



Sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B en cepas de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos

Javier Martínez y Cristina Albrecht

Hospital Nacional de Clínicas, Laboratorio Central, División Micología, Córdoba, Argentina

Resumen

Se determinó la sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B en 84 aislamientos clínicos de *Candida*, por el método de macrodilución en RPMI, según propuesta del NCCLS. La anfotericina B fue muy activa, (CMI < 1,25 µg/ml), particularmente en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Menos del 5% de los aislamientos identificados como *C. glabrata* y/o *C. albicans*, presentaron baja sensibilidad a la anfotericina B, (CMI 80 > 2,50 µg/ml). El fluconazol fue menos activo frente *C. glabrata* y *C. krusei*, (CMI > 100 µg/ml). Los perfiles de CMI del fluconazol, sugieren la importancia de la identificación a nivel de especie a los fines del tratamiento.

Palabras clave

Fluconazol, Anfotericina B, Sensibilidad, *Candida*

Susceptibility to fluconazole and amphotericin B in clinical *Candida* isolates

Susceptibility to fluconazole and amphotericin B in 84 clinical isolates of *Candida* was determined by a macrodilution method (NCCLS). Amphotericin B was very active (CMI <1.25 µg/ml) against *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. Less than 5% of *C. albicans* and/or *C. glabrata* isolates presented low susceptibility to the drug (CMI 80 >2.50 µg/ml). Fluconazole was less active against *C. glabrata* and *C. krusei* (CMI 80 >100 µg/ml). The susceptibility profile for fluconazole indicated the importance to the treatment of identification to species level.

Key words

Fluconazole, Amphotericin B, Susceptibility, *Candida*

El incremento de candidiasis en las últimas décadas se acompaña con el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos, menos tóxicos y sistémicamente activos [1-3]. La elección terapéutica se ve dificultada con la aparición de cepas resistentes, principalmente a sustancias azólicas [4,5]. El estudio de la sensibilidad a antifúngicos se ha realizado por diferentes metodologías, considerándose de referencia la propuesta del comité de Estandarización de Laboratorios Clínicos de EEUU (NCCLS, 1992 y versión revisada, 1997) [6,7]. Hemos seguido esta propuesta con el fin de iniciar en nuestro Hospital la mejora de técnicas destinadas a valorar la sensibilidad de cepas de *Candida* en muestras clínicas (hemocultivos, líquido cefalorraquídeo y punciones suprapúbicas) de pacientes afectados por candidiasis sistémicas, infección renal o meningitis por *Candida*. Las mismas fueron seleccionadas por interesarnos la sensibilidad de especies que frecuentemente provocan infecciones que merecen tratamiento por vía sistémica, lo cual exige conocer la sensibilidad al antifúngico a fin de optimizar las dosis.

Relativamente pocos trabajos se realizan siguiendo estrictamente la propuesta estándar, lo cual dificulta la comparación de resultados. No obstante, considerando metodologías comparables, los patrones de sensibilidad para las diferentes especies resultaron similares, siempre que se compararon resultados de investigaciones que utilizaron valores de corte semejantes, para considerar resistente o no a una cepa.

Iniciado este trabajo en 1994-1995, nosotros seguimos la propuesta del NCCLS de 1992, para estandarizar el método de macrodilución en tubos cuyas características principales fueron: 1. Conservación de cepas en agua glicerinada a -70°C. 2. Recultivo de cepas, 24 horas antes de su utilización. 3. Medio de cultivo: RPMI 1640 adicionado de glutamina, bicarbonato de sodio y glucosa al 2%. 4. Regulador de PH: MOPS 33 g/l. 5. Dilución del inóculo 1:10 en RPMI, con volumen final: 2ml. 6. Incubación sin agitación a 37°C. 7. Lectura de resultados a las 48 ± 2h por medidas espectrofotométricas. 8. Utilización de cepas controles (provistas por el Instituto Malbrán de Buenos Aires, Argentina). Se eligieron aquellas que tenían un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) más definido (rango más estrecho) y cercano al valor por el cual cepas de *Candida* son consideradas sensibles o no al antifúngico. Estas concentraciones fueron para el fluconazol: 12,5 µg/ml y para anfotericina B: 1 µg/ml. Los controles utilizados fueron *C. albicans* Janssen Research Foundation 93680 con CMI de 0,62-0,16 µg/ml para anfotericina B y *Candida parapsilosis* ATCC 951706, con CMI de 2-8 µg/ml para el fluconazol.

Dirección para correspondencia:

Dr. Javier Martínez
Miguel B. Pastor 439, B° 17 de agosto, Ciudad de Justo Daract, Provincia de San Luis, C.P. 5738, Argentina

Aceptado para publicación el 24 de septiembre de 1998

Tabla 1. Sensibilidad *in vitro* a la anfotericina B (% acumulado de aislamientos inhibidos)

Especies	Concentración en µg/ml							
	0,08	0,16	0,31	0,61	1,25	2,5	5	10
<i>C. albicans</i>	18%	32%	50%	86%	95.5%	100%		
<i>C. tropicalis</i>		50%	67%	100%				
<i>C. parapsilosis</i>		60%	80%	100%				
<i>C. glabrata</i>		25%	75%	75%	75%	100%		
Total de aislamientos	10%	30%	52%	90%	95%	100%		

Tabla 2. Sensibilidad *in vitro* al fluconazol (% acumulado de aislamientos inhibidos)

Especies	Concentración en µg/ml									
	0,20	0,4	0,8	1,60	3,20	6,40	12,5	25	50	100
<i>C. albicans</i>	1,0%	18%	36%	45%	59%	64%	64%	73%	77%	100%
<i>C. tropicalis</i>					33%	50%	83%	100%		
<i>C. parapsilosis</i>				40%	75%	100%				
<i>C. glabrata</i>								25%	50%	100%
Total de aislamientos	10%	15%	22%	32%	44%	54%	59%	76%	83%	100%

La propuesta del NCCLS establece que deben realizarse ajustes a la metodología, cada vez que los ensayos observen desviaciones mayores a dos diluciones. En nuestro caso esto no sucedió, aunque tuvimos inconvenientes con la recuperación de cepas conservadas según la propuesta de 1992, revisada en 1997, que mejora esta dificultad conservándolas en agua a 4°C. Por lo anterior, nosotros realizamos las pruebas entre 10-15 días de aisladas las cepas. Establecer una correlación entre la evolución clínica de pacientes y el hallazgo de cepas resistentes nos fue muy dificultoso, por ser pacientes en estado clínico terminal y/o afectados de patologías múltiples o porque se discontinuaban los tratamientos, o si iniciaban terapias con otros antifúngicos.

Atendiendo a las consideraciones mencionadas, nosotros estudiamos 84 aislamientos de *Candida*, correspondiendo el 52, 14, 12, 9,5, 5, 2 y 2 %, respectivamente, a *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* y *Candida* spp, respectivamente. Su identificación se realizó acorde a métodos clásicos con test presuntivos y de confirmación, por auxonograma y zimograma [8,9]. Las tablas 1 y 2 resumen las sensibilidades halladas *in vitro* de los aislamientos.

La anfotericina B fue muy activa (CMI 95 = 1,25 µg/ml) con todos los aislamientos y particularmente contra las cepas de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Menos del 5 % de los aislamientos identificados como *C. albicans* y *C. glabrata* presentaron baja sensibilidad (CMI mayor a 2,5 µg/ml).

El fluconazol presentó gran actividad en aislamientos identificados como *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, moderada actividad frente a *C. albicans* y muy baja actividad con *C. glabrata*. Existe un incremento en los valores de CMI, cuando las lecturas se realizan a las 48 h. [10]. Nosotros observamos esta tendencia en nuestro resultado para el fluconazol y en todas las especies estudiadas, observando que la distribución de los valores de CMI se desplaza hacia valores más elevados. Pfaller y cols. [10] sugieren que lecturas realizadas en tiempos prolongados (más de 24h) exacerban el efecto de arrastre que frecuentemente acompaña a la lectura de resultados, en ensayos de sensibilidad a sustancias azólicas.

Sin embargo, los perfiles de distribución de valores de CMI para cada especie efectuados, nos permite asegurar que la identificación de especie en aislamientos clínicos es de singular importancia antes de instaurar el tratamiento con fluconazol, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos y/o que hayan recibido profilaxis azólica [11].

Se debe destacar que el 100% de los aislamientos de *C. glabrata* presentaron muy baja sensibilidad fluconazol (CMI mayor a 12,5 µg/ml), lo cual coincide con lo descrito por otros autores [12,13].

Los procedimientos propuestos por el NCCLS, a los fines de mejorar las pruebas de sensibilidad a sustancias antifúngicas, resultaron una excelente guía en este estudio.

Bibliografía

- Phillips G, Golledge C. Fungal infections in neonates. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:159-61.
- Leibovitz E, Rigaud M, Chanduvani S, et al. Disseminated fungal infections in children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis* 1991;10:888-894.
- Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Antifungal agents: Chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40: 279-291.
- Fan Havard P, Capano D, Smith SM, Mangoa A, Eng RHK. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2302-2305.
- De Muri et al. Resistance to antifungal agents. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 665-85.
- NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standard Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast. Proposed standard Document M27 P Villanova, PA, 1992.
- NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standard Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast. Approved standard Document M27-A. Villanova, PA, 1997.
- Campbell BA, Steward BS, Larsh Howard (Eds.). *The Medical Mycology Handbook*, 1980.
- Murray PR, et al. *Manual of clinical microbiology* ASM Press 1980.
- Pfaller MA, Barry AL. *In vitro* susceptibility of clinical yeast isolates to three antifungal agents determined by the microdilution method. *Mycopathologia* 1995; 130:3-9
- Preston S, Briceland L. Fluconazole for antifungal prophylaxis in chemotherapy induced neutropenia. *Am J Health Syst Pharm* 1995; 52.
- Rodero L, Boutureira M, Vitale R, et al. Infecciones por levaduras: agentes causales y su resistencia a antifúngicos en pacientes pediátricos hospitalizados y en adultos HIV positivos. *Rev Arg Microbiol* 1997;29:7-15.
- Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johnson EM, Von Fraunhofer NA. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* 1998;ii:1310.