

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Sensibilidad de aislamientos clínicos de *Candida albicans* frente a la 5-fluorocitosina

Lic. Carlos M. Fernández Andreu,¹ Lic. Dihadenys Lemus Molina² y Dr. Gerardo Martínez Machín³

RESUMEN

Uno de los antimicóticos más utilizados en la terapéutica de las micosis ha sido la 5-fluorocitosina, sin embargo la aparición de cepas resistentes pudiera ser una limitante importante para su uso, de ahí que resulte necesario conocer la sensibilidad frente a esta droga. Con este objetivo se determinó el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 5-fluorocitosina frente a 50 aislamientos clínicos de *Candida albicans*, mediante un micrométodo de dilución en medio RPMI 1640 comparando 2 métodos de lectura. Los valores de media geométrica obtenidos fueron de 0,95 µg/mL para la lectura visual y 0,75 µg/mL para la lectura automatizada, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas ($p < 0,05$). El coeficiente de correlación lineal de Pearson fue $r = 0,81$, esto indica que aunque hubo buena correlación, también existió discrepancia entre ambas lecturas. La CMI₅₀ fue de 0,5 µg/mL y la CMI₉₀ de 4 mg/mL. En dependencia del método de lectura empleado, se encontraron 90 y 92 % de cepas sensibles, entre 6 y 8 % de cepas resistentes y 2 % de cepas con sensibilidad intermedia. Estos valores indican una baja resistencia frente a esta droga, lo que pudiera tener repercusión directa en la conducta terapéutica a seguir en las candidiasis.

Descriptor DeCS: FLUCITOSINA/uso terapéutico; CANDIDA ALBICANS; TESTS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA/métodos.

La frecuencia de las infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente en las 2 últimas décadas. Las principales causas de este incremento han sido la inmunodepresión producida en los pacientes sometidos a trasplantes de órganos y tratamientos citotóxicos e inmunosupresores, el uso de nuevos antibacterianos de amplio espectro, así como el desarrollo de nuevas maniobras diagnósticas y terapéuticas invasoras y muy especialmente la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).¹ La candidiasis es la micosis oportunista más frecuente en estos pacientes y *Candida albicans* es considerada su principal agente causal.²

En los últimos años, se ha estimulado la investigación en terapéutica antifúngica y las pruebas de sensibilidad *in vitro* han aparecido como una necesidad, para determinar el antimicótico de elección cuando más de uno es potencialmente activo frente a un mismo hongo.³ Entre los antifúngicos recomendados hoy día para el tratamiento de las micosis sistémicas se destaca la 5-fluorocitosina (5-FC).^{4,5}

Los estudios de sensibilidad *in vitro* con agentes antifúngicos no se realizan de forma habitual en los laboratorios de micología médica, sin embargo, cada vez resulta más evidente que es necesario contar con técnicas estandarizadas que permitan orientar

¹ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

² Licenciada en Microbiología.

³ Médico Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado.

el tratamiento adecuado de las micosis, si se tiene en cuenta la creciente frecuencia de aparición de cepas resistentes; por esta razón el propósito en este trabajo fue conocer el comportamiento de los aislamientos clínicos de *Candida albicans* frente a la 5-FC mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

MÉTODOS

Se estudiaron 50 cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) en el período comprendido entre septiembre de 1997 a marzo de 1998, a las que se les determinó la CMI de 5-FC en el medio RPMI 1640 según el micrométodo estandarizado por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos de los EE.UU. (NCCLS) en 1997.⁶

Preparación del inóculo: Las cepas fueron cultivadas en agar Sabouraud e incubadas a 37 °C durante 48 h. De cada cultivo se tomaron 5 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro y se resuspendieron en tubos con 5 mL de agua destilada estéril, hasta alcanzar una turbidez equivalente a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland (10^6 células/mL, en cámara de Neubauer). De esta suspensión se tomaron 50 µL y se pasaron a un tubo con 5 mL de RPMI 1640 pH 7, amortiguado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS), y se obtuvo una densidad de 1×10^4 células/mL.

Diluciones del antifúngico: Partiendo de una solución de 5-FC cuya concentración era de 10 mg/mL se preparó una solución de 1 280 µg/mL; esta fue utilizada para realizar diluciones dobles seriadas en placas de microtitulación de 96 pocillos desde la columna 2 hasta la 11 y finalmente quedó el antifúngico en concentraciones de 64 hasta 0,125 µg/mL (20 µL/pocillo).

Inoculación de las placas: Se distribuyeron 180 µL de la suspensión celular a partir de la columna 2 hasta la 12, por duplicado para cada cepa. En los pocillos de la columna 1 se añadieron 180 µL de medio sin inóculo. La columna 12, al no tener antifúngico, sirvió como control de crecimiento. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda y oscuridad a 35 °C durante 48 h.

Determinación del punto final o CMI: La determinación del punto final se realizó mediante la lectura visual y la lectura automatizada. Para la lectura visual la CMI se definió como la menor concentración de antifúngico frente a la cual las levaduras no exhibían un crecimiento visible, se consideró como criterio de crecimiento un solo botón sedimentado o la presencia de una turbidez en el fondo del pocillo, teniendo en cuenta las características del crecimiento en el pocillo control de la columna 12. Antes de realizar la lectura automatizada las placas fueron agitadas y la CMI se definió como la menor concentración del antifúngico capaz de inhibir 80 % del crecimiento en comparación con el control positivo. La lectura se realizó mediante el fotocolorímetro (Titertek, Multiscan®) a 405 nm.^{5,7} Para la determinación del 80 % de inhibición del crecimiento se empleó la fórmula siguiente:⁸

$$A \leq A_b + [0,2 \times (A_k - A_b)]$$

Donde:

A: Absorbancia.

A_b : Absorbancia del blanco (control sin inóculo y sin droga).

A_k : Absorbancia del control de crecimiento.

Si $A_b = 0$, entonces $A \leq 0,2 \times A_k$

Cuando se observó en la columna 2 un crecimiento igual al de la columna 12 se consideró que el valor de CMI para esa cepa era 128 µg/mL.

Interpretación de los resultados: Se asumieron los criterios de resistencia y sensibilidad aprobados por el NCCLS en 1997 para *Candida* en medio RPMI 1640, según los cuales una cepa se considera *sensible* cuando el valor de CMI es menor o igual a 4 µg/mL, de *sensibilidad intermedia* cuando el valor está entre 8 y 16 µg/mL y *resistente* cuando es superior o igual a 32 mg/mL.⁶

Análisis estadístico de los resultados: Para cada una de las lecturas realizadas (visual y automatizada), se determinaron las medias geométricas de los valores de CMI obtenidos y se compararon según la prueba t de Student para muestras independientes; también se determinaron el rango, los porcentajes acumulativos, las

concentraciones de la droga capaces de inhibir 50 y 90 % de las cepas (CMI_{50} y CMI_{90} respectivamente) y el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

RESULTADOS

En la tabla se presentan los resultados de las 2 lecturas de CMI realizadas y se muestran la cantidad de cepas inhibidas para cada una de las concentraciones de 5-FC utilizadas, así como los porcentajes que representan.

En la figura se muestran los porcentajes acumulativos calculados para cada tipo de lectura; los valores de CMI que inhiben 50 y 90 % de las cepas fueron 0,5 y 4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, tanto para la lectura visual como para la automatizada.

El rango de valores de CMI obtenido para las 2 lecturas fue de 0,125-128 $\mu\text{g/mL}$. Para la lectura

visual la media geométrica fue de 0,95 $\mu\text{g/mL}$ y para la lectura automatizada fue de 0,75 $\mu\text{g/mL}$. Al comparar las 2 medias geométricas obtenidas, se comprobó que no existían diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). El coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) entre las 2 lecturas fue 0,81.

TABLA. Número y porcentaje de cepas de *Candida albicans* inhibidas frente a las distintas concentraciones de 5-FC

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Lectura visual		Lectura automatizada	
	No. de cepas	%	No. de cepas	%
0,125	8	16	13	26
0,25	7	14	7	14
0,5	11	22	5	10
1	7	14	10	20
2	9	18	7	14
4	3	6	4	8
8	0	0	1	2
16	1	2	0	0
32	1	2	0	0
64	0	0	2	4
128	3	6	1	2

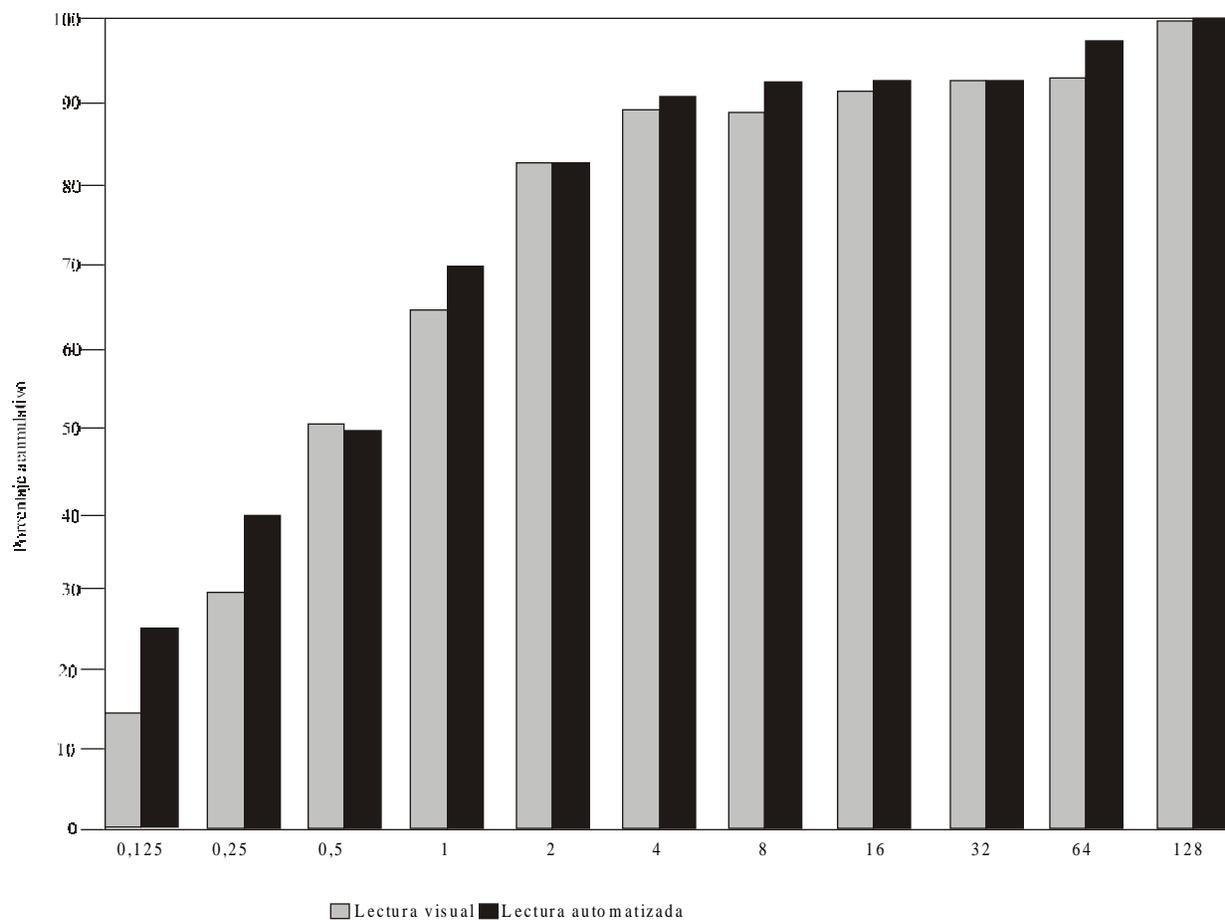


Fig. Porcentajes acumulativos calculados para cada una de las concentraciones de 5-FC utilizadas frente a *Candida albicans*.

Teniendo en cuenta los criterios de sensibilidad y resistencia del NCCLS,⁸ con la lectura visual se encontraron 45 cepas sensibles (90 %), una cepa con sensibilidad intermedia (2 %) y 4 cepas resistentes (8 %); mientras que con la lectura fotolorimétrica fueron detectadas 46 cepas sensibles (92 %), una cepa con sensibilidad intermedia (2 %) y 3 cepas resistentes (6 %).

De las 4 cepas resistentes mediante la lectura visual, 2 lo fueron también en la fotolorimétrica; sin embargo, en las otras 2 cepas, las lecturas discreparon de manera apreciable (visual: 128 µg/mL; automatizada: 4 µg/mL). Mediante la lectura fotolorimétrica, una tercera cepa resistente (64 µg/mL) se comportó como sensibilidad intermedia en la visual (16 µg/mL). Otra cepa clasificada como sensible mediante la lectura visual (4 µg/mL), se comportó como de sensibilidad intermedia en la lectura automatizada (8 µg/mL).

DISCUSIÓN

Una de las drogas de elección para el tratamiento de las candidiasis sistémicas ha sido la 5-FC, pues aunque su espectro de acción es estrecho, su toxicidad para el hombre es relativamente baja. La aparición de cepas resistentes y la utilización de los azoles hizo que comenzara un período de declinación en el uso de esta droga. Ya en la década actual, después de evaluaciones multicéntricas y de ensayos clínicos mejor diseñados, se ha reconsiderado la utilidad de la 5-FC en terapias combinadas con polienos y azoles.^{9,10}

El medio RPMI 1640 permite un adecuado crecimiento de las levaduras; para la mayoría de las cepas, el crecimiento se presentó como una turbidez en el fondo del pocillo y solo en muy pocos casos se pudo observar un botón bien definido. Este crecimiento se hacía visible a las 48 h de incubación. *Espinell-Ingroff* y otros, han reportado un crecimiento visible a las 24 h de incubación y por lo tanto, consideran que es posible realizar la determinación del punto final en ese momento.¹¹ Sin embargo, en este trabajo se pudo confirmar lo planteado por el NCCLS con respecto al tiempo de incubación (48 h) para las especies de *Candida*.

El rango de valores de CMI obtenido de 0,125-128 µg/mL es igual al obtenido por *Barchiesi*

y otros, mientras que *Odds* y otros reportan un rango de 0,05-100 µg/mL.^{7,12}

En un estudio realizado con el medio YNB (*yeast nitrogen base*), *Calhoun* y *Galgiani*¹³ obtuvieron una media geométrica de 0,033 µg/mL y con el medio SAAMF (*synthetic aminoacid fungal medium*) de 2,6 µg/mL.¹³ En el presente trabajo los valores de media geométrica obtenidos fueron de 0,95 y 0,75 µg/mL para las lecturas visual y automatizada respectivamente, los cuales al ser comparados según la prueba t de Student ($p > 0,05$), no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Rodríguez-Tudela y *Martínez-Suárez*, realizando la lectura visual y automatizada encontraron que entre estas existía una buena correlación.¹² *Rodero* y otros reportaron entre estos 2 tipos de lecturas un coeficiente de 0,97, lo que indica muy buena correlación.⁵ En el presente trabajo se obtuvo un valor de r de 0,81, esto permite sugerir que aunque es confiable la lectura visual, en casos dudosos es necesario realizar la lectura automatizada.

Barchiesi y otros reportaron un valor de CMI₅₀ de 0,25 mg/mL y de CMI₉₀ de 8 µg/mL,¹² mientras que en el presente estudio las concentraciones de 5-FC capaces de inhibir a 50 y 90 % de las cepas fueron 0,5 y 4 µg/mL respectivamente, o sea, en cada caso, solo difieren en una dilución. Para inhibir 100 % de las cepas, fueron necesarias concentraciones superiores a 64 µg/mL.

En este trabajo se encontraron discrepancias marcadas solo entre 2 cepas: según la lectura visual se clasificaron como resistentes (128 µg/mL), pero resultaron ser sensibles (4 µg/mL) al ser leídas en el fotolorímetro. En ambos casos la lectura visual resultó muy difícil, pues se apreció un botón no bien delimitado rodeado de una turbidez que hizo clasificarlas como resistentes. Evidentemente el factor subjetivo de apreciación influyó mucho, pues en ambos casos la lectura automatizada fue de 4 µg/mL.

Hasta hace pocos años no existía unanimidad en cuanto a los criterios de sensibilidad y resistencia en los estudios con agentes antifúngicos, aunque la mayoría de los autores consultados coinciden en que una cepa con CMI ≥ 25 µg/mL debe considerarse resistente a la 5-FC.^{3,9,14} En el presente estudio, asumiendo los criterios del NCCLS (M27-A),

se encontró, para las lecturas visual y automatizada, 90 y 92 % de cepas sensibles respectivamente; similares resultados obtuvieron *Dei-Cas* y otros en un estudio realizado con el medio *Shadomy*, donde 94,4 % de las cepas fueron sensibles.¹⁵ *Sakellarides* obtuvo 4 % de cepas resistentes en un trabajo realizado con el medio *myco-plate* mediante la técnica de difusión en agar; aunque en este estudio se emplearon otro medio de cultivo y otra técnica de evaluación *in vitro*, los resultados son similares a los de este autor, pues se obtuvo 8 y 6 % de cepas resistentes para la lectura visual y automatizada, respectivamente.¹⁶

Entre las causas de resistencia a la 5-FC en *C. albicans*, se encuentra en primer lugar la deficiencia en la enzima uridina monofosfato pirofosforilasa, que interviene en la síntesis de 5-flúor uridina monofosfato y de las fosforilaciones sucesivas hasta obtener 5-flúor uridina trifosfato y en la síntesis de 5 desoxiuridina monofosfato.¹⁰ Sin embargo, no se descartan las otras teorías propuestas como son la activación de ciertos mecanismos que permitirían la reparación del ARN alterado y la activación de la síntesis de pirimidinas que competirían con la propia 5-FC.¹⁷

En un trabajo previo realizado en Cuba por *Halley* y otros con la utilización del sistema ATB-Fungus (bioMérieux), se encontró 39,1 % de cepas resistentes, 8,7 % de cepas con sensibilidad intermedia y 52,2 % de cepas sensibles.¹⁴ Aunque estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo, confirman la existencia del fenómeno de resistencia en nuestro medio por lo que se hacen necesarios estudios más amplios y profundos.

La determinación de la CMI de 5-FC está indicada fundamentalmente para aquellos casos de candidiasis sistémica con sospechas de fallo terapéutico, por lo que esta técnica constituye una herramienta de gran valor al nivel de Laboratorios de Referencia o en aquellos hospitales que atiendan a grupos de pacientes con factores predisponentes para esta micosis.

SUMMARY

5-fluorocytosine has been one of the most used antimycotics in the therapeutics of mycosis, however the appearance of resistant strains may be an important limitant for its use. That's why it

is necessary to know the sensitivity to this drug. To this end, it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of 5-fluorocytosine against 50 clinical isolates of *Candida albicans* by a micromethod of dilution in RPMI 1640 media, comparing 2 reading methods. The values of the geometrical mean obtained were 0.95 mg/mL for the visual reading and 0.75 mg/mL for the automated reading. There were no significant differences between them ($p < 0.05$). Pearson's lineal correlation coefficient was $r = 0.81$. It indicates that although there was a good correlation, there was also discrepancy between both readings. The IMC_{50} was of 0,5 $\mu\text{g/mL}$ and the IMC_{90} of 4 mg/mL. 90 and 92% of sensitive strains, between 6 and 8% of resistant strains and 2% of strains with intermediate sensitivity were found depending on the reading method used. These values show a low resistance against this drug, which may have a direct repercussion on the therapeutic behaviour to be followed in candidiasis.

Subject headings: FLUCYTOSINE/therapeutic use; CANDIDA ALBICANS, MICROBIAL SENSITIVITY TESTS/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dupont B, Graybill JR, Armstrong D, Laroche R, Touzé JE, Wheat LJ. Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 1992;30 (Suppl 1):19-28.
- Bowden RA. Prevention of candidal infection in immunocompromised patients: what for whom?. *Int J Infect Dis* 1997;1(Suppl 1):32-5.
- Rodero LL, Davel GO, Vivot W, Canteros CE, Fernández C. Pruebas de sensibilidad *in vitro* para levaduras: evaluación de un micrométodo. *Rev Arg Microb* 1995;27:81-89.
- Bodey GP. Disseminated candidiasis in neutropenic patients. *Int J Infect Dis* 1997;1(Suppl 1):2-5.
- Odds FC. Antifungal agents and their use in *Candida* infections. En: *Candida* and candidosis. 2ª ed. London: Ballière Tindal, 1988:279-313.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, approved standard M27-A. Villanova. NCCLS, 1997.
- Odds FC, Vranckx L, Woestenborghs F. Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(9):2051-60.
- Eldere J van, Joosten L, Verhoeghe A, Surmont I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standard Broth Microdilution method compared with E-test and semi-automated broth microdilution test. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):842-7.
- Viviani MA. Flucytosine-What is its future? *J Antimicrob Chemother* 1995;35:241-4.
- Bossche H vanden. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:44-9.
- Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, et al. Collaborative comparison of broth microdilution and microdilution antifungal susceptibility test. *J Clin Microbiol* 1992;30(12):3138-45.
- Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Rinaldi MG. Comparative study of broth microdilution and microdilution techniques for *in vitro* antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' Proposed Standard. *J Clin Microbiol* 1994;32(10):2494-500.
- Calhoun DL, Galgiani JN. Analysis of pH and buffer effects on flucytosine activity in broth dilution susceptibility testing of *C. albicans* in two synthetic media. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26(3):364-7.
- Halley MC, Hart M, Martínez ML, Valdivia I, Fernández C, Espinosa F. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de hongos

- levaduriformes frente a diversos antifúngicos. Rev Esp Quimioter 1997;10(4): 328-33.
15. Del-Cas E. Kinetic study of antifungal activity of amphotericin B, 5-fluorocytosine and ketoconazole against clinical yeast isolates using liquid-phase turbidimetry. Mycoses 1991;34:167-72.
 16. Sakellarides E. Sensibilité de Candida spp. A la 5-fluorocytosine, á l'amphotéricine B et aux imidazoles. J Suisse Med 1981;11: 1367-72.
 17. Borges M. Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. Rev Infect dis 1980;2(4): 520-33.

Recibido: 21 de octubre de 1999. Aprobado: 31 de marzo del 2000.

Lic. *Carlos M. Fernández Andreu*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu