

# PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICÓTICA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP. DE PACIENTES CON CÁNCER

Pilar Rivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Cancerología E.S.E., Laboratorio Clínico  
Bogotá, D. C., Colombia.

## RESUMEN

**Objetivo:** determinar la sensibilidad antimicótica de aislamientos clínicos de *Candida* spp. provenientes de pacientes oncológicos con uno o más episodios de infección y establecer los perfiles de sensibilidad y resistencia a los diferentes antimicóticos.

**Materiales y métodos:** entre marzo de 1999 y febrero de 2002 se aislaron y clasificaron 181 cepas de levaduras a partir de muestras clínicas de 67 pacientes. Se determinó la sensibilidad a anfotericina B, fluconazol, itraconazol y ketoconazol mediante pruebas de microdilución en caldo, según la metodología recomendada en el documento M 27-A del Comité Nacional para los Estándares en el Laboratorio Clínico de Estados Unidos (NCCLS).

**Resultados:** el agente fúngico más frecuente fue *C. albicans* (51,6%, 95/181), seguido de *C. tropicalis* (34,2%, 62/181). Un 15,2% de los aislamientos presentó resistencia a la anfotericina B (MIC > 1mg/L) y un 19,6% mostró resistencia al fluconazol. No se encontraron diferencias de sensibilidad entre los aislamientos de *C. albicans* y los aislamientos de otras especies de *Candida*. Los aislamientos de *C. glabrata* presentaron mayor resistencia a anfotericina B, en comparación con las demás especies de *Candida* ( $p = 0.006$ ).

**Discusión:** las frecuencias de aislamiento de *C. albicans* y de las otras especies de *Candida* fueron similares a las reportadas en la bibliografía para pacientes oncológicos. La prevalencia de resistencia *in vitro* a la anfotericina B fue muy superior a la encontrada en otros reportes, lo que amerita estudios complementarios de confirmación. No es posible comparar los datos de sensibilidad *in vitro* a los azoles, debido a la ausencia de trabajos similares. Las pruebas de sensibilidad antimicótica *in vitro* y la identificación del patógeno fúngico a nivel de especie constituyen herramientas de utilidad en lo epidemiológico y lo clínico para detectar cepas de *Candida* spp. potencialmente resistentes.

**Palabras clave:** test de susceptibilidad microbiana, *Candida*, droga, aislamiento y purificación, neoplasmas, levaduras, agentes antifúngicos.

---

### Correspondencia:

Pilar Rivas, Grupo de Micología-Microbiología. Laboratorio Clínico, Instituto Nacional de Cancerología E.S.E.  
Av. 1 No. 9-85, Bogotá, D. C., Colombia. Teléfono: 3340961  
pilyrivas@hotmail.com

Recibido: 1/12/03; aceptado: 08/01/04

# ANTIMICOTIC SENSIBILITY TESTS IN CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA SPP* OF CANCER PATIENTS

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the antimicrobial susceptibility of *Candida* spp isolates obtained from oncologic patients with one or more episodes of infection and to establish the susceptibility and resistance profiles to the different antimicrobials.

**Materials and methods:** The broth microdilution reference method (NCCLS, document M27-A) was employed to determine the *in vitro* susceptibility to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, and ketoconazole in 181 isolates recovered between 1999 and 2002 from 67 cancer patients.

**Results:** *C. albicans* was the more frequent etiologic agent isolated (51,6%, 95/181), followed by *C. tropicalis* (34,2%, 62/181). 15,2% of the isolates showed resistance to amphotericin B (CMI > 1 µg/mL) and 19,6% showed resistance to fluconazole. There were no differences in susceptibility between *C. albicans* isolates and non-*albicans Candida* species. The *C. glabrata* isolates showed higher resistance to amphotericin B than and other *Candida* isolates ( $p = 0.006$ ).

**Discussion:** The observed frequencies for *C. albicans* and non-*albicans Candida* species were similar to the frequencies reported for oncologic patients in other studies. The observed resistance to amphotericin B was higher than the one reported in other works, so that additional confirmatory studies are required. It was not possible to compare the sensibility prevalence to azoles, due to the absence of similar studies. *In vitro* susceptibility test and species identification are important tools at clinic and epidemiologic levels to detect potentially resistant *Candida* spp. strains.

**Key words:** Microbial sensitivity test, *Candida*, isolation and purification, neoplasms, yeast, antifungal agents.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia de los agentes infecciosos a un gran número de medicamentos y el aumento de la incidencia de infecciones fúngicas han llevado a una creciente demanda de agentes antifúngicos para profilaxis y tratamiento y, por ende, han generado la necesidad de una nueva generación de antifúngicos (1,2), muchos de los cuales presentan graves desventajas: alto costo, alta tasa de efectos adversos, ineficacia contra nuevas especies de hongos y desarrollo rápido de resistencia (3,4). El paciente oncológico es muy susceptible a adquirir infecciones microbianas, por lo que es sometido con frecuencia a tratamientos antibióticos de amplio espectro que inducen la aparición de diferentes grados de resistencia (5,6).

Las pruebas de microdilución en caldo para determinar la sensibilidad antimicótica *in vitro* constituyen herramientas importantes para la evaluación preclínica y la selección y el monitoreo de terapias antimicóticas (7-18);

su implementación puede ayudar a mejorar los protocolos de diagnóstico, evaluación, tratamiento y pronóstico de las infecciones fúngicas (19-25).

Los objetivos de este trabajo son describir la sensibilidad antimicótica de aislamientos clínicos de *Candida* spp. provenientes de pacientes oncológicos con uno o más episodios de infección y establecer los perfiles de sensibilidad y resistencia a los diferentes antimicóticos mediante la prueba de microdilución en caldo.

## METODOLOGÍA

### Población

Entre marzo de 1999 y febrero de 2002 se aislaron 181 cepas de levaduras a partir de muestras clínicas (sangre, líquido cefalorraquídeo, líquidos corporales

estériles, esputo seriado, lavado bronqueoalveolar, cepillado bronquial y orina) de 67 pacientes oncológicos con diagnóstico de infección micótica sistémica.

### Identificación de género y especie

Todos los aislamientos obtenidos fueron identificados a nivel de género y especie a partir de cultivos puros de 24-48 horas en agar Sabouraud-Dextrosa (Difco, BD)®, mediante el método espectrofotométrico automatizado MicroScan WalkAway-96 ® (Rochem Biocarem, USA).

### Pruebas de microdilución en caldo

Para la estandarización de las pruebas se empleó la metodología recomendada en el documento M 27-A del Comité Nacional para los Estándares en el Laboratorio Clínico de Estados Unidos (NCCLS)(7). Para el control de calidad se usaron las cepas *C. parasilopsis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Se utilizaron, como antifúngicos, anfotericina B (AB) (Bristol Meyer Squibb Company, USA), fluconazol (FCZ), (Pfizer Inc., New York, NY), itraconazol (ITZ) (Janssen Pharmaceutic, Titusville, NJ) y ketoconazol (KTZ) (Jansen Cilag, USA). Las soluciones iniciales se prepararon teniendo en cuenta la potencia de cada lote de antimicrobiano (dato suministrado por el fabricante). Se ensayaron 10 concentraciones para cada fármaco, las diluciones fueron hechas en RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)® y 100 µL de cada dilución fueron dispensados en microplacas de cultivo celular estériles de 96 pozos de fondo plano con tapa.

Los inóculos de trabajo se prepararon en solución salina a partir de subcultivos de las levaduras en estudio, sembradas 24 horas antes de realizar la prueba, y se ajustaron a una turbidez de 0,5 en la escala McFarland ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL). Las suspensiones se ajustaron a  $1 \times 10^3$  UFC/mL en RPMI, se dispensaron 100 µL en las microplacas que ya contenían el fármaco y se incubaron en atmósfera húmeda a  $35 \pm 2$  °C durante 48 ± 2 horas. Aunque el documento M27-A recomienda la lectura visual de las microplacas, en este trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a partir de la densidad óptica (DO) a 405 nm de cada uno de los pozos en un lector de microplacas (Multiskan MCC/340)® (23). Para la anfotericina B se identifica la concentración del fármaco con la menor DO, que corresponde al 100% de inhibición del crecimiento. Para los azoles (FCZ, ITZ, KTZ), se considera como CMI la

concentración del fármaco que causa el 50% de inhibición del crecimiento.

Para clasificar la levaduras en sensibles (S), sensibles dosis (SDD) y resistentes (R) se emplearon los puntos de corte recomendados en el documento M27-A para los azoles (7). Dado que el documento no establece puntos de corte para la anfotericina B, se consideraron como aislamientos probablemente sensibles aquellos con CMI < 1 µg/mL y como probablemente resistentes aquellos con CMI > 1 µg/mL (9-11).

### Análisis estadístico

Se empleó el programa EPI-INFO 6.04 para la elaboración de la base de datos y el análisis de la información. Se empleó la prueba de  $\chi^2$  para comparar las frecuencias de resistencia a los antimicóticos en las diferentes especies de *Candida*. Se consideró una diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se obtuvieron, en total, 181 aislamientos de levaduras, 178 de especies de *Candida* y 3 de géneros diferentes a *Candida*. En la tabla 1 se presentan los géneros y especies del total de aislamientos. El agente etiológico aislado con mayor frecuencia fue *C. albicans*, con 95 aislamientos (51,6% de los casos), seguido de *C. tropicalis*, con 62 aislamientos (34,2% de los casos). El 1,5 % de los aislamientos correspondió a otros géneros de levaduras, que se incluyeron en la tabla debido a que fueron aisladas en el segundo o tercer episodio de infección de los pacientes en estudio pero que no se incluyeron en el análisis estadístico.

En la tabla 2 se presentan los porcentajes totales de sensibilidad *in vitro* de los 184 aislamientos a los cuatro fármacos analizados. Un 15,2% de los aislamientos presentó una CMI >1 µg/mL para la anfotericina B y un 19,6% mostró resistencia al fluconazol.

Los perfiles de sensibilidad y resistencia a los antimicóticos probados de los cuatro agentes etiológicos aislados con mayor frecuencia se presentan en la figura 1. Se observó un porcentaje elevado de sensibilidad de los microorganismos frente a la anfotericina B (*C. albicans* 82,1%, *C. tropicalis* 92%, *C. guilliermondii* 71,4%, *C. krusei* 100%) y una sensibilidad variable a los diferentes azoles: itraconazol (*C. albicans* 38,9%, *C. tropicalis* 47,6%, *C. guilliermondii* 28,5%, *C. krusei* 33,3%), ketoconazol (*C. albicans* 66,3%, *C. tropicalis* 44,4%, *C. krusei* 66,6%) y fluconazol (*C. albicans* 70,5%, *C. tropicalis* 60,3%, *C. guilliermondii* 71,4%).

**Tabla 1. Agentes etiológicos aislados en los pacientes en estudio**

Géneros y especies	Aislamientos	%
<i>C. albicans</i>	95	51,6
<i>C. tropicalis</i>	63	34,2
<i>C. guilliermondii</i>	7	3,8
<i>C. krusei</i>	6	3,3
<i>C. parasilopsis</i>	4	2,2
<i>C. glabrata</i>	4	2,2
<i>C. kefyr</i>	2	1,1
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,5
<i>Hansenula anomala</i>	1	0,5
TOTAL	184	100

**Tabla 2. Susceptibilidad a los agentes antimicóticos de los diferentes aislamientos**

Antimicótico	Sensible	n SDD	Resistente
Anfotericina B (AB)	154 (85,1%)		27 (14,9%)
Itraconazol (ITZ)	75 (41,4%)	43 (23,8%)	63 (34,8%)
Ketoconazol (KTZ)	100 (55,2%)	38 (30%)	43 (23,7%)
Fluconazol (FCZ)	114 (63%)	32 (17,2%)	35 (19,3%)

SDD = Sensible dependiendo de la dosis.

En las especies aisladas en menor frecuencia, (5,5%) como *C. parasilopsis*, *C. kefyr* y *C. glabrata*, se observó una buena sensibilidad a la anfotericina B (3,8%) y a los azoles: itraconazol (3,1%), ketoconazol (3,1%) y fluconazol (2,2%), en comparación con los otros aislamientos de *Candida* spp.

No se encontró asociación entre la resistencia y los agentes etiológicos aislados (*C. albicans* vs. *C. non-albicans*). Tampoco fue posible establecer de manera individual una asociación de niveles de resistencia según especie, a excepción de la presencia de resistencia a la anfotericina B y el aislamiento de *C. glabrata* vs. *C. non-glabrata* ( $p = 0,006$ ).

## DISCUSIÓN

Las frecuencias de aislamiento de *C. albicans* (51,6%) y de las otras especies de *Candida* (46,8%) fueron similares a las reportadas en la bibliografía para pacientes oncológicos (2,6). Sin embargo, llama la atención la mayor frecuencia de aislamientos de especies como *C. guilliermondii* y *C. krusei*, en comparación con las *C. parasilopsis* y *C. glabrata* encontradas en este grupo de pacientes.

A pesar de la falta de consenso en relación con los puntos de corte para la anfotericina B (9-11,25,26), un 15,2% de las cepas de estudio (28 cepas) presentó CMI > 1 mg/mL, lo que indica la probabilidad de resistencia. Esta frecuencia es alta, ya que la mayoría de estudios señalan la resistencia a este fármaco como un evento inusual. En pacientes con cáncer existen pocos estudios a este respecto; sin embargo, varios de ellos reportan un 7,4% de aislamientos resistentes en pacientes oncológicos (27-29). La frecuencia de cepas resistentes en este estudio señala la necesidad de implementar en nuestro medio métodos complementarios de confirmación que permitan una interpretación adecuada de la presencia de resistencia (29).

La resistencia de las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* al fluconazol fue similar a la reportada en la bibliografía (3). Los porcentajes de resistencia encontrados para itraconazol y ketoconazol son excesivamente altos si se considera que son fármacos de uso limitado entre nuestros pacientes. En el caso del itraconazol, este resultado podría explicarse por un error en la estimación de las CMI, derivado de la insolubilidad propia de este fármaco, por una selección errónea del coeficiente de inhibición o por la manifestación de una resistencia primaria específica derivada del aislamiento de determinadas cepas (11,15,16,20); y en el caso particular de los aislamientos de *C. albicans* se podría pensar en una posible resistencia cruzada con aislamientos levaduriformes en los que las CMI para fluconazol fueron altas (15).

No es posible comparar los datos de sensibilidad y resistencia in vitro a los azoles obtenidos en este estudio con los reportados en otros estudios de pacientes oncológicos (3,4,27-33), debido al bajo número de pacientes incluidos en ellos. Sólo aparecen reportes de resistencia del 5% al 25% en pacientes VIH positivos con Candidiasis orofaríngea (11,33).

Se han demostrado diferencias específicas de especie en la sensibilidad de aislamientos de *Candida* a varios antifúngicos (11). La obtención del perfil de sensibilidad antimicótica y la identificación del patógeno fúngico a nivel de especie constituyen importante información en lo epidemiológico, con aplicabilidad en la práctica clínica para detectar la presencia de cepas de *Candida* spp. potencialmente resistentes (15).

Si se va a establecer la asociación entre el aislamiento de una agente etiológico específico y su perfil de resistencia, en teoría se deberían vigilar las especies *non-albicans* (11); sin embargo, en este estudio se vio un número lo suficientemente alto de cepas resistentes

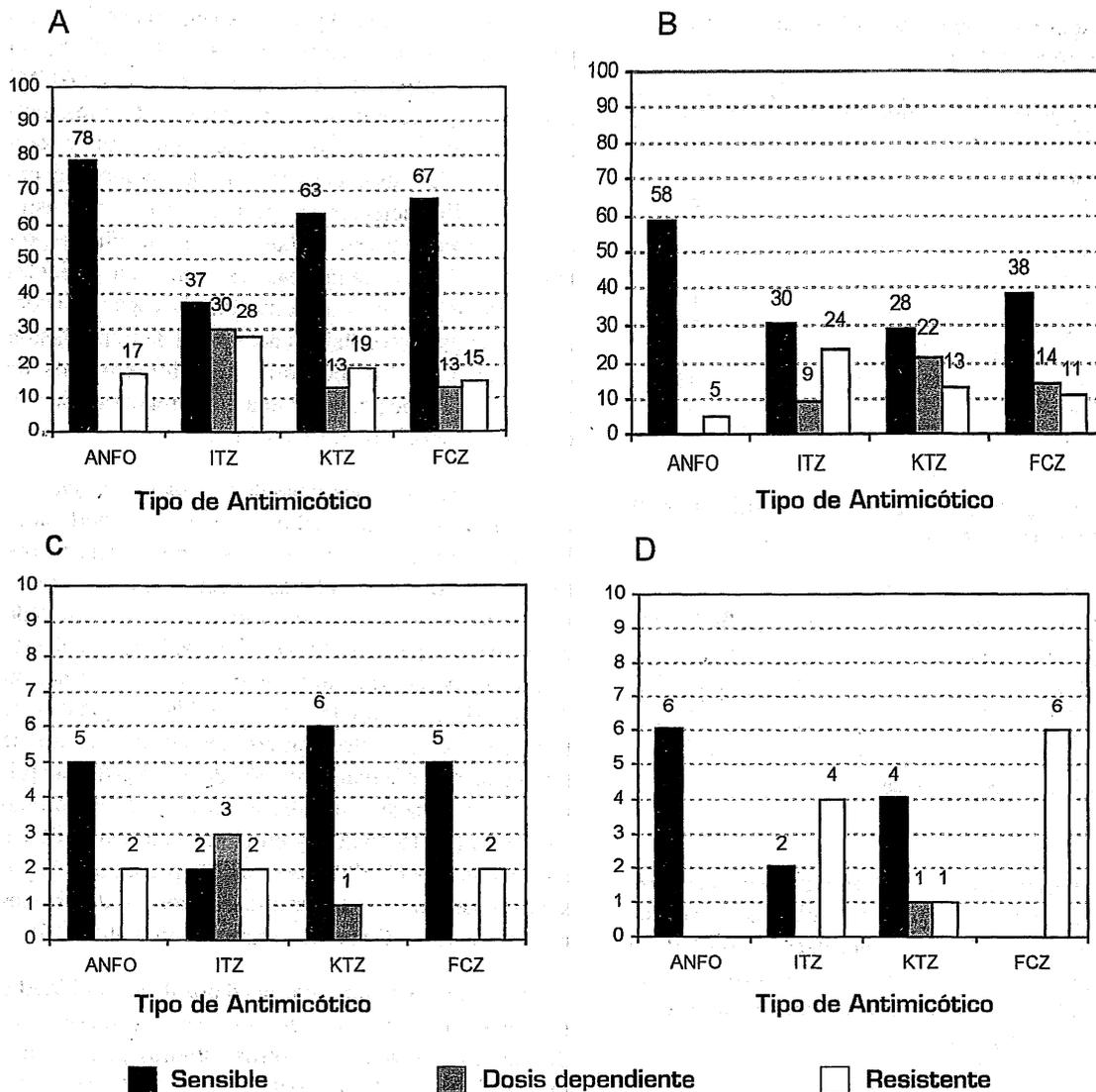


Figura 1. Perfil de sensibilidad y resistencia de *C. albicans* (A), *C. tropicalis* (B), *C. guilliermondii* (C) *C. krusei* (D) a los diferentes antimicóticos probados.

a los diferentes fármacos probados para *C. albicans*, que señala la importancia de establecer una vigilancia epidemiológica que incluya estas cepas.

La mayor resistencia a la anfotericina encontrada en *C. glabrata* y la anfotericina B confirmaría la tendencia de esta especie a la resistencia (3), aunque, dada su baja frecuencia de aislamiento, no reviste mayor interés como causante de resistencia (11,33). Este estudio confirmó la insensibilidad de la *C. krusei* al fluconazol.

## REFERENCIAS

1. Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol* 1999 Mar;32(2):531-7.
2. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Huoston A, Coffman SM, et al. *Bloodstream*

- infections due to Candida species: SENTRY Antimicrobial Surveillance program in North America and Latin America, 1997-98. Antimicrob Agents Chemother 2000 Mar;44(3):747-51.*
3. Sheeman DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azoles antifungal agents. Clin Microbiol Rev 1999 Jan;12(1):40-79.
  4. Boken DJ, Swindells S, Rinald MG. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1993; 7(6):1018-21.
  5. Bodey GP. Candidiasis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. New York: Raven Press; 1993.
  6. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995;20:115-25.
  7. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27A. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.
  8. Espinel-Ingroff A. Fungal identification and antifungal susceptibility testing. Workshop 1997 Jul 21-25, Universidad de los Andes, Bogotá (Colombia).
  9. Galgiani JN, Batlett M, Espinel A, Fromtling R, Pfaller M, Rinaldi M. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Proposed Standard. NCCLS Document M27-PA (ISB 1-56238-186-5). Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992;12(25):1-25.
  10. Pfaller MA, Yu WL. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. Infect Dis Clin North Am 2001 Dec;15(4):1227-61.
  11. Rodríguez-Tudela JL, Rodero L, Córdoba S, Cuenca M. "Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio". Memorias del 3º. Curso Hispano-Argentino de Micología Médica. 2000 Ag 28 - Sep 1; Buenos Aires (Argentina).
  12. Perea M, Rodríguez S, Espinel IA, Sussmann PO, Cepero MC. Determinación de la sensibilidad e aislamientos clínicos de *Candida spp* de pacientes con cáncer frente a diferentes antimicóticos "Informe preliminar" [tesis de grado]. Santa Fé de Bogotá: Universidad de los Andes; 1997.
  13. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001 Oct;14:643-58.
  14. Wong-Beringera A, Hindler J, Brankovic L, Muehlbauer L, Steele-Moore L. Clinical applicability of antifungal susceptibility testing on non-*Candida albicans* species in hospitalized patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2001 Jan;39(1):5-31.
  15. Pfaller MA, Rex JH. Antifungal susceptibility testing: Technical advances and potential clinical applications. Clin Infect Dis 1997;24:776-84
  16. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Baartlett M, Espinel IA, Ghannoum M, et al. Development of interpretive and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin Infect Dis 1997 Jun;24(6):235-48.
  17. Ghannoum MA, Rex JH, Galgiani JN. Minireview. Susceptibility testing of fungi: Current status of correlation of in vitro data with clinic outcome. J Clin Microbiol 1996;34(3):489-95.
  18. Espinel-Ingroff A. Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Newsletter 1996;18(21):161-8.
  19. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis 2002 Oct 15;35(8):982-9.
  20. Rodríguez-Tudela JL, Martínez J, Dronda F. Correlation of in-vitro susceptibility test results with clinical response: A study of azole therapy in AIDS patients. J Antimicrobiol Chemother 1995;35(6): 793-804.
  21. Ascioğlu S, De Pauw B, Bennett JE, et al. Analysis of Definitions Used In Clinical Research on Invasive Fungal Infections (IFI): Postal for New, Standardized Definitions. Poster presented at 39th ICAAC in San Francisco. Poster number 1639 in session 159 - Management of Fungal Infections in Humans. San Francisco; 1999.

22. Rex JH, Nelson PW, Paetznick UL, et al. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998 Jan; 42(1): 129-34.
23. Pfaller MA, Messer SS, Coffman S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations, by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole DO870. *J Clin Microbiol* 1995 May; 33(5):1094-97.
24. Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellano M. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* 2001 July; 39(7): 2513-7.
25. Rex JH, Chester R, Cooper JR, Merz WG, Galgiani JN, Anaissie EJ. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Apr; 39(4): 906-9.
26. Lozano-Chiu M, Nelson PW, Lancaster M, Pfaller MA, Rex JH. Lot-to-lot variability of *Candida* isolates to amphotericin B. *J Clin Microbiol* 1997 Jan; 35(1);270-2.
27. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382-402.
28. Dick JD, Rosengard BR, Merz WG. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered for clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18:158-163.
29. Nolte FS, Parkinson T, Falconer DJ. Isolation and characterization of fluconazole and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 Jan; 44(1);196-99.
30. Bart-Delabesse E, Deventer HV. Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J Clin Microbiol* 1995 Dec; 33(12):3278-83.
31. Redding SW, Pfaller MA. Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *Candida albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering one or more episodes of infections. *J Clin Microbiol* 1997 July; 35(7);1 761-5.
32. Bart-Delabesse E. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. *J Clinical Microbiol* 1993 Nov; 31(11);2933-7.
33. Denning DW, Baily GG, Hood SV. Azole resistance in *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16(4):261-80.