

Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test

Josep M. Torres-Rodríguez, Neus Madrenys, Teresa Jiménez, Pere Saballs

Grup de Recerca en Micologia Experimental i Clínica. IMIM/ Universitat Autònoma de Barcelona, Avda. Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, España.

Resumen

Desde la aparición de cepas de *Candida albicans* y de especies relacionadas resistentes a la 5 fluorocitosina y los azoles, se ha hecho evidente la necesidad de disponer de métodos que permitan conocer la sensibilidad *in vitro* de manera fiable y accesibles a la mayoría de los laboratorios clínicos de micología. El desarrollo de un nuevo método de difusión en medio sólido de un gradiente continuo de antifúngico es la base del E-test que ya ha sido aplicado anteriormente como antibiograma en bacteriología. En el presente trabajo se ha analizado la sensibilidad *in vitro* de 40 cepas pertenecientes al género *Candida* y 10 de *Hansenula anomala* determinando las Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) con el E-test y con el micrométodo de referencia en medio líquido estandarizado según las recomendaciones del NCCLS y utilizando cepas de referencia como control de calidad. En este estudio se ha comprobado que la concordancia (diferencia en los valores de la CIM de mas menos una dilución) entre el micrométodo de referencia y el E-test es elevada pero variable dependiendo del antifúngico y la especie de levadura considerada. En un número importante de cepas las CIM del E-test resultaron inferiores a las proporcionadas por el micrométodo de dilución en medio líquido.

Las CIM de *C. albicans* y *Torulopsis glabrata* resultaron iguales o inferiores a 0,50 µg/ml para la anfotericina B. Dos cepas de *C. albicans* y otras dos de *H. anomala* presentaron CIM iguales o superiores a 8 µg/ml para la 5 fluorocitosina.

Todas las cepas de *T. glabrata* y el 40% de *C. albicans* mostraron las CIM iguales o superiores a 16 µg/ml para el fluconazol. Las CIM fueron inferiores para los otros dos azoles estudiados. Los resultados obtenidos demuestran que globalmente existe una buena concordancia entre el E-test y el micrométodo de dilución recomendado por el NCCLS sugiriendo que por su facilidad de ejecución y simplicidad el E-test puede ser empleado por los laboratorios clínicos de rutina en el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

Palabras clave

Antifúngicos, Sensibilidad *in vitro*, Resistencias, E-test, Micrométodo en medio líquido

Minimal inhibitory concentrations of *Candida* species to five antifungals by using the reference dilution micromethod and the E-test

Summary

It is accepted that the frequency of candidosis has increased during the last decade, specially in hospitalized patients. The more frequent use of azole antifungals and the recognition of isolates of *Candida* sp resistant to these and other drugs such as 5-fluorocytosine constitute a great need for a reproducible and useful *C. albicans in vitro* susceptibility testing method for monitoring antifungal therapy in clinical mycological laboratories. The E-test is a novel agar diffusion technique for testing the susceptibility of yeasts against a defined continuous gradient of drug and could be used by most clinical laboratories. In this study the E-test and the NCCLS reference microbroth method (M27-P guidelines) were used to determine the MICs of amphotericin B, 5-fluorocytosine, itraconazole, fluconazole and ketocanazole for 50 clinical isolates of *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata*, *C. tropicalis* and *Hansenula anomala* and five reference ATCC strains. The main purpose of the study was to compare the results obtained by the two methods.

In general good agreement (± 1 dilution) was obtained between both methods, despite differences observed for some species-antifungal combinations in which the MICs were lower by the E-test than by the microbroth method. MICs for *C. albicans* and *T. glabrata* to amphotericin B were < 0.50 µg/mL. Two isolates of *C. albicans* and two others of *H. anomala*, showed MIC < 8 µg/mL for 5-fluorocytosine. All isolates of *T. glabrata* and 40% of *C. albicans* showed MICs > 16 µg/mL for fluconazole. The results of this study indicate that E-test is an alternative for susceptibility testing to the NCCLS reference method. Because its simplicity it seems to be an easier test for routine clinical laboratories.

Dirección para correspondencia:

Dr. Josep M^a Torres-Rodríguez
Grup de Recerca en Micologia Experimental i Clínica. IMIM/ Universitat Autònoma de Barcelona, Avda Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona, España.
Fax. (+34 3) 221337
E-mail: JMTORRES@IMIM.ES

Aceptado para publicación el 25 de abril de 1997

Key words

Antifungals, *In vitro* susceptibility, Yeasts, E-test, Broth micromethod

Hasta la introducción de los nuevos triazoles en la década de los 1990 y su amplio uso tanto para el tratamiento de las micosis superficiales como el de las sistémicas, no se consideraba imprescindible el disponer de métodos de estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. En efecto, solamente se conocían algunos pocos casos de resistencia *in vitro* al ketoconazol en enfermos de candidosis granulomatosa crónica tratados durante largos periodos de tiempo [1,2]. Sin embargo a partir de que el fluconazol y, en menor proporción, el itraconazol se empezaron a administrar particularmente en candidosis orofaríngea, esofágica y vaginal en enfermos infectados por el VIH se empezaron a producir dos fenómenos cuya repercusión clínica todavía es objeto de controversia. Por una parte se detectó un número creciente de especies de levaduras que demuestran ser "intrínsecamente" o "naturalmente" resistentes *in vitro* al fluconazol y muchas de ellas también al itraconazol, entre las cuales *Candida krusei* y la mayoría de cepas de *Torulopsis (Candida) glabrata* son las más importantes [3,4]. El segundo fenómeno es la aparición de cepas de *Candida albicans* que muestran unas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) al fluconazol superiores a los 8 µg/ml, valor considerado como equivalente a resistencia. La mayoría de estas cepas parecen haber adquirido esta resistencia después de un tiempo largo de administración oral de fluconazol sea de forma continuada, intermitente o bien como profilaxis de infecciones fúngicas oportunistas [5-7]. El problema real es que en muchos casos esta resistencia *in vitro* se acompaña de una pérdida de respuesta terapéutica al tratamiento, lo que crea una comprensible alarma entre los médicos que administran estos fármacos [8].

Si bien no necesariamente una resistencia *in vitro* se acompaña siempre de una falta de respuesta al tratamiento, se considera importante conocer en primer lugar cual o cuales son las especies de *Candida* que infectan al paciente VIH+ y si las cepas aisladas son sensibles *in vitro* a los antifúngicos a administrar.

Aunque las resistencias a la anfotericina B son poco frecuentes y parecen limitarse a algunas especies como *Candida lipolitica* y a unas escasas cepas de otras levaduras, por el hecho de que tanto en su forma convencional como en las nuevas formulaciones asociada a lípidos, sigue siendo el antifúngico patrón y de referencia para el tratamiento de las micosis sistémicas graves [9] se considera de interés estudiar y controlar la evolución de la sensibilidad *in vitro* ya que en este caso, al igual que con la 5-fluorocitosina [10] existe una buena correlación con la respuesta terapéutica.

Los laboratorios clínicos de diagnóstico suelen no disponer de experiencia y menos aún de tiempo y personal para seguir la bibliografía especializada en el tema, poner a punto y aplicar, de forma rutinaria, los métodos recomendados para estudiar la sensibilidad a los antifúngicos, métodos que son artesanales y relativamente complejos para la disponibilidad de estos laboratorios. Por estos motivos es de particular interés la comercialización de pruebas de sensibilidad bien estandarizadas y reproducibles que tengan una buena correlación con las propuestas por los expertos en el tema. La aplicación del sistema E-test al estudio de la sensibilidad a cinco antifúngicos de administración sistémica, constituye una interesante aportación que para su validación final debe pasar por estudios comparativos independientes que determinen hasta que punto puede ser una técnica eficaz que ofrezca una respuesta a los problemas mencionados; éste es el objetivo de este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Un total de 40 cepas de tres especies del género *Candida* todas ellas obtenidas de cultivos de candidosis orofaríngeas de enfermos infectados por el VIH fueron seleccionadas para este estudio. Éstas se distribuyeron en 25 cepas de *C. albicans*, 13 de *Torulopsis glabrata* y dos de *Candida tropicalis*. Todas fueron identificadas mediante sus características morfológicas y sus propiedades de asimilación de azúcares utilizando el sistema Auxocolor (Sanofi, París). Otras 10 cepas de la especie *Hansenula anomala* (anamorfo de *Candida pelliculosa*) aisladas de hemocultivos de pacientes leucémicos en un hospital pediátrico de Buenos Aires también fueron incluidas en el estudio. Estas cepas fueron identificadas por la observación de ascosporas y la asimilación de azúcares [11].

Se incluyeron cinco cepas de referencia de sensibilidad conocida como control de calidad; estas cepas fueron *C. albicans* (ATCC 90028), *T. glabrata* (ATCC 90030), *Candida pseudotropicalis* (ATCC 28838) *Candida tropicalis* (UPV 1096) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

Antifúngicos. Se ensayaron cinco antifúngicos: anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Estos antifúngicos fueron proporcionados directamente por los laboratorios productores en forma de polvo que fue diluido convenientemente utilizando DMSO, etanol o solución salina, según el caso.

Los mismos antifúngicos están disponibles en forma de tiras de plástico no poroso de 5 mm de ancho y 50 mm de largo presentando en una de sus caras una escala numérica que expresa la concentración en µg/ml del antifúngico que se encuentra distribuido en un gradiente continuo y exponencial en la cara opuesta. (E-test, AB Biodisk, Suecia). El rango de concentración es de: 0,02-32 µg/ml para la anfotericina B, 5-fluorocitosina, ketoconazol e itraconazol y 0,016-256 µg/ml para el fluconazol. Estas tiras se conservaron a -20°C hasta su uso.

Micrométodo en medio líquido (MML). Se empleó la técnica recomendada por el NCCLS [12] utilizando microplacas de 96 pocillos, estériles y de fondo plano. El medio de cultivo utilizado fue el RPMI + 2% de glucosa. Las concentraciones de los antifúngicos fueron de 0,03 a 64 µg/ml excepto en el pocillo número 12 que fue utilizado para el control de crecimiento. Para preparar los inóculos se emplearon cultivos de 24 h en medio de agar glucosado de Sabouraud. Varias colonias fueron suspendidas en una solución salina estéril hasta obtener una densidad equivalente al 0,5 de la escala McFarland ajustándose a continuación a 10⁴ UFC/ml por lectura en un espectrofotómetro a 530 nm. La inoculación se efectuó con 100 µl de la suspensión de 10⁴. Las placas se incubaron a 37°C y las lecturas se hicieron a las 24 y 48 h en un espectrofotómetro a 492 nm para los azoles y 5-fluorocitosina y a 610 nm para la anfotericina B. Las CIMs se determinaron como el 80% de crecimiento en relación al pocillo control. Todas las pruebas se efectuaron por duplicado.

E-test. Se siguieron estrictamente las indicaciones proporcionadas por los fabricantes (AB Biodisk). El medio utilizado fue el agar RPMI + 2% de glucosa, en tampón fosfato pH 7, que se dispuso en placas de Petri de 90 mm de diámetro.

El inóculo se ajustó a la escala 0,5 de McFarland con control en un espectrofotómetro a 530 nm y se distri-

buyó uniformemente sobre la superficie del medio utilizando un escobillón estéril. Una vez estuvo el medio seco se colocaron dos tiras por placa y se incubaron a 35°C durante 48 h realizando las lecturas de los halos a las 24 y 48 h.

El punto final fue la concentración en la cual la elipse de inhibición interceptaba la escala del antifúngico en la tira correspondiente. Estas pruebas también fueron realizadas por duplicado.

En el estudio comparativo entre los resultados obtenidos por las dos pruebas se consideró que había concordancia si las diferencias entre las CIMs proporcionadas por el E-test y las del micrométodo no diferían en más de una dilución.

RESULTADOS

Las CIM determinadas para las cinco cepas de referencia mostraron valores dentro de los rangos previstos (Tabla 1). La reproducibilidad de ambas técnicas resultó adecuada.

Tabla 1. Resultados de las concentraciones inhibitorias mínimas a anfotericina B (AB), 5-fluorocitosina (FC), itraconazol (IT), fluconazol (FN) y ketoconazol (KZ) en cinco cepas de referencia utilizando el micrométodo en medio líquido (ML) y el E-test (ET).

Cepa	ATCC	AB		FC		IT		FN		KZ	
		ML	ET	ML	ET	ML	ET	ML	ET	ML	ET
<i>C. albicans</i>	90028	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,47	32	2	0,25	0,12
<i>T. glabrata</i>	90030	0,5	0,125	0,125	0,08	1,00	4,0	32	24	1,0	0,5
<i>C. pseudotropicalis</i>	28838	0,125	0,250	0,125	0,047	0,03	0,09	0,25	1,0	0,003	0,003
<i>C. krusei</i>	6258	0,5	0,250	0,125	0,64	0,25	0,38	256	256	0,5	0,38
<i>C. tropicalis</i>	1096	0,5	0,250	0,125	0,125	0,25	0,125	0,125	4,0	0,5	0,32

Para la anfotericina B, el rango de CIM de *C. albicans* se situó entre 0,5 y <0,06 µg/ml. En el 80% de las cepas estuvo entre 0,125 y 0,25 µg/ml. Para *T. glabrata* se situó entre 0,125 y 0,50 µg/ml y para *H. anomala* resultaron inferiores o iguales a 0,25 µg/ml. Las dos cepas de *C. tropicalis* mostraron unas CIM inferiores a 0,06 µg/ml con el E test y de 0,25 y 0,50 µg/ml con el MML.

Con la 5-fluorocitosina el 96% de las cepas de *C. albicans* tuvieron una CIM entre 0,50 y <0,06 µg/ml. *T. glabrata* presentó unas CIM muy bajas de 0,125 a <0,06 µg/ml al igual que ocho de las 10 cepas de *H. anomala* las dos restantes presentaron CIM superiores a los 8 µg/ml.

En el caso de los azoles, las sensibilidades resultaron variables. Con el fluconazol el 40% de las cepas de *C. albicans* presentaron CIM iguales o superiores a 16 µg/ml. En el caso de *T. glabrata*, el 100% de las cepas con el MML y el 92% con el E-test también presentaron CIM iguales o superiores a los 16 µg/ml.

Para el itraconazol, el 30% de las cepas de *C. albicans* mostraron CIM con ambos métodos de dos o más µg/ml al igual que el 92% de las cepas de *T. glabrata*. Todas las cepas de *H. anomala* presentaron CMI entre 0,125 y 1,0 µg/ml para este triazol.

Con el ketoconazol *C. albicans* solamente presentó el 15% de las cepas con valores de CIM iguales o superiores a los 2 µg/ml. *T. glabrata* mostró el 51% de las cepas con CIM iguales a superiores a los 2 µg/ml con el MML y solamente el 8% con el E-test. Ninguna de las cepas de *H. anomala* alcanzó CIM superiores a 0,50 µg/ml. Las dos cepas de *C. tropicalis* presentaron CIM < 0,06 µg/ml.

La concordancia entre el micrométodo en medio

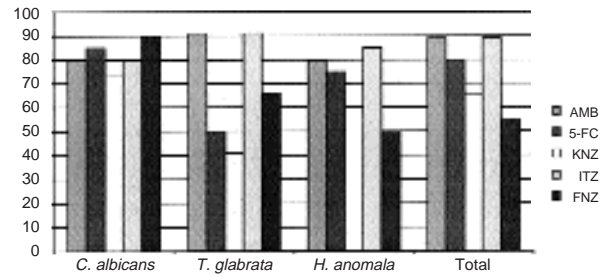


Figura 1. Concordancia entre los resultados obtenidos con el E-test y las CIM en micrométodo en medio líquido en 40 cepas de levaduras. AMB: anfotericina B; 5FC: 5-fluorocitosina; KNZ: ketoconazol; ITZ: itraconazol; FNZ: fluconazol.

líquido (MML) y el E-test resultó variable en función de la especie de levadura y del antifúngico estudiados (Figura 1). *C. albicans* mostró la concordancia máxima del 90% con el fluconazol, seguida del 85% para la 5-fluorocitosina, 80% para anfotericina B e itraconazol y del 75% para el ketoconazol.

Con *T. glabrata* la mayor concordancia se obtuvo con la anfotericina B e itraconazol (91%), resultando inferiores para el fluconazol (66%), 5-fluorocitosina (50%) y ketoconazol (41%). Las discordancias fueron debidas a que las CIM resultaron inferiores con el E-test (95% de las cepas con CIM < 0,06 µg/ml) que con el MML.

Las dos cepas de *C. tropicalis* estudiadas presentaron CIM menores con el E-test que con el MML para la 5-fluorocitosina y la anfotericina B.

En la concordancia de ambas pruebas fue máxima para la anfotericina B (80%), itraconazol y 5-fluorocitosina (75%); dos cepas presentaron CIM superior a los 8 µg/ml para este último antifúngico.

DISCUSIÓN

Los métodos de estudio de la sensibilidad *in vitro* que actualmente se consideran de referencia son los recomendados por el NCCLS en su documento M-27P [12] y posteriores modificaciones [13] que se basan en la dilución en medio líquido en tubo (macrométodo) o microplaca (micrométodo). Aunque el método de difusión en agar ha sido considerado por algunos investigadores [14] como una prueba que promete dar resultados consistentes y, con los datos de que se dispone, parece que globalmente producen una elevada concordancia, de hasta el 90% [15,16]; es necesario disponer de suficiente experiencia a través de estudios comparativos desarrollados por laboratorios independientes.

En 1995, Colombo *et al.* [17] comparando el E test con el macrométodo recomendado por el NCCLS [12] en un número elevado de cepas de levaduras que incluía a *Cryptococcus neoformans* y tres especies de *Candida*, llegaron a la conclusión, similar a la obtenida en este estudio, de que en general la concordancia era buena, aunque existen diferencias en los resultados, dependiendo de la combinación especie-antifúngico. Estos autores sin

embargo solamente estudiaron los tres azoles, sin considerar la anfotericina B y la 5-fluorocitosina, que posiblemente sean los que ofrecen una mayor concordancia de resultados.

La aportación del E-test como método comercial estandarizado que proporciona datos cuantitativos de CIM, puede ser determinante para el desarrollo y aplicación de las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los principales antifúngicos sistémicos, especialmente en un momento en que la aparición de resistencias aconseja la realización de estos estudios de forma extensiva para conocer la realidad de cada centro y área geográfica, que posiblemente se relacionen con la política antibiótica hospitalaria, ya que un número muy elevado de resistencias están apareciendo en enfermos hospitalizados y la infección nosocomial por *C. albicans* y otras especies parece ir en aumento [18]. Ello también es de importancia en los enfermos infectados por el VIH quienes presentan elevados niveles de resistencia al fluconazol especialmente cuando se trata de *T. glabrata*.

Además de constituir un método novedoso y original de eficacia demostrada en bacteriología [19] el E-test es de rápida ejecución y de lectura fácil, siempre que se tenga cierta experiencia en leer los halos y puntos de intersección de la elipse, especialmente cuando ésta no es simétrica o suficientemente clara.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que el grado de concordancia con el micrométodo de dilución en medio líquido es variable y depende en gran medida del antifúngico estudiado así como de la especie de hongo analizada y que en este estudio solamente se han incluido cuatro diferentes especies, aunque una de ellas ha sido muy poco estudiada hasta ahora.

La incorporación de las cepas de referencia asegura un adecuado control de calidad y deben ser incluidas siempre que se efectúen este tipo de estudio para validar los resultados.

Otras variables a tener en cuenta para el desarrollo futuro del E-test como la posibilidad de utilizar medios de cultivo alternativos al RPMI como el Casitone u otros, y su aplicación a otras especies fúngicas, especialmente las de hongos miceliares, constituyen un objetivo de estudio para determinar la real utilidad de este método.

Bibliografía

- Warnock DW, Johnson EM, Richardson MD, Vickers CFH. Modified response to ketoconazole of *Candida albicans* from a treatment failure. *Lancet* 1983; i:642-643.
- Odds FC. Resistance of yeasts to azole derivative antifungals. *J Antimicrob Agents Chemother* 1993; 31:463-471.
- Vanden Bossche H, Marichal P, Odds FC, Le Jeune L, Coene MC. Characterization of azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2602-2610.
- Karyotakis NC, Anaissie ES, Hachem R, Dignani MC, Samois G. Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 1993; 168:1311-1313.
- Rex JH, Rinaldi MC, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 30:1-8.
- Millon L, Manteaux G, Reboux C, et al. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patient: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1115-1118.
- Sangland D, Kuchner K, Isher F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patient involve specific transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2378-2386.
- Ghannoum MA, Rex JH, Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of *in vitro* data with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 1996; 34:489-495.
- Hay R. New antifungal agents. *Rev Iberoam Micol* 1996; 13 (Supl 1):S56-S59.
- Iwata K. Drug resistance in human pathogenic fungi. En Iwata K, Vanden Bossche H. *in vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. Amsterdam, Elsevier Sci Publ, 1985: 65-88.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: Characteristic and identification. Cambridge, Cambridge Univ Press, 1990:460-1.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard. Document M27-P. NCCLS. ISBN 1-56238-185-5, Villanova, PA 19085, 1992.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative standard. NCCLS document M27-T. NCCLS 771. Villanova, PA 19085, 1995.
- Espinel-Ingroff A. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev Esp Quimioter*, 1994;7:20-31.
- Rubio Calvo MC, Gil Tomás J, Ruesca RB. Valoración *in vitro* de la sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Iberoam Micol* 1996, 13 (Supl. 1) S60-S63.
- Espinel-Ingroff A. Etest for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1994;19:217-20
- Colombo AL, Barchesi F, McGough D, Rinaldi MG. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995, 33:530-540.
- Beck Sagué CM, Jarvis WR and the National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993; 167:1247-1251.
- Sánchez M, Jones RN. Etest, an antimicrobial susceptibility testing method with broad clinical and epidemiological application. *Antimicrob Newslett* 1993;81-87.