

# Determinación de sensibilidad y CMI de caspofungina en cepas multirresistentes de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* mediante la técnica de microdilución

Gerardo Becerra Victorio\*, Gabriela Carrillo Núñez\*, Arturo Plascencia\*\*, Carlos C. Rivera Mendoza\*\*, Fernando Velarde Rivera\*, Miguel Domínguez Hernández\*, Iván I. Hernández Cañaveral\*.

Susceptibility and MIC determination versus caspofungin in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* multiresistant isolates

Fecha de aceptación: agosto 2008

## Resumen

**Antecedentes.** Las cepas del género *Candida* han adquirido actualmente importancia como patógenos en infecciones nosocomiales debido a su capacidad de generar resistencia. Las equinocandinas son un grupo de antimicóticos de uso reciente, pero los equipos automatizados no contemplan aún la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) para estos fármacos.

**Objetivo.** Determinar la sensibilidad o resistencia, así como la CMI de caspofungina en cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* multirresistentes aisladas de pacientes con fungemias diseminadas.

**Material y métodos.** Se aislaron 10 cepas del género *Candida* resistentes a fluconazol, provenientes de pacientes pediátricos. Fueron subcultivadas, y estandarizadas para realizar el ensayo frente a caspofungina por la técnica de microdilución en placas de 96 pocillos, con base en el documento NCCLS M27-A2 en un medio RPMI con L-glutamina e indicador de pH amortiguado con MOPS. La CMI fue definida como la concentración menor a la cual no hubo crecimiento visible después de 24, 48 y 72 horas de incubación a 35°C y 37°C.

**Resultados.** Después de 48 horas del ensayo a 35°C, las CMI para *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron similares con un valor de 0.625 µg/ml. No hubo resistencia a caspofungina en ninguna de las muestras.

**Conclusión.** Identificamos las mejores condiciones para determinar la sensibilidad y las CMI de *C. albicans* y *C. tropicalis* mediante la técnica de microdilución para caspofungina.

**Discusión.** La caspofungina ha sido usada como alternativa en pacientes con fungemias diseminadas con cepas de *Candida* resistentes a los tratamientos usuales. Generalmente este tipo de fungemias se trata con anfotericina B, la cual presenta una serie de efectos adversos, que las equinocandinas no tienen y que incluso exhiben propiedades farmacocinéticas favorables, dependientes de la dosis.

**Palabras clave:** Resistencia, caspofungina, *Candida*, CMI

## Abstract

**Background.** The strains of the genus *Candida* have currently acquired importance as pathogens in nosocomial infections because of their ability to generate resistance. Echinocandins are a group of antifungals of recent use, but the automated equipment still does not observe the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) for these drugs.

**Material and method.** We isolated 10 strains of the genus *Candida* resistant to fluconazole from pediatric patients. They were subcultivated, and standardized to perform the test against caspofungin by microdilution technique in 96-well plates, with a RPMI medium with L-glutamine and a pH indicator buffered with MOPS (based on the document NCCLS M27-A2). MIC was defined as the lowest concentration in which there is no growth after 24, 48, and 72 hours of incubation at 35°C and 37°C.

**Results.** After 48 hours of the assay at 35°C. MIC was 0.615 µg/ml for *C. albicans* and *C. tropicalis*. There is no resistance to caspofungin in any of the samples.

**Conclusion.** We identified the better conditions for the determination of sensibility and MIC of *C. albicans* and *C. tropicalis* through the technical of microdilution for caspofungin.

**Discussion.** Caspofungin has been used as an alternative for the treatment of disseminated fungemias with strains of the genus *Candida* with resistance to usual treatment. Commonly this type of fungemia is treated with amphotericin B, which presents a range of adverse effects, that echinocandins do not have and exhibit favorable pharmacokinetic properties, depending on the dose.

**Key words:** Resistance, caspofungin, *Candida*, MIC, Echinocandins

\*Departamento de Microbiología y Patología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

\*\*Servicio de Infectología Pediatría, Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde".

## Introducción

*C. albicans* y *C. tropicalis* son las levaduras más frecuentemente aisladas en casos de fungemia diseminada.<sup>1</sup> El uso indiscriminado de antimicóticos ha ido generando cepas resistentes de estas levaduras, lo cual complica el tratamiento.<sup>2,3</sup> Afortunadamente, las equinocandinas conforman un grupo de antimicóticos de amplio espectro que han demostrado una buena eficacia terapéutica contra cepas resistentes.<sup>4,5</sup> Sin embargo, los equipos automatizados habitualmente no contemplan aún la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de estos fármacos, y las condiciones óptimas no han sido establecidas, por lo cual es necesario usar la técnica de microdilución para determinar la sensibilidad o resistencia de estas levaduras a la caspofungina.<sup>6</sup>

## Objetivo

Determinar la sensibilidad o resistencia, así como la CMI de cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* multirresistentes aisladas de pacientes con fungemias diseminadas.

## Material y métodos

### Aislamiento de las levaduras

Se identificaron 10 cepas del género *Candida* resistentes a fluconazol; seis fueron *C. albicans* y cuatro *C. tropicalis*. Se aislaron y subcultivaron cepas provenientes de pacientes pediátricos con fungemias diseminadas en el Servicio de Infectología Pediatría del Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde" en la ciudad de Guadalajara.

### Estandarización del inóculo

El inóculo fue preparado por el método espectrofotométrico. Probando lo sugerido por los lineamientos del NCCLS [siglas en inglés para Comité Nacional de Normas para Laboratorios Clínicos] de:  $0.5-2.5 \times 10^3$ , y dos de mayor densidad de:  $1-5 \times 10^4$  y  $1-5 \times 10^5$ .<sup>6</sup>

### Prueba de susceptibilidad

La prueba de susceptibilidad fue evaluada por triplicado de acuerdo con los lineamientos del CLSI [siglas en inglés para Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio] con base en el documento NCCLS M27-A2, utilizando un medio RPMI con L-glutamina y un indicador de pH amortiguado con MOPS.<sup>6,7</sup>

La sensibilidad y la CMI fueron determinadas por la técnica de microdilución en placas de 96 pocillos con medio RPMI y los inóculos previamente mencionados. Se usaron concentraciones descendentes de caspofungina y determinamos la CMI en el pozo con ausencia de turbidez.

La CMI fue definida como la concentración menor a la cual no hubo crecimiento visible después de 24, 48 y 72 horas de incubación a 35°C y 37°C.

## Resultados

El tiempo óptimo de evaluación fue a las 48 horas del ensayo, a una temperatura de 35°C; la densidad sugerida por el CLSI es suficiente, aunque es más evidente con el inóculo de  $1-5 \times 10^4$ .

Las CMI para *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron similares con un valor de  $0.625 \mu\text{g/ml}$ . No hubo resistencia a caspofungina en ninguna de las muestras.

## Conclusión

Identificamos las mejores condiciones para determinar la sensibilidad y las CMI de *C. albicans* y *C. tropicalis* mediante la técnica de microdilución para caspofungina.

## Discusión

La caspofungina está autorizada e indicada para el tratamiento de candidiasis orofaríngea y esofágica, así como de candidemia intraabdominal, peritonitis e infecciones del espacio pleural.<sup>8,9</sup> La caspofungina ha sido usada como alternativa en pacientes con fungemias diseminadas con cepas de *Candida* resistentes a los tratamientos usuales. Generalmente este tipo de fungemias se tratan con anfotericina B, la cual presenta una serie de efectos adversos, que las equinocandinas no tienen y que incluso exhiben propiedades farmacocinéticas favorables, dependientes de la dosis.<sup>10,11</sup>

## Bibliografía

1. Hernández Hernández Francisca. "Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México". *Salud Pública Méx* 2003; 45(6): 455-460.
2. Cantón E, Pemán J, Bosch M, Viudes A, Gobernado M. "Actividad del voriconazol sobre levaduras aisladas de hemocultivo determinada por dos métodos". *Rev Esp Quimioter* 2005;18:308-312.
3. Saunus JM, Kazoullis A, Farah CS. "Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections". *Front Biosci* 2008;13:5345-58.
4. Claudia Wagner *et al.* "The Echinocandins: Comparison of Their Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Applications". *Pharmacology* 2006;78:161-177.
5. Sobel JD, and Sanjay G. Revankar. "Echinocandins — First-Choice or First-Line Therapy for Invasive Candidiasis?" *N Engl J Med* 2007;24 (356):2525-2526.
6. Murray, Patrick R *et al.* *Manual of Clinical microbiology*. 9ª ed. Washington, DC: ASM Press, 2007, vol. 2, pp. 1954-1971.
7. Jacobsen Mette D; Whyte Julie A; Odds Frank C. "*Candida albicans* and *Candida dubliniensis* respond differently to Echinocandin Antifungal Agents In Vitro". *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007;5(51):1882-1884.
8. Lichtenstern C, Nguyen TH, Schemmer P, Hoppe-Tichy T, Weigand MA. "Efficacy of caspofungin in invasive candidiasis and candidemia-de-escalation strategy". *Mycoses* 2008;(51)Suppl 1:35-46.
9. Kauffman CA, Carver PL. "Update on echinocandin antifungals". *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2008;29(2):211-9.
10. Balani SK *et al.* "Metabolites of caspofungin acetate, a potent antifungal agent, in human plasma and urine". *Drug Metab Dispos* 2000;28: 1274-1278.
11. J Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, Hesney M, Winchell GA, Deutsch PJ, Greenberg H, Hunt TL, Waldman SA. "Single- and Multiple-Dose Pharmacokinetics of Caspofungin in Healthy Men". *Antimicrob agents and chemother* 2002;46(3):739-745.