
Utilidad de los estudios *in vitro* para seleccionar los estudios *in vivo*

Francesc Marco^{a,*}, Josefina Liñares^b y José María Miró^c

^aServeis de Microbiologia y ^cMalalties Infeccioses.

IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer)-Hospital Clínic Universitari de Barcelona.

^bServei de Microbiologia. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

RESUMEN

El conocimiento de los métodos utilizados para valorar la actividad *in vitro* de los antibióticos es fundamental para el desarrollo de muchos modelos experimentales en enfermedades infecciosas. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por agar dilución, macro o microdilución o por E-test, o la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) informa acerca de la actividad *in vitro* de un antibiótico en particular. Para analizar la actividad de dos antibióticos en combinación deben realizarse pruebas más complejas como curvas de letalidad o el método del tablero de ajedrez. La actividad bactericida del suero (ABCS) aporta información sobre la actividad del suero más el antibiótico administrado frente al microorganismo responsable de la infección. Otras técnicas de utilidad en los modelos experimentales en animales son la determinación de las concentraciones de los antibióticos en el suero por bioensayo y el cultivo cuantitativo de los tejidos.

Palabras clave:

Curva de letalidad. Sinergia. Actividad *in vitro*.

UTILITY OF *IN VITRO* STUDIES TO CHOOSE *IN VIVO* STUDIES

To develop an experimental animal model in infectious diseases requires to know the methodology used to determine the *in vitro* activity of antibiotics. Information about the *in vitro* activity of an antibiotic alone is obtained with the determination of agar dilution, macro or microdilution or E-test minimal inhibitory concentrations (MIC) and the minimal bactericidal concentrations (MBC). Time-Killing curves or checkerboard method studies the *in vitro* activity of antibiotic combinations. Serum bactericidal titers inform us about serum and antibiotic activity against the infectious etiological agent. Antibiotic serum levels determination by bioassay and quantitative bacteriological culture of tissue are useful procedures in experimental model animals.

Key words:

Time-Killing curve. Synergy. *In vitro* activity.

Introducción

Disponer de un modelo experimental animal que simule una determinada enfermedad ha sido y sigue siendo uno de los pilares en los que se fundamenta el desarrollo de la medicina. A juzgar por los artículos publicados en las revistas médicas de mayor prestigio, el progreso experimentado en los últimos años con el uso de estos modelos es espectacular. En teoría, la información

obtenida con los modelos experimentales puede ser de gran utilidad para comprender mejor la fisiopatogenia de la enfermedad objeto de estudio, para intentar mejorar su tratamiento, ya sea con la utilización de fármacos conocidos o de nueva síntesis o bien, para valorar las posibles opciones disponibles destinadas a prevenir su aparición.

Para el desarrollo de un modelo experimental en el que se va a estudiar una determinada enfermedad infecciosa será necesario conocer determinadas metodologías básicas que serán utilizadas, en primer lugar, como paso previo al desarrollo del modelo y que después se irán em-

*Correo electrónico: marco@medicina.ub.es.

pleando a lo largo de su realización. En la rutina diaria de un laboratorio de microbiología no es infrecuente que se realicen algunas de las mismas, sobre todo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La información que se obtiene resulta fundamental, ya que, aparte de conocer la etiología de la enfermedad infecciosa que quiere estudiarse (microorganismos responsables o frecuencia de aislamiento), se conocerá su sensibilidad a los antibióticos (CMI₅₀ y CMI₉₀) o la existencia de posibles problemas particulares de resistencia y permitirá plantear la posibilidad de estudiar nuevas combinaciones de antibióticos o de nuevas moléculas de futura comercialización.

Definiciones

Todo investigador en modelos experimentales de enfermedades infecciosas debe estar familiarizado con determinados términos utilizados frecuentemente en el laboratorio y asociados con el estudio de la actividad *in vitro* de los antibióticos. Se comentarán a continuación algunos de los más frecuentes. El término *concentración mínima inhibitoria (CMI)* hace referencia a la concentración más pequeña de antibiótico que inhibe el crecimiento macroscópico de un microorganismo después de un período de incubación estándar, generalmente de 18 a 24 h. La *concentración bactericida mínima (CBM)* es la concentración más pequeña de un antibiótico que produce una reducción igual o superior al 99,9 % en el número de células viables al compararlo con el inóculo inicial. Podemos utilizar el término *concentración mínima letal (CML)* para referirnos a cualquier microorganismo, incluyendo bacterias, hongos o virus.

La *actividad bacteriostática del suero (ABTS)* es la mayor dilución (o título) de una muestra de suero tomada de un paciente que está recibiendo un tratamiento antimicrobiano que inhibe el crecimiento macroscópico después de la incubación, por lo general de 18 a 24 h. El estudio se realiza con el microorganismo responsable de la infección del paciente. En la *actividad bactericida del suero (ABCS)* se valora la mayor dilución (o título) de una muestra de suero que produce una reducción igual o superior al 99,9 % en el número de células viables comparado con el inóculo inicial después de la incubación. En el *efecto paradójico o fenómeno "Eagle"* se produce un inexplicable aumento en el número de células viables (que indica un descenso de la actividad bactericida) a medida que la concentración del antibiótico se incrementa por encima de la CMI. La *tolerancia* es un fenómeno en el que antibióticos

bactericidas parecen carecer o tener reducida esta actividad frente a determinadas cepas. A menudo se cree que se debe a una alteración en la actividad enzimática autolítica de la propia bacteria, aunque podrían estar implicados otros mecanismos. Como parte de la definición de tolerancia se acepta que cuando detectamos este fenómeno la relación entre la CMB y la CMI es igual o superior a 32 (CMB/CMI \geq 32). En las *curvas de letalidad (Time-Killing curves)* se valora la actividad bactericida de un antibiótico o de una combinación de antibióticos a una concentración determinada efectuando subcultivos a diferentes horas durante las 24 h de incubación. Esto permite conocer la disminución del número de bacterias viables en relación con el inóculo inicial según el tiempo de incubación y saber el grado de actividad bactericida del antibiótico. El método del tablero de ajedrez (*checkerboard test*) valora la actividad *in vitro* de dos (a veces tres) antibióticos para determinar si la combinación es más activa que cualquiera de los dos antibióticos administrados de forma individual.

Métodos para estudiar la actividad *in vitro* de los antibióticos

Los métodos comentados en esta revisión son los siguientes:

Estudios con un solo antibiótico.

Determinación de la CMI.

Agar dilución.

Macrodilución.

Microdilución.

E-test.

Determinación de la CMB

Combinaciones de dos antibióticos.

Curvas de letalidad (*Time-Killing curves*).

Método del tablero de ajedrez (*checkerboard*).

Actividad in vivo de los antibióticos.

Actividad bactericida del suero.

Otras técnicas útiles.

Determinación de las concentraciones de antibióticos en el suero.

Cultivo de tejidos.

Estudios con un solo antibiótico. Determinación de la CMI

En la actualidad se dispone de diversos métodos que permiten conocer la actividad *in vitro* que manifiestan algunos fármacos frente a los microorganismos, ya sean bacterias, hongos o virus. Sólo se comentarán los de mayor utilidad práctica. La determinación de la CMI puede rea-

lizarse por agar dilución, macrodilución, microdilución o por el método E-test. La metodología recomendada para la realización de los tres primeros está perfectamente estandarizada en los documentos publicados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹, y las normas que proporciona el fabricante del método E-test (AB-Biodisk, Suecia) son fundamentales para su realización. Además, es altamente recomendable la lectura de las metodologías publicadas en manuales de laboratorio como el de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM)^{2,3} y libros de texto especializados⁴.

Agar dilución

En este método se prepara una batería de placas de agar con el antibiótico a estudiar a diversas concentraciones, generalmente dobles, y se inoculan diversas cepas bacterianas con un replicador de Steers que permite depositar encima del medio alrededor de 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC/spot). No nos extenderemos en su explicación porque se trata de un método laborioso que no suele emplearse de forma rutinaria y su uso queda restringido a estudios o valoraciones, generalmente de carácter multicéntrico, de nuevos antibióticos.

Macrodilución y microdilución

La determinación de la CMI por macrodilución o microdilución se realiza en ambos casos con un medio líquido, y la diferencia fundamental entre los dos métodos es el volumen utilizado. En el método de macrodilución se suele trabajar con volúmenes de 1 o 2 ml y en el de microdilución

con 100 μ l, raras veces con 200 μ l (CMI para hongos) o con 50 μ l (métodos comercializados). En líneas generales, la sistemática de trabajo suele ser la siguiente.

Medio de cultivo. Por la buena reproducibilidad lote a lote, baja presencia de inhibidores y crecimiento satisfactorio para una gran mayoría de microorganismos patógenos, se suele emplear caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes (Ca^{++} , 20 a 25 mg/l y Mg^{++} , 10 a 12,5 mg/l). Algunos microorganismos necesitan la adición de suplementos, como ocurre con los estreptococos que requieren añadir al medio sangre de caballo lisada (proporción final: 2-5 %). En la tabla I se indican los medios utilizados según los microorganismos más habituales.

Preparación de los antibióticos a estudiar. Una vez disuelto el antibiótico a partir de sustancia pura valorada (generalmente suministrada por el laboratorio fabricante del antibiótico) se realizan las diluciones apropiadas para conseguir las concentraciones deseadas en los tubos (macrodilución) o placas de microtítulo (microdilución). El volumen que se dispensará en los tubos será de 1 ml (aunque también puede trabajarse con 0,5 ml) y en los pocillos de microtítulo 50 μ l.

Inóculo. Se prepara un suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a una escala de McFarland 0.5 (aproximadamente 10^8 UFC/ml) a partir de un cultivo puro de 24 h o inoculando varias colonias en un medio de cultivo líquido que se incubará hasta conseguir la densidad óptica deseada. Una vez ajustado el inóculo, se di-

TABLA I
MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS PARA DETERMINAR LA CMI SEGÚN
EL TIPO DE MICROORGANISMO

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Comentarios</i>
Enterobacterias	Mueller-Hinton más cationes	
<i>P. aeruginosa</i>	" /idem	Incubar 24 h completas para detectar resistencia a la vancomicina Añadir 2 % de NaCl para la oxacilina Incubar 24 h completas
<i>Enterococcus</i> spp.	" /idem	
<i>Staphylococcus</i> spp.	" /idem	
<i>Streptococcus</i> spp. (incluye <i>S. pneumoniae</i>)	Mueller-Hinton más cationes con 2-5 % de sangre lisada de caballo	
<i>L. monocytogenes</i>		
<i>Haemophilus</i> spp.	<i>Haemophilus</i> Test Medium (HTM)	

luirá de forma apropiada según cada método con la finalidad de conseguir que en cada tubo o pocillo de la placa tengamos alrededor de 5×10^5 UFC/ml (margen de $3-7 \times 10^5$ UFC/ml). Es aconsejable efectuar un recuento de colonias a partir del inóculo inicial para asegurar que el inóculo final sea lo más cercano posible al recomendado.

Inoculación de los tubos o las placas de microtítulo. En ambos métodos, la inoculación se efectuará preferentemente dentro de los primeros 15 min después de ajustar el inóculo. En el método de macrodilución se inoculan los tubos que contienen 1 ml con las concentraciones de antibióticos preparadas (a excepción del tubo control) con 1 ml del medio de cultivo (inóculo). El volumen final será de 2 ml. Si se ha optado por trabajar con 0,5 ml el volumen final será 1 ml. En el método de microdilución el volumen que contienen los pocillos con el antibiótico es de 50 μ l y se añaden otros 50 μ l con el inóculo. Otra opción, válida en los dos métodos, es añadir un volumen que no exceda el 10 % del volumen final (p. ej., 5-10 μ l de inóculo si el volumen final es de 100 μ l). Debe tenerse presente que cuando se añade el inóculo (1 ml o 50 μ l) se efectúa una dilución 1:2 que disminuye a la mitad la concentración del antibiótico. Es aconsejable realizar controles de la pureza del inóculo efectuando un subcultivo en un medio no selectivo.

Incubación. Para los dos métodos, el período de incubación es de 18-20 h a 35 °C en atmósfera aerobia. Para determinados microorganismos la incubación puede ampliarse a 20-24 h (*Streptococcus* spp. o *Haemophilus* spp.) o a 24 h completas (*S. aureus* oxacilina resistente o *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina).

Lectura de la CMI. Una vez comprobada la presencia de crecimiento en el tubo o pocillo control se determinará la CMI, que corresponderá al primer tubo o pocillo en el que se produce una inhibición del crecimiento macroscópico del microorganismo estudiado.

Control de calidad. Las cepas recomendadas por el NCCLS son las más adecuadas para esta finalidad. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 son las cepas más útiles, ya que la mayoría de antibióticos tienen unos intervalos de diluciones perfectamente definidos. El empleo de otras cepas ATCC dependerá de los microorganismos estudiados.

E-test

La determinación de la CMI por el método E-test es relativamente reciente, pero poco a poco se va introduciendo en la rutina diaria de un laboratorio de microbiología. Los resultados obtenidos presentan una buena correlación con los métodos tradicionales (agar dilución, macrodilución o microdilución)⁵ y tiene la enorme ventaja respecto a estos métodos de que su realización es mucho más sencilla. Por otra parte, es un método que podríamos considerar caro y su aplicación en el campo de los estudios *in vitro* en modelos experimentales quedaría limitado a aspectos muy concretos. En esencia, el método consiste en aplicar unas tiras de plástico que contienen el antibiótico que ensayamos en la superficie de una placa de agar que previamente ha sido inoculada con el microorganismo a estudiar. Tras la incubación y si el microorganismo es sensible se produce una elipse de inhibición alrededor de la tira con el antibiótico. La lectura de la CMI se realiza en el punto de intersección entre el borde de inhibición de la elipse y la tira con el antibiótico.

Para su realización es aconsejable seguir las instrucciones del fabricante, pero los aspectos más importantes son los siguientes: se utilizan los medios de cultivo (Mueller-Hinton, otros según el microorganismo) y la misma forma de preparación del inóculo (McFarland 0.5) que recomienda el NCCLS. Para la inoculación de las placas se introduce un escobillón estéril en la suspensión bacteriana y al retirarlo, se presiona contra la pared interna del tubo para eliminar el exceso de líquido. A continuación se siembra la superficie del agar tres veces, rotando la placa, con la finalidad de conseguir una distribución homogénea del inóculo. Se deja absorber este inóculo un mínimo de 10-15 min hasta que la superficie esté completamente seca y se deposita la tira o tiras de antibióticos (el número dependerá del diámetro de la placa de Petri utilizada) en la superficie del agar. Como las tiras deben guardarse a -20 °C debemos tener la precaución de retirarlas previamente y dejarlas a temperatura ambiente unos 30 min. La incubación de las placas no difiere de las indicaciones habituales del NCCLS, tras la cual se efectuará la lectura de la CMI como se ha comentado anteriormente.

Determinación de la CMB

Una vez determinada la CMI y para conocer en qué dilución se produce una reducción del inóculo inicial igual o superior al 99,9 % (CMB),

deben efectuarse subcultivos en medio sólido de todos aquellos tubos o pocillos en los que no exista crecimiento macroscópico. Independientemente del método utilizado para determinar la CMI (macro o microdilución) es recomendable que el volumen a subcultivar sea de 100 μ l, aunque algunos laboratorios utilizan un volumen inferior (10 μ l). Con la ayuda de una pipeta se mezcla bien el contenido de cada tubo o pocillo sin crecimiento macroscópico aspirando de 6 a 10 veces. A continuación se aspira 100 μ l (por duplicado en el método por macrodilución) y se dispensan en una placa de agar sangre (otro medio si no crece el microorganismo). Se deja secar 15-20 min y se extiende por la superficie del agar. La incubación se realiza a 35 °C durante 24-72 h según el microorganismo. Tras esta incubación se determina el número de colonias que crecen en las placas y se calcula el número máximo permitido según el inóculo inicial. Por ejemplo: 5×10^5 UFC/ml (inóculo) \times 0,1 ml (volumen sembrado en las placas) \times 0,001 (porcentaje de células permitidas) = 50 UFC. En este caso, cuando la suma del número de colonias en las dos placas es igual o inferior a 50, la dilución es bactericida. Si se subcultiva un inóculo inferior (10 μ l) el cálculo del número de bacterias se realiza según el método de Pearson et al⁶.

Lectura de la CMB

La CMB corresponderá a aquella dilución en la que tras los subcultivos en placas no existe crecimiento bacteriano o el número de colonias es inferior al número máximo permitido. Para profundizar en la metodología utilizada en la determinación de la CMB remitimos al lector a la lectura de bibliografía especializada^{4,7,8}.

Estudios con dos antibióticos

Curvas de letalidad (Time-Killing curves)

La actividad bactericida de los antibióticos también puede estudiarse mediante la realización de curvas de letalidad. En este método se valora la dinámica de la actividad de los antibióticos, solos o en combinación, a lo largo de un período de tiempo de 24 h (hay excepciones según el microorganismo) mediante el recuento del número de bacterias viables a unas horas determinadas. No existe una metodología completamente estandarizada para su realización y hay ciertas diferencias según la bibliografía, por lo que la consulta de textos de referencia es im-

prescindible^{7,9}. El estudio se realiza generalmente con un volumen total de 10 ml y se utilizan un tubo control de crecimiento, un tubo control de esterilidad, un tubo para cada antibiótico sólo a la concentración escogida y un tubo para cada combinación de antibióticos. Antes de realizar una curva de letalidad deben conocerse la CMI y la CMB de los antibióticos que quieren valorarse para decidir las concentraciones de los mismos (p. ej., CMI, $1/2 \times$ CMI, $1/4 \times$ CMI o $2 \times$ CMI). Los aspectos más importantes del procedimiento que comentaremos son los siguientes:

Medio de cultivo. Se emplea medio de Mueller-Hinton suplementado con cationes. Para conocer el medio de cultivo más adecuado según el microorganismo véase la tabla I.

Preparación del antibiótico. Una vez disuelto el antibiótico se diluirá hasta conseguir una concentración 100 veces superior a la concentración final que vayamos a estudiar. En el caso de valorar la actividad de un solo antibiótico se añaden 100 μ l de la solución 100 veces concentrada a un tubo con 9,9 ml de medio de cultivo. Si se trata de estudiar la combinación de dos antibióticos se dispensan 100 μ l de la solución 100 veces concentrada del antibiótico A y 100 μ l de la solución 100 veces concentrada del antibiótico B a un tubo con 9,8 ml de medio de cultivo.

Inóculo. Debe prepararse de tal forma que permita conseguir, una vez diluido, un inóculo final entre 5×10^5 y 10^6 UFC/ml. Una forma de conseguirlo sería preparar una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a una escala de McFarland 1 (aproximadamente 3×10^8 UFC/ml) que se diluirá 1:5 mediante la adición de 1 ml de la suspensión a 4 ml de medio de cultivo (aproximadamente 6×10^7 UFC/ml).

Inoculación e incubación. Añadiremos 100 μ l del inóculo que contiene 6×10^7 UFC/ml a cada tubo (excepto tubo control de esterilidad) con 10 ml de medio más antibiótico(s). La concentración final será de 6×10^5 UFC/ml. Se mezcla bien con la ayuda de un vórtex y antes de incubar a 35 °C se retiran 100 μ l del tubo control para efectuar diluciones seriadas y sembrar placas de cultivo que permitirán conocer el inóculo real inicial. Es aconsejable efectuar una siembra con un asa calibrada del tubo con el McFarland 1 para asegurar la pureza del inóculo. Algunos autores han intentado utilizar inóculos mayores (10^7 o 10^8 UFC/ml) para intentar simular al máximo la situación real de la infección *in vivo*. En

estos casos se debe ser cauteloso en la interpretación de los resultados ya que cuando la concentración llega a 10^9 - 10^{10} UFC/ml se agotan los nutrientes del medio de cultivo.

A las horas determinadas previamente (p. ej., 4, 8 y 24 h) desde el inicio de la incubación, se retiran los tubos de la estufa, se agitan (vórtex) y se aspira una alícuota de 100 μ l de cada tubo para efectuar diluciones seriadas y siembra en placa de cultivo. Es importante que este proceso no se demore más allá de los 10 min para evitar interrumpir el ciclo de crecimiento.

Lectura de resultados. En primer lugar, se determina el inóculo real mediante el recuento de las colonias que han crecido en las placas de cultivo (aproximadamente 6×10^5 UFC/ml). Posteriormente se cuentan las colonias que han crecido en las placas correspondientes a las diferentes diluciones realizadas según el tubo y las horas de siembra. Para calcular el número de UFC/ml es aconsejable utilizar las placas cuyo número de colonias sea entre 30 y 300. Placas con recuentos inferiores o superiores no son aconsejables, aunque pueden utilizarse si no hay otra opción. Una vez conocido el número de UFC/ml se convierten a valores en \log_{10} y se representan en una gráfica como las de la figura 1.

Interpretación de los resultados. Determinar si las combinaciones de antibióticos estudiadas son sinérgicas (reducción del crecimiento de al menos $2 \log_{10}$ con la combinación de antibióticos comparado con el antibiótico solo más activo), antagónicas (incremento del crecimiento de al menos $2 \log_{10}$ con la combinación de antibióticos comparado con el antibiótico solo más activo) o indiferentes (cuando existe una variación menor de $1 \log_{10}$, ya sea un incremento o un descenso en el crecimiento con la combinación de antibióticos comparado con el antibiótico solo más activo). Se considera que un antibiótico o combinación de antibióticos es bactericida cuando se produce un descenso de, al menos, $3 \log_{10}$ en el número de bacterias a las 24 h de incubación en comparación con el inóculo inicial (fig. 1).

Método del tablero de ajedrez (Checkerboard)

El método del tablero de ajedrez es ampliamente utilizado en los laboratorios de microbiología para valorar combinaciones de antibióticos. Con este método se evalúa la actividad inhibitoria (a veces bactericida) de una combinación de antibióticos utilizando las recomendaciones del

NCCLS para determinar la CMI y la CMB. Puede realizarse en tubos (macrodilución) o en placas de microtítulo (microdilución)^{9,10}.

El intervalo de concentraciones estudiadas para cada antibiótico suele ser de al menos cuatro o cinco diluciones por debajo de la CMI y dos diluciones por encima. Una vez diseñado, el método consiste en una serie de columnas en las que cada tubo o pocillo contiene la misma cantidad de un antibiótico A que está diluido a lo largo del eje \times (abscisas) y filas en las que cada tubo o pocillo contiene la misma cantidad de un antibiótico B que está diluido a lo largo del eje y (ordenadas) (fig. 2). El resultado es que en cada tubo o pocillo hay dos antibióticos con dos concentraciones (excepto en la columna o fila con un solo antibiótico o los controles).

En su realización se seguirán las recomendaciones comentadas en el apartado de determinación de la CMI en cuanto a la preparación de antibióticos, diluciones, medio de cultivo, inóculo, incubación y lectura de la CMI. Debe tenerse presente el factor de dilución a la hora de añadir los antibióticos para calcular su concentración final.

Para la interpretación de los resultados se determina la CMI de los antibióticos solos y en combinación, y se calcula el índice FIC (concentración inhibitoria fraccionada) para cada antibiótico según la fórmula siguiente:

$$FIC = FIC A + FIC B = A/CMIA + B/CMIB.$$

En la fórmula, A o B son la CMI del antibiótico en combinación y CMIA o CMIB son la CMI del antibiótico solo. Si el índice FIC es $\leq 0,5$ se considera que la combinación de antibióticos es sinérgica, si es > 4 , antagónica, y entre $> 0,5$ y ≤ 4 , indiferente. Dentro de este último concepto podría añadirse una nueva definición que considerara una combinación como aditiva cuando el índice FIC es igual a 1. El método puede completarse, a la vez que se convierte en más complejo, si se llevan a cabo subcultivos para conocer la actividad bactericida (CMB) y calcular el índice FBC. En la figura 2 se representan gráficamente estos resultados.

¿Qué método escoger para nuestros estudios?

La primera opción probablemente sería determinar por microdilución la CMI y la CMB del antibiótico(s) a estudiar frente al microorganismo escogido. Una vez conocida esta información se planteará efectuar más estudios según el mode-

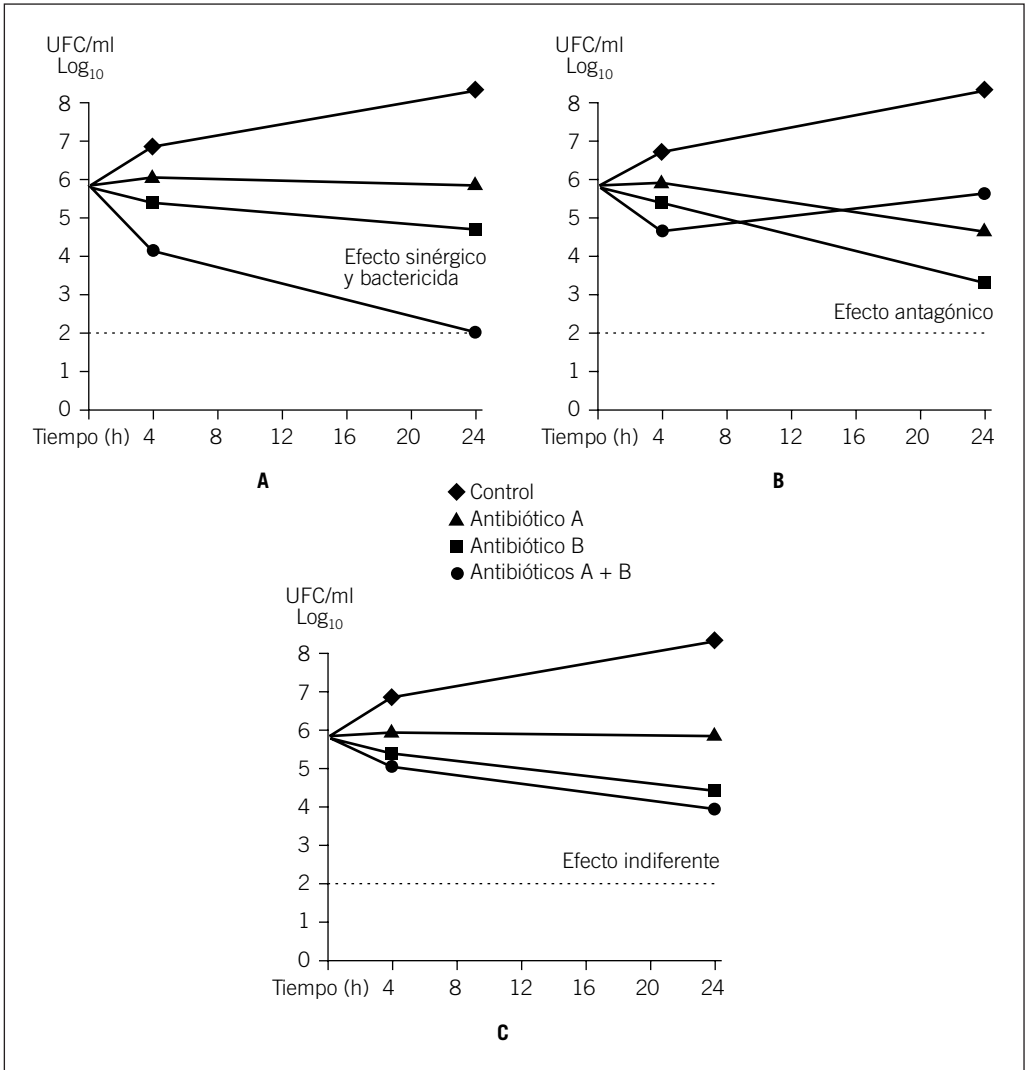


Fig. 1. Curvas de letalidad. Ejemplos de efectos sinérgico (A), antagónico (B) e indiferente (C) obtenidos al combinar dos antibióticos (A + B).

lo que se desee estudiar. Por ejemplo, si nuestra intención es valorar la eficacia de un nuevo antibiótico comparándolo con las pautas de tratamiento recomendadas, la información que nos proporciona la CMI y la CMB es, en principio, suficiente. Si lo que pretendemos es estudiar nuevas combinaciones de antibióticos, deberemos optar por la realización de curvas de letalidad, ya que proporcionan información sobre la dinámica de la actividad de los antibióticos.

Actividad *in vivo* de los antibióticos

La actividad bactericida del suero es una prueba que, aunque realizada *in vitro*, informa acerca de la actividad *in vivo* del suero del paciente más el antibiótico(s) que está recibiendo para tratar su infección. No obstante, debe tenerse presente que se trata de una prueba realizada *in vitro* y, como tal, se ve influida por todos los factores que afectan a la determinación de la actividad de un

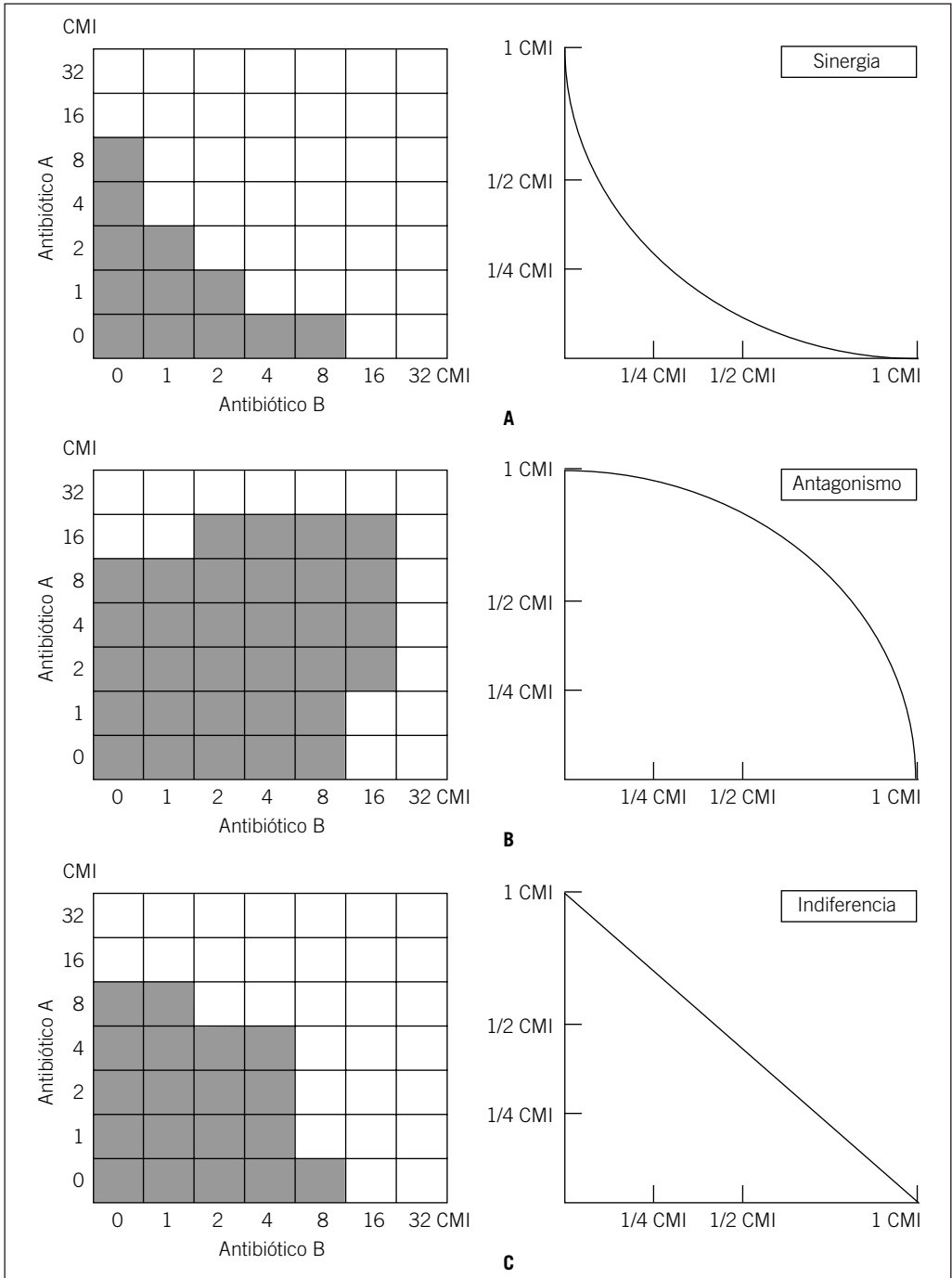


Fig. 2. Método del tablero de ajedrez. Ejemplos de efectos sinérgico (A), antagónico (B) e indiferente (C) obtenidos al combinar dos antibióticos (A + B).

antibiótico además del suero del paciente (por las proteínas que contiene) y el diluyente escogido.

Actividad bacteriostática y bactericida del suero

Schlichter y MacLean¹¹ fueron los primeros investigadores que utilizaron la determinación de la actividad bacteriostática del suero (ABTS) para valorar la efectividad de la penicilina en el tratamiento de la endocarditis bacteriana. Poco después, Fisher¹² utilizó la actividad bactericida del suero (ABCS) con el mismo propósito. A pesar de su empleo durante muchos años y en diversas enfermedades, la determinación de la ABCS sigue siendo motivo de controversias y de desacuerdos sobre su verdadera utilidad. Con esta prueba se determina la actividad bacteriostática y bactericida del suero del paciente que contiene el antibiótico(s) administrado frente al microorganismo que le produce la infección. El suero se diluye geoméricamente y se añade un inóculo estándar a cada tubo o pocillo antes de su incubación a 35 °C durante 24 h. La actividad bacteriostática del suero (ABTS) es la que corresponde a la dilución más alta que inhibe el crecimiento macroscópico. Después de efectuar subcultivos de aquellos tubos o pocillos sin crecimiento, se determina la dilución más alta que produce una reducción $\geq 99,9\%$ del inóculo inicial (ABCS). Aunque la prueba puede realizarse por macrodilución, se prefiere el método de microdilución por utilizar menor cantidad de suero y medio de cultivo, requerir menor tiempo para su realización y haber demostrado una buena reproducibilidad^{13,14}.

Dilución del suero. Dispensar 50 μ l del diluyente (aconsejable suero inactivado, pero también se emplea medio de cultivo) en los pocillos 2 a 12. Utilizar otros pocillos para control de esterilidad y crecimiento. Añadir 50 μ l del suero a estudiar a los pocillos 1 y 2. Efectuar diluciones dobles.

Inóculo. Igual que el empleado para determinar la CMI. Efectuar subcultivos para conocer el inóculo real.

Inoculación e incubación. Dispensar 50 μ l del inóculo a los pocillos correspondientes. Incubar a 35 °C durante 24 h.

Lectura de la actividad bacteriostática. Determinar la dilución más alta del suero en la que no se aprecia crecimiento macroscópico. Calcular el

inóculo empleado mediante el recuento de las colonias. De todos los pocillos en los que no se aprecia crecimiento efectuar subcultivos por duplicado (10 μ l) extendiendo todo el volumen en la superficie de la placa. Incubar las placas 24-72 h según el microorganismo.

Lectura de la actividad bactericida. Tras el recuento del número de colonias en las placas, la actividad bactericida del suero corresponderá a la dilución más alta del suero del paciente que reduce el inóculo inicial en un 99,9 % o más.

Otras técnicas útiles

Determinación de las concentraciones de antibióticos en el suero

La determinación de las concentraciones de antibióticos en el suero resulta de gran utilidad en un modelo experimental de enfermedad infecciosa, ya que permite conocer si el antibiótico administrado alcanza los valores esperados. Esto es especialmente importante cuando se utilizan modelos de farmacocinética humanizada. Aunque se pueden utilizar diversos métodos (HPLC o inmunoanálisis con técnica EMIT)¹⁵ sólo se describirá la metodología necesaria para determinar los valores de los antibióticos en el suero por bioensayo, ya que éste suele ser el método más utilizado en modelos experimentales.

Preparación de placas de agar. Como medio de cultivo se suele emplear agar de Mueller-Hinton que una vez esterilizado se dejará enfriar hasta una temperatura de 50-55 °C. A continuación se dispensan 17,5 ml de agar en placas de Petri estériles (diámetro 19 mm) y se deja solidificar. Se añade a 100 ml de medio 1 ml de un inóculo McFarland 0,5 preparado a partir de un cultivo de toda la noche y se dispensan 12,5 ml en cada placa. De esta forma, el inóculo final será de 10⁵ a 10⁶ UFC/ml. El microorganismo a utilizar dependerá del antibiótico que se desea medir, pero deberá ser lo suficientemente sensible como para que el nivel de detección inferior sea de 0,5 a 1 μ l.

Preparación del patrón de concentraciones de referencia. Una vez disuelto el antibiótico, se efectúan las diluciones necesarias para obtener las concentraciones que se utilizarán como estándar. La última dilución (1:1) debe efectuarse con suero de conejo o del animal de nuestro modelo.

Preparación de las muestras. El suero obtenido tras centrifugación de la sangre se congela en diversas alícuotas. Se utiliza una alícuota cada vez desechando el suero sobrante.

Inoculación de las muestras y estándar. En placas de Petri estériles se colocan diversos discos de papel (especiales para ensayo de antibióticos) sobre los que se depositan 20 µl del suero o del antibiótico estándar. A continuación, y con la ayuda de unas pinzas, se colocarán los discos con las muestras de suero o estándar. En cada placa con muestras de suero debe colocarse un disco con una concentración conocida del antibiótico estándar para poder corregir las variaciones que se produzcan respecto al mismo.

Incubación. Se efectúa a 35 °C durante 18-24 h.

Lectura e interpretación de los resultados. La lectura de las placas se realiza con la ayuda de un pie de rey midiendo los halos de inhibición alrededor de los discos. A partir de las concentraciones estándar se calcula la recta de regresión ($\log y = a + bx$) correspondiente, a partir de la cual podrán calcularse las concentraciones de las muestras.

Consideraciones a tener en cuenta. Los bioensayos se realizan por triplicado y se emplea la media de los tres valores para realizar los cálculos. Debe procurarse que los halos de inhibición de las muestras se encuentren dentro del rango obtenido con el estándar. Si es necesario, se diluirán las muestras para conseguirlo. Debe calcularse el coeficiente de variabilidad inter e intraanálisis de nuestro método mediante repeticiones del mismo bioensayo a lo largo de varios días y en el mismo día.

Cultivo de tejidos

El cultivo de cualquier tejido infectado en un modelo experimental animal es uno de los parámetros empleados para valorar la eficacia del tratamiento antibiótico utilizado. Puede realizarse de forma cualitativa (hay o no hay crecimiento) o cuantitativa (determinamos el número de UFC/g de tejido y comparamos los resultados según la media \pm desviación estándar).

Procesamiento. Se extrae el tejido (p. ej., vegetaciones cardíacas) objeto de estudio, se pesa y se homogeneiza en un medio líquido con un volumen conocido (p. ej., caldo de tripticasa-soja). Se

efectúan diluciones del homogeneizado hasta 10^{-6} o 10^{-7} (según la densidad bacteriana esperada) en el mismo medio líquido y se siembra de cada dilución incluido el homogeneizado, 0,1 ml (duplicado) en placas de agar apropiadas según el microorganismo. Tras una incubación de 24-78 h (depende del microorganismo) se realiza el recuento de colonias en cada placa y se calcula el número de bacterias por gramo de tejido según la siguiente fórmula¹⁶:

$$\text{UFC/g} = \frac{\text{número de colonias} \times \text{dilución} \times 10}{\text{peso tejido} \times (\text{volumen medio} + \text{peso tejido})}$$

Es conveniente sembrar el resto del homogeneizado (residual) en placas de agar invertido para mejorar el límite de detección del método en caso de que el número de UFC/g de tejido sea inferior a 10^2 .

BIBLIOGRAFÍA

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard (4th ed.). Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, document M7-A4, 1997, NCCLS.
2. Lorraine T. Broth microdilution MIC testing. En: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.2: 1-30.
3. Novak SM. Etest susceptibility testing. En: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.2a: 1-17.
4. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. En: Lorian V, editor. Antibiotics in Laboratory Medicine (4th ed.). Maryland: Williams and Wilkins, 1996; 52-111.
5. Baker CN, Stocker SA, Culverm DH, Thornsberry C. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29: 533-538.
6. Pearson RD, Steigbigel RT, Davis HT, Chapman SW. Method for reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 699-708.
7. Knapp C, Moody JA. Tests to Assess Bactericidal Activity. En: Isenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.16: 1-33.
8. Peterson LR, Shanholtzer CJ. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 420-432.

9. Eliopoulos GM, Moellering Jr RC. Antimicrobial combinations. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine* (4ª ed.). Maryland: Williams and Wilkins, 1996; 330-396.
10. Moody JA. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. En: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.18: 1-28.
11. Schlichter JG, MacLean H. A method for determining the effective therapeutic level in the treatment of subacute bacterial endocarditis with penicillin: a preliminary report. *Am Heart J* 1947; 34: 209-211.
12. Fisher AM. A method for determination of antibacterial potency of serum during therapy of acute infections. Preliminary report. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1952; 90: 313-319.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methodology for the serum bactericidal test* (2ª ed.). Villanova, PA: Document M21T. Tentative guideline, 1992, NCCLS.
14. Griffin J. Serum Inhibitory and Bactericidal Titers. En: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 5.17: 1-19.
15. Klassen M, Edberg SC. Measurement of antibiotics in human body fluids: techniques and significance. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine* (4ª ed.). Maryland: Williams and Wilkins, 1996; 230-295.
16. Loeb EC, Marvin JA, Heck EL, Curreri PW, Baxter, CR. The method of quantitative burn wound biopsy cultures and its routine use in the care of the burned patient. *Am J Clin Pathol* 1974; 61: 20.

DISCUSIÓN

J.M. MIRÓ: ¿Qué criterios utilizarías en el laboratorio para poder seleccionar aquellas combinaciones de antibióticos o aquellos antibióticos que evaluarías en un modelo *in vivo*?

F. MARCO: Depende del objetivo que se pretenda. Si se quiere evaluar un fármaco nuevo frente a una pauta ya conocida, probablemente lo primero que hay que hacer es una determinación de la CMI y de la CMB. Si únicamente vamos a evaluar un antibiótico, no es necesario hacer nada más. En el supuesto de analizar combinaciones de fármacos conocidos que aún no se han estudiado, aparte de la CMI y de la CMB, es evidente que se requieren otras pruebas como una curva de letalidad, que ofrece más información sobre la dinámica de actividad de los antibióticos frente a la bacteria que se está estudiando.

J. GAVALDÀ: Últimamente se ha publicado una normativa de la Sociedad Americana de Microbiología que actualiza el concepto de sinergia y acepta que sólo se puede hablar de sinergia cuando uno de los antibióticos utiliza una concentración que no inhibe el crecimiento de la bacteria. Por ello, en muchas de las curvas que aparecen habitualmente en la bibliografía no se podría hablar de sinergia. ¿Cuál es vuestra opinión al respecto?

F. MARCO: Es evidente que cuando se realiza una curva de letalidad si el antibiótico más activo es bactericida, la curva ya no es de utilidad si lo que se pretende es efectuar un análisis de la sinergia entre diferentes antibióticos.

J. GAVALDÀ: Mi comentario venía a raíz del último artículo que publicamos en marzo sobre las combinaciones de ampicilina y ceftriaxona, en el que Barbara Murray, editora de la revista, no

aceptó de ninguna de las maneras el concepto de sinergia de la combinación, a pesar de que la combinación bajaba tres y cuatro logaritmos el efecto de los fármacos individualmente. Tuvimos que reinventar el término de "cooperación antimicrobiana entre fármacos" para sustituir al de sinergia.

J.M. GATELL: Me ha llamado la atención que todavía estéis utilizando de una manera tan extensa el bioensayo para determinar las concentraciones de antibióticos. Actualmente en los laboratorios de farmacología se emplean métodos como la HPLC u otros más precisos y menos engorrosos. ¿Esto se debe a que lo reserváis sólo para antibióticos muy raros en los cuales no se dispone de otro método, o simplemente utilizáis el bioensayo como método más cómodo para vosotros?

F. MARCO: La HPLC es un sistema con un nivel de detección mucho mejor y menos subjetivo que el bioensayo, por lo que es el método más recomendable. Sin embargo, hay antibióticos en los cuales todavía no está desarrollado el sistema de detección por HPLC o no existe la posibilidad de utilizarlo; en estos casos, la alternativa suele ser el bioensayo.

J.L. RODRIGUEZ TUDELA: Me gustaría añadir la siguiente consideración sobre el tema del bioensayo y es que, al menos en el campo de los antifúngicos, es recomendable aplicar ambos métodos. Hay algunos antifúngicos que producen metabolitos activos, como es el caso del itraconazol, con los que se ha observado una mejor correlación *in vitro-in vivo* con el bioensayo que con HPLC, a no ser que se determinen itraconazol e hidroxitraconazol.

J.M. MIRÓ: Lo que ha explicado Francesc Marco sirve fundamentalmente para las bacterias, ¿crees que es aplicable también para los hongos habituales (*Candida*, *Aspergillus*, etc.)?

J.L. RODRÍGUEZ TUDELA: En el campo de los antifúngicos nos encontramos todavía en la infancia de lo que se ha explicado. Con determinados fármacos tenemos una idea más o menos acertada de lo que significa la CMI dentro del labo-

ratorio, pero tenemos poca idea de lo que significa la CFM. Se están empezando a hacer otras determinaciones como las curvas de letalidad, aunque la discusión sigue abierta en cuanto al inóculo a utilizar (las recomendaciones son diferentes según el país). Nuestra intención es acercarnos un poco más al nivel existente en investigación sobre bacterias, pero creo que todavía queda mucho camino por recorrer.