



Perfil de sensibilidad antifúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos en un Hospital Universitario, Maracaibo, Venezuela

Noris Margarita Arcaya¹, Luz Mila Mesa², Maritza Rebeca Pineda³, Haydee Beltrán-Luengo³ y Belinda Milagros Calvo⁴

¹Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Facultad de Medicina Departamento de Estudios Morfofuncionales, Coro, Estado Falcón; ²Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Cátedra de Micología, Maracaibo; ³Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo; ⁴Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Medicina, Cátedra de Medicina Tropical, Maracaibo, Venezuela

Resumen El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad in vitro a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, de aislamientos de *Candida*, obtenidos de pacientes atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Venezuela. La determinación de la sensibilidad a los antifúngicos se realizó según el método de dilución en caldo desarrollado por el *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). El perfil de sensibilidad de 74 aislamientos mostró que todos fueron sensibles a anfotericina B, y el 97,2% y 89,2% lo fueron a fluconazol e itraconazol, respectivamente.

Palabras clave *Candida*, Hemocultivos, Sensibilidad antifúngica

Profile of antifungal susceptibility of species of *Candida* isolated from hemocultures in a University Hospital, Maracaibo, Venezuela

Summary The aim of this study was to determine the in vitro susceptibility of amphotericin B, fluconazol and itraconazole, to several *Candida* spp recovered from blood cultures on hospitalized patients at the University Hospital of Maracaibo, Venezuela. The determination of the antifungal susceptibility was carried out according to the microdilution method in broth developed by The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The profile of susceptibility of the 74 isolates showed that all the studied species were susceptible to amphotericin B, and 97.2% and 89.2% to fluconazole and itraconazole, respectively.

Key words *Candida*, Hemocultures, Antifungal susceptibility

Dirección para correspondencia:
Sra. Noris Arcaya
Calle 79 con Av. 18, Sector Paraíso
Edif. San Francisco Xavierus, Apto. 1.1
Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela
Tel.: +58 261 759 5470
E-mail: norisarcaya@unefm.edu.ve

Aceptado para publicación el 31 de enero de 2006

©2006 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 €:

El *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) ha desarrollado un estándar de microdilución en caldo para la determinación in vitro de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de varios antifúngicos frente a especies de levaduras fermentadoras [2]. Se basa en el documento de referencia M27A del *Laboratory Standard Institute* (CLSI, anteriormente NCCLS) [10]. No obstante, incorpora algunas modificaciones como el uso del medio RPMI suplementado con 2% de glucosa, un tamaño de inóculo de 10^5 CFU/ml, placas de fondo plano, tiempo de incubación de 24 h y lectura espectrofotométrica con un 50% de inhibición para los puntos de corte de los azoles y la 5- fluorocitosina [5,17].

El objetivo de esta investigación fue la determinación de la sensibilidad de los aislamientos de *Candida* obtenidos de hemocultivos en Maracaibo (Venezuela) a los antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

Se estudiaron 74 aislamientos del género *Candida* (21 *Candida albicans*, 20 *Candida tropicalis*, 22 *Candida parapsilosis*, cinco *Candida guilliermondii*, cinco *Candida pelliculosa* y una *Candida glabrata*), obtenidos de hemocultivos de pacientes atendidos en el Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo de marzo de 2000 hasta septiembre de 2002 y procesados en el Centro de Referencia Bacteriológica de este hospital. No se consideró si los aislamientos obtenidos fueron secuenciales o de episodios diferentes. La determinación de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos se realizó por el procedimiento estándar de microdilución en caldo (EUCAST) [2], en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Madrid (España).

Se utilizó el medio RPMI-1640 sin bicarbonato (Oxoid, España) y con L-glutamina, pH 7 con 0,165M ácido-morfolinopropanosulfónico (MOPS, Sigma, EE.UU.)

y suplementado con 18 g de glucosa por litro, para obtener una concentración final de 2% (RPMI-2% glucosa). Se utilizó anfotericina B (Sigma), fluconazol (Pfizer, Inglaterra) e itraconazol (Janssen, Bélgica). Las soluciones madres respectivas fueron disueltas en dimetilsulfóxido. El inóculo se preparó con una suspensión de cinco colonias de 1 mm de diámetro de cada aislamiento cultivado en agar glucosado de Sabouraud a 35 °C durante 24 h, en 5 ml de agua estéril. La turbidez de cada suspensión se midió por espectrofotometría a una longitud de 530 nm y se ajustó a una densidad óptica que osciló entre 0,11 y 0,13. La concentración final del inóculo fue $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC/ml.

Se usaron placas estériles de microtitulación de fondo plano (Labcenter, España). Se realizaron diluciones seriadas de cada antifúngico en cada placa, con un volumen del medio de ensayo de 100 µl en cada pocillo. Dos pocillos libres de antifúngico fueron usados como controles de esterilidad y crecimiento, respectivamente. A cada pocillo se le añadió 100 µl del inóculo final de cada aislamiento, a excepción del pocillo control de esterilidad.

Las concentraciones finales de cada antifúngico fueron: 0,03-16 µg/ml para anfotericina B, 0,12-64 µg/ml para fluconazol y 0,015-8 µg/ml para itraconazol. Se usaron las cepas *Candida krusei* ATCC6258 y *C. parapsilosis* ATCC22019 como controles de calidad.

Las CMI₅₀ se determinaron mediante un espectrofotómetro MRXII (Dynatech, Cultek, España) a una longitud de onda de 530 nm. Para la anfotericina B, se consideró la CMI como la concentración más baja de antifúngico en que la absorbancia era menor o igual al 10% de la absorbancia del control de crecimiento (90% de inhibición). Para itraconazol y fluconazol, se consideró la CMI como la concentración más baja de antifúngico en que la absorbancia era menor o igual al 50% de la absorbancia del control de crecimiento (50% de inhibición).

Tabla 1. CMI₅₀, CMI₉₀ y rango de variación (µg/ml) de anfotericina B, fluconazol e itraconazol frente a especies de *Candida* aisladas en hemocultivos.

Especies de <i>Candida</i>	n	Antifúngico	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango
<i>C. albicans</i>	21	anfotericina B	0,03	0,06	0,03 - 0,12
		fluconazol	0,12	0,25	0,12 - 4
		itraconazol	0,015	0,03	0,015 - 0,06
<i>C. tropicalis</i>	20	anfotericina B	0,12	0,12	0,06 - 0,12
		fluconazol	0,25	0,5	0,12 - 0,5
		itraconazol	0,03	0,12	0,015 - 0,25
<i>C. parapsilosis</i>	22	anfotericina B	0,06	0,12	0,03 - 0,25
		fluconazol	0,25	1	0,12 - 16
		itraconazol	0,03	0,06	0,015 - 0,25
<i>C. guilliermondii</i>	5	anfotericina B			0,03 - 0,06
		fluconazol			0,25 - 8
		itraconazol			0,015 - 0,25
<i>C. pelliculosa</i>	5	anfotericina B			0,03 - 0,06
		fluconazol			1 - 2
		itraconazol			0,03 - 0,25
<i>C. glabrata</i>	1	anfotericina B			0,12
		fluconazol			16
		itraconazol			1
Total	74	anfotericina B	0,06	0,12	≤ 0,03 - 0,25
		fluconazol	0,25	2	< 0,12 - 16
		itraconazol	0,03	0,25	< 0,015 - 1

Tabla 2. Número y porcentaje de especies de *Candida* aisladas en hemocultivos por categoría de sensibilidad in vitro a anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

Categoría de sensibilidad	Anfotericina B n (%)	Fluconazol n (%)	Itraconazol n (%)
Sensible	74 (100)	72 (97,2)	67 (90,5)
Intermedio	–	2 (2,7)	6 (8,1)
Resistente	–	–	1 (1,4)

Los aislamientos fueron clasificados como sensibles, intermedios o resistentes. Las categorías fueron definidas en base a las CMI's determinadas por el método EUCAST sobre estudios comparativos con el método M27 del CLSI [7], sobre estudios de correlación in vitro/in vivo con especies causantes de candidiasis esofágicas en pacientes con sida y sobre datos bibliográficos de la farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD) [1,6,9,16]. El método del EUCAST no ha definido aún los puntos de corte y los usados en este estudio son tentativos. Anfotericina B: $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ (sensible), $0,50$ - $1,0$ $\mu\text{g/ml}$ (intermedio) y ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ (resistente). Fluconazol: ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ (sensible), 16 - 32 $\mu\text{g/ml}$ (intermedio) y > 64 $\mu\text{g/ml}$ (resistente). Itraconazol: $\leq 0,12$ $\mu\text{g/ml}$ (sensible), $0,25$ - $0,50$ $\mu\text{g/ml}$ (intermedio) y ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ (resistente).

Las variaciones de la CMI de las especies de *C. albicans* y *Candida* no *C. albicans* frente a tres antifúngicos se resumen en la tabla 1. Se observó una amplia variación de los valores de CMI's para fluconazol, en comparación con anfotericina B e itraconazol. En el perfil de sensibilidad de los aislamientos de *Candida* analizados en este estudio, se observó que la mayoría de los aislamientos de *C. albicans* y *Candida* no *C. albicans* fueron sensibles a anfotericina B, fluconazol e itraconazol, lo cual concuerda con otras investigaciones [6,11,13].

La anfotericina B presentó buena actividad contra todos los aislamientos. Resultados similares han sido reportados [6,8,14]. Es de notar, que la mayoría de los aislamientos de *C. albicans* (20,3%) fueron inhibidos por la CMI más baja de este antifúngico ($\leq 0,03$ $\mu\text{g/ml}$). No fue posible determinar los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀, de otras especies aisladas (*C. guilliermondii*, *C. pelliculosa* y *C. glabrata*) debido a su escaso número de aislamientos (Tabla 1).

El fluconazol también fue efectivo contra la mayoría de los aislamientos de las especies de *Candida*, los cuales fueron inhibidos por una concentración < 8 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 1). Sólo se observó sensibilidad intermedia (16 $\mu\text{g/ml}$) en dos de los aislamientos (uno de *C. glabrata* y otro de *C. parapsilosis*) cuyos valores de CMI fueron mayores a los reportados por otros investigadores [4].

Sin embargo, la resistencia de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* a fluconazol ha sido reportada [6,11]. En *C. albicans* se ha descrito resistencia a fluconazol en aislamientos mucocutáneos, por lo cual se hace necesario monitorizar cualquier incremento en la resistencia a este azol entre los aislamientos sanguíneos, ya que se ha encontrado resistencia en un 1,9% de los aislamientos de esta especie [3].

La mayoría de los aislamientos de *C. albicans* (25,7 %) fueron inhibidos a una concentración $\leq 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ de itraconazol (Tabla 1). El 2,7% de los aislamientos de *C. guilliermondii* y *C. pelliculosa* presentaron sensibilidad intermedia a una concentración de $0,25$ $\mu\text{g/ml}$. Se observó para *C. albicans* valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ similares a los reportados en un estudio de aislamientos de varias regiones de América del Sur [8] y menores a los reportados en otro estudio de la misma región [15]. Entre las especies de *Candida* no *C. albicans*, *C. tropicalis* presentó valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ mayores a los reportados en Brasil [8] y menores a los observados en España [6].

Es de hacer notar que la alta sensibilidad obtenida a los antifúngicos probados en este estudio permite su uso en los esquemas terapéuticos en nuestros centros hospitalarios. Se deben realizar investigaciones clínicas para valorar estos hallazgos.

Las autoras agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela y al Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Bibliografía

- Andes D, Stamsted T, Conklin R. Pharmacodynamics of amphotericin B in a neutropenic-mouse disseminated-candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 922-926.
- Antibiotic Susceptibility. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1. Taufkirehen, European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases, 2002.
- Carrillo AJ, Tur C, Estivil D, Montsant L, Carceller A, Hernández-Molina JM, Torres-Rodríguez JM. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 50-54.
- Colombo AL, Nucci M, Salomao, Branchini ML, Ritchmann R, Derossi A, Wey BS. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect* 1999; 34: 281-286.
- Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Influence of glucosa supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 525-532.
- Cuenca-Estrella M, Rodero L, García-Effron G, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 981-987.
- Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodríguez-Tudela JL, Verweij PE. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3884-3889.
- Godoy P, Tiraboshi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, De Almeida LP, Da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003; 98: 401-405.
- Laguna F, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV, Polo R, Valencia E, Díaz-Guerra TM, Dronda F, Pulido F. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 124-130.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27-A, Wayne, PA, 1997.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2, Wayne, PA, 2002.
- Pfaller MA, Barry AL. In vitro susceptibility of clinical yeast isolates to three antifungal agents determine by the microdilution method. *Mycopathologia* 1995; 130: 3-9.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Mecer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN, and the International Fungal Surveillance Participant Group. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 78-83.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Mecer SA, Hollis RJ, and the SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. Isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 852-856.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, and the SENTRY Participant group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibility to fluconazole, ravuconazol, and voriconazol of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3254-3259.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis J, Messer SA, for the SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1886-1889.
- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-658.
- Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2513-2517.