

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Susceptibilidad *in vitro* frente a fluconazol y voriconazol de cepas de *Cryptococcus* aisladas en Cuba

María Teresa Illnait Zaragoza¹, Jacobus Franciscus Gerardus Marie Meis,² Gerardo Félix Martínez Machín,³ Ilse Curf Bruker,⁴ Carlos Manuel Fernández Andreu⁵ y Mayda Rosa Perurena Lancha⁶

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: las infecciones fúngicas invasoras se han incrementado como consecuencia de los avances de la medicina en el área de la transplantología, el tratamiento del cáncer, las enfermedades autoinmunes y el sida, fundamentalmente. La criptococosis, antes infrecuente, ocupa ahora el tercer lugar en la incidencia de micosis graves en este último grupo de pacientes y constituye además la de mayor letalidad. Hasta el momento existen pocos reportes sobre el desarrollo de resistencia de *Cryptococcus* a los antifúngicos, pero se prevé que el amplio uso de fluconazol pudiera favorecer la emergencia de cepas menos sensibles. **OBJETIVOS:** dada la importancia de mantener la vigilancia de la susceptibilidad a los antifúngicos y de poder evaluar nuevas opciones terapéuticas, se determinó la actividad *in vitro* del fluconazol y el voriconazol frente a un amplio número de cepas de *Cryptococcus* aisladas a partir de muestras clínicas y ambientales mediante el método de Etest. **MÉTODOS:** se determinó la susceptibilidad *in vitro* mediante Etest frente a fluconazol y voriconazol de 159 cepas de *Cryptococcus* (117 obtenidas a partir de muestras clínicas y 42 de fuentes ambientales de la región centro-occidental de Cuba). **RESULTADOS:** los aislamientos estudiados mostraron valores bajos de concentraciones mínimas inhibitorias, sobre todo frente a voriconazol. Los rangos, las medias geométricas y las modas fueron de 0,031-128, 4,631 y 3 mg/mL para fluconazol y 0,003-8, 0,02 y 0,016 mg/mL para voriconazol, respectivamente. Aunque de forma general los valores de concentraciones mínimas inhibitorias fueron más elevados en los aislamientos ambientales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$) entre las cepas de acuerdo con el origen (clínica/ambiental) o la procedencia geográfica. **CONCLUSIONES:** se señala la importancia de continuar este tipo de estudio para la detección de la aparición de resistencia a las drogas más empleadas en la terapéutica anticriptocócica, así como en la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de esta infección.

Palabras clave: *Cryptococcus*, susceptibilidad *in vitro*, fluconazol, voriconazol, Etest.

INTRODUCCIÓN

Antes de la aparición del sida, la criptococosis se comportaba como una infección poco frecuente.¹ Posteriormente, su incidencia se elevó como consecuencia del incremento de la población inmunocomprometida, resultado del aumento de las terapias inmunosupresivas y de la pandemia pro-

ducida por la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).² Luego de la introducción de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARVAE), el número de pacientes afectados por esta micosis en el último grupo de personas ha declinado, aunque la tasa de mortalidad por su causa continúa invariable (10 %), con un tiempo de vida medio de 14 d a pesar del tratamiento

¹ Máster en Bacteriología-Micología. Investigadora Auxiliar. Profesora Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

² Doctor en Ciencias. Hospital Canisius Wihelmina (CWZ), Nijmegen, Países Bajos.

³ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. IPK.

⁴ Licenciada en Microbiología. CWZ. Países Bajos.

⁵ Doctor en Ciencias. Investigador Titular. Profesor Titular. IPK. La Habana, Cuba.

⁶ Máster en Bacteriología-Micología. Investigador Auxiliar. Profesor Asistente. IPK. La Habana, Cuba.

antifúngico convencional.³ Al menos 2 factores pudieran explicar estos hechos: el incremento de la presión intracraneal y la moderada efectividad del régimen terapéutico que con frecuencia requiere más de 2 semanas para esterilizar el líquido cefalorraquídeo.^{3,4}

Hasta el momento, los principales antifúngicos disponibles para el tratamiento de la criptococosis se encuentran limitados a la anfotericina B, la 5 fluocitosina y el fluconazol.^{3,4} Aunque existen evidencias de que las recaídas de infecciones oportunistas son menos frecuentes cuando los pacientes reciben TARVAE, las guías actuales de tratamiento recomiendan el uso de fluconazol como terapia de mantenimiento en los cuadros meníngeos.^{3,4}

La mayor preocupación con respecto al uso de los azoles, es la posible emergencia de cepas menos sensibles, lo cual ha sido descrito en otros hongos, aislados particularmente en pacientes inmunocomprometidos.² No obstante, la resistencia de *Cryptococcus* a estos antifúngicos se ha reportado con menos frecuencia.¹⁻³

Los resultados de trabajos previos realizados en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), empleando el método de microdilución en caldo, han demostrado una elevada sensibilidad de las cepas de *Cryptococcus* estudiadas frente a fluconazol y anfotericina B.^{5,6} Dada la importancia de mantener la vigilancia de la susceptibilidad a los antifúngicos y de poder evaluar nuevas opciones terapéuticas, se determinó la actividad *in vitro* del fluconazol y el voriconazol frente a un amplio número de cepas de *Cryptococcus*, aisladas a partir de muestras clínicas y ambientales mediante el método de Etest.

MÉTODOS

Microorganismos

Se estudiaron 159 cepas de *Cryptococcus*: 117 fueron aisladas de pacientes con neurocriptococosis (93 de ellos eran seropositivos al VIH) y 42 a partir de excretas de palomas de 3 localizaciones geográficas de Cuba: Ciudad de La Habana (5), Cienfuegos (6) y Pinar del Río (31).

Todos los especímenes fueron identificados en el momento de su aislamiento siguiendo la

metodología convencional⁷ y se conservaron en agua destilada estéril a temperatura ambiente. Estos procedimientos se llevaron a cabo en el laboratorio de micología del IPK. Antes de realizar los estudios de susceptibilidad antifúngica, la identidad de todos los aislamientos fue confirmada mediante el sistema comercial Auxacolor^{MT2} (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia).

Determinación de la susceptibilidad antifúngica

Se emplearon tiras de Etest de fluconazol y voriconazol (AB BIODISK; Solna, Suecia). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron determinadas siguiendo la metodología de *Pfaller* y otros. Se estimó como CMI el valor más bajo de concentración donde el borde de la elipse de inhibición interceptó la escala de la tira.⁸

Como controles fueron utilizadas las cepas *Candida krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Análisis estadístico

Se determinaron los intervalos, las modas y las medias geométricas (MG) de los valores de CMI obtenidos. La CMI₅₀ y la CMI₉₀ fueron definidas como las menores concentraciones de la droga que inhibieron a 50 y 90 % de las cepas, respectivamente, y fueron calculadas a partir de los porcentajes acumulativos del número de cepas inhibidas a las diferentes concentraciones de cada antifúngico. Para el análisis de los resultados se empleó el programa GraphPad versión 3.00 para Windows (GraphPAD Sofwar, San Diego, California, EUA). La significación estadística fue definida para $p \geq 0,05$.

RESULTADOS

Del total de cepas, 157 (98,74 %) fueron identificadas como *C. neoformans* var. *grubii* y 2 de los aislamientos a partir de muestras ambientales de Pinar del Río resultaron *C. albidus* y *C. albidusimilus* (0,63 % en cada caso).

Los valores de CMI de las cepas controles se comportaron dentro de los rangos reportados por

TABLA. Resultados de CMI (mg/mL) frente a fluconazol y voriconazol de cepas de *Cryptococcus* aisladas en Cuba

	Rangos	Fluconazol				Voriconazol				
		MG	Moda	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rangos	MG	Moda	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Cepas ambientales (n= 42)	0,031-6	0,199	0,125	0,125	0,5	0,008-0,5	0,185	0,25	0,125	0,25
Ciudad de La Habana (n= 5)	0,5-6	1,086	*	0,63	4	0,008-0,032	0,021	*	0,016	0,032
Pinar del Río (n= 31)	0,031-0,5	0,168	0,25	0,125	0,25	0,016-0,5	0,172	0,25	0,25	0,5
Cienfuegos (n= 6)	0,125-0,5	0,176	0,125	0,125	0,5	0,125-0,5	0,28	0,25	0,25	0,5
Cepas clínicas (n= 117)	0,5-128	4,653	2	4	24	0,003-8	0,021	0,016	0,016	0,047
VIH (+) (n= 93)	0,5-128	4,653	2	4	24	0,003-8	0,021	0,016	0,016	0,047
VIH (-) (n= 24)	2-32	4,657	*	4	32	0,004-0,32	0,021	0,023	0,023	0,064
Total de cepas (n= 159)	0,031-128	4,631	3	4	24	0,003-8	0,02	0,016	0,023	0,064

* No se pudo determinar la moda.

el CLSI y los aislamientos estudiados mostraron patrones uniformes de susceptibilidad frente a los antifúngicos probados.

En la tabla se muestran los datos de susceptibilidad antifúngica obtenidos. De forma general, se encontró que las cepas estudiadas fueron más sensibles al voriconazol. Las CMI variaron de 0,031 a 128 $\mu\text{g/mL}$ y de 0,003 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para el fluconazol y el voriconazol, respectivamente. Los valores más elevados correspondieron a los aislamientos de origen clínico, los cuales mostraron cifras de CMI₅₀, CMI₉₀ y media geométrica superiores respecto a las de origen ambiental. Entre estas últimas, las procedentes de Ciudad de La Habana mostraron ser menos susceptibles frente a estas drogas; no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Debido al incremento de las infecciones fúngicas sistémicas, los reportes cada vez más frecuentes de fallo terapéutico durante el tratamiento con azoles y el desarrollo creciente del número de agentes antifúngicos, han traído como consecuencia que la ayuda del laboratorio de microbiología para guiar la selección de la terapia antimicótica haya ganado mayor atención.⁹⁻¹²

A pesar de la experiencia acumulada y la aparición de nuevas preparaciones antifúngicas, el tratamiento de la infección por *Cryptococcus* está aún por resolverse. La alta incidencia de mortalidad y de recaídas indica la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas. No obstante, existen escasos estudios de correlación entre los resultados

de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* y la respuesta clínica al tratamiento anticriptocócico.^{12,13}

El método de microdilución en caldo recomendado por el CLSI permanece como método de referencia, no obstante, su incorporación a la rutina del laboratorio ha sido difícil y se han desarrollado otros métodos alternativos durante los últimos años.¹² Maxwell y otros, así como Aller y otros sugieren que la prueba de Etest pudiera ser una alternativa útil, por resultar de más fácil realización y sus resultados son tan confiables como los de las pruebas de microdilución en caldo.^{12,13}

El amplio uso del fluconazol, especialmente en los pacientes VIH positivos, pudiera generar una presión selectiva en el surgimiento de cepas menos sensibles a este antifúngico, sin embargo, hasta el momento los mecanismos de resistencia de *Cryptococcus* a los azoles no han sido claramente definidos y solo se ha reportado un escaso número de cepas de esta levadura resistente a estos.^{11,14-16} Los resultados de este trabajo no evidencian diferencias significativas entre los aislamientos a partir de pacientes con sida respecto al resto.

De las drogas estudiadas, el fluconazol mostró la menor actividad, que coincide con lo publicado internacionalmente.^{1,2,7} Reportes previos han demostrado la baja acción de este antimicótico *in vitro* frente a *C. neoformans*, por lo que los buenos resultados terapéuticos obtenidos han sido ampliamente atribuibles a la alta concentración que es capaz de alcanzar en el LCR.^{9,10}

Afortunadamente el arsenal antifúngico se ha incrementado en las 2 últimas décadas. El voriconazol es un nuevo triazol con actividad frente a aislamientos de *Candida*, incluidos aquellos con

resistencia *in vitro* al fluconazol.^{12,15} La favorable farmacocinética del voriconazol pudiera explicar los mejores resultados observados en ratas infectadas que han sido tratadas con esta droga, en comparación con aquellas que han recibido itraconazol. No obstante, su actividad frente a *C. neoformans* no ha sido suficientemente estudiada.^{15,16}

Estos resultados concuerdan con aquellos informados por Bava y Negroni,¹⁶ Fromtling y otros¹⁷ así como Franzot y otros¹⁸ que no encontraron diferencia significativa en la susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos ambientales y clínicos de *Cryptococcus* obtenidos en Argentina, Puerto Rico y Brasil, respectivamente.

En conclusión, los resultados aquí presentados sugieren que a pesar del amplio uso del fluconazol como terapia de mantenimiento en las personas con sida, la mayoría de las cepas de *Cryptococcus* estudiadas parecen ser susceptibles *in vitro* a esta droga. Por otra parte, los bajos valores de CMI encontrados frente al voriconazol demuestran que este es más activo que el fluconazol. No obstante, estos alentadores resultados necesitan ser confirmados mediante ensayos clínicos para dilucidar el papel de este nuevo antifúngico en el tratamiento de la infección criptocócica. Hoy día, cuando *Cryptococcus* ha emergido como un importante patógeno oportunista, los estudios de susceptibilidad *in vitro* constituyen una herramienta de gran utilidad en la determinación de la conducta terapéutica a seguir, con vistas a mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por esta micosis.

AGRADECIMIENTOS

A la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ISHAM, de sus siglas en inglés) así como al Hospital Canisius-Wilhelmina de Nijmegen, Países Bajos, los cuales financiaron este estudio.

In vitro susceptibility of isolated *Cryptococcus* strains to fluconazole and voriconazole

ABSTRACT

INTRODUCTION: invasive fungal infections have increased as a result of medical advances in the sphere of transplantation, cancer treatment, autoimmune diseases and AIDS fundamentally. *Cryptococcus* disease, infrequent before, holds the third place in

the incidence of severe mycosis in AIDS patients and it is also the most lethal. Up to the present, there exist few reports on the development of *Cryptococcus* resistance to antifungal products, however, it is foreseen that wide use of fluconazole might encourage the emergence of less susceptible strains. OBJECTIVES: given the importance of surveillance of antifungal susceptibility and of the evaluation of new therapeutical options, *in vitro* action of fluconazole and voriconazole on a high number of isolated *Cryptococcus* strains was determined through Etest method on clinical and environmental samples. METHODS: *in vitro* susceptibility to fluconazole and voriconazole of 159 *Cryptococcus* strains (117 from clinical samples and 42 from environmental sources of Central and Western regions in Cuba) was determined through Etest method. RESULTS: the studied isolates showed low MIC values, mainly susceptibility to voriconazole. Ranges, geometric means and modes were 0.031-128, 4.631 y 3 mg/mL for fluconazole and 0.003-8, 0.02 y 0.016 mg/mL for voriconazole, respectively. Although MIC values were generally higher than those of environmental isolates, there were no statistically significant differences ($p=0.05$) among strains according to their origin (clinical/environmental) or to their geographical location. CONCLUSIONS: this paper points out the importance of continuing this type of study for the detection of resistance to the most used drugs in anticryptococcus disease therapy as well as in the search of new strategies to treat this infection.

Key words: *Cryptococcus*, *in vitro* susceptibility, fluconazole, voriconazole, Etest.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aller AI, Claro R, Castro C, Serrano C, Colon MF, Martín-Mazuelo E. Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in HIV infected patients to fluconazole, itraconazole and voriconazole in Spain 1994-1996 and 1997-2005. *Chemotherapy*. 2007;53:300-5.
- Ren P, Jun L, Chin Y, Hsien J, Kuei W, Ming J. et al. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus* species from Taiwan: Surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:512-7.
- Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reigold AL, et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:3065-9.
- Saag MS, Graybill JR, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderky WG et al. Practice guidelines for the management of *Cryptococcus* disease. *Clin Infect Dis*. 2000;30:710-8.
- Fernández CM, González M, Illnait MT, Martínez GF. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Rev Cubana Med Trop*. 1998;50:48-53.
- Fernández CM, Pimentel T, Martínez GF, González M. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*. *Rev Cubana Med Trop*. 1999;51:55-7.
- Peman J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. [citado el 2 de febrero de 2008]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com>
- Pfaller MA, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream

- isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1875-80.
9. Chen SC, Sorrell TC. Antifungal agents. New drugs, old drugs. *Med J Aust.* 2007;187:404-9.
 10. Chang HC, Chang JJ, Chan SH, Huang AH, Wu TL, Lin MC, et al. Evaluation of Etest for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1328-33.
 11. Boschman CR, Bodnar UR, Tornatore MA, Obias AA, Noskin GA, Englund K, et al. Thirteen-year evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistant strains carried by cancer patients at a large medical centre. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:734-8.
 12. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ. Evaluation of Etest method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 2003;41:97-9.
 13. Aller AI, Martin-Mazuelos E, Gutierrez MJ. Comparison of the Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:997-1000.
 14. Sarl B, Monchy D, Vann M, Keo C, Sarthou1 JL, Buisson Y. Increasing *in vitro* resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* Cambodian isolates: April 2000 to March 2002. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:563-5.
 15. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, Greenberg RN, Dupont B, Torres-Cisneros J, et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis.* 2003;36:1122-31.
 16. Bava AJ, Negrón R. *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus* strains to 5 antifungal drugs. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989;31:346-50.
 17. Fromtling RA, Abruzzo GK, Ruiz A. Virulence and antifungal susceptibility of environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico. *Mycopathologia.* 1998;106:163-6.
 18. Franzot PS, Hamdan JS. *In vitro* susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to five antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:822-4.

Recibido: 4 de abril de 2008. Aprobado: 20 de mayo de 2008.
Dra. *María Teresa Illnait*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". AP 601, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: mtillnait@infomed.sld.cu