

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE UN NUEVO
ANTIFÚNGICO EN HONGOS DE INTERÉS CLÍNICO**

GUADALUPE CHARRIEL RODRÍGUEZ

Tesis Doctoral

CÓRDOBA, Junio 2003

DIRECTORES

Prof.^a. Dra. D.^a. MARÍA JOSÉ LINARES SICILIA
Pofesora Titular de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina de Córdoba

Prof. Dr. D. FRANCISCO SOLÍS CUESTA
Pofesor Titular de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina de Córdoba

Prof. Dr. D. MANUEL CASAL ROMÁN
Catedrático de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina de Córdoba

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. D. Manuel Casal Román, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba, Director de este trabajo, por permitirme realizarlo en esta Cátedra y por todas las facilidades puestas a mi disposición a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral.

A los Profesores Dra D^a. María José Linares Sicilia, Tutora de esta Tesis, y Dr. D. Francisco Solís Cuesta, ambos Profesores Titulares del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba, no sólo por su dirección y orientación en la realización de esta Tesis, sino también por el tiempo dedicado y el constante estímulo y apoyo sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

A D^a. Josefa González López, Técnico Especialista de Laboratorio, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba, por la desinteresada colaboración en el trabajo diario del laboratorio, así como su disponibilidad personal y su amable trato.

Al Dr. Esteban Tarrada Merino, por la ayuda prestada en la realización iconográfica de este trabajo.

A los compañeros y personal auxiliar de este Departamento por su colaboración.

ÍNDICE

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	7
I.1. GENERALIDADES.....	7
I.2. ANTIFÚNGICOS.....	9
I.2.1. Polienos.....	11
I.2.1.1. Anfotericina B.....	11
I.2.1.2. Nistatina.....	12
I.2.2. Lipopéptidos.....	13
I.2.2.1. Caspofungina.....	13
I.2.2.2. Anidulafungina.....	14
I.2.3. Azoles.....	15
I.2.3.1. Itraconazol.....	16
I.2.3.2. Fluconazol.....	17
I.2.3.3. Genaconazol.....	18
I.2.3.4. Saperconazol.....	19
I.2.3.5. Posaconazol.....	19
I.2.3.6. Ravuconazol.....	19
I.2.3.7. Otros nuevos triazoles.....	20
I.2.4. Voriconazol	21
I.2.4.1. Estructura química.....	21
I.2.4.2. Farmacocinética y metabolismo.....	22

I.2.4.3. Microbiología.....	23
I.2.4.4. Indicaciones de voriconazol.....	25
I.2.4.5. Efectos adversos.....	26
I.3. TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS.....	28
I.3.1. HONGOS LEVADURIFORMES:.....	28
I.3.1.1. Métodos cuantitativos:.....	28
I.3.1.1.1. Método de Referencia M27-A:.....	28
a). Método de microdilución.....	28
b). Método de macrodilución.....	30
I.3.1.1.2. Sensititre Yeast One.....	30
I.3.1.1.3. ASTY colorimetric panel.....	30
I.3.1.1.4. Etest®.....	31
I.3.1.1.5. Dilución en Agar.....	32
I.3.1.2. Métodos semicuantitativos:.....	32
I.3.1.2.1. Candifast.....	32
I.3.1.2.2. Mycototal.....	33
I.3.1.2.3. ATB Fungus.....	33
I.3.1.2.4. CHROMAgar Candida más fluconazol.....	33
I.3.1.3. Métodos cualitativos:.....	34
I.3.1.3.1. Difusión de discos.....	34
I.3.1.3.2. Fungitest.....	34

I.3.2. HONGOS FILAMENTOSOS:.....	35
I.3.2.1. Métodos cuantitativos:.....	35
I.3.2.1.1. Método de Referencia M38-P:.....	35
a). Método de Microdilución.....	35
b). Método de Macrodilución.....	36
I.3.2.1.2. Sensititre Yeast One.....	36
I.3.2.1.3. Etest®.....	36
I.3.2.1.4. Dilución en Agar.....	37
I.3.2.2. Métodos cualitativos:.....	37
I.3.2.2.1. Difusión en discos.....	37
II. OBJETIVOS.....	38
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
III.1. MATERIAL.....	39
III.1.1. Recogida e identificación de cepas.....	39
III.1.2. Aislamientos fúngicos.....	48
III.1.3. Agentes antifúngicos.....	48
III.1.3.1. Método NCCLS.....	49
III.1.3.2. Método Sensititre Yeast One.....	49
III.1.3.3. Medio CHROMAgar Candida más fluconazol.....	49

III.1.4. Medios de cultivo.....	50
III.1.4.1. Método NCCLS.....	50
III.1.4.2. Método Sensititre Yeast One.....	50
III.1.4.3. Medio CHROMAgar Candida más fluconazol.....	50
 III.2. MÉTODOS.....	 51
III.2.1. Método de microdilución para Hongos Levaduriformes (M27-A):.....	 51
III.2.1.1. Preparación de la solución madre de fluconazol y voriconazol.....	 51
III.2.1.2. Preparación de las diluciones de fluconazol y voriconazol.....	 51
III.2.1.3. Llenado de las placas.....	58
III.2.1.4. Preparación del inóculo.....	59
III.2.1.5. Inoculación de las placas.....	61
III.2.1.6. Control de pureza del cultivo.....	61
III.2.1.7. Incubación de las placas.....	62
III.2.1.8. Lectura e interpretación de los resultados.....	62
III.2.2. Método Sensititre Yeast One:.....	64
III.2.2.1. Fundamento.....	64
III.2.2.2. Preparación del inóculo.....	64
III.2.2.2.1. Hongos levaduriformes.....	64
III.2.2.2.2. Hongos filamentosos.....	65
III.2.2.3. Inoculación del panel.....	65

III.2.2.4. Incubación.....	65
III.2.2.5. Control del inóculo.....	65
III.2.2.6. Lectura.....	66
III.2.3. Medio CHROMAgar Candida más fluconazol:.....	68
III.2.3.1. Preparación del inóculo.....	68
III.2.3.2. Inoculación de las placas e incubación.....	68
III.2.3.3. Lectura e interpretación de los resultados.....	68
III.2.4. Controles de calidad de los tres procedimientos.....	70
IV. RESULTADOS.....	72
IV.1. CHROMAgar Candida más fluconazol: Comparación con técnicas de microdilución.....	72
IV.2. Investigación de la sensibilidad de <i>Candida</i> spp. a voriconazol mediante dos métodos de microdilución.....	78
IV.3. Estudio de sensibilidad de hongos filamentosos a seis antifúngicos mediante una técnica de microdilución: Sensititre Yeast One.....	81
V. DISCUSIÓN.....	90
V.1. CHROMAgar Candida más fluconazol: Comparación con técnicas de microdilución.....	90
V.2. Investigación de la sensibilidad de <i>Candida</i> spp. a voriconazol mediante dos métodos de microdilución.....	96
V.3. Estudio de sensibilidad de hongos filamentosos a seis antifúngicos mediante una técnica de microdilución: Sensititre Yeast One.....	100

VI. CONCLUSIONES.....	107
VII. RESUMEN. PALABRAS CLAVE.....	109
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	112

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. GENERALIDADES

Las micosis invasoras en pacientes inmunodeprimidos o con tratamientos médico quirúrgicos se han incrementado en los últimos años (129). Estas infecciones se acompañan de una elevada morbi-mortalidad al incidir la mayoría de ellas sobre pacientes inmunocomprometidos por distintas causas: pacientes sometidos a quimioterapia antineoplásica, tratados con corticoterapia y fundamentalmente los afectos de SIDA.

Muchos de los hongos emergentes originan problemas de resistencia intrínseca a los antifúngicos clásicos mientras que simultáneamente aparecen resistencias *in vitro* secundarias, o aislamientos clínicos resistentes pertenecientes a especies que eran sensibles, como en el caso de *Candida albicans* frente a fluconazol en los pacientes infectados por el VIH con candidiasis orofaríngea (106). A ello ha contribuido el amplio uso del fluconazol en el tratamiento y prevención de infecciones por levaduras que ha incrementado la detección de éstas con susceptibilidad disminuida al fluconazol (103).

El aumento de resistencias crea la necesidad de usar nuevos antifúngicos.

Los nuevos antifúngicos, entre los que se encuentra el voriconazol (24) suponen una mejora de la eficacia clínica y paralelamente una reducción de la toxicidad.

La mayor disponibilidad de antifúngicos, hace necesario caracterizar su potencia, es decir determinar los valores de actividad *in vitro* frente a distintos patógenos. De este modo se pretende establecer la posible eficacia clínica orientando así al clínico en su decisión terapéutica (83).

En 1997, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicó el documento M27-A, en él se propone un método de dilución en medio líquido para las pruebas de susceptibilidad antifúngica de levaduras y organismos levaduriformes, sobre todo de *Candida spp.* y *Cryptococcus neoformans* (94).

Posteriormente en 1998, la necesidad de disponer de un protocolo para el estudio de la sensibilidad frente a hongos filamentosos, propició la aparición del documento M38-P (95).

Sin embargo la laboriosidad y complejidad de los métodos estandarizados es poco compatible con las características del laboratorio de Microbiología de tipo medio y la creciente demanda de este tipo de ensayos. Se trata de métodos poco prácticos desde el punto de vista rutinario y no carentes de cierta dificultad en la interpretación. De esta forma, son necesarias alternativas que sean más accesibles y eficientes, de ahí la aparición de métodos comerciales de sencilla y rápida ejecución como el Sensitre Yeast One (45).

I.2. ANTIFÚNGICOS

Avances significativos en la terapia antifúngica han ocurrido en los últimos 13 años. La industria farmacéutica ha realizado un enorme esfuerzo en busca de nuevas drogas cada vez más eficaces y seguras. Muchos de estos avances han sido vinculados a la introducción de los triazoles: itraconazol, fluconazol y posteriormente los nuevos triazoles, entre los que se encuentra el voriconazol (70).

Los antifúngicos podemos clasificarlos atendiendo a su estructura química, o a su lugar de acción (133).

- Según su estructura química, pueden clasificarse en:

1. Polienos: Anfotericina B, Nistatina, etc.
2. Tiocarbamatos: Tolfnatato, Tolciclato.
3. Alilaminas: Naftifina, Terbinafina.
4. Imidazoles: Ketoconazol, Miconazol, etc.
5. Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Ravuconazol, Posaconazol, etc.
6. Nucleósido- péptidos: Polioxina D, Nikkomicina.
7. Péptidos: Tetaína.
8. Lipopéptidos: Equinocandinas, Cilofungina.
9. Glucopéptidos: Papulocandina.
10. No clasificados: 5- fluorocitosina, Griseofulvina.

- Según su lugar de acción (tomada de G. San Blas (127), modificada de Kerridge a la cual se ha añadido los nuevos antifúngicos), los antifúngicos se clasifican en:

1. Sobre el núcleo:

1.1. Síntesis defectuosa de RNA: 5- fluorocitosina.

1.2. Disrupción del huso cromático: Griseofulvina.

2. Sobre la membrana citoplasmática:

2.1. Sobre la integridad física de la membrana: Polienos.

2.2. Sobre la síntesis de ergosterol de la membrana:

2.2.1. Por inhibición de escualeno epoxidasa:

a) Alilaminas: Naftifina, Terbinafina.

b) Tiocarbamatos: Tolnaftato, Tolciclato.

2.2.2. Por inhibición de 14 alfa demetilasa del lanosterol: azoles.

a) Imidazoles: Ketoconazol, Miconazol, etc.

b) Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Ravuconazol, Posaconazol, etc.

3. Sobre la pared celular:

3.1. Síntesis de quitina:

a) Nucleósido- péptidos: Polioxina D, Nikkomicina.

b) Péptidos: Tetaina.

3.2. Síntesis de glucano:

a) Lipopéptidos: Equinocandinas, Aculeacina, Cilofungina.

b) Glucolípidos: Papulocandina B.

Haciendo referencia a los principales grupos donde hoy se centra la investigación, destacamos

I.2.1. POLIENOS

Los antifúngicos más representativos de este grupo son la nistatina y la anfotericina B, con una gran actividad frente a un amplio espectro de patógenos, entre ellos, *Candidas* que no responden a los azoles, *Histoplasma capsulaatum*, *Coccidioides immitis* y *Blastomyces dermatitidis*, entre otros, solo limitados en su uso terapéutico por los efectos tóxicos (19, 70).

Para reducir su toxicidad sin afectar a su eficacia, se buscan nuevas formulaciones y vías de administración, como la encapsulación en el interior de liposomas o partículas lipídicas y otros.

I.2.1.1. Anfotericina B:

A pesar de su nefrotoxicidad y efectos adversos constituye el fármaco de elección en la mayoría de las micosis sistémicas graves, especialmente en enfermos inmunocomprometidos (61) y continúa siendo el estándar con el que se comparan los nuevos antifúngicos.

La asociación con lípidos facilita los tratamientos de larga duración de anfotericina disminuyendo su toxicidad (20).

Las nuevas formulaciones como la anfotericina B-liposomal y el complejo lipídico de anfotericina B están aportando verdaderas ventajas en clínica condicionadas únicamente por la relación coste-beneficio del tratamiento concreto (20, 123, 137).

Su uso está recomendado en los tratamientos de larga duración de micosis graves refractarias al tratamiento antifúngico convencional o bien cuando la anfotericina B desoxicolato está contraindicada por problemas de toxicidad (19).

I.2.1.2. Nistatina:

La indicación terapéutica principal son las candidiasis mucocutáneas (rinofaríngeas, digestivas y vulvovaginales). En candidiasis sistémicas se emplea con la finalidad de esterilizar el tracto gastrointestinal, punto de partida de la diseminación.

Las nuevas formulaciones liposomales de nistatina han demostrado ser efectivas en el 60 % de los episodios de candidiasis refractarios a anfotericina B, fluconazol y/o 5-fluorocitosina. Tiene menor toxicidad que anfotericina B (67).

I.2.2. LIPOPEPTIDOS.

Son sustancias de origen fúngico. Todas ellas presentan un mecanismo de acción común sobre la membrana celular, haciéndola muy frágil y favoreciendo su lisis, aún no siendo el principal lugar de acción y sin descartar la existencia de otras dianas.

De la amplia variedad de familias dentro de este grupo, ha prosperado la investigación sobre las equinocandinas, destacando como novedades importantes: caspofungina, anidulafungina y micafungina (54).

I.2.2.1. Caspofungina (MK-0991 ó L-743,872):

Es un aminoderivado hidrosoluble perteneciente a una amplia familia de sustancias relacionadas con las pneumocandinas (12).

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de β -(1,3)-D-glucano, componente esencial de la pared celular de muchos hongos, al alterar la función de la glucano sintetasa (9). Este proceso de síntesis de la pared celular de los hongos no se produce en los mamíferos.

Dependiendo de la concentración se comporta como fungistático o fungicida (39). Los tejidos donde alcanza mayor concentración son hígado, riñón e intestino grueso. Se alcanzan niveles fungicidas tras la administración de una dosis única diaria, debido a su elevada vida media, amplia distribución y lenta acumulación en tejidos (58).

Se muestra superior a los azoles tanto en cepas sensibles como resistentes a éstos del género *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*) (6, 134). Ha presentado una actividad limitada *in vitro* frente a *C. neoformans* (73). Útil en infecciones producidas por *Pneumocystis carinii* en pacientes inmunocomprometidos, en las esofagitis candidiásicas en pacientes infectados por el V.I.H., así como en

aspergilosis pulmonar invasora que no han respondido al tratamiento antimicótico convencional o que no toleran dicho tratamiento (119).

I.2.2.2. Anidulafungina (LY- 303366):

Sustancia semisintética derivada de la equinocandina cilofungina pero con un espectro de acción y toxicidad más favorable.

Su mecanismo de acción es similar a la caspofungina. Su biodisponibilidad oral es superada por un análogo suyo, la enfumafungina (105).

La actividad antifúngica *in vitro*, fungicida o fungistática según los casos, es elevada frente a *Candida* (en aislamientos sensibles o no al fluconazol), *Aspergillus* spp. y *P. carinii* pero no frente a *C. neoformans* (2, 44). Es un buen candidato en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea en pacientes infectados por el V.I.H. (44).

I.2.3. AZOLES.

Un grupo de antifúngicos, los azoles, han tenido un gran impacto en la terapia de infecciones fúngicas debidas a levaduras, sin embargo su utilidad clínica contra los hongos filamentosos ha sido limitada (104), de ahí la necesidad de buscar nuevos azoles.

Haciendo una breve reseña acerca de los azoles, comentaremos que fue en 1969 cuando dos empresas farmacéuticas, Bayer AG y Janssen Pharmaceutica, introdujeron en el mercado, tras largas investigaciones, dos nuevos agentes antifúngicos, clotrimazol y miconazol respectivamente (56, 133). De ellos fue el clotrimazol el primero en introducirse en la clínica, por lo cual, se considera el primer antifúngico azólico.

En 1977 aparece el ketoconazol, primero de su grupo en ser activo por vía oral. Posteriormente irrumpen en clínica: fluconazol, itraconazol y otros azoles, con buena tolerancia, absorción oral y eficacia frente a micosis tanto superficiales como sistémicas (10).

Este grupo de fármacos podemos clasificarlos en función de su desarrollo histórico y sus funciones (99).

a). “Primera generación”: incluyen derivados imidazólicos activos por vía tópica. Comprende una larga lista.

b). “Segunda generación”: lo constituyen imidazoles N- sustituidos activos por vía oral. El más importante del grupo es el ketoconazol.

c). “Tercera generación”: este grupo lo forman los derivados triazólicos.

Todos ellos poseen un mecanismo de acción común que consiste en la inhibición de la enzima 14 α -demetilasa del lanosterol dependiente del citocromo P-450 bloqueando la síntesis de ergosterol, principal esterol constituyente de la membrana celular del hongo (26, 88, 127). Sin embargo, según el antifúngico encontramos distinta afinidad frente a la enzima 14 α -demetilasa presente en los

mamíferos que interviene en la síntesis tanto del colesterol como de las hormonas esteroideas (testosterona y cortisol) (127). Esto limita el uso de algunos de ellos. En este sentido los derivados triazólicos muestran una mayor selectividad por la enzima del hongo (127). Son fungistáticos a bajas concentraciones mientras que a concentraciones más elevadas se comportan como fungicidas por acción directa sobre la membrana celular del hongo (26, 88).

A continuación haremos una reseña de los más importantes.

I.2.3.1. Itraconazol (R- 51211):

Antifúngico del grupo de los triazoles, muy similar al ketoconazol pero con el que mantiene claras diferencias, Sus propiedades farmacocinéticas y mecanismo de acción son similares al fluconazol pero con la diferencia de que itraconazol es muy lipofílico (5, 31).

Se administra vía oral, teniendo buena absorción, el tomarlo con alimentos ricos en lípidos o inmediatamente después de la ingesta aumenta su biodisponibilidad. Precisa de la acidez gástrica para su absorción, al igual que ketoconazol (5, 56).

Circula unido a proteínas plasmáticas aproximadamente el 99,8 % de la droga y alcanza concentraciones tisulares mayores que las plasmáticas, fundamentalmente en tejido adiposo, piel y anejos. Por el contrario, los niveles alcanzados en orina y LCR son mínimos (60, 132).

Metabolismo hepático, produciéndose más de 30 metabolitos. En caso de Insuficiencia renal no precisa ajuste de dosis, y sus niveles no se ven afectados por la hemólisis ni diálisis peritoneal (5, 56, 132).

Este antifúngico presenta actividad frente a *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pityrosporum* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* y hongos dematiáceos (5, 60). Está indicado en el tratamiento de candidiasis sistémicas y superficiales (candidiasis orofaríngea y vulvovaginal), dermatomicosis (pitiriasis versicolor y

tiñas), aspergillosis, histoplasmosis, criptococosis, blastomicosis y esporotricosis (60, 132).

Los efectos secundarios más frecuentes que presenta el itraconazol son los digestivos: náuseas, vómitos, diarreas y malestar abdominal. También puede presentar anorexia, prurito, rash y cefalea. En ocasiones se ha observado elevación de las enzimas hepáticas y más raramente hepatitis sintomática (5, 132). Se ha descrito un caso de hipermineralocorticismo (5, 56).

I.2.3.2. Fluconazol (UK- 49,858):

Agente antifúngico bis-triazólico, la presencia de un segundo anillo triazólico eleva su potencia y resistencia a la degradación metabólica.

▪**Farmacocinética:** Se caracteriza por su bajo peso molecular, su escasa unión a proteínas plasmáticas (11 %) y solubilidad en agua (35, 37, 60) haciendo posible su administración tanto por vía oral como intravenosa. Su absorción oral es casi completa (> 90 %) con una biodisponibilidad del 94 % respecto a la forma intravenosa, no viéndose afectada la absorción por alimentos o modificadores del pH gástrico (57, 69) aunque si puede retrasarse.

Difunde bien a todos los fluidos corporales incluyendo LCR, humor acuoso, saliva, esputo y secreción vaginal (55). Se elimina fundamentalmente por orina, un 80 % de la dosis sin modificar y un 11 % en forma de metabolitos (37, 55).

La semivida plasmática de fluconazol oscila entre 27 y 37 horas. Esto junto a la resistencia a ser metabolizado permite su administración una sola vez al día (69).

▪**Mecanismo de acción:** Al igual que otros agentes antifúngicos imidazólicos, actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol, componente esencial de las membranas fúngicas, mediante la inhibición de la enzima 14 α -demetilasa del lanosterol dependiente del citocromo P-450. Sin embargo, a diferencia de otros imidazoles como el ketoconazol muestra menor afinidad por los sistemas enzimáticos de

mamíferos dependientes del citocromo P-450 (60). La enzima 14 α -demetilasa dependiente del citocromo P-450 en los mamíferos, media en la síntesis de colesterol, componente fundamental de las células. Por este motivo, los antifúngicos imidazólicos pueden presentar cierta toxicidad para las células de mamíferos, disminuyendo la síntesis de colesterol. Esto no se observa con la administración de fluconazol.

A diferencia de ketoconazol, tampoco se aprecia tras la administración de fluconazol, interferencia en la síntesis de hormonas androgénicas y esteroides suprarrenales.

▪Farmacodinámica: Fluconazol se ha mostrado eficaz frente a infecciones causadas por *Candida*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Histoplasma*. Es menos activo frente a *Aspergillus* y algunas especies de *Candida* como *C. glabrata* y *C. krusei* (61). Otra característica importante de fluconazol es que no altera de forma negativa la respuesta inmunitaria.

I.2.3.3. Genaconazol (SCH 39304):

Genaconazol es un potente agente antifúngico triazólico que es activo tanto por vía oral como por vía tópica (71).

Sus características farmacocinéticas y mecanismo de acción son similares al itraconazol y fluconazol (131).

Obtenido por la combinación de dos enantiómeros, RR (SCH 42427) y SS (SCH 42426), siendo el primero el que le confiere la actividad antifúngica (78). Puede ser administrado vía oral o endovenosa y se une a proteínas plasmáticas en un 10-15 %. Muy soluble en lípidos y parcialmente soluble en agua. Posee una buena penetración tisular incluido LCR. Se excreta por riñones el 60 % en forma activa (56). A altas dosis reduce el número de *Aspergillus fumigatus* viables en los tejidos pulmonares (1).

Los estudios realizados en modelos animales parecen otorgarle una mayor eficacia y un espectro de actividad mayor que el de fluconazol.

I.2.3.4. Saperconazol (R-66905):

Antifúngico triazólico que contiene un anillo 2, 4 difluorofenil altamente lipofílico. Actividad *in vitro* frente a *Candida* y *Aspergillus*. También es activo frente a *Malassezia*, *Cryptococcus* y hongos dimórficos (131). Administración vía oral y parenteral. Actividad sinérgica con 5-fluorocitosina (60).

I.2.3.5. Posaconazol (SCH-56592):

Triazol con mejor patrón de actividad antifúngica que fluconazol e itraconazol, incluso frente a hongos con resistencia primaria o secundaria a fluconazol como son *Candida krusei* y algunas especies de *Aspergillus* (7, 48). Presenta una excelente eficacia en el tratamiento de candidiosis sistémicas y vaginales, aspergilosis sistémica y pulmonar, histoplasmosis, blastomicosis, dermatofitosis, criptococosis diseminada, coccidioidomicosis e incluso algunas infecciones por protozoos, como tripanosomiasis (27, 110).

Buena biodisponibilidad que se puede incrementar al vehiculizarse con ciclodextrina para su administración oral (81). El órgano donde alcanza mayor concentración es el pulmón.

La obtención, en las primeras 24 horas tras la administración, de niveles en suero superiores a la CMI de muchos hongos así como su actividad frente a *Aspergillus*, algo superior a la de voriconazol hacen de este azol una buena elección como tratamiento en infecciones fúngicas resistentes a otros azoles (14).

I.2.3.6. Ravuconazol (BMS- 207147):

Su mecanismo de acción es similar al de itraconazol.

Presenta actividad fungicida frente a *C. neoformans*, superior a voriconazol e itraconazol. Eficaz en el tratamiento de infecciones producidas por algunas especies de *Aspergillus*, *Candida*, *Microsporum*, *Trichophyton* e hifomicetos hialinos (140).

I.2.3.7.Otros Nuevos Triazoles:

Existen otros compuestos de este grupo como: ER-30346 y D-0870, derivados del fluconazol; así como T-8581, UR-9746, UR-9751 que se encuentran aún en investigación (56, 104).

D-0870 es otro triazol que ha mostrado eficacia contra especies de *Candidas* resistentes a fluconazol y otros hongos oportunistas ha sido evaluado en el tratamiento de candidosis oroesofágicas resistentes a fluconazol en pacientes con VIH, siendo bien tolerado y eficaz (21).

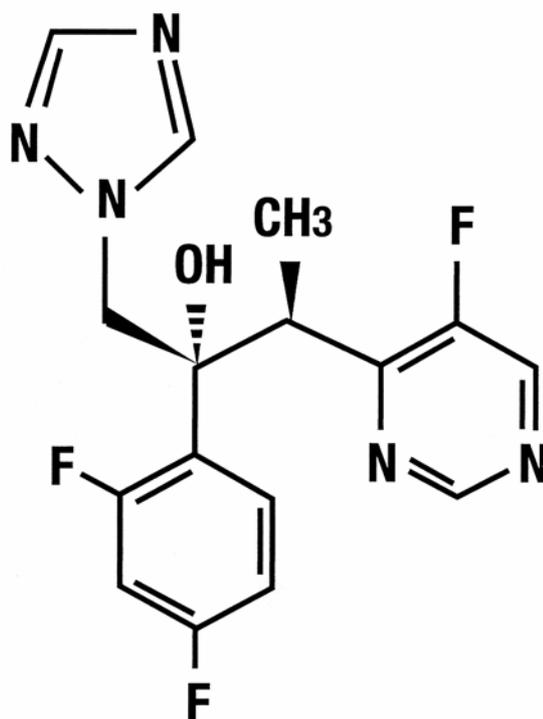
Syn-2869 muestra una buena actividad, comparable a itraconazol, frente a hongos dematiaceos (68).

Por su marcada importancia en este estudio, dedicaremos a continuación un apartado especial al voriconazol.

I.2.4. VORICONAZOL(UK-109,496).**I.2.4.1. Estructura química:**

Voriconazol es un nuevo antifúngico triazol. Su nombre químico es (2R, 3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoro-4-pirimidinil)-1-(1H-1, 2, 4-triazol-1- y 1)-2 butanol. La fórmula química que le corresponde es $C_{16}H_{14}F_3N_5O$ y el peso molecular 349,3 Da (24).

Figura 1.- Estructura química del voriconazol.



I.2.4.2. Farmacocinética y metabolismo:

Después de la administración oral, voriconazol se absorbe rápidamente, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) entre 1 y 2 horas, si se realiza en ayunas, ya que los alimentos con alto contenido graso reducen la C_{max}. Sin embargo, las modificaciones del pH gástrico no afectan la absorción del fármaco (51).

La biodisponibilidad absoluta de voriconazol es alta, aproximadamente del 96 %, lo cual permite la sustitución de la administración intravenosa por la vía oral cuando la evolución clínica lo permita.

La unión a proteínas plasmáticas es moderada, se estima en un 58 %. El elevado volumen de distribución sugiere una distribución amplia en los diferentes tejidos, lo cual es especialmente útil en el tratamiento de una gran número de infecciones fúngicas invasivas (51).

Voriconazol se metaboliza principalmente en el hígado por las isoenzimas del citocromo P-450: CYP2C9 y CYP3A4. Se transforma en más de 8 metabolitos diferentes, siendo el más frecuente el derivado N-óxido, que supone el 72 % de los metabolitos, sin apenas actividad antifúngica. Se elimina en orina aproximadamente el 80 % en forma de metabolitos y menos del 2 % sin modificar (51).

Al igual que otros azoles de metabolización hepática, la farmacocinética de voriconazol no es lineal (57). La administración de dosis crecientes de voriconazol produce concentraciones superiores a lo esperado proporcionalmente, debido a la saturación de las enzimas hepáticas. Existen factores que pueden influir sobre la farmacocinética del voriconazol como el sexo, la edad y diferencias genéticas (raza y genotipos de la isoenzima CYP2C19 del citocromo P450), sin embargo no es preciso ajustar la dosis en relación con ellos. Es necesario considerar poblaciones especiales en cuanto a la dosis de fármaco a administrar:

- Los niños tienen mayor capacidad de eliminar voriconazol que los adultos, en relación con el peso corporal.

▪En casos de insuficiencia hepática leve a moderada, se recomienda administrar igual pauta de dosis de carga pero dividir a la mitad la dosis de mantenimiento.

▪No es necesario ajustar la dosis de voriconazol por vía oral cuando los pacientes presentan insuficiencia renal de leve a grave. Sin embargo se ha observado acumulación del excipiente de la formulación intravenosa, SBECD (sulfobutil-éter- β -ciclodextrina), por eso en estos pacientes debe emplearse la administración oral.

Voriconazol se metaboliza en diferentes isoenzimas hepáticas, por lo cual puede influir o ser influido por medicaciones administradas de forma concomitante que utilizan la misma vía de metabolización. Diferentes estudios han demostrado que voriconazol no presenta interacciones farmacocinéticas apreciables con fármacos que no se metabolizan por el citocromo P450 (51).

El excipiente usado para solubilizar el voriconazol y poder administrarlo por vía intravenosa, SBECD, es una sustancia farmacológicamente inerte que no altera la farmacocinética de voriconazol.

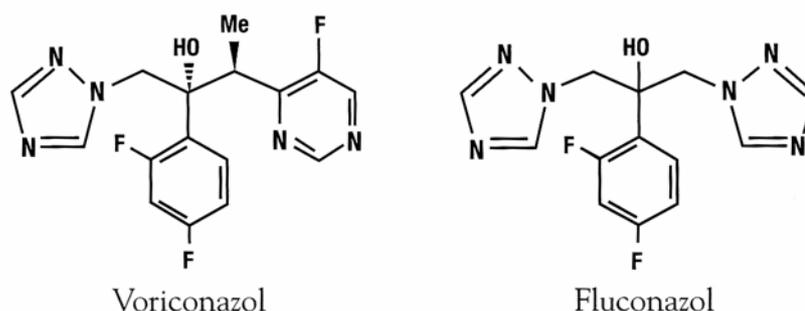
I.2.4.3. Microbiología de voriconazol:

▪Mecanismo de acción:

Voriconazol es un antifúngico triazol derivado de fluconazol. Su espectro antifúngico se incrementa al introducir un grupo α -metil en la posición propil de fluconazol. La potencia antifúngica aumenta debido a la sustitución de un anillo triazol con una 4-fluoropirimidina (24, 125). Ver figura 2.

Su mecanismo de acción es similar a otros azoles, inhibe la enzima 14- α -esterol demetilasa, dependiente del citocromo P450. De esta manera inhibe un paso crítico en la síntesis de ergosterol fundamental en la membrana celular y para el crecimiento óptimo del hongo (24, 128).

Figura 2.- Comparación de la estructura química de Voriconazol y Fluconazol.



▪ Actividad antimicrobiana:

Presenta una potente actividad antifúngica frente a diferentes especies de *Candidas*, tanto resistentes a fluconazol como *C. krusei* o *C. glabrata* (con respuesta parcial o completa) como frente a otras *Candidas* como son *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* (43, 72, 110). Por tanto, voriconazol está indicado en el tratamiento de infecciones graves por *Candida*, incluyendo *C. krusei*, resistentes a fluconazol.

Ha demostrado eficacia clínica frente a distintas especies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans* (66, 93).

Tiene, también, actividad fungicida frente a diferentes especies de *Scedosporium*, incluyendo *S. apiospermum* y *S. prolificans*, considerado resistente al resto de tratamientos existentes actualmente (59, 106) y frente a diferentes especies de *Fusarium* que son con frecuencia resistentes a anfotericina B.

Se han tratado, con respuesta parcial o completa, casos de infecciones producidas por: *Cladosporium* spp, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium* spp, incluyendo *P. marneffeii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Alternaria* spp, *Blastoschizomyces capitatus*, *Conidiobolus coronatus*, *Exserohilum rostratum*, *Exophiala spinifera*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Madurella mycetomatis*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phialophora richardsiae*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Trichosporon* spp, incluyendo infecciones por *T. beigelii* (49, 50, 89, 104, 112, 138).

También se ha visto actividad *in vitro* frente a diferentes aislados clínicos como: *Histoplasma capsulatum*, *Acremonium* spp., *Bipolaris* spp. y *Cladophialophora* spp.; en la mayoría de estos cultivos fue precisa una concentración de voriconazol entre 0,05 y 2 µg/ml para inhibir el crecimiento de estos hongos (43, 50, 104, 138).

Se ha observado actividad *in vitro* frente a *Curvularia* spp. y *Sporothrix* spp. (89).

I.2.4.4.Indicaciones de voriconazol:

Según lo expuesto anteriormente voriconazol está indicado en:

-Tratamiento de infecciones graves por *Candidas* resistentes a fluconazol, incluyendo *C. krusei* que junto a *C. glabrata* y *C. albicans* fueron las especies más prevalentes en las candidiasis invasivas. El éxito de la terapia con voriconazol dependió también de la enfermedad de base que presentaba el paciente (neoplasia, S.I.D.A./V.I.H., trasplante,...).

- Tratamiento de la aspergilosis invasiva y aspergilosis del S.N.C., destacando la eficacia en el tratamiento de esta última, una de las infecciones por *Aspergillus* más difíciles de tratar. Un diagnóstico precoz y la instauración del tratamiento sin dilación pueden reducir la mortalidad de la aspergilosis invasiva (130).

- Tratamiento de infecciones fúngicas graves por *Scedosporium* spp., *S. apiospermum* o su forma sexuada, *Pseudoallescheria boydii*, pueden producir infecciones subcutáneas, así como neumonía, meningitis y abscesos cerebrales en pacientes con casi ahogamiento en aguas estancadas (97). *S. Prolificans* puede causar infección osteoarticular o infección diseminada en pacientes neutropénicos (64).

- Tratamiento de infecciones causadas por *Fusarium*, el 90 % descritas en pacientes con neoplasias hematológicas, sobre todo leucemia aguda (116). Se trata de infecciones resistentes a anfotericina B y los azoles, lo cual contribuye a la alta mortalidad que se asocia con estas infecciones (13).

Voriconazol debe emplearse principalmente en pacientes inmunocomprometidos (neutropénicos, con inmunodeficiencias adquiridas o congénitas, trasplantados de médula ósea, que presenten la enfermedad del injerto contra el huésped,...) con infecciones fúngicas progresivas y posible amenaza para su vida.

I.2.4.5.Efectos adversos de voriconazol:

La gravedad de los efectos adversos observados durante la terapia con voriconazol fue generalmente leve o moderada. Aquellos comunicados con mayor frecuencia fueron:

- Alteraciones visuales: alteración de la percepción de los colores, fotofobia, visión borrosa y alteración de la percepción visual. Se trata de alteraciones transitorias que se resuelven espontáneamente. Parecen estar asociadas con dosis o concentraciones plasmáticas de voriconazol más altas.

- Alteraciones digestivas: náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal.

- Fiebre, rash, cefalea, sepsis, edemas periféricos, alteraciones respiratorias y alucinaciones.

- Alteraciones de la función hepática: incluyeron alteraciones significativas de las transaminasas hasta casos de toxicidad hepática grave: ictericia, hepatitis, colestasis o fallo hepático fulminante, estos últimos en muy raros casos y relacionados con enfermedades de base graves. La mayoría de las alteraciones se resolvieron durante el tratamiento sin ajuste de dosis. Estas alteraciones parecen estar relacionadas con dosis y concentraciones plasmáticas más altas. Por todo ello, la evaluación del paciente debe incluir control de la función hepática (62).

- Alteración de la función renal: no se han observado alteraciones renales con la administración de voriconazol por vía oral. En pacientes con disfunción renal moderada o grave (aclaramiento de creatinina < 50 ml/min.) se producirá una acumulación del excipiente del voriconazol por vía intravenosa, SBECD. En estos casos debe administrarse voriconazol por vía oral y si no es posible, vigilar estrechamente los niveles de creatinina sérica.

En cuanto a los efectos adversos no se observaron diferencias clínicamente significativas en relación con la edad, la raza el sexo.

Los efectos secundarios que con mayor frecuencia obligaron a suspender el tratamiento con voriconazol fueron las alteraciones de la función hepática, las alteraciones visuales y el rash (34).

Voriconazol está contraindicado en tratamientos concomitantes con terfenadina, rifampicina, fenobarbital, carbamacepina, astemizol, pimocida, cisaprida, quinidina, sirolimus y alcaloides ergóticos (24).

Se debe tener precaución en pacientes que presentan hipersensibilidad a otros azoles.

No debe administrarse durante el embarazo y su uso no es compatible con la lactancia.

I.3. TÉCNICAS DE SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS

I.3.1. HONGOS LEVADURIFORMES.

I.3.1.1. Métodos cuantitativos:

Estudian la sensibilidad a los antifúngicos mediante diluciones seriadas, obteniendo la CMI (concentración mínima inhibitoria) frente a las distintas especies.

I.3.1.1.1. Método de Referencia M27-A:

Consiste, básicamente, en cuantificar la inhibición del crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura en el mismo medio pero sin antifúngico (control). Los siguientes parámetros: pH, medio de cultivo, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse a lo recomendado en dicho documento puesto que cualquier variación en ellos puede afectar los resultados.

a). Método de Microdilución:

Se detallará en el apartado Material y Métodos.

▪ J. L. Rodríguez Tudela propone algunas modificaciones al método de microdilución M27-A del NCCLS. La preparación del medio, fármacos e inóculo así como las condiciones de incubación siguen las recomendaciones del documento M27-A del NCCLS. El medio utilizado, RPMI-glucosa, es el mismo medio propuesto por el NCCLS pero suplementado con 18 grs. de glucosa por litro (concentración final, 20 grs./litro). El incremento del crecimiento de algunas especies como *C. albicans* en el pocillo control (libre de fármaco) con dicho medio, RPMI-glucosa, es un avance que facilita la lectura de la inhibición del

crecimiento por los azoles en las pruebas de sensibilidad antifúngica (29, 124).

▪ Documento M27-A2 del NCCLS: Describe un método para las pruebas de sensibilidad de los agentes antifúngicos a las levaduras que causan infecciones fúngicas invasivas, entre ellas: *Candida spp.* (incluyendo *Candida glabrata*) y *Cryptococcus neoformans*. La selección y preparación de los agentes antifúngicos, la realización e interpretación de las pruebas de sensibilidad así como de los controles de calidad, son discutidos. Como novedad incluye con respecto al M27-A, los rangos de CMI para nuevos antifúngicos azólicos como voriconazol, ravuconazol y posaconazol (96).

La metodología del M27-A2 para *Candida* recomienda la lectura del “punto de corte” de la CMI a las 48 horas. Para la mayoría de los aislamientos la diferencia entre la lectura a las 24 ó 48 horas es mínima y no altera la categorización de las cepas como sensibles o resistentes. Sin embargo para algunas cepas (5% de los aislamientos) la lectura a las 24 horas tiene mayor relevancia clínica debido al efecto *trailing* desarrollado en la lectura a las 48 horas que incrementa significativamente la CMI, haciendo que un aislamiento que aparecía como sensible a las 24 horas, aparezca como resistente a las 48 horas. Los aislamientos que presentan esta conducta deberían ser categorizados como sensibles mejor que como resistentes. Esto ha sido corroborado por la demostración de que el efecto *trailing* puede ser eliminado por la disminución del pH del medio a 5 o menos (84) y por la demostración clínica de que candidiasis orofaríngeas debidas a tales aislamientos responden a bajas dosis de fluconazol usadas en tratamientos de aislamientos sensibles típicos (121). A la luz de estas observaciones, ambos rangos de CMI de microdilución, a las 24 y 48 horas son proporcionados para los dos controles de calidad y los ocho agentes antifúngicos sistémicos incluidos en el documento M27-A2 (los nuevos agentes antifúngicos introducidos, como los ya establecidos en el documento M27-A) (96).

b). Método de Macrodilución:

En este método: el medio de cultivo, la preparación del mismo, de la solución madre de antifúngico, son iguales al método de microdilución.

Se utilizan tubos estériles y el volumen final de cada tubo es de 1 ml. Tras la preparación de las diluciones de los antifúngicos se consigue una concentración final, para los antifúngicos solubles en agua, de 64-0,12 µg/ml y para los antifúngicos insolubles en agua de 16-0,03 µg/ml.

La lectura de los resultados se hace visualmente comparando la turbidez de los tubos con la del control diluido. La valoración de la CMI es similar al método de microdilución.(16)

Este método se utiliza poco pero a veces puede ser útil:

-cuando se requiere un resultado rápido y no se dispone de medios comerciales o placas preparadas.

-también en cepas de *C. albicans* en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (“trailing effect”).

I.3.1.1.2.Sensititre Yeast One:

Se comentará en el apartado Material y Métodos.

I.3.1.1.3.ASTY colorimetric panel:

Sistema de determinación de la sensibilidad en tiras de pocillos que contienen previamente deshidratadas las concentraciones de antifúngicos a ensayar. Los antifúngicos estudiados son cuatro (anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol), en rangos de concentración similares a los utilizados en el método de microdilución del NCCLS de referencia. En la ejecución ambos métodos son

paralelos, la diferencia estriba en la presencia de un indicador de pH colorimétrico. Este indicador de color permite determinar las CMI de los antifúngicos cuando se produce el viraje de color azul (sin crecimiento) a púrpura (inhibición parcial del crecimiento) y rojo (crecimiento).

Este sistema permite la incorporación de nuevos antifúngicos en la medida que éstos estén disponibles (18).

La correlación con respecto al método de referencia depende del género y especie de levadura, del antifúngico empleado y del período de incubación, siendo mejor a las 48 horas. Según Pfaller y colaboradores (111), se obtuvo una excelente concordancia entre este método y el de referencia.

I.3.1.1.4. Etest®:

Método de difusión en agar comercializado por AB biodisk, inicialmente desarrollado para bacterias, posteriormente fue adaptado para levaduras.

Se basa en tiras de plástico inerte, tiras de Etest, con un gradiente de concentración de antifúngico. Al depositarlas sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación a 35° C durante 24-48 horas para *Candida spp* y 48-72 horas para *C. neoformans*, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de Etest.

La correlación con el método M27-A, varía entre el 60 y el 100 % (76, 109), dependiendo de varios factores como: el medio de cultivo, combinación especie-antifúngico, tiempo de incubación (mejor correlación con lectura a las 24 horas que a las 48 horas), antifúngico (la correlación es más baja en los azoles debido al problema de la lectura por la aparición del doble halo) (85).

Parece ser el método de elección para detectar las cepas resistentes a anfotericina B tanto para *Candida spp* como para *C. neoformans*.

I.3.1.1.5. Dilución en agar:

Se basa en el uso de placas Yeast Morphology Agar (YMA) (Difco) con distintas concentraciones de fluconazol (0,125-256 µg/ml) inoculadas con una suspensión de levaduras e incubadas a 35° C durante 24 horas para *Candida* spp y 72 horas para *C. neoformans*.

La CMI es definida como la concentración más baja de antifúngico donde se observa una disminución considerable del tamaño de las colonias en comparación con el control del crecimiento (placa sin antifúngico).

Este método tiene la ventaja de ser rápido, fácil y económico; pero tiene el inconveniente de la subjetividad de su lectura y que sólo es aplicable al fluconazol. La correlación con el método de referencia es buena, pudiéndose utilizar para la selección de cepas resistentes al fluconazol (9).

I.3.1.2. Métodos semicuantitativos:

Se estudia la sensibilidad a antifúngicos en dos concentraciones críticas. En la interpretación de la lectura sólo se puede establecer la categoría clínica: sensible, intermedio y resistente.

I.3.1.2.1. Candifast (Internacional Mycoplasma, Francia):

Sistema comercializado que presenta en la misma galería 8 pruebas para la identificación de levaduras (crecimiento en presencia de actidiona y fermentación de sacarosa, lactosa, trehalosa, rafinosa, maltosa, celobiosa y galactosa) y 8 pocillos para el estudio de la sensibilidad a varios agentes antifúngicos (anfotericina B, fluorocitosina, nistatina, miconazol, econazol, ketoconazol y fluconazol). El medio de identificación que emplea es caldo base Mycoplasma suplementado con urea 20 g/l, rojo fenol 0,004 % y agar 0,5 g/l (86, 115).

El inóculo se prepara suspendiendo una colonia de 1-3 días crecida en agar glucosado de Sabouraud en el medio de identificación y tras su homogenización, se inocula cada pocillo con tres gotas de la suspensión; los pocillos se recubren con dos gotas de aceite mineral estéril y el sistema se incuba a 37° C procediendo a su lectura a las 24 y 48 horas (115).

I.3.1.2.2. Mycototal (Behring):

Test de microdilución que utiliza un medio semisintético y varios antifúngicos con dos concentraciones críticas para cada uno: anfotericina B (4 y 1 mg/l), fluorcitosina (32 y 8 mg/l) y miconazol, econazol, ketoconazol, tioconazol y clotrimazol (8 y 1 mg/l todos ellos). El sistema se incuba durante 48 horas a 28° C en atmósfera húmeda (86).

I.3.1.2.3. ATB Fungus®:

Es un sistema no colorimétrico comercializado por bioMérieux. Se basa en el método del NCCLS, utiliza diluciones seriadas para anfotericina B (1-8 µg/ml) y 5-fluorocitosina (0,25-128 µg/ml) y dos concentraciones críticas para el resto de antifúngicos: nistatina (4 y 8 µg/ml), ketoconazol, miconazol y econazol (1 y 8 µg/ml).

Su utilidad en las micosis sistémicas es limitada al no incorporar antifúngicos tan importantes en la clínica como el fluconazol y el itraconazol (36).

I.3.1.2.4. CHROMAgar Candida más Fluconazol:

Será detallado en Material y Métodos.

I.3.1.3. Métodos cualitativos:

I.3.1.3.1. Difusión de discos:

Con este método se estudia la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido.

La utilidad de este método ha estado limitada por los problemas de difusión de la mayoría de los antifúngicos y por su falta de correlación con la clínica. Actualmente sólo se ha encontrado correlación con los antifúngicos solubles en agua (fluconazol y 5-fluorocitosina) (46). Se establece una buena correlación entre los halos de inhibición de discos (25µg y/o 50 µg) y tabletas (15 µg) de fluconazol y los valores de las CMI obtenidos por el método de referencia M27-A (90).

I.3.1.3.2. Fungitest:

Es un método colorimétrico fabricado por Sanofi Diagnostic Pasteur. Está basado en el método de microdilución del NCCLS, incluye 6 antifúngicos cada uno de ellos a dos concentraciones críticas: anfotericina B (2 y 8 µg/ml), 5-fluorocitosina (2 y 32 µg/ml), miconazol (0,5 y 8 µg/ml), ketoconazol (0,5 y 4µg/ml), itraconazol (0,5 y 4 µg/ml) y fluconazol (8 y 64 µg/ml). Se presenta en forma de galería con 16 pocillos: 2 controles de crecimiento, 12 con los antifúngicos deshidratados y 2 pocillos controles de esterilidad.

Es un método fácil y cómodo, pero habría que revisar las concentraciones críticas en relación con la normativa del NCCLS. No existe buena correlación con el M27-A en los azoles para las cepas resistentes. Las concentraciones de itraconazol y anfotericina B son muy elevadas.

I.3.2. HONGOS FILAMENTOSOS.

I.3.2.1. Métodos cuantitativos:

I.3.2.1.1. Método de referencia M38-P:

a). Método de Microdilución:

La necesidad de disponer de un protocolo para el estudio de la sensibilidad frente a hongos filamentosos, propició la aparición del documento M38-P, publicado en 1998 por el NCCLS (95).

Las características del medio de cultivo, pH, preparación de la solución madre de antifúngico y diluciones son iguales a las del método M27-A.

El inóculo se prepara a partir de un cultivo en agar glucosado de patata (PDA), a una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/ml, debido a que el tamaño de las conidias es distinto para cada especie, la densidad óptica para obtener dicha concentración variará según la especie.

Las placas se inoculan con 100 μ l de la suspensión de conidias o esporangiosporas, posteriormente se incuban a 35° C hasta que se observe crecimiento en el pocillo control, dependiendo de la especie el tiempo de incubación oscila entre 21-74 horas para los azoles y 5-fluorocitosina.

La CMI es la concentración más baja que produce una reducción importante del crecimiento (≥ 50 %) con respecto al crecimiento del pocillo control. La CMI de anfotericina B es la concentración más baja que produce una inhibición total del crecimiento (100 %).

b). Método de Macrodilución:

Se utilizan tubos estériles de 11 x 70 mm. y el volumen final es de 1 ml.

El medio de cultivo y preparación del mismo, la solución madre y diluciones del antifúngico, la preparación del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación son iguales que para el método de microdilución.

A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de Mac Farland se diluye 1/100 en medio RPMI (concentración $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml).

La lectura de los resultados se hace visualmente a las 48 horas de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. La CMI para los distintos antifúngicos coincide con la del método de microdilución.

I.3.2.1.2.Sensititre Yeast One:

Se desarrollará en Material y Métodos.

I.3.2.1.3.Etest®:

Método muy útil para determinar la sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos a los antifúngicos, ya que, al contrario de lo que ocurre en las levaduras, las elipses de inhibición son nítidas y fáciles de interpretar.

La correlación con el método M38-P (a las 48 horas) es superior al 80-90 % para anfotericina B e itraconazol, cuando la lectura se hace a las 24 horas con Etest (47). Para algunas especies como *A. flavus*, *P. boydii* y *S. prolificans* los valores de CMI por Etest son más altos que los obtenidos por el método M38-P (46). Sin embargo, aún se requieren más estudios para determinar la correlación de este método con los datos *in vivo*.

I.3.2.1.4. Dilución en Agar:

Similar al utilizado para bacterias. A partir de una dilución 10 veces la concentración final del antifúngico a evaluar, se preparan diluciones seriadas y se incorporan al agar fundido. Las placas con el antifúngico se inoculan con suspensiones entre 10^5 - 10^7 UFC/ml. La incubación se realiza a 28° C ó 35° C durante 48-72 horas y la lectura de la CMI se hace según el método convencional (87).

I.3.2.2. Métodos cualitativos:

I.3.2.2.1. Difusión en discos:

Método útil para conocer la sensibilidad de *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos a la anfotericina B y a los nuevos antifúngicos, como las equinocandinas.

Los resultados obtenidos con caspofungina y anfotericina B muestran mayor correlación con los datos *in vivo* que los resultados del método M38-P aunque se precisan más estudios (46, 87).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

- Conocer la sensibilidad a distintos antifúngicos de diferentes especies de hongos aislados de muestras clínicas a través de métodos colorimétricos.
- Determinar la sensibilidad de distintas especies de hongos levaduriformes y filamentosos al voriconazol.
- Establecer la CMI del voriconazol para las distintas especies.
- Estudio comparativo de sensibilidad- resistencia entre voriconazol y fluconazol.
- Comparar nuestros datos con los obtenidos por otros autores.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. MATERIAL:

III.1.1. Recogida e identificación de cepas.

Se estudiaron un total de 504 muestras procedentes de distintos orígenes, englobando un total de 514 cepas.

Se llevaron a cabo varios estudios en paralelo:

- En el primero de ellos se comparó la sensibilidad al fluconazol de hongos levaduriformes por el medio CHROMAgar Candida más fluconazol (CHROM-FZ) con dos técnicas de microdilución: Sensititre Yeast One y el método de referencia M27-A.

En este estudio se incluyeron un total de 156 aislamientos clínicos procedentes de distintos orígenes: 55 exudados vaginales, 20 esputos, 20 orinas, 18 abscesos, 10 L.C.R. (líquido cefalorraquídeo), 9 hemocultivos, 7 puntas de catéteres, 3 exudados orofaríngeos, 3 exudados óticos y 11 provenientes de distintos orígenes que englobamos bajo el término “otros” y especificaremos su procedencia según la especie, todo ello queda reflejado en la tabla I. Ellos incluían: 109 *Candida albicans*, 19 *C. parapsilosis*, 12 *C. glabrata*, 11 *C. tropicalis*, 2 *C. krusei*, 1 *C. pelliculosa*, 1 *C. lambica*, 1 *Saccharomyces cerevisiae*.

El porcentaje más elevado de muestras clínicas procesadas correspondió a las de procedencia vaginal (35,26 %). La especie más frecuentemente aislada fue *Candida albicans* con un 69,87 % respecto al total de especies.

La proporción de cada especie con respecto al total de especies estudiadas figura en la tabla II.

Tabla I.-Procedencia de las muestras investigadas según especie en el estudio comparativo de sensibilidad al fluconazol por el medio CHROM-FZ y dos técnicas de microdilución.

ESPECIE Origen de la muestra	<i>Candida albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. lambica</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Total
Exudado vaginal	47		7		1				55 (35, 26 %)
Espuito	11		3	2	1	1	1	1	20 (12, 82 %)
Orina	13	3		4					20 (12, 82 %)
Absceso	12	2	1	3					18 (11, 54 %)
L.C.R.	10								10 (6, 41 %)
Hemocultivo	4	4	1						9 (5, 77 %)
Punta de catéter	1	4		2					7 (4, 49 %)
Exudado orofaríngeo	3								3 (1, 92 %)
Exudado ótico		3							3 (1, 92 %)
Otros	8 ¹	3 ²							11 (7, 05 %)
Total	109	19	12	11	2	1	1	1	156 (100 %)

¹Incluye: líquido pleural (1), exudado ocular (1), cultivo de Shirley (1), exudado uretral (1), líquido ascítico (2), bilis (1) y lavado broncoalveolar (1).

²Incluye: exudado purulento ocular (1), broncoaspirado (1) y exudado de zona de marcapasos (1).

Tabla II.- Distribución de las especies estudiadas en el estudio comparativo de sensibilidad al fluconazol por el medio CHROM-FZ y dos técnicas de microdilución.

<u>Especie</u>	<u>Número de cepas</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
<i>Candida albicans</i>	109	69,87
<i>C. parapsilosis</i>	19	12,18
<i>C. glabrata</i>	12	7,69
<i>C. tropicalis</i>	11	7,05
<i>C. krusei</i>	2	1,28
<i>C. pelliculosa</i>	1	0,64
<i>C. lambica</i>	1	0,64
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,64
Total	156	100

- En el segundo estudio se comparó la sensibilidad de *Candida* spp. al voriconazol mediante dos métodos de microdilución: Sensititre Yeast One y el método de Referencia M27-A.

El estudio englobó un total de 272 cepas, procedentes de 262 muestras clínicas: 65 esputos, 62 exudados faríngeos, 49 hemocultivos, 49 abscesos, 29 exudados vaginales y 8 orinas. Incluían: 132 *Candida albicans*, 62 *C. parapsilosis*, 33 *Candida glabrata*, 21 *C. krusei*, 15 *C. tropicalis* y 9 *C. lusitaniae*.

Las muestras se obtuvieron de 262 pacientes ya que en algunas de ellos coexistieron dos especies; en 8 muestras de esputo se aisló además de *C. albicans* otra levadura: *C. krusei* en 4 aislamientos clínicos, *C. glabrata* en 3 muestras y *C. tropicalis* en 1 caso. También encontramos dos especies distintas en dos muestras de exudados vaginales donde coexistieron *C. albicans* con *C. glabrata*. Todo ello se muestra en la tabla III.

La especie más frecuente en este estudio correspondió a *Candida albicans* con una proporción del 48,53 % respecto al total de especies testadas. El porcentaje más elevado de muestras clínicas procesadas correspondió a las que procedían de esputo, un 24,81 % del total de muestras, teniendo en cuenta que algunas muestras de esputo (8 aislamientos clínicos) englobaban dos especies distintas, como comentamos anteriormente, el porcentaje de cepas procedentes de esputo respecto al total de cepas es de un 26,84 %.

El porcentaje de cada especie con respecto al total de especies estudiadas figura en la tabla IV.

Tabla III.- Procedencia de las cepas investigadas según especie en el estudio comparativo de la sensibilidad al voriconazol mediante dos técnicas de microdilución.

<u>Origen de la muestra</u> \ <u>ESPECIE</u>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	Total de muestras	Total de cepas
Espudo	47	5	12	7	2		65 ¹ (24, 81 %)	73 (26, 84 %)
Exudado faríngeo	33	4	8	9	6	2	62 (23, 66 %)	62 (22, 79 %)
Hemocultivo	28	12	5	3	1		49 (18, 70 %)	49 (18, 01 %)
Absceso	8	32		1	1	7	49 (18, 70 %)	49 (18, 01 %)
Exudado vaginal	16	9	4	1	1		29 ² (11, 07 %)	31 (11, 40 %)
Orina			4		4		8 (3, 05 %)	8 (2, 94 %)
Total	132	62	33	21	15	9	262 (100 %)	272 (100 %)

¹ Existen 8 muestras de esputo en las que coincide una cepa de *C. albicans* con: *C. krusei* (en 4 muestras), *C. glabrata* (en 3 muestras) y *C. tropicalis* (en 1 muestra).

² Existen 2 muestras de exudado vaginal en las cuales coinciden una cepa de *C. albicans* con una cepa de *C. glabrata*.

Tabla IV.- Distribución de las especies estudiadas en el estudio comparativo de la sensibilidad al voriconazol mediante dos técnicas de microdilución.

<u>Especie</u>	<u>Número de cepas</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
<i>Candida albicans</i>	132	48,53
<i>C. parapsilosis</i>	62	22,79
<i>C. glabrata</i>	33	12,13
<i>C. krusei</i>	21	7,72
<i>C. tropicalis</i>	15	5,51
<i>C. lusitaniae</i>	9	3,31
Total	272	100

- En el tercer estudio se obtuvo la sensibilidad a seis antifúngicos, entre ellos el voriconazol, de hongos filamentosos mediante una técnica de microdilución: Sensititre Yeast One.

Para ello se estudiaron 86 cepas, procedentes de distintos orígenes que quedan recogidas en la tabla V, en orden de frecuencia según la procedencia sería: 48 esputos, 12 broncoaspirados (BAS), 8 exudados óticos, 5 lavados broncoalveolares, 2 exudados faríngeos, 2 exudados nasales, 2 líquidos cefalorraquídeos (L.C.R.), 2 biopsias, 1 absceso cerebral, 1 granuloma, 1 hemocultivo, 1 exudado conjuntival, 1 sobrenadante de válvula pulmonar.

El número de cepas pertenecientes a cada género que se incluyeron en el estudio fueron: 79 *Aspergillus*, 4 *Fusarium*, 2 *Scedosporium apiospermum* y 1 *Rhizomucor pusillus*. El desglose del número de cepas según cada especie queda reflejado en la tabla VI.

El origen más frecuente de los aislamientos clínicos fue de esputo, un 55,81 % del total de muestras clínicas. El género más frecuente *Aspergillus* que representa un 91,86 % del total de cepas.

Tabla V.- Procedencia de las muestras investigadas según especie en el estudio de la sensibilidad al voriconazol de hongos filamentosos mediante una técnica de microdilución.

ESPECIE Origen de la muestra	Aspergillus fumigatus	A. terreus	A. niger	A. flavus	A. nidulans	A. ustus	Fusarium moniliforme	F. oxyosporum	Scedosporium apiospermum	Rhizomucor pusillus	Total
Espudo	26	8	3	5	1	1	2		2		48 (55, 81 %)
BAS	7	3	1					1			12 (13, 95 %)
Exudado faríngeo	2										2 (2, 32 %)
Exudado nasal	1							1			2 (2, 32 %)
Absceso cerebral	1										1 (1, 16%)
Granuloma	1										1 (1, 16 %)
L.C.R.	2										2 (2, 32 %)
Biopsia	2										2 (2, 32 %)
Hemocultivo	1										1 (1, 16 %)
Exudado conjuntival	1										1 (1, 16 %)
Exudado ótico	1	2	4	1							8 (9, 30 %)
Lavado broncoalveolar	1	1	3								5 (5, 81 %)
Sobrenadante de válvula pulmonar										1	1 (1, 16 %)
Total	46	14	11	6	1	1	2	2	2	1	86 (100 %)

Tabla VI.- Distribución de las especies de hongos filamentosos en el estudio de la sensibilidad al voriconazol mediante una técnica de microdilución.

<u>Especie</u>	<u>Número de cepas</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	46	53,49
<i>A. terreus</i>	14	16,28
<i>A. niger</i>	11	12,79
<i>A. flavus</i>	6	6,98
<i>A. nidulans</i>	1	1,16
<i>A. ustus</i>	1	1,16
- Total <i>Aspergillus</i>	79	91,86
<i>Fusarium moniliforme</i>	2	2,32
<i>F. oxysporum</i>	2	2,32
- Total <i>Fusarium</i>	4	4,65
<i>Scedosporium apiospermum</i>	2	2,32
<i>Rhizomucor pusillus</i>	1	1,16
Total	86	100

- Se procedió a la identificación de las cepas mediante criterios microbiológicos simples tales como el análisis macroscópico, para observar la morfología de la colonia o el estudio del crecimiento en medios cromogénicos como el CHROMAgar, seguido de criterios microscópicos de identificación (visualización microscópica, producción de tubo germinal y clamidosporas).

Junto a ellos se llevó a cabo una investigación por criterios bioquímicos, como el auxonograma mediante el método ID 32 C (bioMérieux). Este sistema está compuesto por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada. Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada, en nuestro estudio se realizó manualmente (77).

III.1.2. Aislamientos fúngicos.

Todos los aislamientos fueron almacenados como suspensiones en agua destilada estéril congelados a -70° C. hasta que se realizase el estudio. Antes de las pruebas cada aislamiento de hongos levaduriformes se cultivó en CHROMagar Candida para asegurar la pureza y el óptimo crecimiento (83). Cada aislamiento de hongos filamentosos fue cultivado en Agar Sabouraud más cloranfenicol.

III.1.3. Agentes antifúngicos.

Los estudios realizados muestran la sensibilidad frente a voriconazol de distintas cepas, comparándola con la sensibilidad frente a fluconazol.

III.1.3.1. En el Método NCCLS:

Ambos antifúngicos, en forma de polvo valorado antifúngico estándar, fueron suministrados por Pfizer Inc. Central Research Division (Groton, Conn). Para las diluciones del fluconazol y voriconazol fueron seguidas las recomendaciones del NCCLS, como desarrollaremos más adelante. Las concentraciones finales de fluconazol variaron desde 0,12 a 64 $\mu\text{g/ml}$. y de voriconazol entre 0,03 a 16 $\mu\text{g/ml}$.

III.1.3.2. En el Método Sensititre Yeast One:

Las placas de 96 pocillos con el azul Alamar incorporado, vienen preparadas con concentraciones dobles seriadas de antifúngicos deshidratados: anfotericina B (0,008-16 $\mu\text{g/ml}$.); fluconazol (0,125-256 $\mu\text{g/ml}$.), itraconazol (0,008-16 $\mu\text{g/ml}$.), ketoconazol (0,008-16 $\mu\text{g/ml}$.), 5 fluorocitosina (0,03-64 $\mu\text{g/ml}$.) y posteriormente han incluido el voriconazol (0,008-16 $\mu\text{g/ml}$.). Este último antifúngico ocupa la séptima de las ocho filas de la placa. El control de crecimiento se incluye en el primer pocillo de la primera fila (1 A). (42, 87).

III.1.3.3. En el Medio CHROMAgar Candida más fluconazol:

El fluconazol es el antifúngico utilizado que se añade al medio CHROMAgar Candida para conseguir concentraciones de 8 $\mu\text{g/ml}$. (102).

III.1.4. Medios de cultivo.

III.1.4.1. Método NCCLS:

El medio utilizado es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco ICN, Oxoid, Sigma), el cual es tamponado a pH $7 \pm 0,1$ con 0,164 M del tampón ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) (ICN, Sigma).

-Componentes: RPMI 1640 (10,40 gr.), tampón MOPS (34,53 gr.) y agua destilada (1.000 ml.) (87).

III.1.4.2. Método Sensititre Yeast One:

Es el mismo que el método de referencia: RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato cálcico, tamponado a pH $7 \pm 0,1$ con MOPS (0,164 M.), pero suplementado con 1,5% de glucosa. (87).

III.1.4.3. Método CHROMAgar *Candida* más fluconazol:

CHROMAgar *Candida* (París, Francia) fue preparado a partir de un medio en polvo según las instrucciones del fabricante (102). El medio preparado el cual contiene cloranfenicol (0,5 gr/l), agar (15 gr/l), peptona bacteriológica (10,2 gr/l) y mezcla cromogénica (22 gr/l), fue calentado hasta hervir de 15 a 30 minutos para disolver el agar y enfriado a 45° C en un baño de agua. La solución de fluconazol (2mg/ml) (Pfizer, New York, N.Y.) fue añadida al medio a 45° C agitándola, para obtener una concentración final de 8µg de fluconazol por ml de agar (103).

III.2. MÉTODOS:

III.2.1. Método de microdilución para hongos levaduriformes M27-A.

III.2.1.1. Preparación de la solución madre de fluconazol y voriconazol.

-Preparamos una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración al menos 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar (94).

- Fluconazol (antifúngico soluble en agua): Se preparó una solución a una concentración de 1280 µg/ml. El diluyente empleado fue agua destilada estéril.
- Voriconazol (antifúngico insoluble en agua): Se preparó una solución a una concentración de 1600 µg/ml. Se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO).

-Repartimos la solución obtenida en tubos con 1,1ml cada uno y congelamos a – 70 ° C hasta su utilización (un máximo de 6 meses).

III.2.1.2. Preparación de las diluciones de fluconazol y voriconazol.

Se siguió el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. La preparación de las diluciones es distinta según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua (16).

- **Dilución de fluconazol** (soluble en agua):

1. A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640.

Tabla VII.- Diluciones del fluconazol.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
Nº 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	Nº 2
Nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	Nº 3
Nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	Nº 4
Nº 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	Nº 5
Nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	Nº 6
Nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	Nº 7
Nº 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	Nº 8
Nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	Nº 9
Nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	Nº 10
Nº 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	Nº 11

Al terminar las diluciones, todos los tubos contenían 1 ml., excepto el tubo nº 11 (2 ml.). De este último se desechó 1 ml.

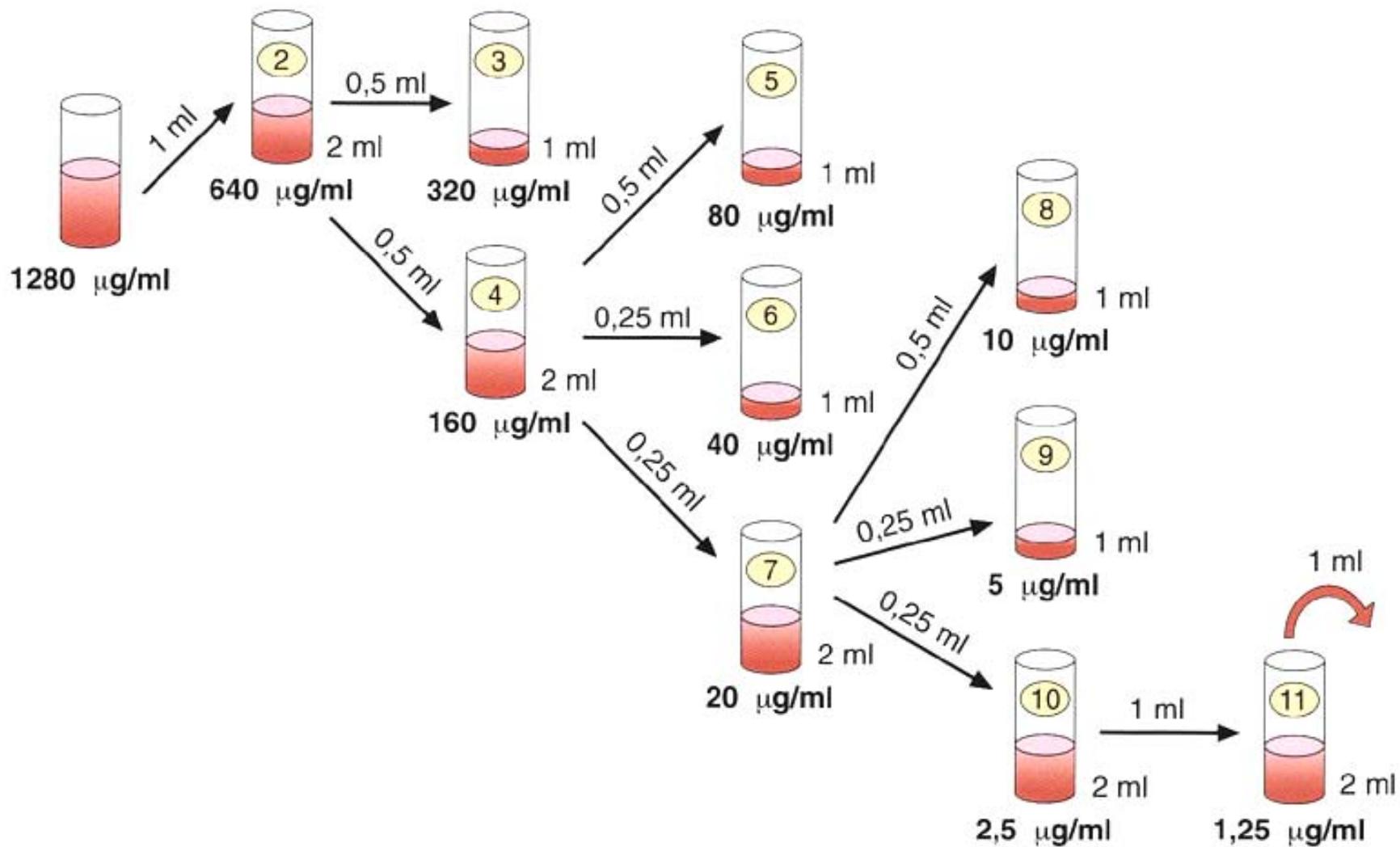
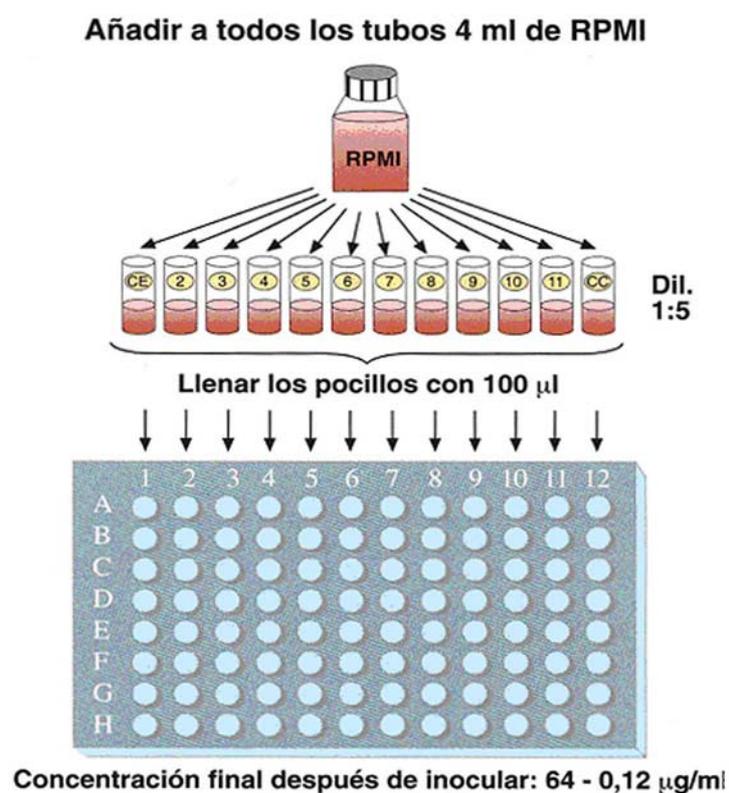


Figura 3.- Esquema para las diluciones de fluconazol.

2. Posteriormente se realizó una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml. de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos era dos veces mayor que la concentración final deseada (de 128 $\mu\text{g/ml}$. a 0,25 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 4.- Segundo paso de las diluciones de fluconazol (método de microdilución).



Con los volúmenes indicados se prepararon cinco placas de fluconazol. Las concentraciones finales obtenidas en la placa después de inocular estuvieron comprendidas entre 64 y 0,12 $\mu\text{g/ml}$.

- **Dilución de voriconazol** (insoluble en agua):

1. A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.

Tabla VIII.- Diluciones del voriconazol.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
Nº 2	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 µg/ml	Nº 3
Nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 µg/ml	Nº 4
Nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 µg/ml	Nº 5
Nº 5	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 µg/ml	Nº 6
Nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 µg/ml	Nº 7
Nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 µg/ml	Nº 8
Nº 8	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	Nº 9
Nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	Nº 10
Nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	Nº 11

Al terminar las diluciones, todos los tubos contenían 1 ml. Excepto el nº 11 que contenía 2 ml.

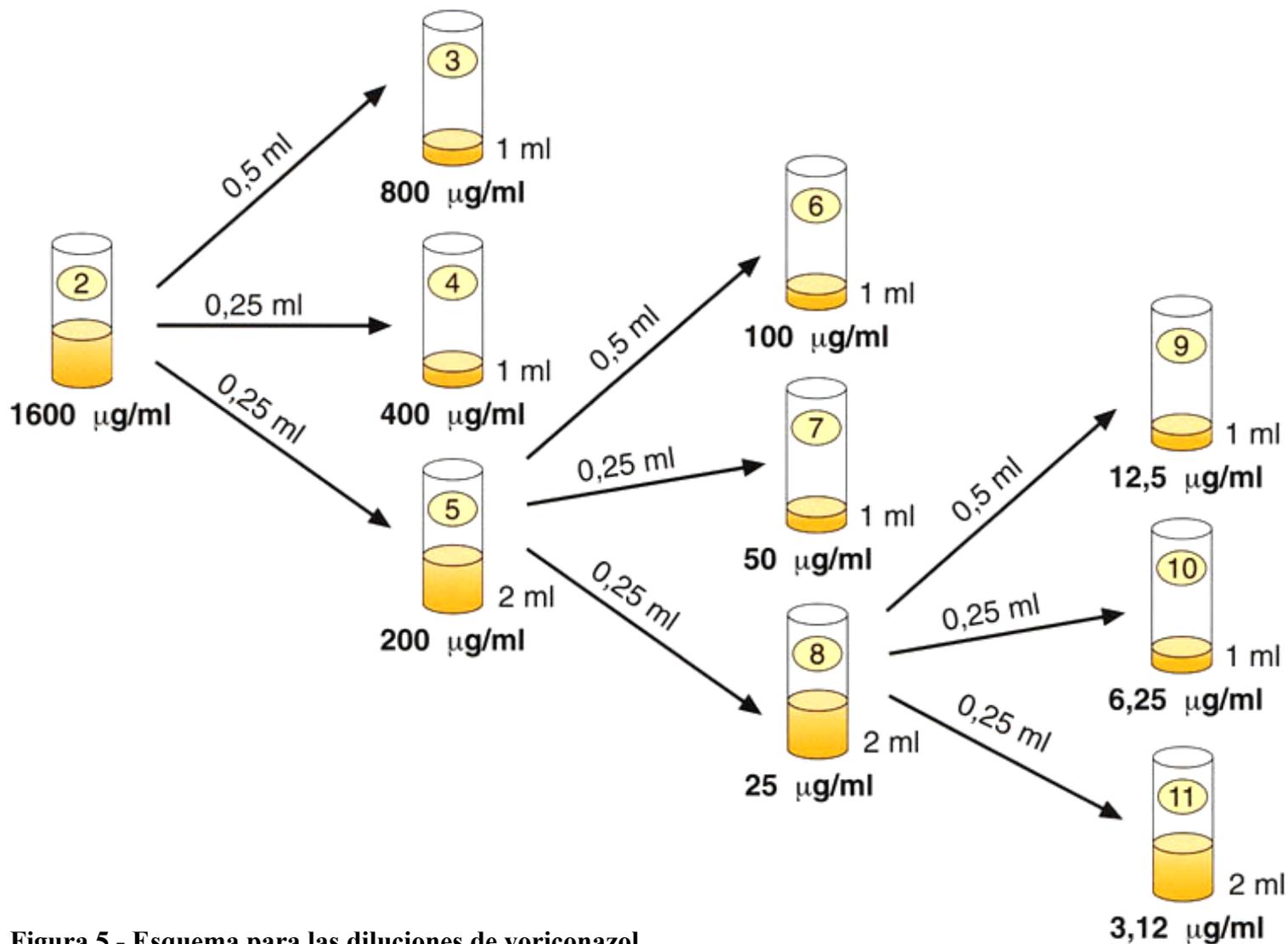
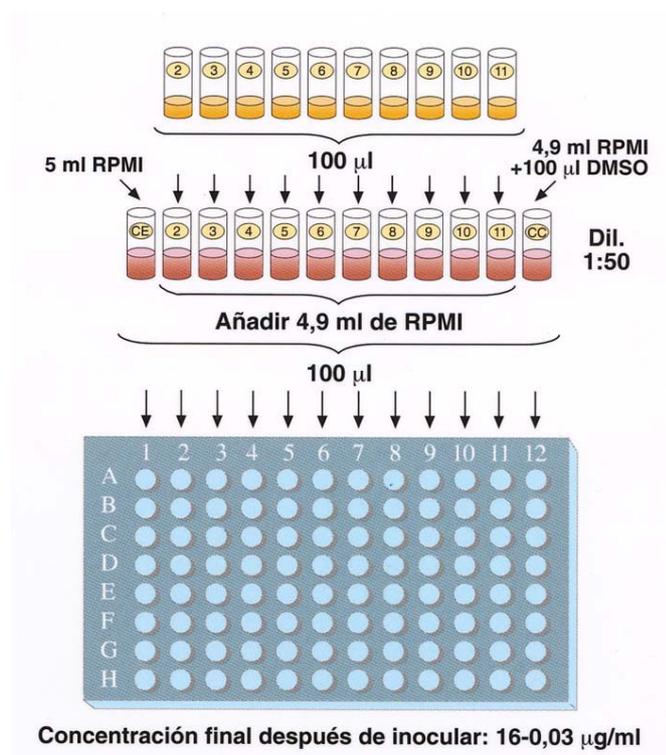


Figura 5.- Esquema para las diluciones de voriconazol.

2. Seguidamente se realizó una dilución 1/50 tomando 100 μ l. de cada tubo que se transfirieron a otro tubo con RPMI (4,9 ml), con lo cual la concentración de antifúngico obtenida es dos veces mayor a la concentración final deseada (32 μ g/ml a 0,06 μ g/ml) y la DMSO, 2%.

Figura 6.- Segundo paso de las diluciones de voriconazol (método de microdilución).



Con los volúmenes indicados se pudieron preparar cinco placas de voriconazol. Las concentraciones finales obtenidas en la placa después de inocular estuvieron comprendidas entre 16 y 0,03 μ g/ml.

III.2.1.3. Llenado de las placas.

Desde cada tubo se procedió al llenado de las placas microtiter estériles de 96 pocillos con 100 μ l. de solución, de fluconazol o voriconazol, siguiendo los siguientes pasos (16):

- Del contenido del tubo dos se tomaron 100 μ l por pocillo y se rellenaron sucesivamente los pocillos de la columna n° 2 (2A - 2H).
- Con el contenido del tubo n° 3 se llenaron los pocillos de la columna n° 3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo n° 4 se rellenaron los pocillos de la columna n° 4 (4A - 4H).
- Y así sucesivamente hasta la columna n° 11.
- Los pocillos de la columna n° 12 se rellenaron en el caso de la dilución del fluconazol con 100 μ l de RPMI (control de crecimiento) y en la dilución del voriconazol con 100 μ l. de la dilución resultante entre 4,9ml de RPMI y 100 μ l de DMSO (2% de DMSO).
- Los pocillos de la columna n° 1 se llenaron con 200 μ l de RPMI (control de esterilidad).
- Una vez llenas las placas se cerraron y se congelaron a -70° C hasta su utilización.

III.2.1.4. Preparación del inóculo.

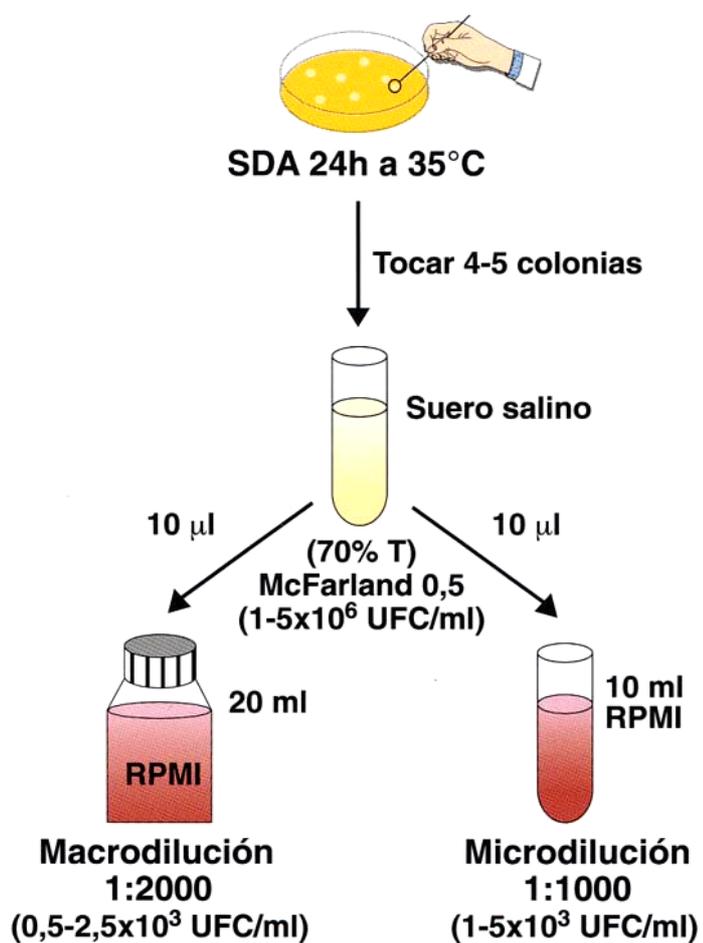
Si la cepa a utilizar había estado congelada, antes de preparar el inóculo se sembraba en medio de agar glucosado de Sabourand (SDA) durante 24 horas a 28° C.

En el caso de *Candida* spp, cepas utilizadas en nuestro estudio, el inóculo se preparó de la siguiente forma: con un asa de cultivo estéril se tomaban unas cinco colonias de ≥ 1 mm y 24 horas de crecimiento en placa de SDA, se suspendían en un tubo con agua destilada estéril. Se agitaba bien y se ajustaba a una densidad óptica de 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad precisa de agua destilada estéril, ello se realizó con la ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm). Se obtuvo una solución con una concentración aproximada de $1-5 \times 10^6$ UFC/ml.

Seguidamente con medio RPMI se realizó una dilución 1:1000, para ello se tomaron 10 μ l del inóculo anteriormente ajustado y se añadieron a 10 ml del medio RPMI (concentración obtenida $1-5 \times 10^3$ UFC/ml).

Con esta última dilución se inocularon las placas de microdilución que contenían las diluciones de fluconazol o voriconazol. La concentración final de levaduras en las placas fue de $0,5-2,5 \times 10^3$ (94).

Figura 7.- Preparación del inóculo de levaduras.



III.2.1.5. Inoculación de las placas.

Cuando las placas de microdilución iban a ser inoculadas, se sacaban del congelador y se dejaban a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.

Se inocularon con 100 µl de la suspensión de la cepa desde el pocillo dos hasta el 12 (16).

La columna n° 1 (1A-1H) que contenía 200 µl de RPMI, se utilizó como control de esterilidad del medio.

La columna n° 12 (12A-12H) que no contenía antifúngico pero sí la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico, fue el control de crecimiento.

Al inocular las placas, las concentraciones de los pocillos se diluyeron $\frac{1}{2}$. Por tanto, la concentración final de antifúngico en los pocillos fue de 64-0,12 µg/ml para fluconazol y de 16-0,03 µg/ml para voriconazol.

Una misma placa de microdilución se utilizó para estudiar la sensibilidad a fluconazol o voriconazol de ocho cepas distintas.

III.2.1.6. Control de pureza de cultivo.

Para controlar la pureza y el tamaño del inóculo utilizado se sembraban 10 µl del pocillo control (n° 12) en una placa de CHROMAgar e incubamos 24 horas a 35° C, se realizaba un conteo de las colonias (UFC) que debía estar comprendido entre 10 y 50 colonias (94).

III.2.1.7. Incubación de las placas.

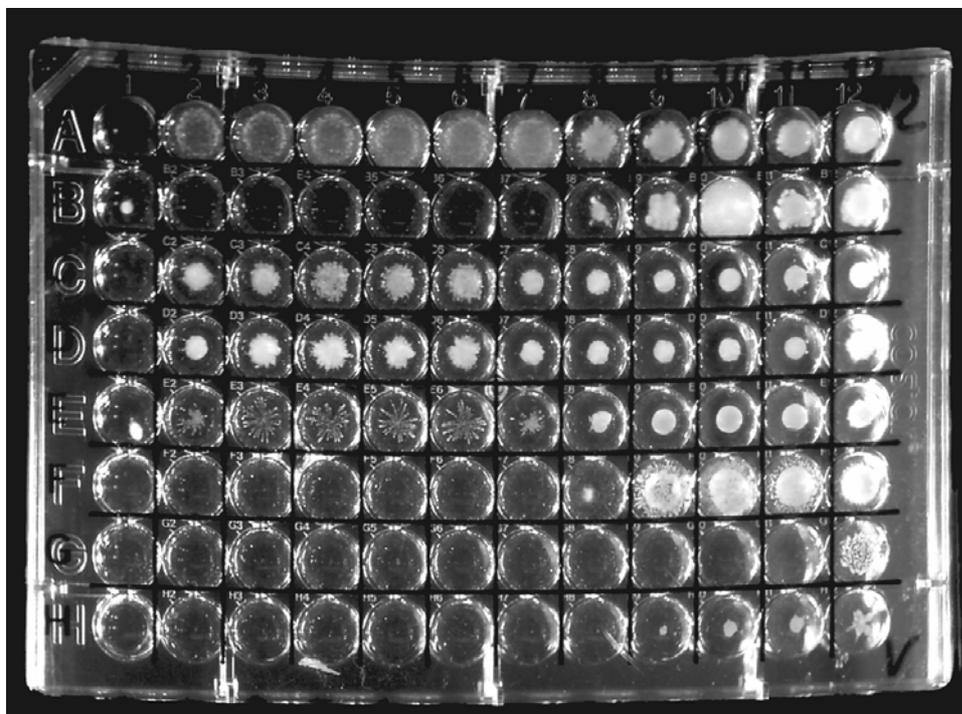
Las placas fueron incubadas a 35° C durante 48 horas. Previamente se envolvieron en papel de estaño (94).

III.2.1.8. Lectura e interpretación de los resultados.

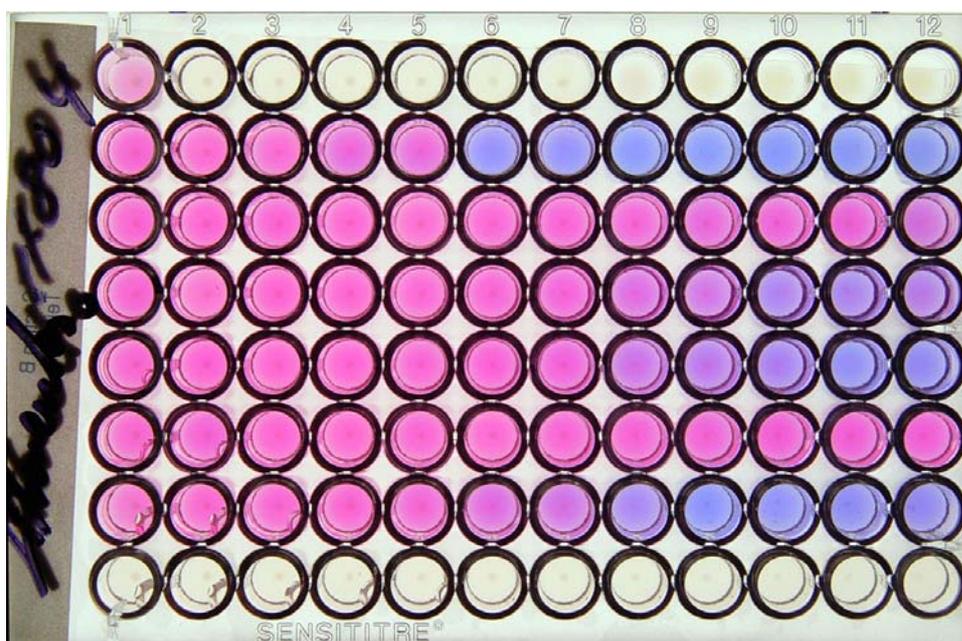
Se realizó una lectura visual con ayuda de un espejo invertido.

Para los compuestos azólicos, como el fluconazol y el voriconazol, la CMI se define como la concentración más baja de antifúngico que produce un $\geq 50\%$ de reducción del crecimiento de la levadura, comparada con el crecimiento control libre de fármaco. (41,83) (fotografía 1).

Fotografía 1.- Panel del método de microdilución del NCCLS.



Fotografía 2.- Panel Sensititre Yeast One con efecto *trailing* en los antifúngicos azólicos.



III.2.2. Método Sensititre Yeast One.

III.2.2.1. Fundamento.

Este sistema se basa en una técnica de microdilución en medio líquido RPMI 1640 con glucosa. Contiene un indicador de crecimiento de oxido-reducción, que detecta las variaciones de pH (azul Alamar), permitiendo determinar la sensibilidad *in vitro* de forma cuantitativa y por medio de un cambio colorimétrico a distintos antifúngicos, entre ellos el fluconazol y el voriconazol (46). La lectura con este método es más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que, cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules (86).

Es un método poco laborioso, estandarizado y con una gran correlación con respecto al método descrito en el documento M 27-A del NCCLS en referencia a una gran mayoría de variables experimentales.

III.2.2.2. Preparación del inóculo.

III.2.2.2.1. Hongos levaduriformes:

Con el asa de cultivo se tocaron aproximadamente cinco colonias de ≥ 1 mm en SDA, de 24 horas de crecimiento para *Candida* spp. Emulsionamos las colonias en un tubo de agua destilada, agitando y ajustando con un espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm) a una densidad óptica equivalente al 0,5 de la escala McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml). Inoculamos 20 μ l de esta suspensión en el tubo con 10 ml de medio de cultivo (dilución de trabajo: $1,5-8 \times 10^3$ UFC/ml) (87).

III.2.2.2.2. Hongos filamentosos:

Cada aislamiento fue cultivado en medio agar dextrosa y patata (PDA), incubándose durante 7 a 14 días a 30° C. Una vez crecidas las colonias, mediante un asa bacteriológica estéril se frotó con suavidad la superficie del hongo, extrayendo el micelio aéreo (conidios y fragmentos de hifas) que se suspendió en agua destilada estéril con Tween 80 (1%) (22). La densidad óptica se ajustó a 0,5 de la escala McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml). De esa dilución se tomaron, al igual que para los hongos levaduriformes, 20 μ l que se añadieron a un tubo con 10 ml de RPMI, obteniendo una concentración de $1,5-8 \times 10^3$ UFC/ml (87).

III.2.2.3. Inoculación del panel.

El panel se rehidrató dispensando 100 μ l de la suspensión del inóculo en cada pocillo; esto se realizó automáticamente con el autoinoculador Sensititre.

III.2.2.4. Incubación.

Las placas previamente selladas con papel autoadhesivo, se incubaron a 35° C durante 24-48 horas en aerobiosis para *Candida* spp. Para hongos filamentosos durante 48-72 horas dependiendo de la especie.

III.2.2.5. Control del inóculo.

Del mismo tubo de RPMI con el que se inocularon los paneles, se sembraron 10 μ l en una placa de SDA. Se incubó a 35° C y a las 24 horas (para *Candida* spp.) se contaron el número de UFC, creciendo entre 15-18 colonias.

III.2.2.6. Lectura.

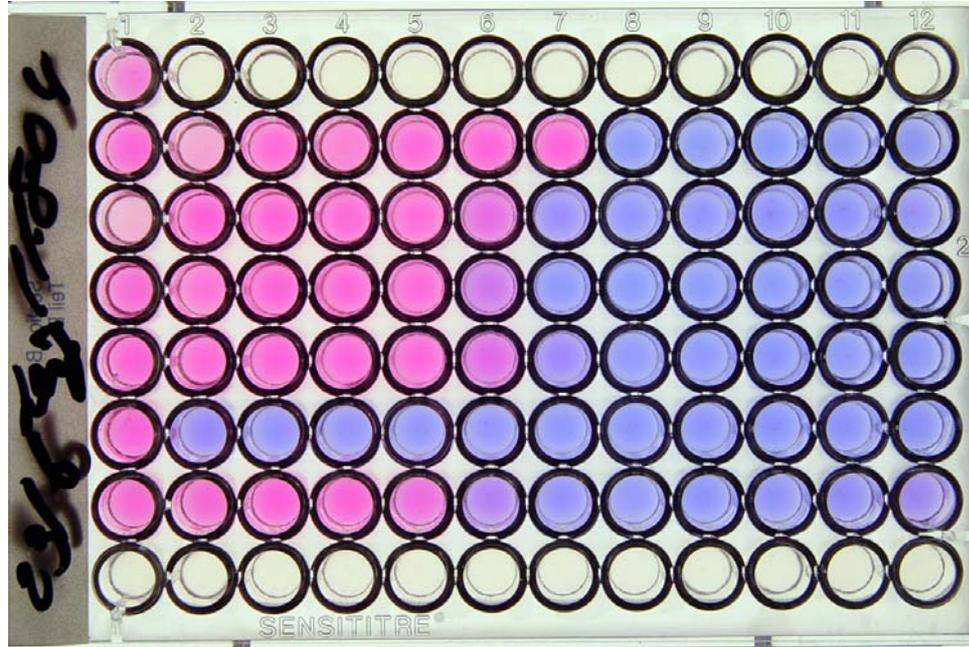
En primer lugar se comprobó el viraje a rosa del pocillo control de crecimiento, de no producirse se prolongaba la incubación hasta su cambio de color. La lectura de los resultados, es decir la determinación de las CMI, se efectuó a las 24 horas de incubación para *Candida* spp y a las 48-72 horas para hongos filamentosos, observando la variación de color del azul de Alamar® que estaba asociado al desarrollo del inóculo (fotografía 3 y 4), permitiendo la determinación de manera más clara de los puntos de corte, en comparación con la turbidimétrica. Ello redujo la influencia del efecto de arrastre característico de los antifúngicos azólicos en los métodos de dilución sobre la interpretación de los resultados (45).

La CMI de otros antifúngicos es la concentración más baja de antifúngico que no muestra cambio de color, es decir, el primer pocillo azul. Sin embargo, en los azoles no hay siempre un paso de rosa a azul, pudiendo aparecer un color intermedio púrpura (debido al efecto *trailing*) (fotografía 2), en este caso la CMI es la concentración del primer pocillo púrpura (46).

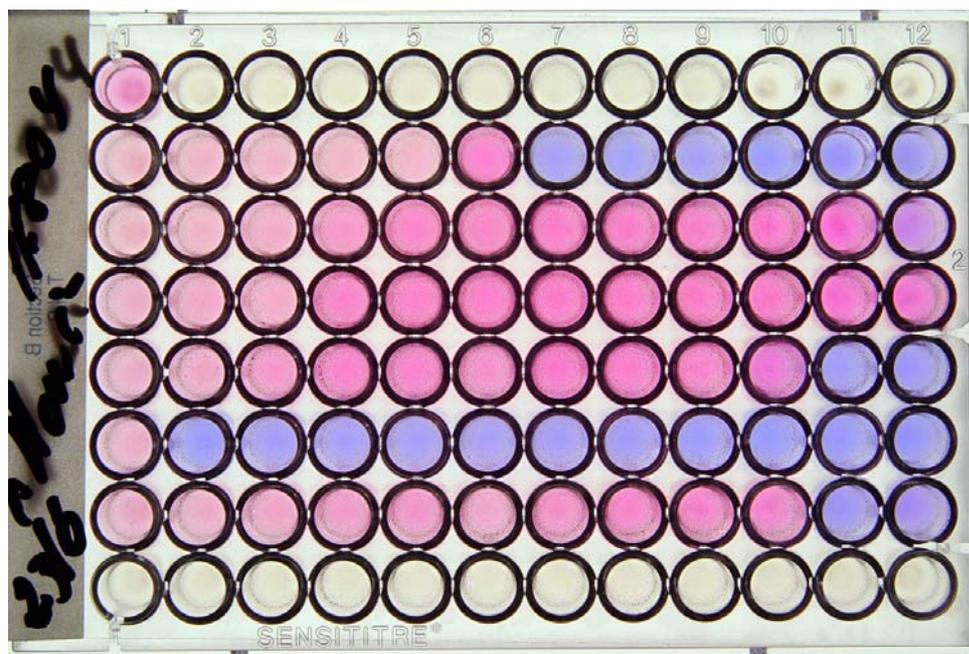
En la lectura de la CMI no se tuvo en cuenta la turbidez de los pocillos.

A partir de estos datos se calcularon las CMI₅₀ y CMI₉₀ como aquellas concentraciones de antifúngico que inhibieron al 50% y 90% de los aislamientos, respectivamente, para aquellos géneros y especies con más de cinco cepas ensayadas.

Fotografía 3.- Panel de Sensititre Yeast One . Sensibilidad al voriconazol.



Fotografía 4.- Panel de Sensititre Yeast One. Resistencia al voriconazol.



III.2.3. Medio CHROMAgar Candida más fluconazol.

III.2.3.1. Preparación del inóculo.

Las muestras clínicas que fueron sometidas al estudio fueron cultivadas usando un método de dilución en agar. Depuradas por aislamiento, las colonias procedentes de cada muestra fueron emulsionadas en agua destilada estéril (118, 139). Las placas a utilizar se dejaron a temperatura ambiente para que ofrecieran una superficie húmeda pero no mojada para poder efectuar la siembra correctamente.

III.2.3.2. Inoculación de las placas e incubación.

Con una suspensión de 0,5 de McFarland, se usó un asa estéril de 10 μ l para inocular placas de CHROMagar que contenían 8 μ gr de fluconazol por ml en una mitad de la placa y en la otra sin fluconazol. Las placas fueron incubadas a 30° C en atmósfera aerobia previamente a la valoración del crecimiento que se llevó a cabo a las 24 y 48 horas.

III.2.3.3. Lectura e interpretación de los resultados.

Los resultados procedentes del medio que contenía fluconazol fueron registrados como sensibles o con sensibilidad disminuida al fluconazol, en base a las características del crecimiento. Las colonias que fueron visualmente más pequeñas de tamaño, como puntas de alfiler, en medio con fluconazol respecto al medio sin fluconazol fueron registradas como sensibles. Las colonias que demostraron crecimiento que fue indistinguible en medio con o sin fluconazol fueron registradas como con sensibilidad disminuida al fluconazol (fotografía 5).

Fotografía 5.- Placas de CHROMAgar Candida fluconazol.



Los resultados en este estudio fueron leídos siempre por la misma persona (98, 103, 135).

Aislamientos de control con sensibilidad conocida fueron incluidos para comparar con las muestras testadas (98, 135).

III.2.4. Controles de calidad de los tres procedimientos.

En cada ensayo se incluyó una cepa control, cuya CMI se ha determinado repetidamente. Ello permitió detectar cualquier alteración del antifúngico en el caso de que la CMI obtenida no se ajustará a los rangos establecidos.

Como control de calidad en los tres métodos fueron usadas dos cepas de hongos levaduriformes: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 con susceptibilidad conocida al fluconazol y voriconazol (8).

Los rangos de CMI de estas cepas para los antifúngicos estudiados, según el método de microdilución M27-A2, (96) quedan expuestos en la tabla IX.

Tabla IX.- Intervalo de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M 27-A2 lectura a las 24 y 48 horas:

Antifúngico	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Anfotericina	0,25-2	0,5-4	0,5-2	1-4
5-fluorocitosina	0,06-0,25	0,12-0,5	4-16	8-32
Fluconazol	0,5-4	1-4	8-64	16-128
Itraconazol	0,12-0,5	0,12-0,5	0,12-1	0,25-1
Ketoconazol	0,03-0,25	0,06-0,5	0,12-1	0,25-1
Voriconazol	0,016-0,12	0,03-0,25	0,06-0,5	0,25-1

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. CHROMAgar Candida más fluconazol: Comparación con técnicas de microdilución.

Todas las cepas de los aislamientos clínicos crecieron en los controles de crecimiento utilizados en el medio CHROMAgar Candida así como en los métodos Sensititre y método de referencia: NCCLS, documento M27-A.

La tabla X muestra el rango de CMI en ($\mu\text{gr/ml}$) del fluconazol, obtenido por los dos métodos de microdilución: Sensititre®/Alamar Yeast One y el método de referencia (NCCLS, documento M27-A), para las distintas especies incluidas en el estudio.

Las especies que mostraron más sensibilidad al fluconazol mediante estos dos métodos fueron: *C. parapsilosis* con un rango de CMI entre 1 – 4 $\mu\text{gr/ml}$ según Sensititre y 0,125 - 4 $\mu\text{gr/ml}$ según NCCLS así como *C. pelliculosa* con una CMI de 2 y 4 $\mu\text{gr/ml}$ para Sensititre y NCCLS respectivamente y *C. lambica* con una CMI de 2 $\mu\text{gr/ml}$.

Las más resistentes al fluconazol, por los dos métodos de microdilución, fueron: *C. krusei* con un rango de CMI entre 128 - > 256 $\mu\text{gr/ml}$ según Sensititre y 64 - > 256 $\mu\text{gr/ml}$ por el NCCLS y *C. glabrata* con una CMI que osciló desde 32 $\mu\text{gr/ml}$ a > 256 $\mu\text{gr/ml}$ por ambos métodos.

La CMI del fluconazol para *C. albicans* tuvo valores más variables entre 0,125 - > 256 $\mu\text{g/ml}$, destacando como hacíamos referencia en la introducción el aumento de resistencias de algunas cepas de *C. albicans* al fluconazol.

C. tropicalis y *Saccharomyces cerevisiae* tuvieron valores de CMI de fluconazol encuadrados como sensibles o sensibles dependiendo de la dosis.

La concordancia entre ambos métodos de microdilución (en aquellas especies cuyo número de cepas estudiadas fue superior a 10) fue $\geq 90\%$, siendo mayor para las especies: *C. tropicalis* con una concordancia entre ambos métodos del 98 % y más significativo en el caso de *C. parapsilosis* con una concordancia del 100 %. Existió una alta correlación en la CMI₅₀ y CMI₉₀ por ambos métodos de microdilución para *C. albicans* y *C. parapsilosis*, llegando a ser del 100 %.

Comparamos las sensibilidades, según la CMI, obtenidas con ambos medios de microdilución con la obtenida utilizando el CHROMAgar Candida más fluconazol. En el medio CHROMAgar Candida más fluconazol una cepa se consideró con sensibilidad disminuida al fluconazol cuando su crecimiento en la placa de medio con el antifúngico era igual al obtenido en la placa sin fluconazol. La lectura del crecimiento en las placas se llevó a cabo a las 24 y 48 horas.

En la tabla XI se presenta el número de aislamientos con sensibilidad disminuida al fluconazol según el procedimiento empleado.

El hecho de que el número de cepas de algunas especies como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. pelliculosa* con sensibilidad disminuida al fluconazol por el medio CHROMAgar Candida más fluconazol se incrementa en la lectura realizada a las 48 horas respecto a la realizada a las 24 horas puede justificarse por el hecho de que muchas cepas requieran más de 24 horas de incubación para mostrar crecimiento.

Para la evaluación de los resultados se debe tener en cuenta que el medio CHROM-FZ permite diferenciar cepas sensibles (CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$) a fluconazol de aquellas con sensibilidad disminuida al fluconazol (CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), mientras que ambos métodos de microdilución permiten distinguir, dentro de las cepas con sensibilidad disminuida, las cepas sensibles dependiendo de la dosis (CMI: 16 – 32 $\mu\text{g/ml}$) y las resistentes (CMI ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$). Por lo cual al comparar los tres métodos, en el caso del Sensititre y NCCLS el valor que tomamos como referencia es el total de cepas que incluye las sensibles dependiendo de la dosis y las resistentes al

fluconazol, de esta forma obtenemos una alta correlación de resultados entre los tres métodos para todas las especies estudiadas.

Comparando en porcentajes la resistencia al fluconazol mediante el medio CHROM-FZ y los dos métodos de microdilución observamos que para el total de cepas estudiadas de las distintas especies (156 cepas), en el medio CHROM-FZ obtenemos 53,20 % de cepas con sensibilidad disminuida al fluconazol o con una CMI ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ en la lectura a las 48 horas; mientras que con los métodos Sensititre y el de referencia del NCCLS los porcentajes son 48,71 % y 49,35 % respectivamente incluyendo las cepas resistentes (CMI ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) como aquellas con sensibilidad dependiente de la dosis (CMI: 16 - 32 $\mu\text{g/ml}$).

Un 3,85 % de las cepas estudiadas (6 cepas) con crecimiento o sensibilidad disminuida en el medio CHROM-FZ fueron sensibles con el método de referencia del NCCLS, este porcentaje incluye las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis*. No encontramos por el contrario cepas resistentes en el M-27A y sensibles en el medio CHROM-FZ

El mayor número de cepas en nuestro estudio correspondió a la especie *C. albicans*, de la cual un 53,21 % de las cepas mostraron sensibilidad disminuida al fluconazol en el CHROM-FZ, mientras que en el Sensititre y método de referencia el porcentaje fue 50,45 % y 51,37 % respectivamente. En la especie *C. parapsilosis*, un 21,05 % de las cepas estudiadas mostraron sensibilidad disminuida al fluconazol en el medio CHROM-FZ, este porcentaje fue menor para el Sensititre y el NCCLS (10,52 %).

Estos resultados demuestran un alto porcentaje de resistencia al fluconazol sobre todo de la especie *C. albicans*, una especie tradicionalmente sensible a este azol (106).

La mayor concordancia entre los tres procedimientos empleados se produce para tres especies: *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Las 12 cepas estudiadas de *C. glabrata* mostraron sensibilidad disminuida al fluconazol por los tres métodos: CHROMAgar Candida más fluconazol (a las 48 horas), SENSITITRE y el método de referencia; de las 11 cepas de *C. tropicalis* el porcentaje de aquellas que tuvieron

sensibilidad disminuida al fluconazol fue: 36,36 % por el CHROM-FZ y los dos métodos de microdilución y las dos cepas estudiadas de *C. krusei* mostraron sensibilidad disminuida con las tres técnicas utilizadas, así como en la lectura en el medio CHROMAgar Candida más fluconazol llevada a cabo a las 24 y 48 horas.

TABLA X.-: Rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ de fluconazol obtenido por ambos métodos de microdilución. Porcentaje de concordancia entre Sensititre y NCCLS.

ESPECIE (n°)	SENSITITRE			NCCLS			Porcentaje de concordancia entre Sensititre y NCCLS
	Rango de CMI (en µg/ml)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango de CMI (en µg/ml)	CMI ₅₀	CMI ₉₀	
<i>C. albicans</i> (109)	0,125 - > 256	4	≥ 64	0,125 - > 256	4	≥ 64	96,33 %
<i>C. parapsilosis</i> (19)	1 - 4	2	4	0,125 - 4	2	4	100 %
<i>C. glabrata</i> (12)	32 - > 256	16	64	32 - > 256	8	64	90 %
<i>C. tropicalis</i> (11)	1 - 32	2	8	2 - 64	2	2	98 %
<i>C. krusei</i> (2)	128 - > 256			64 - > 256			
<i>C. pelliculosa</i> (1)	2			4			
<i>C. lambica</i> (1)	2			2			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	8			32			

TABLA XI.- Número de aislamientos con sensibilidad disminuida a fluconazol.

Especies (n°)	CHROMAgar Candida más Fluconazol. Lectura:		SENSITITRE*			Método de referencia (NCCLS, documento M27-A)*		
	24 horas	48 horas	SDD	R	Total	SDD	R	Total
	<i>C. albicans</i> (109)	41	58	35	20	55	33	23
<i>C. parapsilosis</i> (19)	2	4	2	0	2	2	0	2
<i>C. glabrata</i> (12)	10	12	5	7	12	6	6	12
<i>C. tropicalis</i> (11)	2	4	4	0	4	3	1	4
<i>C. krusei</i> (2)	2	2	0	2	2	0	2	2
<i>C. pelliculosa</i> (1)	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>C. lambica</i> (1)	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1)	1	1	0	1	1	1	0	1

(*) En ambos medios de microdilución se consideró: SDD: CMI entre 16 - 32 µg/ml

R: CMI ≥ 64µg/ml.

IV.2. Investigación de la sensibilidad de *Candida* spp. a voriconazol mediante dos métodos de microdilución.

Todas las cepas de los aislamientos clínicos crecieron en los controles de crecimiento utilizados en los métodos Sensititre y Método de referencia (MR).

En ambos métodos, la CMI de las cepas utilizadas como controles de calidad estuvo dentro de los límites aceptados para el voriconazol (8).

La tabla XII muestra el rango de CMI en $\mu\text{gr/ml}$ de voriconazol, obtenido por los dos métodos de microdilución: Sensititre® / Alamar Yeast One y el MR, para las distintas especies incluidas en el estudio. También se exponen la CMI₅₀ y CMI₉₀ del voriconazol obtenida por ambos métodos en las especies estudiadas.

La especie *Candida albicans* fue clasificada en tres grupos en función de su sensibilidad frente al fluconazol. De los 132 aislamientos de *Candida albicans*: 66 fueron clasificados como sensibles al fluconazol, 24 sensibles dependiendo de la dosis (SDD FZ) y 42 resistentes al fluconazol.

La mayor concordancia entre ambos métodos se produjo para las especies: *C. glabrata* y *C. krusei*. Para *C. glabrata* el rango de CMI fue 0,03 - 1 $\mu\text{gr/ml}$ por los dos métodos y las CMI_{50/90}: 0,125 $\mu\text{gr/ml}$ / 0,25 $\mu\text{gr/ml}$ para Sensititre y MR respectivamente. De igual modo para *C. krusei* el rango de CMI fue de 0,06 - 0,25 $\mu\text{gr/ml}$ y las CMI_{50/90}: 0,125 $\mu\text{gr/ml}$ / 0,25 $\mu\text{gr/ml}$ para los dos métodos respectivamente. Por lo cual la concordancia de ambos métodos de microdilución para ambas especies (*C. glabrata* y *C. krusei*) fue del 100 %, dando rangos de actividad del voriconazol frente a dichas especies, lo cual tiene gran interés al tratarse de especies resistentes al fluconazol.

En el caso de *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* la concordancia entre ambos métodos fue de un 98 % coincidiendo los rangos de CMI y de CMI₅₀, existiendo una diferencia para la CMI₉₀ de ambas especies de ± 1 dilución. Esta diferencia de ± 1

dilución, también se estableció para el rango de CMI, CMI₅₀ o CMI₉₀ de las especies: *Candida albicans* sensible al fluconazol y *C. parapsilosis* por ambos métodos, llegando a ser la concordancia entre Sensititre y MR de un 98 %.

Para *Candida albicans* con sensibilidad dependiendo de la dosis de fluconazol (SDD FZ) resultó una concordancia entre los dos métodos de un 97 %, con una diferencia de ± 2 diluciones para los valores de CMI. En el caso de *Candida albicans* resistente al fluconazol existió una alta correlación para la CMI₅₀ y CMI₉₀ y para el rango de CMI obtenido por ambos métodos: 0,03-16 $\mu\text{gr/ml}$.

En relación a la actividad de voriconazol podemos decir que en todas las especies estudiadas con la excepción de *Candida albicans* resistente al fluconazol por el MR, obtuvimos rangos de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ para el voriconazol de $< 1 \mu\text{gr/ml}$, por tanto de actividad del voriconazol frente a dichas especies (130). En *C. albicans* resistente a fluconazol, la CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidas fueron $\leq 1 \mu\text{gr/ml}$, por tanto también de actividad del voriconazol, aunque el rango de CMI fue más amplio.

Tabla XII.- Sensibilidad de las especies estudiadas al voriconazol mediante dos métodos de microdilución: Sensititre Yeast One y el Método de Referencia del NCCLS (MR).

		Rango de CMI ($\mu\text{gr/ml}$)	CMI ₅₀ ($\mu\text{gr/ml}$)	CMI ₉₀ ($\mu\text{gr/ml}$)
<i>C. albicans</i> 66 sensibles FZ	MR (M27-A)	0,03 - 0,125	0,03	0,06
	SENSITITRE	0,03 - 0,25	0,03	0,03
<i>C. albicans</i> 24 SDD FZ	MR (M27-A)	0,03 - 0,5	0,06	0,5
	SENSITITRE	0,03 - 0,125	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> 42 resistentes FZ	MR (M27-A)	0,03 - 16	0,03	1
	SENSITITRE	0,03 - 16	0,06	1
<i>C. parapsilosis</i>	MR (M27-A)	0,03 - 0,06	0,03	0,06
	SENSITITRE	0,03 - 0,125	0,03	0,125
<i>C. glabrata</i>	MR (M27-A)	0,03 - 1	0,125	0,25
	SENSITITRE	0,03 - 1	0,125	0,25
<i>C. krusei</i>	MR (M27-A)	0,06 - 0,25	0,125	0,25
	SENSITITRE	0,06 - 0,25	0,125	0,25
<i>C. tropicalis</i>	MR (M27-A)	0,03 - 0,25	0,03	0,25
	SENSITITRE	0,03 - 0,25	0,03	0,125
<i>C. lusitaniae</i>	MR (M27-A)	0,03 - 0,06	0,03	0,03
	SENSITITRE	0,03 - 0,06	0,03	0,06

IV.3. Estudio de sensibilidad de hongos filamentosos a seis antifúngicos mediante una técnica de microdilución: Sensititre Yeast One.

El género más frecuente en el estudio realizado correspondió a *Aspergillus*, 79 cepas de las 86 testadas, que representa un 91,86 % del total de cepas. La especie más identificada fue *Aspergillus fumigatus*, 46 cepas, con un porcentaje de un 53,48 % respecto al total de cepas. El porcentaje más elevado de muestras clínicas procesadas correspondió a las de procedencia de esputo, un 55,81 % respecto al total, es decir 48 de las 86 cepas testadas.

Las CMI de los distintos antifúngicos para las cepas control utilizadas, *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019, estuvieron dentro de los intervalos especificados en el documento M 27-A y M 27-A2 del NCCLS (ver tabla IX en la sección Material y Métodos).

Todas las cepas del estudio crecieron a las 48 - 72 horas de incubación, observándose el viraje a rosa del pocillo control de crecimiento, las cepas que tardaron más en crecer (72 horas) correspondieron a las especies: *Aspergillus fumigatus* (1 cepa), *Aspergillus niger* (1 cepa), así como todas las cepas estudiadas de *Fusarium* (4 cepas) y *Scedosporium apiospermum* (2 cepas).

En las tablas XIII-XVIII se señalan los resultados obtenidos de sensibilidad de las especies estudiadas frente a los seis antifúngicos presentes en el panel de Sensititre Yeast One, entre ellos el voriconazol. Estos resultados se resumen en forma de rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ que iremos comentando.

La tabla XIII muestra la sensibilidad de los hongos filamentosos frente a la anfotericina B. El rango de CMI para las distintas especies es muy amplio, siendo la más sensible una cepa de la especie *Aspergillus flavus*, con una CMI de 0,008 µg/ml y la más resistente una cepa de la especie *Aspergillus fumigatus*, con una CMI > 16

µg/ml. La CMI₅₀ y CMI₉₀ para el género *Aspergillus* se mantuvo en 0,5 µg/ml, excepto para *Aspergillus flavus* cuya CMI₅₀ fue una dilución menor.

La sensibilidad *in vitro* frente a anfotericina B del resto de las cepas testadas, *Scedosporium apiospermum* y *Rhizomucor pusillus*, se demostró con una CMI igual a 0,25 µg/ml, fue menor para las cuatro cepas estudiadas de *Fusarium* cuyo rango de CMI estuvo entre 1 - 2 µg/ml.

En la tabla XIV se resume la sensibilidad frente a fluconazol de las cepas estudiadas. Tanto la CMI₅₀, la CMI₉₀ como el rango obtenido de CMI nos dan valores de resistencia frente al fluconazol. Tan sólo dos cepas de *Aspergillus fumigatus* procedentes de dos muestras de esputo mostraron sensibilidad a este azol con valores de CMI de 0,125 y 0,5 µg/ml.

La sensibilidad frente a itraconazol queda reflejada en la tabla XV. Dentro de la especie *Aspergillus fumigatus* encontramos la cepa más sensible a este azol, CMI de 0,008 µg/ml, así como la más resistente, CMI > 16 µg/ml. Encontramos también una cepa del género *Fusarium* perteneciente a la especie *Fusarium moniliforme* que muestra alta resistencia al itraconazol, CMI > 16 µg/ml.

La CMI₅₀ para *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus terreus*, así como la CMI₉₀ para *Aspergillus flavus* fue una dilución menor a la obtenida por las mismas especies frente a Anfotericina B. Por lo cual podemos decir que la sensibilidad en estas cepas es mayor al itraconazol que a la anfotericina B.

La sensibilidad al ketoconazol se muestra en la tabla XVI. La especie en la que encontramos la cepa más sensible así como la más resistente es *Aspergillus fumigatus*. La CMI₅₀ y CMI₉₀ de ketoconazol frente a las especies testadas fue hasta cinco diluciones superior a la obtenida con anfotericina B e itraconazol, por lo cual la sensibilidad frente a ketoconazol fue menor.

La tabla XVII señala la sensibilidad frente a 5-fluorocitosina de las cepas estudiadas, mostrando todas ellas rangos de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ superiores a otros antifúngicos como anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y voriconazol.

La sensibilidad de las cepas frente a voriconazol se manifiesta en la tabla XVIII. El rango de CMI obtenido por los distintos géneros es el menor si lo comparamos con cualquiera de los otros cinco antifúngicos estudiados, siendo la $CMI \leq 1 \mu\text{g/ml}$, excepto para una cepa de *Fusarium moniliforme* cuyo valor de CMI fue $4 \mu\text{g/ml}$. La única cepa testada de *Rhizomucor pusillus* mostró una CMI para voriconazol de $2 \mu\text{g/ml}$, por tanto de menor sensibilidad frente a este azol. La CMI_{50} y CMI_{90} obtenidas para el resto de géneros testados fue también $\leq 1 \mu\text{g/ml}$.

Tabla XIII.- Sensibilidad de los hongos filamentosos estudiados a la Anfotericina B mediante el Método Sensititre Yeast One.

Especie (n)	Rango de CMI (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀(µg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (46)	0,125 - > 16	0,5	0,5
<i>A. terreus</i> (14)	0,25 - 1	0,5	0,5
<i>A. niger</i> (11)	0,25 - 0,5	0,5	0,5
<i>A. flavus</i> (6)	0,008 - 1	0,25	0,5
<i>A. nidulans</i> (1)	0,5		
<i>A. ustus</i> (1)	1		
<i>Fusarium moniliforme</i> (2)	1 - 2		
<i>F. oxysporum</i> (2)	1		
<i>Scedosporium apiospermum</i> (2)	0,25		
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	0,25		

Tabla XIV.- Sensibilidad de los hongos filamentosos estudiados al Fluconazol mediante el Método Sensititre Yeast One.

Especie (n)	Rango de CMI (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀(µg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (46)	0,125 - > 256	> 256	> 256
<i>A. terreus</i> (14)	64 - > 256	256	> 256
<i>A. niger</i> (11)	128 - > 256	> 256	> 256
<i>A. flavus</i> (6)	256 - > 256	256	> 256
<i>A. nidulans</i> (1)	> 256		
<i>A. ustus</i> (1)	128		
<i>Fusarium moniliforme</i> (2)	128 - > 256		
<i>F. oxysporum</i> (2)	256		
<i>Scedosporium apiospermum</i> (2)	32		
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	64		

Tabla XV.- Sensibilidad de los hongos filamentosos estudiados al Itraconazol mediante el Método Sensititre Yeast One.

Especie (n)	Rango de CMI (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀(µg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (46)	0,008 - > 16	0,25	0,5
<i>A. terreus</i> (14)	0,125 - 0,5	0,25	0,5
<i>A. niger</i> (11)	0,25	0,5	0,5
<i>A. flavus</i> (6)	0,25	0,25	0,25
<i>A. nidulans</i> (1)	0,25		
<i>A. ustus</i> (1)	0,25		
<i>Fusarium moniliforme</i> (2)	0,5 - > 16		
<i>F. oxysporum</i> (2)	1		
<i>Scedosporium apiospermum</i> (2)	2		
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	0,06		

Tabla XVI.- Sensibilidad de los hongos filamentosos estudiados al Ketoconazol mediante el Método Sensititre Yeast One.

Especie (n)	Rango de CMI (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀(µg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (46)	0,008 - > 16	4	8
<i>A. terreus</i> (14)	0,25 - 8	1	4
<i>A. niger</i> (11)	2 - 8	4	4
<i>A. flavus</i> (6)	0,25 - 2	1	2
<i>A. nidulans</i> (1)	1		
<i>A. ustus</i> (1)	0,25		
<i>Fusarium moniliforme</i> (2)	0,5 - 4		
<i>F. oxysporum</i> (2)	1		
<i>Scedosporium apiospermum</i> (2)	1		
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	0,125		

Tabla XVII.- Sensibilidad de los hongos filamentosos estudiados a la 5-Fluorcitosina mediante el Método Sensititre Yeast One.

Especie (n)	Rango de CMI (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀(µg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (46)	0,125 - > 64	32	> 64
<i>A. terreus</i> (14)	1 - > 64	64	> 64
<i>A. niger</i> (11)	1 - > 64	8	8
<i>A. flavus</i> (6)	8 - > 64	16	32
<i>A. nidulans</i> (1)	> 64		
<i>A. ustus</i> (1)	> 64		
<i>Fusarium moniliforme</i> (2)	16 - > 64		
<i>F. oxysporum</i> (2)	> 64		
<i>Scedosporium apiospermum</i> (2)	64		
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	> 64		

Tabla XVIII.- Sensibilidad de los hongos filamentosos estudiados al Voriconazol mediante el Método Sensititre Yeast One.

Especie (n)	Rango de CMI (µg/ml)	CMI₅₀ (µg/ml)	CMI₉₀(µg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (46)	0,016 - 1	0,25	1
<i>A. terreus</i> (14)	0,06 - 0,5	0,125	0,5
<i>A. niger</i> (11)	0,125 - 1	0,25	0,5
<i>A. flavus</i> (6)	0,06 - 0,5	0,25	0,5
<i>A. nidulans</i> (1)	0,25		
<i>A. ustus</i> (1)	0,06		
<i>Fusarium moniliforme</i> (2)	0,5 - 4		
<i>F. oxysporum</i> (2)	0,5		
<i>Scedosporium apiospermum</i> (2)	1		
<i>Rhizomucor pusillus</i> (1)	2		

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. CHROMAgar Candida más fluconazol: Comparación con técnicas de microdilución.

Para que un caso de resistencia sea correctamente evaluado se debe disponer de un método de sensibilidad *in vitro* fiable y estandarizado. En el año 1997, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicó un método de referencia para levaduras, el documento M27-A, en él se propone un método de dilución en medio líquido y en el protocolo se consensúan las distintas variables experimentales (136). Los estándares del NCCLS constituyen los métodos de referencia más difundidos y que más se han utilizado para realizar correlaciones con la clínica. Pero este método es muy laborioso y complejo, lo cual es poco compatible con la creciente demanda de este tipo de ensayos (46).

Para el diagnóstico micológico así como para el estudio de la sensibilidad de distintas especies de hongos a diferentes antifúngicos se están produciendo avances importantes que permiten un diagnóstico más rápido y eficiente. La velocidad en la obtención de éste diagnóstico es un aspecto fundamental en la medicina actual, ya que un diagnóstico rápido posibilitará la prescripción de un tratamiento antifúngico específico que permitirá un uso racional de los antifúngicos y limitará el desarrollo de resistencias (11).

Idealmente, las pruebas de sensibilidad antifúngica deben ser fáciles de realizar, con una buena relación coste-efectividad y que proporcionen los puntos de corte de las CMI que sean reproducibles y puedan determinarse con prontitud después de un corto periodo de incubación. Además estos resultados de las CMI deben servir como predictores de la eficacia de los fármacos o de la respuesta *in vivo*.

En el campo de las pruebas de sensibilidad antifúngica, no fue hasta los primeros años de la década 1990 que se lograron buenos acuerdos entre los datos de la CMI obtenidos en distintos laboratorios (41, 53, 107).

Para obviar los inconvenientes que se presentan con el uso del método de referencia para levaduras (NCCLS, documento M27-A) por su laboriosidad, nosotros hemos determinado la sensibilidad disminuida al fluconazol mediante un método sensible pero más rápido y económico, CHROMAgar Candida más fluconazol. Este medio tuvo una doble utilidad, tanto en la identificación como en la detección de la sensibilidad de las cepas al fluconazol. Los patrones de color de las levaduras observados en el CHROMAgar Candida también ayudaron en la comparación del crecimiento de las colonias en medio con y sin fluconazol permitiendo una mayor rapidez en la identificación de las cepas resistentes.

En el estudio realizado el número de cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. pelliculosa* que presentaban sensibilidad disminuida al fluconazol se incrementó en la lectura a las 48 horas, respecto de la de 24 horas. Entre las cepas de *C. albicans*, 17 cepas mostraron menor crecimiento y/o diferente color (verde más claro o blanco) tras 24 horas de incubación comparado con el observado a las 48 horas (verde). De las 4 cepas de *C. parapsilosis* que crecieron a las 48 horas (color blanco, blanco rosáceo o rosa crema) 1 de ellas a las 24 horas tuvo menor crecimiento y otra coloración distinta (blanca que pasaría a rosa cremosa). En la especie *C. glabrata* dos de las cepas que aparecían como sensibles a las 24 horas con ausencia de crecimiento, crecieron a las 48 horas (coloración violeta, rosa violácea o morada). Igual ocurrió con *C. tropicalis* donde a las 24 horas sólo 2 cepas crecieron, aumentando a las 48 horas a 4 el número de cepas con sensibilidad disminuida al fluconazol, dando una coloración azul, azul-turquesa o violeta gris. Para *C. pelliculosa* la única cepa estudiada no tuvo crecimiento a las 24 horas pero sí a las 48 horas (color rosa-violeta).

En el medio CHROM-FZ la discordancia entre las dos lecturas, a las 24 y 48 horas, puede ser debida como comentamos con anterioridad a la necesidad de algunas cepas de mayor tiempo de incubación para mostrar crecimiento. Las especies *C. krusei*, *C. lambica* y *Saccharomyces cerevisiae* mostraron mayor concordancia en la lectura a las 24 y 48 horas dando el mismo número de cepas con sensibilidad disminuida al fluconazol, aunque este resultado no se puede considerar significativo por el escaso número de cepas estudiadas.

Comparando los tres procedimientos empleados para determinar la sensibilidad disminuida al fluconazol (CHROM-FZ y los dos métodos de microdilución), observamos que para la mayoría de las especies, sobre todo *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* existe una alta correlación entre ellos, siempre que en los métodos de microdilución consideremos como sensibilidad disminuida al fluconazol tanto aquellas cepas cuyo rango de CMI sea de sensibilidad dependiente de la dosis (CMI: 8 - 32 µg/ml) como las que presentan una CMI \geq 64 µg/ml (resistentes). Esta distinción no es posible cuando se emplea el medio CHROM-FZ por lo cual muchas de las cepas consideradas con sensibilidad disminuida en este medio en realidad son cepas con sensibilidad dependiente de la dosis. Sin embargo, esto no afectaría a algunas especies como *C. krusei* que tiene rango en los métodos de microdilución de resistencia al fluconazol y concuerda perfectamente con los resultados obtenidos en el CHROM-FZ.

Debemos también considerar que existen factores como el medio usado que pueden contribuir al mayor o menor crecimiento de las distintas especies de levaduras.

Estos resultados indican que las levaduras aisladas a partir de muestras clínicas de las que generalmente se aíslan cepas con sensibilidad dependiente de la dosis de fluconazol, como esputo o exudados orofaríngeos, en nuestro estudio el 14,74 % del total de muestras, el CHROM-FZ presenta una baja especificidad ya que solo determina sensibilidad o resistencia, considerando como resistentes cepas que en realidad son sensibles dependiendo de la dosis (ver tabla XI), y por tanto en estos casos sería necesario aplicar otros métodos como los de microdilución

expuestos en este trabajo. Sin embargo en el estudio de muestras de otras procedencias como exudados vaginales, hemocultivos,... a partir de las que generalmente se aíslan menor número de cepas con sensibilidad dependiente de la dosis, el medio CHROM-FZ puede representar un método rápido de cribado para determinar sensibilidad o resistencia al fluconazol.

También la utilidad de esta técnica va a depender de la especie estudiada, así en especies con mayor resistencia al fluconazol como *C. krusei*, obtenemos mayor beneficio con el medio CHROM-FZ.

Se han logrado grandes avances en los métodos disponibles para probar la sensibilidad antifúngica de levaduras. El método colorimétrico Sensititre Yeast One y CHROM-FZ evaluados en el presente estudio proporcionan una mayor rapidez de resultados en comparación con los obtenidos por el método de referencia NCCLS M27-A. Algunos autores piensan que el método colorimétrico es un método subjetivo al definir la CMI, en ocasiones, según un leve cambio de color (42).

La cuestión que muchos expertos se plantean actualmente es si pueden basarse las indicaciones de los diferentes antifúngicos, en los resultados obtenidos con los estudios de sensibilidad disponibles.

Según algunos autores la correlación entre las pruebas *in vitro* de sensibilidad a los antifúngicos y la respuesta al tratamiento de los enfermos con micosis no es muy alta (122). Se considera una buena correlación *in vitro- in vivo* cuando puede predecirse la resistencia clínica mediante la detección *in vitro* de la resistencia microbiológica. Así se ha observado a veces una disminución de la respuesta al tratamiento cuando la cepa tiene una CMI elevada, como es el caso de las candidiasis orofaríngeas por cepas resistentes *in vitro* al fluconazol. Sin embargo no se establece una correlación tan clara en las candidiasis profundas, lo que sin duda limita los estudios de sensibilidad a los antifúngicos, aunque en ello parecen influir varias variables: pocos estudios clínicos al respecto, realizarlos con pocos enfermos, no considerar dosis de antifúngico o enfermedad de base e incluir un número muy limitado de cepas resistentes *in vitro*.

Lo que si parece incuestionable es que las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos pueden tener mayor utilidad, ayudando a elegir la terapia antifúngica y la dosis más adecuada, en determinados casos como en: cepas de enfermos con terapia profiláctica antifúngica previa, cepas de especies poco frecuentes cuyo espectro de sensibilidad *in vitro* se desconoce o cepas de enfermos que han tenido un fracaso terapéutico (38).

Por otra parte es importante realizar estudios epidemiológicos periódicos para conocer el perfil de sensibilidad de las distintas especies así como su incidencia.

Los azoles, desde su introducción (fluconazol en 1990 e itraconazol en 1992), han sido usados ampliamente para el tratamiento de las micosis sistémicas. El empleo de fluconazol se ha incrementado como profilaxis primaria, terapéutica empírica y para profilaxis secundaria. El aumento de la resistencia a los azoles se ha encontrado fundamentalmente en pacientes infectados con VIH que desarrollan frecuentemente candidiasis orofaríngeas pero también en pacientes no infectados con VIH y en pacientes no expuestos previamente a antifúngicos (135).

La prevalencia de las infecciones debidas a organismos levaduriformes resistentes a los azoles se ha estimado entre 21-32 % en pacientes sintomáticos (79); estos datos concuerdan con nuestros resultados para los métodos de microdilución (19,23 % en el Sensititre y 20,51 % en el NCCLS) y menos en el caso del medio CHROM-FZ (53,20 %) ya que este incluye no solo cepas resistentes (CMI \geq 64 $\mu\text{g/ml}$) sino también aquellas sensibles dependiendo de la dosis (CMI entre 16 - 32 $\mu\text{g/ml}$).

No hay muchos trabajos publicados acerca de la validez del medio CHROMAgar más fluconazol para detectar la sensibilidad o resistencia de las cepas al fluconazol.

En un trabajo publicado por T. F. Patterson en 1996 (102) hace referencia a la idoneidad del método para diferenciar de forma rápida y sensible las cepas sensibles o resistentes al fluconazol, tomando el valor de 8 $\mu\text{g/ml}$. como el punto de

corte para señalar sensibilidad (103). Vergheze (135) refiere la concordancia entre las cepas encontradas resistentes al fluconazol por el medio del CHROMAgar Candida más fluconazol (con 8 µg/ml y 16 µg/ml de fluconazol) y por una técnica de macrodilución. Canle (15) obtiene una alta concordancia entre el método de CHROMAgar Candida con 8 µg/ml de fluconazol con el Sensititre para las especies de *C. albicans* y de *C. parapsilosis*.

Existen algunos estudios realizados que tratan de relacionar el tamaño de las colonias obtenidas en las placas de CHROMAgar Candida más fluconazol con la CMI para estas cepas (65).

Por todo ello y a la vista de nuestros resultados pensamos que el medio CHROMAgar Candida más 8 µg/ml de fluconazol, puede ser utilizado para determinar sensibilidad o sensibilidad disminuida al fluconazol indicando claramente las cepas sensibles al fluconazol mediante la ausencia de crecimiento. Sin embargo, para poder determinar si el crecimiento en el medio representa realmente una cepa resistente ($CMI \geq 64 \mu\text{g/ml}$) o si se trata de cepas con sensibilidad dependiente de la dosis (CMI entre 16 - 32 µg/ml), debe realizarse un estudio mediante otras técnicas, en laboratorios de Micología Clínica experimentados en técnicas de sensibilidades a antifúngicos. La utilidad del medio CHROM-FZ dependerá de la procedencia de la muestra y de la especie estudiada.

V.2. Investigación de la sensibilidad de *Candida* spp. a voriconazol mediante dos métodos de microdilución.

Una de las ventajas que obtenemos con el Sensititre Yeast One es la facilidad de utilización en la práctica en laboratorios de Microbiología clínica de nivel diagnóstico. La complejidad técnica y la falta de adiestramiento técnico en la lectura e interpretación de los resultados con el MR (Método de Referencia del NCCLS) son datos a tener en cuenta a la hora de valorar la utilidad de este método comercializado (108). Los resultados obtenidos en los estudios de sensibilidad pueden verse afectados por muchas variables experimentales que se pueden reducir al eliminar determinados procesos de manipulación como la preparación de las diluciones y el medio de cultivo, aumentando el nivel de automatización (3).

La CMI por el MR fue definida como la menor concentración de antifúngico que produjo una inhibición del crecimiento del $\geq 50\%$ (41). El característico efecto de arrastre conocido como *trailing effect* o crecimiento residual de los microorganismos, al utilizar antifúngicos azólicos, que dificulta la interpretación de los resultados en el MR, se soluciona en parte mediante técnicas comercializadas que facilitan dicha lectura a través de un cambio de color del indicador de pH presente en el medio de cultivo (91).

El sistema Sensititre tiene la ventaja de una lectura más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules. Sin embargo, con los azoles, debido al efecto trailing, el cambio de color no es tan evidente y, en ocasiones, pasa de rosa (crecimiento) a púrpura (inhibición parcial del crecimiento) (46), en este caso la CMI es la concentración del primer pocillo púrpura.

Los métodos colorimétricos comercializados se caracterizan por un alto nivel de reproducibilidad y estandarización por lo que su aceptación viene condicionada por la relación coste / beneficio.

Una de las características más importantes de Sensititre Yeast One radica en la posibilidad de incorporar nuevos antifúngicos a medida que éstos, vayan siendo introducidos en la clínica, siendo así la única técnica comercializada que permite actualmente determinar la sensibilidad *in vitro* al voriconazol.

La concordancia entre Sensititre Yeast One y el MR (microdilución), no ha sido aún establecida para el voriconazol. Sin embargo si hay estudios que establecen la concordancia entre los dos métodos para otros antifúngicos.

Según Messer y Pfaller (91) la concordancia fue del 83 % para el itraconazol y del 93 % para la 5-fluorocitosina. Arikan y colaboradores (3) obtuvieron resultados similares para fluconazol y anfotericina B, así como Posteraro y colaboradores (117). Chryssanthou (25) realiza una comparación entre pruebas de sensibilidad antifúngica de *Candida* spp a los siguientes antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina B y 5-fluorocitosina encontrando un alto porcentaje de concordancia, del 87%, entre Sensititre Yeast One y el Método de Referencia del NCCLS.

La concordancia entre ambos métodos está influenciada por algunas variables experimentales entre las que se encuentra el tiempo de incubación, que afecta de forma distinta a diferentes géneros y especies de levaduras. Así, según Espinel-Ingroff (45), la concordancia entre ambos métodos, para *Candida albicans* era mayor a las 24 horas de incubación y oscilaba entre el 97 % para la anfotericina B y el 87% para fluconazol, mientras que para otras especies de *Candida* los valores se incrementaron hasta el 97-100 % en el resto de antifúngicos.

Respecto a la actividad del voriconazol, hasta la fecha no se han establecido puntos de corte que puedan separar las cepas sensibles de las resistentes. Teniendo en cuenta las dosis terapéuticas recomendadas de voriconazol, 100 - 300 mg/12 horas por vía oral o parenteral, con las cuales alcanzamos concentraciones plasmáticas entre 0,9 y 4 mg/l. (74). Podemos decir que las cepas con CMI < de 1 - 2 mg/l podrían considerarse como sensibles y las que presenten CMI > 1 - 2 mg/l considerarlas resistentes.

Un posible marcador de resistencia cruzada entre los fármacos azoles es la actividad que presentan frente a *Candida albicans* resistente a fluconazol. Cuenca-Estrella (29) observó que para ciertas cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* con sensibilidad reducida al fluconazol, la CMI₅₀ de voriconazol fue < 0,5 µg/ml, mostrando por tanto, el voriconazol una excelente actividad *in vitro* frente a este tipo de levaduras. No obstante, los aislamientos de *C. tropicalis* con sensibilidad reducida a fluconazol tenían resistencia cruzada con voriconazol (CMI₅₀ = 4µg/ml) y otros azoles, como el itraconazol.

Posteriormente el mismo autor, Cuenca-Estrella (30) compara la actividad frente a voriconazol de distintas especies de *Candida*, encontrando que aquellas que presentan CMI más elevadas, como *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. guilliermondii*, tienen también mayor resistencia frente a fluconazol e itraconazol. No coinciden estos datos con nuestros resultados, ya que obtuvimos para *C. krusei* y *C. glabrata* una CMI₉₀ igual a 0,25 µg/ml frente a voriconazol, por tanto de mayor sensibilidad a dicho antifúngico.

En nuestro estudio voriconazol mostró actividad (CMI ≤ 1 µgr/ml) para todas las especies estudiadas: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. albicans*, sobre todo aquellas sensibles a fluconazol y sensibles dependiendo de la dosis a fluconazol, ya que hubo una pequeña proporción de cepas resistentes al fluconazol frente a las cuales mostró menor actividad el voriconazol, CMI > 1 µgr/ml) (114), ello podría ser explicado por la posible existencia de resistencias cruzadas a los azoles, al compartir mecanismos de resistencia.

Así, podemos señalar, que voriconazol es activo frente a cepas y especies resistentes *in vitro* a fluconazol, lo que le otorga un papel terapéutico en algunas infecciones por levaduras. Sin embargo, hay que indicar que las cepas con resistencia *in vitro* a fluconazol presentan CMI de voriconazol significativamente más elevadas que las cepas sensibles a fluconazol (29).

Respecto a la CMI₉₀ de *C. glabrata* obtenida por el MR nuestro resultado (0,25µgr/ml) no concuerda con el referido por otros autores. Así, Espinel-Ingroff (43) relata como la CMI₉₀ obtenida para esta especie por el MR es de 4 µgr/ml. Hoban (63) refiere una CMI₉₀ de 2 µgr/ml para *C. glabrata* mediante el MR.

Por tanto según ambos autores *C. glabrata* presentaría resistencia al voriconazol (CMI > 1µg/ml) señalando el hecho de que en ambos estudios *C. glabrata* presenta: resistencia al fluconazol en el estudio de Espinel-Ingroff (43) o sensibilidad dependiendo de la dosis de fluconazol en el trabajo publicado por Hoban (63).

Voriconazol presenta efecto fungistático sobre distintas especies del género *Candida*, ya que concentraciones entre 0,25 y 10 mg/l sólo consiguen inhibir el crecimiento de las cepas (40, 80). En condiciones anaerobias este antifúngico puede tener efectos fungicidas sobre *C. albicans* (141).

Tenemos que hacer referencia al interés como alternativa de este antifúngico, voriconazol, frente a especies resistentes al fluconazol como *C. glabrata* y *C. krusei*, destacando la importancia de este nuevo antifúngico como opción en las candidiasis resistentes al fluconazol de los pacientes con S.I.D.A. (114), pacientes oncológicos o con enfermedades hematológicas (126).

La elevada concordancia entre los dos métodos estudiados, 97-100 %, junto a la reducción del tiempo de procesado, la facilidad en la realización y lectura por el método comercializado sugieren la utilidad de este método, Sensititre Yeast One, para determinar la sensibilidad al voriconazol de los organismos levaduriformes frecuentemente aislados en los Laboratorios de Micología Clínica.

V.3. Estudio de hongos filamentosos a seis antifúngicos mediante una técnica de microdilución: Sensititre Yeast One.

Los hongos filamentosos oportunistas se han convertido en los últimos años en una seria amenaza para los pacientes inmunodeprimidos. La incidencia de infecciones producidas por *Aspergillus* se ha incrementado en las últimas dos décadas hasta el punto que se ha convertido en la infección fúngica invasiva que con mayor frecuencia pone en peligro la vida del paciente (34, 82). Este incremento parece ser debido a la extensión en el uso de los fármacos inmunodepresores para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, a la expansión del SIDA, al aumento de tratamientos quimioterápicos frente a distintos tumores así como al elevado número de trasplantes realizados (33, 75, 82).

Se dispone de muy pocos datos sobre la sensibilidad in vitro de los hongos filamentosos a los antifúngicos (17). La estandarización lograda con el documento M 38-P del NCCLS permite realizar estudios de sensibilidad de los hongos filamentosos y compararlos con los resultados de otros autores.

- Respecto a la sensibilidad al itraconazol:

En el estudio realizado por Carrillo-Muñoz y colaboradores (17), siguiendo el documento M 38-P, las distintas especies del género *Aspergillus* estudiadas (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. glaucus* y *A. nidulans*) mostraron una sensibilidad uniforme al itraconazol. La CMI₅₀ obtenida fue de 0,5 µg/ml, mientras en nuestro estudio, que incluye las especies: *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* y *A. ustus*, la CMI₅₀ fue una dilución menor en las especies testadas, excepto para *A. niger* que tuvo el mismo valor 0,5 µg/ml. Igual ocurrió en la CMI₉₀, donde para Carrillo-Muñoz y colaboradores se obtuvo un valor de 1 - 2 µg/ml, siendo en nuestro trabajo hasta 2 diluciones menor. Existe por tanto una alta concordancia con los resultados aportados por este autor. La misma concordancia se establece con los resultados de Ana Espinel-Ingroff (49) donde la

CMI₉₀ obtenida para las especies de *Aspergillus* es igual o con una diferencia de una dilución respecto a nuestros resultados.

Señalar también que nuestros resultados en lo que se refiere a la CMI₉₀ para las especies de *A. fumigatus*, *A. flavus*, y *A. niger* coinciden totalmente o se diferencian en una dilución con los aportados por Johnson y colaboradores (66) así como con los señalados por Murphy y colaboradores (93).

Los puntos de corte para el itraconazol frente a hongos filamentosos todavía no han sido establecidos (17). Según Odds y colaboradores (100) consideran resistencia al itraconazol una CMI ≥ 2 mg/l y sensibilidad CMI ≤ 1 mg/l al obtener una buena respuesta terapéutica en algunos estudios de correlación *in vitro-in vivo*. Para Denning y colaboradores (32) el criterio de resistencia se establece para aquellas cepas con una CMI ≥ 16 mg/l. Por tanto, según Odds y colaboradores (100), el 4,65 % de las cepas estudiadas por nosotros (4 cepas que corresponden a 1 de *Aspergillus fumigatus*, 1 de *Fusarium moniliforme* y 2 de *Scedosporium apiospermum*) serían resistentes a itraconazol, sin embargo el porcentaje de resistencia en nuestro estudio sería de 2,32 % si se aplica el criterio de Denning y colaboradores (32), con 2 cepas con CMI ≥ 16 mg/l, una de *Aspergillus fumigatus* y otra de *Fusarium moniliforme*.

El número de cepas estudiadas de *Fusarium* spp. fue menor, en total cuatro, con un amplio rango de CMI de 0,5 - >16 μ g/ml (una cepa de *F. moniliforme* con una CMI frente a itraconazol de 0,5 μ g/ml, otra de la misma especie presentó CMI > 16 μ g/ml y para las dos cepas de *F. oxysporum* obtuvimos una CMI igual a 1 μ g/ml), por lo cual no podemos establecer concordancia con otros autores donde este género muestra sensibilidad más reducida al itraconazol. Así Espinel-Ingroff (49) al estudiar la sensibilidad *in vitro* frente a itraconazol de cinco cepas de *Fusarium moniliforme* y seis cepas de *F. oxysporum*, obtiene una CMI > 8 μ g/ml en todos los aislamientos y por tanto una CMI₉₀ > 8 μ g/ml. La misma autora, Espinel-Ingroff (44) en otro estudio realizado obtiene una CMI igual a 8 μ g/ml para la misma especie, *Fusarium* spp. Johnson y colaboradores (66) evalúan la actividad antifúngica de tres fármacos frente a hongos filamentosos, la especie *Fusarium solani* presenta un rango de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ frente a itraconazol > 16 μ g/ml.

- En cuanto a la sensibilidad a la anfotericina B:

Nuestros resultados en referencia a la CMI₉₀ difieren en 2 o 3 diluciones si los comparamos con los obtenidos por Murphy y colaboradores (93) para las especies *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*, observando mayor sensibilidad en nuestras cepas con una CMI₉₀ igual a 0,5 µg/ml. En cambio sí se aproximan más a los expuestos por Johnson y colaboradores (66), coincidiendo la CMI₉₀ para *A. fumigatus* y difiriendo en una dilución para *A. flavus*.

Al compararlos con los datos de A. Espinel-Ingroff (49) podemos ver una alta concordancia con una diferencia igual o menor a 2 diluciones en la CMI₉₀ de *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. nidulans* y las dos especies de *Fusarium* estudiadas. Para *A. terreus* la actividad fungistática de anfotericina B *in vitro* ha sido menor, CMI₉₀ igual a 4 µg/ml (o mayor de 8µg/ml, a las 72 horas), en el estudio realizado por A. Espinel-Ingroff (49) con respecto al nuestro, donde obtuvimos una CMI₉₀ igual a 0,5 µg/ml.

Basándose en datos clínicos de pacientes con candidemia, una CMI ≥ 1 µg/ml podría ser predictivo de fracaso terapéutico a la terapia con anfotericina B (49). Según esto, en nuestro estudio, las cuatro cepas de *Fusarium* serían resistentes, no así la mayoría de cepas de *Aspergillus* testadas, cuya CMI₉₀ es igual a 0,5µg/ml.

La sensibilidad *in vitro* de las cepas de *Scedosporium apiospermum* ensayadas fue mayor, CMI = 0,25 µg/ml, que la obtenida por otros autores como Carrillo-Muñoz y colaboradores (17) (CMI₉₀ > 16 µg/ml) así como Johnson y colaboradores (66) (CMI₉₀ = 8 µg/ml), aunque en esta especie el número de cepas testadas fue menor, sólo dos cepas.

- La sensibilidad de los hongos filamentosos al fluconazol queda de manifiesto con los resultados obtenidos donde observamos una alta resistencia a dicho azol de todos los géneros, especialmente del género *Aspergillus* donde el número de cepas estudiadas fue mayor (n = 79 cepas).

Cermeño y Torres-Rodríguez (23) evaluaron la sensibilidad de hongos dematiáceos a distintos antifúngicos mediante E-test®. El 98,1 % de los aislamientos presentaron valores de 216 mg/l o más para el fluconazol, por lo que fueron considerados resistentes.

Para el Ketoconazol, en el mismo estudio realizado por Cermeño y Torres-Rodríguez (23) los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ oscilaron entre 0,02 mg/l y un máximo de 0,15 mg/l. No concuerdan estos resultados con los nuestros en los que obtuvimos tanto para CMI₅₀ como para CMI₉₀ valores superiores a 1 µg/ml y por tanto de mayor resistencia aunque las especies estudiadas fueron distintas así como la técnica de sensibilidad a antifúngicos empleada.

Fernández-Torres y colaboradores (52) estudian la actividad *in vitro* de diez antifúngicos entre ellos el fluconazol y el ketoconazol frente a dermatofitos. Siguen la metodología del método de referencia del NCCLS para hongos filamentosos (95) con algunas modificaciones, tales como la temperatura y el tiempo de incubación. Considerando juntas todas las especies incluidas en el estudio la CMI₉₀ de fluconazol fue la más alta (32 µg/ml) de todos los antifúngicos testados siendo por tanto el menos activo. La mejor actividad de fluconazol, la mostró frente *Microsporium nanum* (1 µg/ml), *M. racemosum* (1 µg/ml), y *Trichophyton tonsurans* (1,91 µg/ml). Ketoconazol mostró su mejor actividad frente a *Microsporium ferrugineum*, con una CMI₉₀ de 0,03 µg/ml y una CMI₉₀ del total de cepas testadas de 1 µg/ml.

Por tanto, ketoconazol muestra una alta efectividad frente a los dermatofitos estudiados, no así el fluconazol. En cuanto al fluconazol en nuestro estudio observamos aún una mayor resistencia, CMI₉₀ ≥ 256 µg/ml. Respecto al ketoconazol también obtuvimos rangos de mayor resistencia. Siempre considerando que las especies incluidas en el estudio fueron distintas a las empleadas por nosotros.

- La última tabla de los resultados (tabla XVIII) muestra la sensibilidad de los diferentes hongos filamentosos al voriconazol. En ella podemos comprobar como la CMI₉₀ obtenida para las especies *Aspergillus flavus* y *A. niger* coincide con la obtenida por Murphy y colaboradores (93) y se diferencia en una dilución, CMI₉₀ = 1 µg/ml, de la aportada por el estudio de Espinel-Ingroff (49); para *A. fumigatus* la

diferencia entre ambos estudios, el nuestro y el de Murphy, es de sólo dos diluciones, obteniendo estos autores una CMI₉₀ de 0,25 µg/ml, sin embargo si coincide nuestra CMI₉₀ con la aportada por Espinel-Ingroff (49). También obtienen el mismo valor que nosotros de CMI₉₀ para *A. flavus* Johnson y colaboradores (66), existiendo una dilución de diferencia (CMI = 0,5 µg/ml) con la CMI₉₀ de *A. fumigatus* respecto a nuestro estudio.

Para el resto de especies de *Aspergillus* estudiadas por Espinel-Ingroff (49) la concordancia con nuestro estudio es amplia, al diferenciarse tan sólo en una dilución (*A. nidulans*, *A. terreus*). Menor concordancia observamos para las especies de *Fusarium* spp y *Scedosporium apiospermum* donde nuestras cepas muestran rangos de mayor sensibilidad *in vitro* al voriconazol (49), aproximándose más a los resultados obtenidos por otros autores (66, 93).

- La actividad de voriconazol *in vitro* fue mayor o similar a la de itraconazol y anfotericina B para la mayoría de los hongos estudiados pertenecientes a las especies *Aspergillus* spp y *Fusarium* spp.

Las infecciones invasivas por *Scedosporium* y *Fusarium* son verdaderas infecciones oportunistas emergentes y se consideran entre las más agresivas y refractarias al tratamiento (59). Con frecuencia se observa resistencia a la anfotericina B y a los azoles, lo cual contribuye a la alta mortalidad asociada con este tipo de infecciones (13), de ahí la importancia de encontrar un fármaco que pueda tener actividad frente a ambos gérmenes.

En nuestro estudio *Scedosporium apiospermum* obtuvo mayor sensibilidad *in vitro* a anfotericina B (CMI = 0,25 µg/ml) que al voriconazol (CMI = 1 µg/ml) pero dentro del rango de actividad del voriconazol (74, 114), lo que tiene gran interés para poder constituirse según varios autores en el tratamiento de elección de las infecciones causadas por esta especie (28, 43). Frente al itraconazol las dos cepas estudiadas presentaron menor sensibilidad con una CMI = 2 µg/ml.

Voriconazol fue más activo *in vitro* contra la especie *Fusarium* que el resto de antifúngicos testados. Este resultado confirma los datos *in vitro* respecto a *Fusarium* de un estudio previo que compara la actividad de voriconazol e itraconazol (120). Sin

embargo no coincide con Cuenca-Estrella y colaboradores (30) donde para las ocho cepas estudiadas de *F. oxysporum* obtuvieron un intervalo de mayor resistencia, CMI entre 2 - > 8 µg/ml, al obtenido por nosotros en las dos cepas estudiadas de la misma especie (CMI = 0,5 µg/ml). Otros autores como Arikan y colaboradores (4) señalan la posible utilidad terapéutica de voriconazol en las infecciones por el género *Fusarium*.

Rhizomucor pusillus mostró menor CMI frente a itraconazol (CMI = 0,06 µg/ml) y anfotericina B (CMI = 0,25 µg/ml) comparándola con la de voriconazol (CMI = 2 µg/ml).

Al igual que ocurre con las levaduras, voriconazol puede presentar resistencia cruzada con otros azoles. En nuestro estudio no hubo resistencias significativas a itraconazol, tan sólo una cepa de *Fusarium moniliforme* presentó una CMI > 16 µg/ml. Para la misma cepa se obtuvo frente a voriconazol una CMI = 4 µg/ml. Este hecho concuerda con otros estudios (92, 113) en los cuales se comprueba como el ascenso en la CMI de itraconazol se acompaña de un incremento en la CMI del voriconazol.

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran la eficacia *in vitro* del voriconazol como alternativa frente a infecciones invasivas por hongos filamentosos, sobre todo del género *Aspergillus*, resistentes a otros antifúngicos.

El valor clínico de la CMI como predictor de la resistencia o sensibilidad de hongos filamentosos al voriconazol queda por ser establecido en estudios clínicos. Sin embargo, resultados procedentes de modelos animales y ensayos clínicos sugieren que voriconazol es efectivo en infecciones diseminadas por *Aspergillus* (34, 93).

Así, Herbrecht (62) demuestra la respuesta global superior de voriconazol frente a anfotericina B en pacientes inmunocomprometidos que presentaban una infección invasiva por aspergilosis. Voriconazol fue mejor tolerado que anfotericina B, con menos efectos adversos y menor número de abandonos en relación a los mismos; con voriconazol se obtuvo una mayor supervivencia.

La concordancia entre nuestros resultados, obtenidos por el Método Sensititre Yeast One, y la de otros autores (17, 49, 66, 93) obtenidos por el Método de Referencia del NCCLS, documento M 38-P, confirma la utilidad de esta técnica para determinar la sensibilidad al voriconazol de los hongos filamentosos aislados, de una manera rápida y objetiva, evitando la complejidad técnica y la dificultad en la interpretación de los resultados del Método de Referencia.

Voriconazol representa en este momento una excelente opción para el tratamiento de las infecciones fúngicas. Probablemente, es en la actualidad el fármaco antifúngico con un espectro más amplio, incluso superior al de anfotericina B, con la ventaja adicional que supone disponer de la posología oral y parenteral (101).

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1.- La elevada concordancia entre los dos métodos estudiados (Método de Referencia del NCCLS, y Sensititre Yeast One), junto a la reducción del tiempo de procesado, la facilidad en la realización y lectura del método comercializado sugieren la utilidad de este método, Sensititre Yeast One, para determinar la sensibilidad al voriconazol de los organismos levaduriformes y filamentosos frecuentemente aislados en los Laboratorios de Micología Clínica.
- 2.- Una de las características más importantes de Sensititre Yeast One radica en ser la única técnica comercializada que permite actualmente determinar la sensibilidad *in vitro* al voriconazol, tanto de hongos levaduriformes como filamentosos.
- 3.- Voriconazol muestra alta actividad ($CMI \leq 1 \mu\text{gr/ml}$) para todas las especies estudiadas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. parapsilosis*, sobre todo aquellas *C. albicans* sensibles a fluconazol y sensibles dependiendo de la dosis a fluconazol. Frente a algunas de las cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol, el voriconazol mostró menor actividad, ($CMI > 1 \mu\text{gr/ml}$), ello podría ser explicado por la posible existencia de resistencias cruzadas a los azoles, al compartir mecanismos de resistencia.
- 4.- *C. krusei* y *C. glabrata*, especies resistentes a fluconazol, presentaron alta sensibilidad al voriconazol.
- 5.- Señalar la alta sensibilidad al voriconazol de los hongos filamentosos estudiados, sobre todo del género *Aspergillus* así como el género *Fusarium* y la especie *Scedosporium apiospermum* resistentes a otros azoles.

- 6.- Para todas las especies estudiadas tanto de hongos levaduriformes como filamentosos se demostró una mayor actividad *in vitro* del voriconazol en comparación con el fluconazol.
- 7.- La utilidad del medio CHROMAgar Candida más 8 µg /ml de fluconazol como técnica de detección de la sensibilidad de las cepas de los hongos levaduriformes al fluconazol dependerá de la procedencia de la muestra y de la especie estudiada.
- 8.- El medio CHROMAgar Candida más 8 µg/ml de fluconazol, puede ser utilizado para determinar sensibilidad o sensibilidad disminuida al fluconazol indicando claramente las cepas sensibles al fluconazol mediante la ausencia de crecimiento. Sin embargo, para poder determinar si el crecimiento en el medio representa realmente una cepa resistente ($CMI \geq 64 \mu\text{g/ml}$) o si se trata de cepas con sensibilidad dependiente de la dosis (CMI entre 16-32 µg/ml), debe realizarse un estudio mediante otras técnicas, en laboratorios de Micología Clínica experimentados en técnicas de sensibilidades a antifúngicos.

RESUMEN

VII. RESUMEN

Las micosis invasoras en pacientes inmunodeprimidos o con tratamientos médico quirúrgicos se han incrementado en los últimos años. Muchos de los hongos emergentes originan problemas de resistencia intrínseca a los antifúngicos clásicos mientras que simultáneamente aparecen resistencias *in vitro* secundarias, o aislamientos clínicos resistentes pertenecientes a especies que eran sensibles, como en el caso de *Candida albicans* frente a fluconazol en los pacientes infectados por el VIH con candidiasis orofaríngea.

El aumento de resistencias crea la necesidad de usar nuevos antifúngicos. Los nuevos antifúngicos, entre los que se encuentra el voriconazol suponen una mejora de la eficacia clínica y paralelamente una reducción de la toxicidad.

El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCCLS) publicó el documento M27-A y el documento M38-P como un protocolo para el estudio de la sensibilidad frente a hongos levaduriformes y filamentosos. Se trata de métodos poco prácticos, de ahí la necesidad de alternativas más accesibles como el método Sensitre Yeast One.

Los objetivos de este estudio han sido investigar la sensibilidad de distintas especies de hongos levaduriformes y filamentosos al voriconazol comparándola con la sensibilidad al fluconazol, así como conocer la sensibilidad a distintos antifúngicos de los hongos filamentosos testados mediante el método Sensitre Yeast One.

Se llevaron a cabo varios estudios en paralelo. En el primero de ellos se comparó la sensibilidad al fluconazol de hongos levaduriformes por el medio CHROMAgar Candida más fluconazol con dos técnicas de microdilución: Sensitre Yeast One y el método de referencia M27-A. En este estudio se incluyeron un total de 156 aislamientos clínicos procedentes de distintos orígenes que incluían: 109 *Candida albicans*, 19 *C. parapsilosis*, 12 *C. glabrata*, 11 *C. tropicalis*, 2 *C. krusei*, 1 *C. pelliculosa*, 1 *C. lambica*, 1 *Saccharomyces cerevisiae*.

En el segundo estudio se comparó la sensibilidad de *Candida* spp. al voriconazol mediante dos métodos de microdilución: Sensititre Yeast One y el Método de Referencia M27-A. El estudio englobó un total de 272 cepas que incluían 132 *Candida albicans*, 62 *C. parapsilosis*, 33 *Candida glabrata*, 21 *C. krusei*, 15 *C. tropicalis* y 9 *C. lusitaniae*.

En el tercer estudio se obtuvo la sensibilidad a seis antifúngicos, entre ellos el voriconazol, de hongos filamentosos mediante una técnica de microdilución: Sensititre Yeast One. Para ello se estudiaron 86 cepas, de las cuales 79 fueron *Aspergillus*, 4 *Fusarium*, 2 *Scedosporium apiospermum* y 1 *Rhizomucor pusillus*.

Destacó el alto porcentaje de resistencia al fluconazol de *C. albicans*. A la vista de los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que el medio CHROMAgar Candida más 8 µg/ml de fluconazol, puede ser utilizado para determinar sensibilidad o sensibilidad disminuida al fluconazol indicando claramente las cepas sensibles al fluconazol mediante la ausencia de crecimiento. Sin embargo, para poder determinar si el crecimiento en el medio representa realmente una cepa resistente (CMI \geq 64 µg/ml) o si se trata de cepas con sensibilidad dependiente de la dosis (CMI entre 16 - 32 µg/ml), debe realizarse un estudio mediante otras técnicas, en laboratorios de Micología Clínica experimentados en técnicas de sensibilidades a antifúngicos. La utilidad del medio CHROM-FZ dependerá de la procedencia de la muestra y de la especie estudiada.

La concordancia establecida entre el Método de Referencia del NCCLS y el Sistema Sensititre Yeast One para hongos levaduriformes fue superior al 90 %.

Dentro de los hongos levaduriformes, *Candida krusei* y *C. glabrata*, especies con mayor resistencia al fluconazol mostraron alta sensibilidad al voriconazol. Voriconazol presentó actividad *in vitro* (CMI \leq 1 µg/ml) frente a todas las especies estudiadas de hongos levaduriformes: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. parapsilosis*, sobre todo aquellas *C. albicans* sensibles a fluconazol y sensibles dependiendo de la dosis a fluconazol. Frente a algunas de las cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol, el voriconazol mostró menor

actividad, (CMI > 1 µgr/ml), ello podría ser explicado por la posible existencia de resistencias cruzadas a los azoles, al compartir mecanismos de resistencia.

Señalar la alta sensibilidad al voriconazol de los hongos filamentosos estudiados, sobre todo del género *Aspergillus* así como el género *Fusarium* y la especie *Scedosporium apiospermum* resistentes a otros azoles.

Voriconazol presenta *in vitro* alta actividad, lo que representaría una buena opción terapéutica frente a infecciones invasivas por hongos levaduriformes y filamentosos según demuestran los estudios de sensibilidad realizados.

El estudio de sensibilidad de los hongos filamentosos mediante el sistema Sensitre Yeast One mostró alta sensibilidad de la mayoría de especies testadas, del género *Aspergillus* y *Fusarium* así como la especie *Scedosporium apiospermum*, al voriconazol y a la anfotericina B, sensibilidad intermedia frente a itraconazol, mayor resistencia ante 5-fluorocitosina y ketoconazol, siendo muy alta la resistencia frente a fluconazol.

Sensitre Yeast One constituye un método rápido y eficiente para conocer la sensibilidad al voriconazol y a otros antifúngicos tanto de hongos levaduriformes como filamentosos.

- PALABRAS CLAVE:

Voriconazol. Hongos levaduriformes. Hongos filamentosos. Sensitre Yeast One. CHROMAger Candida más fluconazol.

BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Allendoerfer, R., D. Loebenberg, M. G. Rinaldi, and J. R., Graybill. 1995. Evaluation of SCH 51048 in an experimental model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 1345- 1348.
2. Arévalo, M. P., A. J. Carrillo- Muñoz, J. Salgado, C. D. Cárdenes, S. Brió, G. Quindós, and A. Espinel- Ingroff. 2003. Antifungal activity of the echinocandin anidulafungin (VER002, LY-303366) against yeast pathogens: a comparative study with M27-A microdilution method. *JAC.* 51: 163- 166.
3. Arikan, S., D. Gür and M. Akova. 1997. Comparison of Etest, microdilution and colorimetric dilution with reference broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant *Candida* species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses.* 40: 291- 296.
4. Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, S. Nangia, and J. H. Rex. 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3946- 3951.
5. Bailey, E. M., D. J. Krakovsky and M. J. Rybak. 1990. The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy:* 10: 146- 153.
6. Barchiesi, F., A. M. Schimizzi, A. W. Fothergill, G. Scalise, and M. G. Rinaldi. 1999. *In vitro* activity of the new echinocandin antifungal MK-0991 against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 302- 304.

7. Barchiesi, F., D. Arzeni, A. W. Fothergill, L. F. Di Francesco, F. Caselli, M. G. Rinaldi, and G. Scalise. 2000. *In vitro* activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 226- 229.
8. Barry, A. L., M. A. Pfaller, S. D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, C. Knapp, R. P. Rennie, J. H. Rex and M. G. Rinaldi. 2000. Quality control limits for broth microdilution susceptibility test of ten antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3457- 3459.
9. Bartizal, K., C. J. Gill, G. K. Abruzzo, A. M. Flattery, L. Kong, P. M. Scott, J. G. Smith, C. E. Leighton, A. Bouffard, J. F. Dropinski, and J. Balkovec. 1997. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743.872). *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2326- 2332.
10. Bodey, G. P. 1992. Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis.* 14 (supl.): 161- 169.
11. Bouchara, J. P., P. Declerck, B. Cimon, C. Planchenault, L. de Gentile and D. Chabasse. 1996. Routine use of CHROMagar Candida medium for presumptive identification of *Candida* yeast species and detection of mixed fungal populations. *Clin. Microbiol. Infect.* 2 (3): 202- 208.
12. Bouffard, F. A., R. A. Zambias, J. F. Dropinski, J. M. Balkovec, M. L. Hammond, G. K. Abruzzo, K. F. Bartizal, J. A. Marrinan, M B. Kurtz, D. C. McFadden, K. H. Nollstadt, M. A. Powles, and D. M. Schmatz. 1994. Synthesis and antifungal activity of novel cationic pneumocandin Bo derivatives. *J. Med. Chem.* 37: 222- 225.

13. Boutati, E. I., and E. J. Anaissie. 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood*. 90: 999- 1008.
14. Cacciapuoti A., D. Loebenberg, E. Corcoran, F. Menzel, Jr., E. L. Moss, Jr., C. Norris, M. Michalski, K. Raynor, J. Halpern, C. Mendrick, B. Arnold, B. Antonacci, R. Parmegiani, T. Yarosh-Tomaine, G. H. Miller, and R. S. Hare. 2000. *In vitro* and *in vivo* activities of SCH 56592 (posaconazole), a new triazole antifungal agent against *Aspergillus* and *Candida*. *Antimicrob. Agents Chemother* 44: 2017- 2022.
15. Canle D., D. Velasco, M. Tomás, F. Molina, R. Villanueva, M. T. Durán. 2002. Cribado de *Candida* spp. con sensibilidad disminuida a fluconazol mediante CHROMAgar Candida con fluconazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20 (Supl. 1): 164.
16. Cantón Lacasa, E., E. Martín-Mazuelos, A. Espinel-Ingroff. 2001. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, p.15-1 a 15-13, En: J. Pemán, E. Martín-Mazuelos, y M. C. Rubio Calvo (ed.), *Guía Práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica*. Rev. Iberoam. Micol.
17. Carrillo Muñoz, A. J., G. Quindós, M. Ruesga, S. Brió, O. del Valle, V. Rodríguez, J. M. Hernández-Molina, E. Cantón, J. Pemán, P. Santos. 2001. Actividad del itraconazol frente a aislamientos clínicos de *Aspergillus spp* y *Fusarium spp* determinada por el método M-38-P del NCCLS. *Rev. Esp. Quimioterap.* 14 (Nº 3): 281- 285.

18. Carrillo Muñoz, A. J., L. Abarca y G. Quindós. 2001. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Rev. Iberoam. Micol. 18: 150- 155.
19. Carrillo-Muñoz, A. J., S. Brió, y G. Quindós. 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. Rev. Iberoam. Micol. 18: 2- 5.
20. Carrillo-Muñoz, A. J., G. Quindós, C. Tur, M. Ruesga, R. Alonso, O. del Valle, V. Rodríguez, M. P. Arévalo, J. Salgado, E. Martín-Mazuelos, F. J. Bornay-Llinares, A. del Palacio, M. Cuetara, I. Gasser, J. M. Hernández- Molina, and J. Pemán. 2000. Comparative *in vitro* antifungal activity of amphotericin B lipid complex, amphotericin B and fluconazole. Chemotherapy. 46: 235- 244.
21. Cartledge, J. D., D. W. Denning, B. Dupont, N. Clumeck, S. De Wit, J. Midgley, D. A. Hawkins, and B. G. Gazzard. 1998. Treatment of HIV-related fluconazole- resistant oral candidiasis with D-0870, a new triazole antifungal. AIDS. 12 (4): 411- 416.
22. Cermeño-Vivas, J. R., J. M. Torres-Rodríguez. 1998. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. Rev. Iberoam. Micol. 15: 155- 157.
23. Cermeño, J. R., J. M. Torres- Rodríguez. 2001. Sensibilidad *in vitro* de hongos dematiáceos a los antifúngicos utilizando E- test®. Rev. Esp. Quimioterap. 14: 191- 197.
24. Chandrasekar, P. H. and E. Manavathu. 2001. Voriconazole: a second-generation triazole. Drugs of Today. 37: 135- 148.

25. Chryssanthou, E. 2001. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the Sensititre Yeast One Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A reference method. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4181- 4183.
26. Cleary, J. D., J. W. Taylor and S. W. Chapman. 1990. *The Annals of Pharmacotherapy.* 24: 148- 151.
27. Connolly, P., J. Wheat, C. Schnizlein-Bick, M. Durkin, S. Kohler, M. Smedema, J. Goldberg, E. Brizendine, and D. Loebengerg. 1999. Comparison of new triazole antifungal agent, Schering 56592, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis in immunocompetent mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 322- 328.
28. Cuenca-Estrella, M., B. Ruiz-Díez, J. V. Martínez-Suárez, A. Monzón, and J. L. Rodríguez-Tudela. 1999. Comparative *in vitro* activity of voriconazole (UK-109.496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43: 149- 151.
29. Cuenca-Estrella, M., T. M. Díaz-Guerra, E. Mellado, A. Monzón, and J. L. Rodríguez-Tudela. 1999. Comparative *in vitro* activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* species from Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18: 432- 435.
30. Cuenca-Estrella, M. y J. L. Rodriguez-Tudela. 2003. Actividad *in vitro* de voriconazol frente a hongos patógenos humanos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2: 34- 39.

31. Davey, P. 1990. New antiviral and antifungal drugs. *BMJ*. 300: 793-798.
32. Denning, D. W., S. A. Radford, K. L. Oakley, L. Hall, E. M. Johnson, and D. W. Warnock. 1997. Correlation between *in vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 401- 414.
33. Denning, D. W. 1998. Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26 : 781-803.
34. Denning, D. W., P. Ribaud, N. Milpied, D. Caillot, R. Herbrecht, E. Thiel, A. Haas, M. Ruhnke and H. Lode. 2002. The efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 34: 563- 571.
35. Dismukes, W. E.. 1998. Azole antifungal drugs: Old and new. *Ann. Intern. Med.* 109: 177- 179.
36. Druetta, A., A. Freydière, R. Guinet and Y. Gille. 1993. Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 336- 342.
37. Editorial. 1996. Fluconazol. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 14: 203.
38. Ellis, D., D. Marriott, R. A. Hajjeh, D. Warnock, W. Meyer, and R. Barton. 2000. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med. Mycol.* 38. Suppl. 1: 173- 182.

39. Ernest, E. J., M. E. Klepser, S. A. Messer, and M. A. Pfaller. 1999. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 75- 80.
40. Ernest, E. J., K. Yodoi, E. E. Roling, and M. E. Klepser. 2002. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitaniae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob. Agents Chemother.*46: 578- 581.
41. Espinel-Ingroff, A., C. W. Kish, Jr., T. M. Kerkering, R. A. Fromtling, K. Bartizal, J. N. Galgiani, K. Villareal, M. A. Pfaller, T. Gerarden, M. G. Rinaldi, and A. Fothergill. 1992. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3138- 3145.
42. Espinel-Ingroff, A., J. L. Rodríguez-Tudela, and J. V. Martínez-Suárez. 1995. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and -susceptible isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3154- 3158.
43. Espinel-Ingroff, A. 1998. *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 198- 202.

44. Espinel-Ingroff, A. 1998. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH 56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743.872) and LY-303366 against opportunistic filamentous fungi and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2950- 2956.
45. Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S. A. Messer, C. C. Knapp, S. Killian, H. A. Norris, and M. A. Ghaunoum. 1999. Multicenter comparison of the Sensititre yeast one colorimetric antifungal panel with the National Committee for clinical laboratory standard M 27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* and other yeast-like organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37: 591- 595.
46. Espinel-Ingroff, A., D. W. Warnock, J. A. Vazquez, and B. A. Arthington-Skaggs. 2000. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Medical Mycology.* 38: 293- 304.
47. Espinel-Ingroff, A. 2001. Comparison of the Etest with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1360- 1367.
48. Espinel-Ingroff, A. 2001. Germinated and nongerminated conidial suspensions for testing os susceptibilities of *Aspergillus spp.* to amphotericin B, itraconazole, posaconazole, revuconazole and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 605- 607.
49. Espinel-Ingroff, A. 2001. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, Itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39: 954- 958.

50. Espinel-Ingroff, A., V., Chaturvedi, A. Fothergill and M. G. Rinaldi, 2002. Optimal Testing Conditions for determining MICs and Minimum Fungicidal Concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3776- 3781.
51. FDA Antiviral Drugs Advisory Committee Briefing Document for voriconazole (oral and intravenous formulations). October 4, 2001. New York, NY: Pfizer, Inc.
52. Fernández- Torres, B., A. J. Carrillo, E. Martín, A. Del Palacio, M. K. Moore, A. Valverde, M. Serrano, and J. Guarro. 2001. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2524- 2528.
53. Fromtlig, R. A., J. N. Galgiani, M. A. Pfaller, A. Espinel-Ingroff, K. F. Bartizal, M. S. Bartlett, B. A. Body, C. Frey, G. Hall, G. D. Roberts, F. B. Nolte, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, A. M. Sugar, and K. Villareal. 1993. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 39- 45.
54. Georgopadakou, N. H. 2001. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on beta-1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 10: 269- 280.
55. Goa, K. L. and L. B. Barradell. 1995. Fluconazol: Actualización de sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas y de su uso en el tratamiento de micosis superficiales y sistémicas graves en pacientes inmunodeprimidos. *Drugs.* 50: 658- 691.

-
56. Graybill, J. R. 1989. New antifungal agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 402- 412.
 57. Groll, A. H., S. C. Piscitelli, and T. J. Walsh. 1998. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv. Pharmacol.* 44: 343- 500.
 58. Groll, A. H., B. M. Gullick, R. Petraitiene, V. Petraitis, M. Candelario, S. C. Piscitelli, and T. J. Walsh. 2001. Compartmental pharmacokinetics of the antifungal echinocandin caspofungin (MK-0991) in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 596- 600.
 59. Groll, A. H., and T. J. Walsh. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* 7 (suppl. 2): 8- 24.
 60. Gupta, A. K., D. N. Sauder and N. H. Shear. 1994. Antifungal agents: an over view Part II. *J.Am. Acad. Dermatol.* 30: 911- 933.
 61. Hay R. J. 1996. New antifungal agents. *Rev. Iberoam. Micol.* 13: S56- S59.
 62. Herbrecht, R., D. W. Denning, T. F. Patterson, J. E. Bennett, R. E. Greene, J. W. Oestmann, W. V. Kern, K. A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. H. Rubin, J. R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. H. Chandrasekar, M. R. Hodges, H. T. Schlamm, P. F. Troke, B. de Pauw; invasive fungal infections group of the European Organisation for research and treatment of cancer and the global *Aspergillus* Study Group. 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* 347: 408- 415.

-
63. Hoban, D. J., G. G. Zhanel, and J. A. Karlowsky. 1999. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Cryptococcus neoformans* isolates from blood cultures of neutropenic patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1463- 1464.
 64. Idigoras P., E. Pérez-Trallero, L. Piñeiro, J. Larruskain, M. C. López-Lopategui, N. Rodríguez, and J. M. González. 2001. Disseminated infections and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32: e158- e165.
 65. Jianping X., R. Vilgalys, and T. G. Mitchell. 1998. Colony size can be used to determine the MIC of fluconazole for pathogenic yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2383- 2385.
 66. Johnson, E. M., A. Szekely and D. W. Warnock. 1998. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 42: 741- 745.
 67. Johnson, E. M., J. O. Ojwang, A. Szekely, T. L. Wallace, and D. W. Warnock. 1998. Comparison of *in vitro* antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1412- 1416.
 68. Johnson, E. M., A. Szekely and D. W. Warneck. 1999. *In vitro* activity of Syn-2869, a novel triazole agent, against emerging and less common mold pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1260- 1263.
 69. Kauffman, C. A.. 1996. Role of azoles in antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.* 22 (Suppl. 2): 148- 153.

70. Kauffman, C. A. and P. L. Carver. 1997. Antifungal Agents in the 1990s. Current Status and future developments. *Drugs*. 53: 539- 549.
71. Kim, H., E. Radwanski, R. Lavery, C. C. Lin, and A. A. Nomeir. 2002. Pharmacokinetics of the active antifungal enantiomer, SCH 42427 (RR), and evaluation of its chiral inversion in animals following its oral administration and the oral administration of its racemate genaconazole (RR/SS) *Chirality*. 14: 436- 441.
72. Koul, A., J. Vitullo, G. Reyes and M. Ghannoum. 1999. Effects of voriconazole on *Candida glabrata in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 109- 112.
73. Krishnarao T. V., and J. N. Galgiani. 1997 Comparison of the *in vitro* activities of the echinocandin LY 303366, the pneumocandin MK-0991, and fluconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1957- 1960.
74. Lazarus, H. M., J. L. Blumer, S. Yanovich, H. Schlamm, and A. Romero. 2002. Safety and pharmacokinetics of oral voriconazole in patients at risk of fungal infections: a dose escalation study. *J. Clin. Pharmacol.* 42: 395- 402.
75. Lin, S. J., J. Schranz, and S. M. Teutsch. 2001. Aspergillosis case-fatality rate; systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 32: 358- 366.
76. Linares, M. J., J. F. Muñoz, F. Solís, F. C. Rodríguez, A. Valero, M. Casal. 1998. Study of susceptibility of yeast isolates of clinical interest to five antifungal agents using the E-test. *Rev. Esp. Quimioter.* 11: 64- 69.

77. Linares, M. J., F. Solís. 2001. Identificación de levaduras, p. 11-1 a 11-18, En: J. Pemán, E. Martín-Mazuelos, and M. C. Rubio Calvo. Guía Práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Rev. Iberoam. Micol.
78. Loebenberg, D., A. Cacciapouti, R. Parmegiani, E. L. Moss, F. Menzel, B. Antonacci, C. Norr, T. Yarosh- Tomaine, R. S. Hare, and G. H. Miller. 1992. *In vitro* and *in vivo* activities of SCH 42427, the active enantiomer of the antifungal agent SCH 39304. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 498- 501.
79. Maenza, J. R., W. G. Merz, M. J. Romagnoli, J. C. Keruly, R. D. Moore and J. E. Gallant. 1997. Infection due to fluconazole resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clin. Infect. Dis.* 24: 28- 34.
80. Manavathu, E. K., J. L. Cutright, and P. H. Chandrasekar. 1998. Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 3018- 3021.
81. Manavathu, E. K., J. L. Cutright, D. Loebenberg, and P. H. Chandrasekar. 2000. A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory selected resistant isolates of *Aspergillus spp.* to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH-56592). *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 229- 234.
82. Manuel, R. J., and C. C. Kibbler. 1998. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J. Hosp. Infect.* 39: 95- 109.

83. Marco, F., M. A. Pfaller, S. Messer, and R. N. Jones. 1998. In vitro activities of voriconazole (UK- 109.496) and four other antifungal agents against 394 Clinical Isolates of *Candida spp.* Antimicrob. Agents Chemother. 42: 161- 163.
84. Marr, K. A., T. R. Rustad, J. H. Rex, and T.C. White. 1999. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH-dependent. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1383- 1386.
85. Martín-Mazuelos, E., M. J. Gutiérrez, A. I. Aller, S. Bernal, M. A. Martínez, O. Montero, and G. Quindós. 1999. A comparative evaluation of E-test and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida spp.*. J. Antimicrob. Chemoter. 43: 477- 481.
86. Martín Mazuelos, E. 2000. Métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* de levaduras. Rev. Esp. Quimioter. 13: 99- 103.
87. Martín-Mazuelos, E., E. Cantón Lacasa, A. Espinel-Ingroff. 2001. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, p. 16-1 a 16-9, En: J. Pemán, E. Martín-Mazuelos, y M. C. Rubio Calvo (ed.), Guía Práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Rev. Iberoam. Micol.
88. Martínez-Suárez, J. V., J. L. Rodríguez-Tudela. 1996. La resistencia a antifúngicos en los hongos patógenos oportunistas (II). Imidazoles y triazoles. Enf. Infec. Microbiol. Clin 14: 490- 498.
89. McGinnis, M. R., L. Pasarell, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, C. R. Cooper Jr. and M. G. Rinaldi. 1998. *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. Medical Mycology. 36: 239- 242.

90. Meis, J., M. Petrou, J. Bille, D. Ellis, D. Gibbs and the Global Antifungal surveillance group. 2000. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 215- 223.
91. Messer, S. A. and M. A. Pfaller.1996. Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 25: 77- 81.
92. Mosquera, J., and D. W. Denning. 2002. Azole cross- resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 556- 557.
93. Murphy, M., E. M. Bernard, T. Ishimaru, and D. Armstrong. 1997. Activity of voriconazole (UK-109,496) against clinical isolates of species and its effectiveness in a experimental model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 696- 698.
94. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
95. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
96. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard. Second edition, document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.

97. Nesky, M. A., E. C. McDougal and J. E. Peacock. 2000. *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. Clin. Infect. Dis. 31: 673-677.
98. Odds, F. C., and R. Bernaerts. 1994. CHROMAgar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32: 1923- 1929.
99. Odds F. C. 1998. Azole antifungals. General aspects, p. 294-298, In F.C. Odds (ed.), *Candida and Candidosis*. 2ª ed. Londres, Baillière Tindall.
100. Odds, F. C., F. Van Gerven, A. Espinel-Ingroff, M. S. Bartlett, M. A. Ghannoum, M. V. Lancaster, M. A. Pfaller, J. H. Rex, M. G. Rinaldi and T. J. Walsh. 1998. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 282- 288.
101. Pahisa, A. 2003. Introducción. Monográfico: "Voriconazol". Enf. Infec. Microbiol. Clin. 2: 1- 2.
102. Patterson, T. F., S. G. Revankar, W. R. Kirkpatrick, O. Dib, A. W. Fothergill, S. W. Redding, D. A. McGough, and M. G. Rinaldi. 1996. Simple method for detecting fluconazole-resistant yeasts with chromogenic agar. J. Clin. Microbiol. 34: 1794- 1797.

103. Patterson, T. F., W. R. Kirkpatrick, S. G. Revankar, R. K. McAtee, A. W. Fothergill, D. I. Mc Carthy, and M. G. Rinaldi. 1996. Comparative evaluation of macrodilution and chromogenic agar screening for determining fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J. Clin Microbiol.* 34: 3237- 3239.
104. Patterson, T. F. 1999. The role of newer azoles in surgical patients. *J. Chemother.* 11: 504- 512.
105. Pelaez, F., A. Cabello, G. Platas, M. T. Diez, A. González del Val, A. Basilio, I. Martan, F. Vicente, G. E. Bilis, R. A. Giacobbe, R. E. Schwartz, J. C. Onish, M. S. Meinz, G. K. Abruzzo, A. M. Flattery, L. Kong, and M. B. Kurtz. 2000. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema species* biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Sys. Appl. Microbiol.* 23: 333- 343.
106. Perfect, J. R., and W. A. Schell. 1996. The new fungal opportunists are coming. *Clin. Infect. Dis.* 22: S 112- S 118.
107. Pfaller, M. A. , M. G. Rinaldi, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, B. A. Body , A. Espinel-Ingroff, R. A. Fromtling, G. S. Hall, C. E. Hughes, F. C. Odds, and A. M. Sugar. 1990. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1648-1654.
108. Pfaller, M. A., Q. Vu, M. Lancaster, A. Espinel-Ingroff, A. Fothergill, C. Grant, M.R. McGinnis, L. Pasarell, M. G. Rinaldi and L. Steele-Moore. 1994. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeasts isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1625- 1628.

109. Pfaller, M. A., S. A. Messer, A. Karlsson, and A. Bolmström. 1998. Evaluation of E-test method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2586- 2589.
110. Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones, G. V. Doern, M. E. Brandt, and R. A. Hajjeh. 1998. *In vitro* susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 3242- 3244.
111. Pfaller, M. A., S. Arikan, M. Lozano-Chiu, Y.-S. Chen, S. Coffman, S. A. Messer, R. Rennie, C. Sand, T. Heffner, J. H. Rex, J. Wang, and N. Yamane. 1998. Clinical evaluation of the ASTY colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2609- 2612.
112. Pfaller, M. A., J. Zhang, S. A. Messer, M. E. Brandt, R. A. Hajjeh, C. J. Jessup, M. Tumberland, E. K. Mbidde, and M. A. Ghannoum. 1999. *In vitro* activities of Voriconazole, Fluconazole, and Itraconazole against 566 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 169- 171.
113. Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, and R. N. Jones. 2002. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1032- 1037.

114. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, R. J. Hollis, R. N. Jones and the International Fungal Surveillance Participant Group. 2003. In vitro activities of voriconazole, posaconazole and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* 41: 78- 83.
115. Ponton, J., J. M. Torres-Rodríguez, R. Salesa, A. Burgos, A. J. Carrillo-Muñoz, C. García-de la Fuente, A. Carceller, L. Jáudenes, G. Quindós. 1994. Evaluación del Candifast, un nuevo método para la identificación y estudio de la sensibilidad antifúngica de levaduras de interés médico. *Rev. Iberoam.Micol.* 11: 64- 67.
116. Pontón, J., R. Rüchel, K. V. Clemons, D. C. Coleman, R. Grillot, J. Guarro, D. Aldebert, P. Ambroise-Thomas, J. Cano, A. J. Carrillo-Muñoz, J. Gene, C. Pinel, D. A. Stevens and D. J. Sullivan. 2000. Emerging pathogens. *Med. Mycol.* 38 (suppl. 1): 225- 236.
117. Posteraro, B., L. Romano, M. Sanguinetti, G. Morace and G. Fadda. 2000. Comercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: Comparison with the broth microdilution method. *Diagn Microbiol. Infect. Dis.* 38: 29- 36.
118. Powell, H. L., C. A. Sand, and R. P. Rennie. 1998. Evaluation of CHROMAgar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 201- 204.
119. Powles, M. A., P. Liberator, J. Anderson, Y. Karkhanis, J. F. Dropinski, F. A. Bouffard, J. M. Balkovec, H. Fujioka, M. Aikawa, D. McFadden, and D. Schmatz. 1998. Efficacy of MK-991 (L-743.872), a semisynthetic pneumocandin, in murine models of *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1985- 1989.

120. Radford, S. A., E. M. Johnson and D. W. Warnock. 1997. *In vitro* studies of activity of voriconazole (UK-109,496), a new triazole antifungal agent, against emerging and less-common mold pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 841- 843.
121. Revankar, S. G., W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, A. W. Fothergill, S.W. Redding, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson. 1998. Interpretation of trailing end points in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standard method. *J. Clin. Microbiol.* 36: 153- 156.
122. Rex, J. H., T. J. Walsh, M. Nettleman, E. J. Anaissie, J. E. Bennet, E. J. Bow, A. J. Carrillo-Muñoz, P. Chavanet, G. A. Cloud, D. W. Denning, B. E. de Paw, J. E. Edwards Jr, J. W. Hiemenz, C. A. Kauffman, G. Lopez-Berestein, P. Martino, J. D. Sobel, D. A. Stevens, R. Sylvester, J. Tollemar, C. Viscoli, M. A. Viviani and T. Wu. 2001. Need for alternative trial designs and evaluation strategies for therapeutic studies of invasive mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 33: 95- 106.
123. Ringden, O., and J. Tollemar. 1993. Liposomal amphotericin B (AmBisome) treatment of invasive fungal infections in immunocompromised children. *Mykoses.* 36: 187- 192.
124. Rodríguez-Tudela, J. L., and J. V. Martínez-Suárez. 1994. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 45- 48.
125. Sabo, J. A., and S. M. Abdel-Rahman. 2000. Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann. Pharmacother.* 34: 1032- 1043.

126. Safdar, A., V. Chaturvedi, E. W. Cross, S. Park, E. M. Bernard, D. Armstrong and D. S. Perlin . 2001. Prospective study of *Candida species* in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2129- 2133.
127. San Blas G. 1991. Antibióticos antifúngicos: Hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Rev. Iberoam Micol.* 8: 24- 34.
128. Sanati, H., P. Belanger, R. Fratti, and M. Ghannoum. 1997. A new triazole, voriconazole, blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2492- 2496.
129. Simon, D. M., and Stuart Levin. 2001. Infectious complications of solid organ transplantations. *Infectious Disease Clinics of North America.* 15: 521- 549.
130. Stevens, D. A., V. L. Kan, M. A. Judson, V. A. Morrison, S. Dummer, D. W. Denning, J. E. Bennett, T. J. Walsh, T. F. Patterson and G. A. Pankey. 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin. Infect. Dis.* 30: 696- 709.
131. Torres-Rodríguez, J. M. 1992. Antifúngicos de uso sistémico. *Rev. Esp. Quimioterap.* 5: 166- 169.
132. Torres-Rodríguez, J. M. 1994. Antifúngicos empleados en el tratamiento de las micosis humanas, p. 29-41, En J. M. Torres-Rodríguez, A. del Palacio Hernanz, J. Guarro-Artigas, R. Negróni-Briz, and M. Pereiro-Miguens (ed.), *Micología médica*. Masson.

133. Valero, A. J. 1997. Tesis. Investigación de la actividad antifúngica del fluconazol en los hongos levaduriformes. Universidad de Córdoba. España.
134. Vázquez, J. A., M. Linch, D. Boikov, and D. J. Sobel, 1997. *In vitro* activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole-susceptible and resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1612- 1614.
135. Verghese S. L., P. Padmaja, P. Sutha, T. Mathew, and John ES. 2000. Rapid identification of fluconazole resistance using CHROMAgar *Candida*. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 43: 343- 346.
136. Viudes, C., E. Cantón, J. Pemán, J. L. López-Ribot, M. Gobernado. 2002. Correlación entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis y criptococosis. *Rev. Esp. Quimioterap.* 15: 32- 42.
137. Walsh, T. J., J. W. Hiemenz, N. L. Seibel, J. R. Perfect, G. Horwith, L. Lee, J. L. Silber, M. J. DiNubile, A. Reboli, E. Bow, J. Lister, and E. J. Anaissie. 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of efficacy in 556 cases. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1383-1396.
138. Wildfeuer, A., H. P. Seidl, I. Paule and A. Haberreiter. 1998. *In vitro* evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeast, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. *Mycoses.* 41: 309- 319.

139. Willinger, B., and M. Manafi. 1999. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses*. 42: 61- 65.
140. Yamazumi, T., M. A. Pfaller, S. A. Messer, A. Houston, R. R. J. Hollis and R. N. Jones. 2000. *In vitro* activities of ravuconazole (BMS-207147) against 541 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2883- 2886.
141. Zimmermann, K., J. Bernhardt, M. Knoke, and H. Bernhardt. 2002. Influence of voriconazole and fluconazole on *Candida albicans* in long-time continuous flow culture, *Mycoses*. 45 (Suppl 1): 41- 46.