

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*

Lic. Carlos M. Fernández Andreu,¹ Lic. Tamara Pimentel Turino,² Dr. Gerardo Martínez Machín³ y Lic. Mario González Miranda⁴

RESUMEN

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de fluconazol en 36 cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mediante un micrométodo de dilución en caldo casitona teniendo en cuenta que es uno de los antifúngicos de mayor uso en nuestro país para el tratamiento de la meningitis criptocócica, segunda micosis oportunista en orden de frecuencia y la de más alta letalidad en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). La concentración mínima inhibitoria de las cepas estudiadas osciló en un rango de 0,125 hasta más de 64 µg/mL, para una media geométrica de 2,38 µg/mL; el 50 % de las cepas fue inhibido con 4 µg/mL y la menor concentración que inhibió el 90 % fue de 16 µg/mL. Se señala la importancia de continuar este tipo de estudios *in vitro* para la detección de la aparición de resistencia de *C. neoformans* a los antifúngicos.

Descriptores DeCS: FLUCONAZOL/análisis; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/aislamiento & purificación; TESTS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA.

El interés por las pruebas de sensibilidad *in vitro* de los agentes antifúngicos ha aumentado en los últimos años debido al incremento del número de cepas resistentes y a la disponibilidad de nuevos agentes antimicóticos. Estas pruebas permiten obtener datos confiables para orientar la terapia adecuada que se debe seguir en las micosis.^{1,2}

El desarrollo de los derivados triazólicos es un hecho relativamente reciente y representa un avance significativo en el tratamiento de enfermedades producidas por hongos.³ Dentro de este grupo de novedosos y prometedores antimicóticos, el fluconazol ha sido uno de los más reconocidos por la facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica y es, en la actualidad, una de las drogas de elección para el tratamiento de la criptococosis del sistema nervioso central.^{3,4}

La criptococosis es una de las infecciones oportunistas más frecuentes en Cuba, se ha convertido en la segunda micosis de importancia en orden de frecuencia y es la primera causa de letalidad entre las enfermedades causadas por hongos en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana.⁵ Teniendo en cuenta la importancia concedida a los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antimicóticos, al auge de la utilización del fluconazol en estos pacientes y al aumento de casos de criptococosis en los últimos años, el presente estudio se propone determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de fluconazol frente a aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans*, agente causal de la criptococosis.

¹ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

² Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

³ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado.

⁴ Licenciado en Microbiología.

MÉTODOS

Se realizó la determinación de la CMI de fluconazol en 36 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* aisladas de pacientes cubanos mediante un micrométodo de dilución en caldo casitona.^{6,7} De cada una de las cepas sembradas en agar Sabouraud se preparó una suspensión de alrededor de $1-5 \times 10^6$ células/mL que correspondió con el patrón 0,5 de la escala de McFarland. De esta suspensión se tomaron 50 μ L y se añadieron a un tubo que contenía 5 mL de caldo casitona (pH 6,6). A partir de una solución "madre" de fluconazol (Diflucan, Pfizer) de 2 mg/mL se preparó una dilución de 1 280 μ g/mL (ambas en agua destilada) y fue distribuida esta última en los pocillos correspondientes a la columna 2 (20 μ L/pocillo) de placas de microtitulación de fondo plano y se hicieron diluciones dobles seriadas en agua destilada hasta la columna 11. La suspensión de levaduras se añadió a razón de 180 μ L/pocillo desde la columna 2 hasta la 12, la columna 1 quedó como control de medio de cultivo sin inocular y la columna 12 como control de crecimiento sin droga. De esta forma el volumen final de cada pocillo fue de 200 μ L y la concentración final de la droga fue de 64 μ g/mL y la inicial 0,125 μ g/mL (columna 2 hasta la 11, respectivamente). Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 37 °C durante 48 h. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Titertek Multiskan7 Plus a 492 nm. Se definió la CMI como la menor concentración de fluconazol que inhibió el 80 % del crecimiento en comparación con el control.^{8,9} Como control de calidad se utilizó la cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

RESULTADOS

La figura 1 muestra el número de cepas inhibidas frente a cada concentración de fluconazol (CMI); el rango de valores de CMI obtenido fue de 0,125 hasta más de 64 μ g/mL, mientras que la media geométrica fue de 2,38 μ g/mL. La concentración de 4 μ g/mL fue la que inhibió la mayor cantidad de cepas (12 cepas, 33,3 %). Los porcentajes acumulativos de cepas inhibidas por las diferentes concentraciones de la droga se muestran en la figura 2. El 50 % de las cepas, fue inhibido con 4 μ g/mL (CMI₅₀) y la menor concentración, que inhibió el 90 % de las cepas fue de 16 μ g/mL (CMI₉₀). La máxima concentración utilizada (64 μ g/mL) logró inhibir el 97,2 % de las cepas ya que 1 cepa fue resistente a dicha concentración.

DISCUSIÓN

Los valores de CMI del fluconazol obtenidos en el presente trabajo se distribuyen en un amplio rango, desde 0,125 hasta más de 64 μ g/mL, con una media geométrica de 2,38 μ g/mL. Al comparar estos valores con

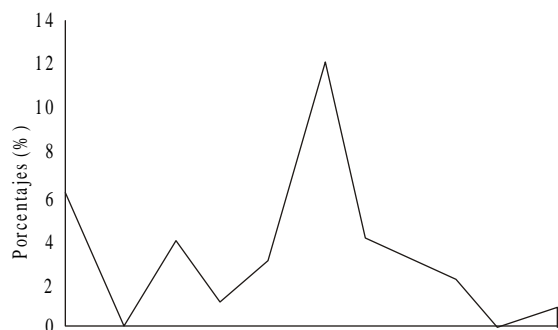


Fig. 1. Número de cepas inhibidas por las diferentes concentraciones de fluconazol.

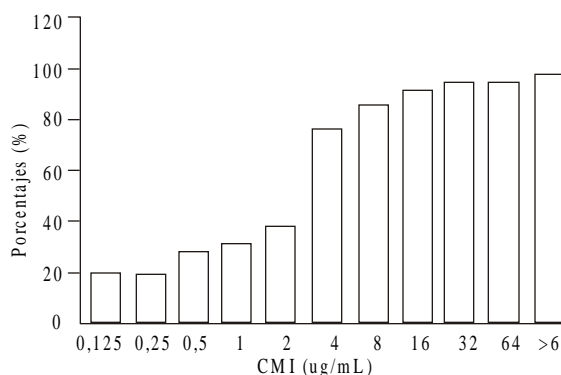


Fig. 2. Porcentajes acumulativos de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de fluconazol frente a las 36 cepas estudiadas.

los obtenidos previamente para estas mismas cepas frente a la anfotericina B,⁷ se observa que la media geométrica para esta droga fue de 0,24 μ g/mL y el rango de 0,125-2 μ g/mL, muy inferiores a los del fluconazol y no fue encontrada ninguna cepa resistente a dicho polieno. Esto era de esperar si se considera que son diferentes los mecanismos de acción de los polienos y los azoles, y por tanto son también diferentes los mecanismos de resistencia a éstos.¹⁰

En una evaluación multicéntrica realizada por Sanati y otros en 1996,¹¹ se observó que las CMIs de las 53 cepas estudiadas de *C. neoformans* con el método descrito por el documento M27-P (NCCLS) se manifestaron en un rango de 0,5-8 μ g/mL. En ese estudio, 56,6 % de las cepas fue inhibido con 4 μ g/mL y 15 % con 8 μ g/mL, superiores a los valores de 33,3 y 11,1 %; respectivamente, hallados por nosotros. Antes, Casadevall y otros habían mostrado su preocupación por el aumento de las CMIs de fluconazol frente a *C. neoformans* y sugirieron la posibilidad de la aparición de resistencia;¹² los valores a los que se refiere su estudio son de 40 μ g/mL, a diferencia del nuestro donde se encontraron altos valores de CMI, incluso una cepa con CMI mayor que 64 μ g/mL. Estos re-

sultados llaman la atención sobre la necesidad de continuar estos estudios para detectar el probable incremento en los valores de CMI y la aparición de cepas resistentes al fluconazol debido al aumento de su uso en los últimos años como profiláctico y en la terapia de mantenimiento dirigida a la meningitis causada por *C. neoformans* y otras micosis en pacientes con sida.⁴

Aunque han existido diversos criterios sobre el valor límite a partir del cual una cepa se debe considerar resistente, recientemente, después de múltiples trabajos colaborativos, se ha llegado a un consenso sobre los criterios de resistencia de *Candida spp.*, frente al fluconazol,⁸ según los cuales se considera una cepa sensible cuando su CMI es menor o igual que 8 µg/mL; sensible dosis dependiente cuando los valores de CMI están entre 16 y 32 µg/mL, y resistente cuando la CMI es mayor o igual que 64 µg/mL. Sin embargo, ha sido señalado que no resulta adecuado extrapolar estos criterios a otros géneros de hongos diferentes de *Candida*. Datos más recientes han demostrado que éstos pudieran ser aplicados a *Cryptococcus* e *Histoplasma*,¹³ aunque todavía se requieren más aportes en este sentido, por lo que se debe continuar trabajando en este campo por parte de los principales grupos en el mundo que abordan esta importante temática.

SUMMARY

The minimum inhibitory concentration of fluconazole was determined in 36 strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by a casitone broth microdilution method, taking into account that it is one of the most used antifungal agents in our country for the treatment of cryptococcal meningitis, the second opportunistic mycosis in order of frequency and that with the highest lethality among AIDS patients. The minimum inhibitory concentration of the studied strains ranged 0.125 to more than 64 µg/mL for a geometrical mean of 2.38 µg/mL. 50 % of the strains were inhibited with 4 µg/mL and the least concentration that inhibited 90 % was 16 µg/mL. It is stressed the importance of continuing this type of *in vitro* studies to detect the appearance of resistance of *C. neoformans* to antifungal agents.

Subject headings: FLUCONAZOLE/analysis; CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/isolation & purification; MICROBIAL SENSITIVITY TESTS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quindós G, Torres Rodríguez JM. Antifúngicos de uso sistémico: resistencias y fracasos terapéuticos. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:27-9.

2. Torres Rodríguez JM, Madrenys N, Jiménez J, Saballs P. Concentraciones mínimas inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución estandarizado y el E-test. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:115-8.
3. Kauffman CA. Role of azoles in antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 1996;22(Suppl 2):S148-53.
4. Horst CM van der, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD, et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1997;337:15-21.
5. Arteaga Hernández E, Capó de Paz V, Pérez Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el SIDA. Un estudio de 211 autopsias. *Rev Iberoam Micol* 1998;15(1):33-5.
6. Drouhet E, Dupont B, Improvisi L, Viviani MA, Totorano AM. Disc agar diffusion and microplate automatized technics for *in vitro* evaluation of antifungal agents on yeast and sporulated pathogenic fungi. En: Iwata K, Bossche H van den, eds. *In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents* Amsterdam: Elsevier Science, 1986:31-49.
7. Fernández Andreu CM, González Miranda M, Illnait Zaragoza MT, Martínez Machín G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B frente a levaduras de interés médico. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(1):48-53.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A ISBN 1-56238-328-0). NCCLS, 940 West Valle y Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087. 1987.
9. Rodero LL, Davel GO, Vivot W, Canteros CE, Fernández C. Pruebas de sensibilidad *in vitro* para levaduras: evaluación de un micrométodo. *Rev Argent Micol* 1995;27:81-9.
10. Bossche H van den. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:44-9.
11. Sanati H, Messer SA, Pfaller M, Witt M, Larsen R, Espinel-Ingroff A, et al. Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* against fluconazole. *J Clin Microbiol* 1996;34:1280-2.
12. Casadevall A, Apitzter ED, Webb D, Rinaldi MG. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1383-6.
13. Rex JH, Pfaller MA, Calgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997;24:235-7.

Recibido: 17 de marzo de 1998. Aprobado: 23 de junio de 1998.
Lic. Carlos M. Fernández Andreu. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.

E.mail: ciipk@infomed.sld.cu