	0,25	0,5	0,38	0,06-≥32	0,25	1
		24 h	0,06	0,001-0,5	0,06	0,25	0,1	0,015-1	0,12	0,3	0,28	0,03-≥32	0,25	1
	48 h	0,12	0,015-1	0,12	0,5	0,17	0,03-≥32	0,25	0,5	0,28	0,03-≥32	0,25	1	

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMF: concentración mínima fungicida; MG: media geométrica; 50 y 90, concentración que inhibe al 50% y al 90% de las cepas, respectivamente. *4 *Candida famata*, 3 *Candida lusitanae*, 3 *Blastoschizomyces capitatus*, 2 *Saccharomyces cerevisiae*, 2 *Yarrowia lipolytica*, 1 *Candida inconspicua*, 1 *Candida lambica*, 1 *Candida sake* y 1 *Pichia ohmeri*.

con CMF >1 mg/l fueron 3 *C. guilliermondii*, 2 *C. krusei*, 1 *C. famata*, 1 *B. capitatus* y 1 *Y. lipolytica*. En este medio, el 8,09% de los aislamientos fueron tolerantes a la caspofungina.

En el medio AM#3-G, la CMI₂ fue ≤0,5 mg/l en el 98,61% de los aislamientos y la CMI₀ fue ≤1 mg/l en el 97,92%. Sólo en un aislamiento de *C. parapsilosis* y otro de *Y. lipolytica* la CMI₂ fue de 1 mg/l. Las levaduras con CMI₀ >1 mg/l fueron 2 *C. guilliermondii* (CMI₀ 2 y ≥32 mg/l) y 1 *Y. lipolytica* (CMI₀ 2 mg/l). En este medio, la diferencia entre los valores de la CMI₂ y la CMI₀ fue ≤2 diluciones excepto en un aislamiento. La CMF fue ≤1 mg/l para el 91,60% de los aislamientos y ≥16 mg/l en 11 (1 *C. famata*, 4 *C. guilliermondii*, 1 *C. parapsilosis*, 4 *C. tropicalis* y 1 *Y. lipolytica*). El 8,3% de los aislamientos fueron tolerantes a la caspofungina.

En la Fig. 1 se representa el porcentaje acumulado de la CMI₂, la CMI₀ y la CMF en los tres medios de cultivo, y en la Tabla 2 la concordancia de los resultados obtenidos en AM#3 y AM#3-G con el medio RPMI y la obtenida entre los medios AM3 y AM#3-G. La concordancia con el medio RPMI fue muy baja tanto para la CMI₂ como para la CMI₀ y la CMF (<60%). Ello se debe a que se utiliza como criterio de igualdad entre los resultados una diferencia ≤2 diluciones, y en el medio AM#3, en general, los resultados de la CMI₂, la CMI₀ y la CMF fueron entre tres y cinco diluciones más bajas que en RPMI; de ahí la baja concordancia obtenida entre los dos medios. La CMI₀ en AM#3 sólo fue mayor que en RPMI en dos aislamientos de *C. krusei* (1 y 3 diluciones, respectivamente). La concordancia entre los medios AM#3 y AM#3-G de la CMI₂ y la CMI₀ fue >90%. En estos medios, las diferencias en los valores de CMI₂, CMI₀ y CMF fueron ≤2 diluciones en el 96,53%, el 95,14% y el 77,21%, respectivamente.

La correlación de los resultados obtenidos en los medios AM#3 y AM#3-G con los obtenidos en RPMI fue positiva; los coeficientes de correlación fueron 0,44 para la CMI₂, 0,56 para la CMI₀ y 0,49 para la CMF en AM#3, y 0,42, 0,51 y 0,41, respectivamente, en el medio AM#3-G. La correlación entre los medios AM#3 y AM#3-G fue 0,73 para la CMI₂, 0,83 para la CMI₀ y 0,59 para la CMF.

Tiempo de incubación

El efecto del tiempo de incubación en los valores de la CMI se puede apreciar en las Tablas 1 y 3. La CMI₅₀ y la CMI₉₀ prácticamente no varían con el tiempo de incubación o aumentan una dilución, dependiendo de la especie. En el medio RPMI, la CMI₂ y la CMI₀ se mantuvieron

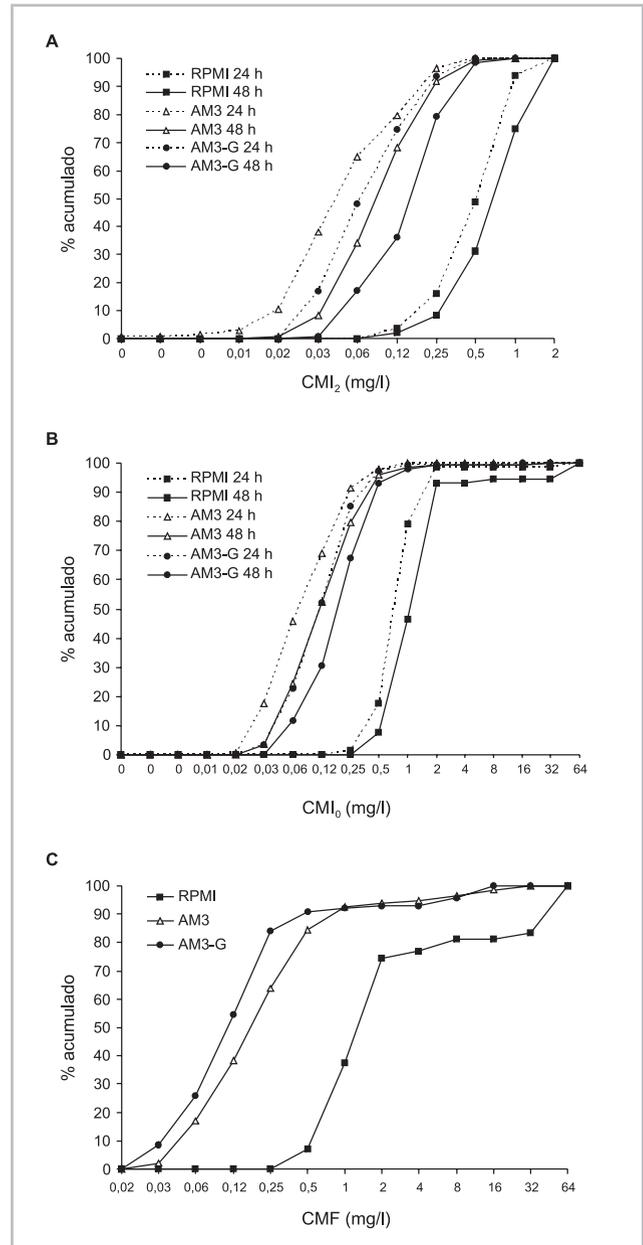


Figura 1. Influencia del medio de cultivo en la CMI₂, la CMI₀ y la CMF de la caspofungina.

igual o aumentaron una dilución en el 93,74% y el 92,36% de los aislamientos, respectivamente; en el medio AM#3 en el 82,4% y el 88,73% de los aislamientos; y en AM#3-G en el 78,17% y el 97,2%.

Efecto paradójico

En la Tabla 4 se presenta la frecuencia con que aparece el efecto paradójico en cada especie y medio de cultivo. En el medio RPMI se observó siempre a concentraciones >8

Tabla 2. Porcentaje de concordancia (± 2 log) con el medio RPMI.

Especie (n)	Tiempo	AM#3			AM#3-G			AM#3 frente a AM#3-G		
		CMI ₂	CMI ₀	CMF	CMI ₂	CMI ₀	CMF	CMI ₂	CMI ₀	CMF
<i>C. tropicalis</i> (42)	24 h	7,14	4,76		26,19	16,67	N.D.	95,24	100	
	48 h	28,57	9,52	23,81	37,71	23,81	28,57	100	100	85,71
<i>C. glabrata</i> (32)	24 h	9,38	6,45		40,63	67,64	N.D.	100	90,32	
	48 h	40,63	12,5	38,71	87,5	43,75	45,16	93,75	96,88	97
<i>C. krusei</i> (21)	24 h	33,33	57,14		23,81	47,62	N.D.	100	100	
	48 h	38,1	42,86	52,38	61,9	42,86	47,62	100	100	76,19
<i>C. parapsilosis</i> (20)	24 h	35	35		70	45	N.D.	100	100	
	48 h	60	30	46,15	60	65	45	100	100	100
<i>C. guilliermondii</i> (11)	24 h	72,73	60		72,73	80	N.D.	90,91	90	
	48 h	63,64	54,55	63,64	81,82	72,73	72,73	100	100	90,91
Otras especies* (18)	24 h	44,44	38,89		55,56	61,11	N.D.	100	100	
	48 h	44,44	27,78	27,78	61,11	44,44	33,33	100	100	94,44
Total (144)	24 h	25	25,35		42,36	46,48	N.D.	97,92	97,18	
	48 h	40,28	23,61	37,5	61,11	43,06	41,26	98,61	99,31	89,71

*4 *C. famata*, 3 *C. lusitaniae*, 3 *B. capitatus*, 2 *S. cerevisiae*, 2 *Y. lipolytica*, 1 *C. inconspicua*, 1 *C. lambica*, 1 *C. sake* y 1 *P. ohmeri*.

Tabla 3. Concordancia (%) entre los resultados obtenidos a las 24 y 48 horas de incubación en los tres medios de cultivo.

Especie (n)	Medio	CMI ₂		CMI ₀	
		± 1 log	± 2 log	± 1 log	± 2 log
<i>C. tropicalis</i> (42)	RPMI	90,48	95,24	97,62	100
	AM#3	69,05	97,62	90,48	100
	AM#3-G	80,95	100	95,24	100
<i>C. glabrata</i> (32)	RPMI	93,75	96,88	96,88	100
	AM#3	90,32	100	77,42	100
	AM#3-G	58,06	96,77	96,77	100
<i>C. krusei</i> (21)	RPMI	95,24	100	95,24	100
	AM#3	76,19	100	95,24	100
	AM#3-G	66,67	100	100	100
<i>C. parapsilosis</i> (20)	RPMI	100	100	90	90
	AM#3	100	100	100	100
	AM#3-G	95	100	100	100
<i>C. guilliermondii</i> (11)	RPMI	90,91	100	81,82	81,82
	AM#3	90	90	70	90
	AM#3-G	90	100	90	100
Otras especies* (18)	RPMI	94,44	100	77,78	88,89
	AM#3	83,33	100	94,44	100
	AM#3-G	94,44	100	100	100
Total (144)	RPMI	93,75	97,92	92,36	95,83
	AM#3	82,39	98,59	88,73	99,3
	AM#3-G	78,17	99,3	97,18	100

*4 *C. famata*, 3 *C. lusitaniae*, 3 *B. capitatus*, 2 *S. cerevisiae*, 2 *Y. lipolytica*, 1 *C. inconspicua*, 1 *C. lambica*, 1 *C. sake* y 1 *P. ohmeri*.

Tabla 4. Influencia del medio de cultivo en la frecuencia del efecto paradójico.

Especie (n)	nº (%) de aislamientos que muestran efecto paradójico en el medio indicado		
	RPMI	AM#3-G	AM#3
<i>C. tropicalis</i> (42)	23 (54,76)	9 (21,13)	4 (9,52)
<i>C. glabrata</i> (32)	4 (12,5)	2 (6,25)	1 (3,13)
<i>C. krusei</i> (21)	1 (4,76)	0	1 (4,76)
<i>C. parapsilosis</i> (20)	12 (60)	1 (5)	0
<i>C. guilliermondii</i> (11)	3 (27,27)	2 (18,18)	0
Otras especies (18)	4 (22,22)	3 (16,67)	3 (16,67)
Total (144)	47 (32,63)	17 (11,81)	9 (6,25)

*4 *C. famata*, 3 *C. lusitanae*, 3 *B. capitatus*, 2 *S. cerevisiae*, 2 *Y. lipolytica*, 1 *C. inconspicua*, 1 *C. lambica*, 1 *C. sake* y 1 *P. ohmeri*.

mg/l, en AM#3 a concentraciones >2 mg/l y en AM#3-G a concentraciones >4 mg/l. Se observó con mayor frecuencia en el medio RPMI y menos en AM#3 (32,63% frente a 6,25%). Por especies, en los tres medios fue más frecuente en *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, y menos en *C. krusei* (en esta especie sólo se observó en el medio RPMI).

DISCUSIÓN

La caspofungina demuestra muy buena actividad en los tres medios de cultivo frente a todas las especies de *Candida* ensayadas. La actividad fungistática es mayor en el medio AM#3, seguida de AM#3-G y RPMI. No obstante, más del 90% de los aislamientos ensayados se inhibieron (CMI₀) con ≤2 mg/l, independientemente del medio de cultivo. Por especies, la influencia del medio de cultivo es más evidente en *C. parapsilosis*, especie sobre la cual la caspofungina es más activa en AM#3-G. La presencia de glucosa en el medio AM#3 disminuye ligeramente la actividad fungistática de la caspofungina. Podría pensarse que la glucosa inhibe su actividad, pero en otro estudio que comparó la actividad de la caspofungina en medio RPMI y RPMI con un 2% de glucosa, la actividad fue mayor en el medio con glucosa (5). Otros autores (8, 9) también obtienen CMI₀ más bajas en medio AM#3 y sugieren que esta mayor actividad podría responder a CMI falsamente elevadas como consecuencia del efecto de *trailing* observado en RPMI, y que este crecimiento puede deberse a restos celulares no viables (evitables si se utilizan criterios de punto final menos estrictos que la CMI₀). Sin embargo, en el presente estudio, en el cual se han utilizado dos criterios de punto final (CMI₂ y CMI₀), la concordancia (±2 log) en-

tre la CMI₂ y la CMI₀ es muy elevada tanto en los medios AM#3 y AM#3-G (99,3%) como en RPMI (93%).

La actividad fungicida de la caspofungina es dependiente de la especie y del aislamiento, y mayor en el medio AM#3. En este medio, la CMF es ≤1 mg/l para el 92,65% de los aislamientos, mientras que en RPMI la CMF es ≤2 mg/l para el 74,31%. En el medio AM#3-G, la actividad fungicida es muy similar a la que se observa en el mismo medio sin glucosa (CMF ≤1 mg/l para el 91,60% de los aislamientos). Por especies es mayor en *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, especies que presentan el mayor porcentaje de aislamientos resistentes al fluconazol (10-13). Otros autores (14, 15) obtienen valores de CMF más bajos, lo que puede deberse a que utilizan volúmenes más pequeños (1-10 µl) para su determinación, probablemente demasiado pequeños para valorar la actividad fungicida. En general, la CMF es ≤4 × CMI₀ en el 86% de los aislamientos en el medio RPMI, en el 91,9% en AM#3 y en el 91,6% en AM#3-G.

La concordancia de los resultados obtenidos en los medios AM#3 y AM#3-G con el medio RPMI es baja (<60%) debido a que en AM#3 y AM#3-G las CMI son entre tres y cinco diluciones más bajas que en RPMI. Por especies, la mejor concordancia se obtiene en aquellas en que no se observa efecto paradójico en el medio AM#3 (*C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*) y en aquellas en que la frecuencia con que se observa dicho efecto es baja en ambos medios (*C. krusei*).

El tiempo de incubación apenas influyó en los resultados de la CMI₂ y la CMI₀ (Tabla 4). En general se mantuvo el mismo valor o aumentó como máximo dos diluciones. El medio en que más influyó el tiempo de incubación fue AM#3, debido a que el crecimiento a las 24 horas es muy escaso y en algunos aislamientos no es suficiente para leer la CMI. La concordancia (±2 log) entre la lectura a las 24 y 48 horas fue >95% tanto para la CMI₂ como para la CMI₀ en los tres medios de cultivo. En el que menos influyó el tiempo de lectura fue el RPMI.

En los tres medios de cultivo ensayados hay pérdida de actividad (efecto paradójico), detectada visualmente, a concentraciones que oscilan entre 32 y 64 × CMI₀ (≥8 mg/l en RPMI, ≥4 mg/l en AM#3-G y ≥2 mg/l en AM#3). Se observa con menor frecuencia en AM#3 que en RPMI (6,25% frente a 32,63%). La adición de glucosa al medio AM#3 aumenta la frecuencia de efecto paradójico de forma diferente según la especie considerada. En otros estudios también se observa un aumento de la frecuencia del efecto paradójico al añadir glucosa al medio RPMI (5, 16). Por especies, en *C. krusei* es donde se presenta con menor frecuencia. Otros autores, al contrario que nosotros, no ob-

servan efecto paradójico en *C. glabrata*, quizás porque han ensayado pocos aislamientos. Las especies en que se observa con mayor frecuencia son *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (17). El efecto paradójico también se ha observado con otras equinocandinas. Aunque el mecanismo molecular se desconoce, se han sugerido varios: la desrepresión de algún mecanismo de resistencia que se activa en presencia de concentraciones elevadas de caspofungina, una superproducción de quitina, la sobreexpresión del gen *MKCI*, una respuesta al estrés a elevadas concentraciones o incluso que se deba a un artefacto de la técnica; esto último es poco probable ya que el efecto paradójico se ha descrito en la penicilina, los betalactámicos y las quinolonas (4, 16, 18-22). Se desconoce la repercusión clínica que pueda tener el efecto paradójico. No obstante, con la micafungina se ha observado un mayor porcentaje de fracaso terapéutico con la dosis de 150 mg que con la de 100 mg (23). En otro estudio de aspergilosis pulmonar en ratón se observa una mayor carga fúngica pulmonar con la dosis de 4 mg que con la de 1 mg (24). Quizás, tal y como sugieren Melo y cols. (25), las equinocandinas no serían recomendables para el sellado terapéutico de los catéteres. Otros autores, utilizando aislamientos con efecto paradójico, no han conseguido reproducirlo *in vivo* (26).

En resumen, el tiempo de incubación no influye en la lectura de la CMI de la caspofungina en el medio RPMI. Además, la actividad de la caspofungina es fungicida en los tres medios de cultivo probados, y la presencia de crecimiento paradójico se observa con mayor frecuencia en el medio RPMI y en *C. tropicalis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L. y cols. *Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant Candida*. J Clin Microbiol 2003; 41: 5729-5731.
- Odds, F.C., Motyl, M., Andrade, R. y cols. *Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against Candida and Aspergillus species*. J Clin Microbiol 2004; 42: 3475-3482.
- Eagle, H., Musselman, A.D. *The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxicaly reduced activity at high concentrations against certain organisms*. J Exp Med 1948; 88: 131.
- Eagle, H. *A Paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin in vitro*. Science 1948; 107: 44-45.
- Romero, M., Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M. *Estudio de la actividad in vitro de caspofungina sobre especies de levaduras diferentes a Candida albicans, determinada por dos métodos: M27-A2 y EUCAST*. Rev Esp Quimioterap 2004; 17: 257-262.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne 2002.
- Cantón, E., Pemán, J., Viudes, A., Quindós, G., Gobernado, M., Espinel-Ingroff, A. *Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream Candida species*. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 203-206.
- Bartizal, C., Odds, F.C. *Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against Candida species and Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2100-2107.
- Nelson, P.W., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. *In vitro growth-inhibitory activity of pneumocandins L-733,560 and L-743,872 against putatively amphotericin B- and fluconazole-resistant Candida isolates: Influence of assay conditions*. J Med Vet Mycol 1997; 35: 285-287.
- Barchiesi, F., Spreghini, E., Tomassetti, S., Arzeni, D., Giannini, D., Scalise, G. *Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4989-4992.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Tendolkar, S., Hollis, R.J., Diekema, D.J. *Variation in susceptibility of bloodstream isolates of Candida glabrata to fluconazole according to patient age and geographic location*. J Clin Microbiol 2003; 41: 2176-2179.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Mills, K., Bolmstrom, A., Jones, R.N. *Evaluation of E-test method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of Candida species*. J Clin Microbiol 2001; 39: 4387-4389.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollis, R.J., Jones, R.N., Diekema, D.J. *In vitro activities of ravuconazole and voriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6,970 clinical isolates of Candida spp.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1723-1727.
- Bartizal, K., Gill, C.J., Abruzzo, G.K. y cols. *In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872)*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2326-2332.
- Espinel-Ingroff, A. *Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2950-2956.
- Jacobsen, M.D., Whyte, J.A., Odds, F.C. *Candida albicans and Candida dubliniensis respond differently to echinocandin antifungal agents in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 1882-1884.
- Chamilos, G., Lewis, R.E., Albert, N., Kontoyiannis, D.P. *Paradoxical effect of echinocandins across Candida species in vitro: Evidence for echinocandin-specific and candida species-related differences*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 2257-2259.
- Stevens, D.A., White, T.C., Perlin, D.S., Selitrennikoff, C.P. *Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations*. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51: 173-178.
- Stevens, D.A., Ichinomiya, M., Koshi, Y., Horiuchi, H. *Escape of Candida from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3160-3161.
- Wiederhold, N.P., Kontoyiannis, D.P., Prince, R.A., Lewis, R.E. *Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against Candida albicans: Possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 5146-5148.
- Ramón, M.S., Jiménez, M.T., Gobernado, M., Martínez, J.P., Cantón, E. *Actividad bactericida y efecto paradójico de fleroxacino y lomefloxacino sobre estafilococos*. Rev Esp Quimioterap 1993; 6: 75-79.

22. Cantón, E., Ramón, M.S., Jiménez, M.T., Martínez, J.P. *Killing kinetics of four quinolones against gram-positive cocci*. Chemotherapy 1993; 39: 394-399.
23. Pappas, P.G., Rotstein, C.M., Betts, R.F. y cols. *Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis*. Clin Infect Dis 2007; 45: 883-893.
24. Wiederhold, N.P., Kontoyiannis, D.P., Chi, J., Prince, R.A., Tam, V.H., Lewis, R.E. *Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis: Evidence of concentration-dependent activity*. J Infect Dis 2004; 190: 1464-1471.
25. Melo, A.S., Colombo, A.L., Arthington-Skaggs, B.A. *Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different Candida species*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3081-3088.
26. Clemons, K.V., Espiritu, M., Parmar, R., Stevens, D.A. *Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1293-1297.