

Actividad *in vitro* de anfotericina B, itraconazol y voriconazol frente a 20 especies de *Aspergillus* empleando el método de microdilución Sensititre®

Pedro García-Martos^a, Lidia García-Agudo^a, Jesús Gutiérrez-Calzada^b, Jesús Ruiz-Aragón^a, Abel Saldarreaga^a y Pilar Marín^a

Servicios de Microbiología. ^aHospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.
^bHospital de León. León. España.

ANTECEDENTES. La actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a *Aspergillus* se ha investigado recientemente. Estudiamos la sensibilidad frente a la anfotericina B, itraconazol y voriconazol de 68 cepas pertenecientes a 20 especies diferentes de *Aspergillus*.

MÉTODOS. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para: 10, *A. fumigatus*; 9, *A. flavus*; 8, *A. niger*; 5, *A. tamarii*; 5, *A. versicolor*; 4, *A. terreus*; 3, *A. glaucus*; 3, *A. ochraceus*; 3, *A. oryzae*; 2, *A. candidus*; 2, *A. chevalieri*; 2, *A. rubrobrunneus*; 2, *A. sclerotiorum*; 2, *A. sydowii*; 2, *A. unguis*; 2, *A. ustus*; 1, *A. clavatus*; 1, *A. nidulans*; 1, *A. pseudofischeri*, y 1, *A. reptans*, utilizando el método de microdilución *Sensititre YeastOne®*.

RESULTADOS. El voriconazol fue más activo *in vitro* que la anfotericina B y el itraconazol, exhibiendo el 95,6% (65/68) de las cepas una CIM igual o inferior a 2 mg/l. Las especies *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. ustus* y *A. reptans* presentaron una sensibilidad reducida frente a la anfotericina B (CIM ≥ 2 mg/l); *A. niger*, *A. versicolor*, *A. sclerotiorum* y *A. ustus* mostraron cierta resistencia *in vitro* frente al itraconazol (CIM ≥ 1 mg/l); *A. sclerotiorum* y *A. ustus* fueron poco sensibles frente al voriconazol (CIM ≥ 2 mg/l).

CONCLUSIONES. La sensibilidad de las especies de *Aspergillus* frente a itraconazol y voriconazol es buena, pero es significativa la sensibilidad reducida frente a la anfotericina B. Estos resultados sugieren que las pruebas de sensibilidad de *Aspergillus* a los antifúngicos están recomendadas para orientar un tratamiento.

Palabras clave: *Aspergillus*. Antifúngicos. Anfotericina B. Itraconazol. Voriconazol.

In vitro activity of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 20 species of *Aspergillus* using the Sensititre® microdilution method

BACKGROUND. The *in vitro* activity of antifungal agents against *Aspergillus* has been recently investigated. We studied the susceptibility to amphotericin B, itraconazole and voriconazole of 68 strains belonging to 20 different *Aspergillus* species.

METHODS. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for 10 strains of *A. fumigatus*, 9 *A. flavus*, 8 *A. niger*, 5 *A. tamarii*, 5 *A. versicolor*, 4 *A. terreus*, 3 *A. glaucus*, 3 *A. ochraceus*, 3 *A. oryzae*, 2 *A. candidus*, 2 *A. chevalieri*, 2 *A. rubrobrunneus*, 2 *A. sclerotiorum*, 2 *A. sydowii*, 2 *A. unguis*, 2 *A. ustus*, 1 *A. clavatus*, 1 *A. nidulans*, 1 *A. pseudofischeri* y 1 *A. reptans*, were determined using the Sensititre® Yeast One microdilution method.

RESULTS. Voriconazole was more active *in vitro* than amphotericin B and itraconazole, with 95.6% (65/68) of strains exhibiting MICs of ≤ 2 mg/l. *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. ustus* and *A. reptans* species presented reduced susceptibility to amphotericin B (MIC ≥ 2 mg/l); *A. niger*, *A. versicolor*, *A. sclerotiorum* and *A. ustus* showed *in vitro* resistance to itraconazole (MIC ≥ 1 mg/l); and *A. sclerotiorum* and *A. ustus* displayed poor susceptibility to voriconazole (MIC ≥ 2 mg/l).

CONCLUSIONS. The susceptibility of *Aspergillus* species to itraconazole and voriconazole was generally good; nevertheless, susceptibility to amphotericin B was low. These results suggest that *Aspergillus* susceptibility testing to this antifungal agent would be advisable to guide treatment.

Key words: *Aspergillus*. Antifungal agents. Amphotericin B. Itraconazole. Voriconazole.

Introducción

Durante los últimos años se aprecia un significativo incremento de la incidencia de infecciones fúngicas, incluidas las causadas por hongos filamentosos y, particular-

Correspondencia: Dr. P. García-Martos.
 Ana de Viya, 13-2 B. 11009 Cádiz. España.
 Correo electrónico: pedromartos@hotmail.com

Manuscrito recibido el 18-12-2003; aceptado el 30-4-2004.

mente, por *Aspergillus*. Las infecciones ocasionadas por especies del género *Aspergillus* son diversas y revisten gravedad en pacientes immunodeprimidos. *A. fumigatus* es la especie que causa la mayoría de las infecciones, especialmente en aspergilosis invasiva, aunque otras especies también se han descrito en estos procesos, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* y algunas más^{1,2}. La aspergilosis invasiva se asocia con una elevada mortalidad debido al estado inmunitario de los pacientes, principalmente, y otros factores entre los que se considera la variable actividad de los antifúngicos frente a las especies de *Aspergillus*. En la actualidad se dispone de cuatro fármacos para el tratamiento: anfotericina B, itraconazol, voriconazol y caspofungina.

En este trabajo se evalúa la sensibilidad de un amplio número de especies de *Aspergillus* frente a anfotericina B, itraconazol y voriconazol, determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el sistema Sensititre YeastOne® (Diagnostic Systems, Inglaterra), un método admitido recientemente por la Food and Drug Administration (FDA) que presenta, en la mayoría de las especies de *Aspergillus* y para anfotericina B e itraconazol, un elevado grado de concordancia³⁻⁶ con el método de referencia de microdilución M38-A propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁷. Este método colorimétrico se ha considerado como una buena alternativa al método de referencia por ser más asequible a los laboratorios de Microbiología, por su sencillez de realización y la facilidad de lectura de los resultados.

Métodos

Se estudió la sensibilidad a la anfotericina B, itraconazol y voriconazol de un total de 68 cepas del género *Aspergillus*, que incluye 20 especies: 10, *A. fumigatus*; 9, *A. flavus*; 8, *A. niger*; 5, *A. tamarii*; 5, *A. versicolor*; 4, *A. terreus*; 3, *A. glaucus*; 3, *A. ochraceus*; 3, *A. oryzae*; 2, *A. candidus*; 2, *A. chevalieri*; 2, *A. rubrobrunneus*; 2, *A. sclero-*

tiorum; 2, *A. sydowii*; 2, *A. unguis*; 2, *A. ustus*; 1, *A. clavatus*; 1, *A. nidulans*; 1, *A. pseudofischeri*, y 1, *A. reptans*. Estas cepas se aislaron de diversas muestras clínicas: 32 exudados óticos, 22 secreciones respiratorias, 7 exudados cutáneos, 4 de heridas, 2 uñas y 1 muestra de sangre, aunque muchas de ellas no se relacionaron con infección.

En todas las cepas se determinó la CIM utilizando el sistema de microdilución Sensititre YeastOne® 03 (Diagnostic Systems Ltd., Inglaterra) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El inóculo se preparó tras cultivo de las cepas en agar de Sabouraud durante 7 días a 30 °C. La superficie del agar fue inundada con 1 ml de solución salina estéril que contenía 0,05% de *Tween* 80 y frotada suavemente con un escobillón para obtener una suspensión de conidios en 5 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión fue filtrada a través de gasa estéril de cuatro dobleces para eliminar las hifas acompañantes, y diluida para ajustar la concentración del inóculo en un espectrofotómetro a 530 nm hasta obtener una transmitancia del 80-82%, equivalente a una concentración de 4×10^5 a 5×10^6 conidios/ml. A partir de esta suspensión se efectuó una dilución en caldo RPMI 1640 tamponado con MOPS a pH 7 hasta alcanzar un inóculo final de $0,4-5 \times 10^4$ conidios/ml. La inoculación de los pocillos de la placa Sensititre se efectuó con 100 µl de esta suspensión, y las placas se incubaron a 35 °C durante 48 y 72 h, antes de realizar la lectura definitiva. Todas las pruebas se realizaron por duplicado para evitar errores de técnica. Como control de calidad se incluyó en el estudio las cepas *Candida albicans* ATCC 68548 y *C. krusei* ATCC 6258 y *A. flavus* ATCC 204304, realizando en ellas las mismas determinaciones. Como CIM se consideró la concentración más baja que produjo ausencia del crecimiento en comparación con el crecimiento del pocillo control sin antifúngico, lo que se interpreta en este sistema por el cambio de color azul (ausencia de crecimiento) a rojo (crecimiento).

Resultados

Todas las cepas de *Aspergillus* crecieron bien a las 48 h de incubación, menos una de *A. rubrobrunneus*, una de *A. pseudofischeri* y una de *A. reptans* que necesitaron prolongar la incubación hasta 72 h para realizar la lectura de resultados. Las CIM de las cepas control estuvieron dentro de los valores esperados. En la tabla 1 se reflejan los resultados del estudio de sensibilidad considerando el inter-

TABLA 1. Sensibilidad de 20 especies de *Aspergillus* a anfotericina B, itraconazol y voriconazol

Especies de <i>Aspergillus</i> (cepas)	Anfotericina B		Itraconazol		Voriconazol	
	Intervalo	CIM ₅₀ (mg/ml)	Intervalo	CIM ₅₀ (mg/ml)	Intervalo	CIM ₅₀ (mg/ml)
<i>A. fumigatus</i> (10)	0,125-1	0,5	0,06-0,5	0,125	0,06-0,5	0,125
<i>A. flavus</i> (9)	1-2	1	0,25-0,5	0,25	0,125-1	0,25
<i>A. niger</i> (8)	0,25-1	0,5	0,25-1	0,5	0,06-0,25	0,125
<i>A. tamarii</i> (5)	0,25-1	0,5	0,125-0,5	0,25	0,25-0,5	0,25
<i>A. versicolor</i> (5)	1-2	1	0,5-1	0,5	0,125-0,5	0,25
<i>A. terreus</i> (4)	0,5-2		0,125-0,5		0,125-0,25	
<i>A. glaucus</i> (3)	0,125-0,5		0,25-0,5		0,125-0,25	
<i>A. ochraceus</i> (3)	1-2		0,25-0,5		0,25-0,5	
<i>A. oryzae</i> (3)	0,25-1		0,125-0,25		0,125-0,5	
<i>A. candidus</i> (2)	0,5-1		0,25-0,5		0,125-0,25	
<i>A. chevalieri</i> (2)	0,125-0,5		0,125-0,25		0,125-0,25	
<i>A. rubrobrunneus</i> (2)*	0,06-0,125		0,03-0,06		0,06	
<i>A. sclerotiorum</i> (2)	2-4		0,5-1		1-2	
<i>A. sydowii</i> (2)	1-0,5		0,06-0,125		0,06	
<i>A. unguis</i> (2)	0,5-1		0,25-0,5		0,125	
<i>A. ustus</i> (2)	0,5-2		2-4		2-4	
<i>A. clavatus</i> (1)	0,06		0,25		0,5	
<i>A. nidulans</i> (1)	1		0,5		0,125	
<i>A. pseudofischeri</i> (1)*	1		0,25		0,25	
<i>A. reptans</i> (1)*	2		0,25		0,125	

*Lectura de la CIM a las 72 h de incubación.

CIM: concentración inhibitoria mínima.

valo de CIM y la CIM₅₀ frente a los tres antifúngicos ensayados de las especies con más de cinco cepas.

Para anfotericina B, un total de 10 cepas (14,7%) presentaron una CIM de 2 mg/l: 3 cepas de *A. flavus*, 2 de *A. versicolor*, una de *A. terreus*, una de *A. ochraceus*, una de *A. sclerotiorum*, una de *A. ustus* y una de *A. reptans*; la CIM fue de 4 mg/l para una cepa de *A. sclerotiorum*. Para itraconazol, 2 cepas de *A. ustus* tuvieron CIM de 2 mg/l y 4 mg/l. En el caso de voriconazol, una cepa de *A. sclerotiorum* y una de *A. ustus* presentaron CIM de 2 mg/l, y una de *A. ustus* tuvo una CIM de 4 mg/l.

Discusión

La sensibilidad disminuida o resistencia *in vitro* de algunas especies de *Aspergillus* se ha descrito recientemente, pero la amplitud de este problema aún es desconocida. Esta resistencia no se corresponde necesariamente con resistencia *in vivo*, pues hay que considerar diversas variables inherentes al paciente. No obstante, la concordancia entre los resultados *in vitro* y la respuesta en modelos animales demuestra que, para algunas especies de *Aspergillus*, los estudios de sensibilidad, a pesar de sus limitaciones, pueden tener relevancia clínica y ser un instrumento importante para proponer terapias alternativas⁸⁻¹⁰.

En el año 2002 se aprobó el método de microdilución propuesto por el NCCLS en el documento M38-A, que establece las condiciones óptimas para determinar la sensibilidad de *Aspergillus* y permite comparar resultados entre varios autores⁷. Los puntos de corte para predecir la resistencia *in vivo* no están, sin embargo, definidos todavía. Así, por ejemplo, para el itraconazol, en algunos estudios de correlación *in vitro-in vivo* se obtiene una adecuada respuesta terapéutica cuando la CIM < 1 mg/l¹¹, pero en otros se clasifica como resistentes sólo a aquellas cepas con CIM ≥ 16 mg/l¹⁰. El método Sensititre YeastOne® ha sido evaluado por algunos autores para *Aspergillus* y encuentran una concordancia superior al 90% para anfotericina B e itraconazol³⁻⁶. La concordancia para este último mejora se interpreta como CIM el primer pocillo con completa inhibición del crecimiento (color azul) y si se aplaza la lectura hasta las 72 h, pues parece que los valores de CIM obtenidos a las 48 h son más bajos que los correspondientes al método del NCCLS^{4,5}.

Considerando los resultados obtenidos en nuestro estudio, las especies de *Aspergillus* menos sensibles a la anfotericina B son: *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. ustus* y *A. reptans*, algunas de ellas implicadas en aspergilosis diseminada. La sensibilidad de las cepas de *A. fumigatus* es bastante buena, hecho referido también en otros estudios^{1,5,6,12-16}, aunque algunos han documentado en esta especie sensibilidad disminuida *in vitro* con CIM elevadas^{4,17-19}. Sensibilidad disminuida a la anfotericina B también se ha descrito, al igual que nosotros, en *A. flavus*^{4,15-17,20,21}, *A. versicolor*²², *A. terreus*^{2,4,16,17}, *A. nidulans*^{4,21} y *A. ustus*⁴. En algunos estudios se ha demostrado resistencia en modelos animales con aspergilosis invasora por *A. fumigatus*²³ y *A. terreus*²⁴.

En el caso del itraconazol, en nuestro estudio se observa una buena actividad *in vitro* con CIM bajas frente a la mayoría de las especies de *Aspergillus*, al igual que han

señalado otros autores^{4,5,13,15}. Sin embargo, 2 cepas de *A. ustus* tuvieron una CIM ≥ 2 mg/l. Algunos estudios previos han comunicado disminución de la sensibilidad *in vitro* frente al itraconazol en *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor* y *A. ustus*, aunque no es un hecho frecuente^{4,15-20,22,25}. Esta resistencia parece ser, en algunos casos, adquirida durante terapia prolongada con este antifúngico, aunque en otros no hay constancia de tratamiento previo, lo que sugiere que se trata de una resistencia primaria, fenómeno posible en especies de *Aspergillus*^{1,8,9,26}. La resistencia también se ha confirmado en modelos animales¹⁰.

Las CIM obtenidas en nuestro estudio frente al voriconazol son, para todas las especies de *Aspergillus*, inferiores a las correspondientes a la anfotericina B y similares a las encontradas frente al itraconazol, al igual que ha sucedido en otros estudios^{1,3,13,14,25}. Solamente se encuentra una CIM ≥ 2 mg/l en una cepa de *A. sclerotiorum* y 2 cepas de *A. ustus*. Las CIM elevadas frente al voriconazol son raras, aunque se han referido en *A. fumigatus*^{12,18,19,27}, *A. flavus*¹² y *A. ustus*¹⁸. Se ha demostrado que no existe resistencia cruzada entre el voriconazol y el itraconazol en *A. fumigatus*, lo que sugiere distintos mecanismos de resistencia^{19,28}.

De nuestro estudio y de otros realizados con anterioridad, se deduce que los azoles itraconazol y voriconazol muestran, sin duda, mayor actividad *in vitro* que la anfotericina B para el conjunto de las especies de *Aspergillus*.

Bibliografía

- Chandrasekar PH, Cutright JL, Manavathu EK. *Aspergillus*: rising frequency of clinical isolation and continued susceptibility to antifungal agents, 1994-1999. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;41:211-4.
- Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus* with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol* 1999;37:2343-5.
- Measaki S, Iwakawa J, Higashiyama Y, et al. Antifungal activity of a new triazole, voriconazole (UK-109496), against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Infect Chemother* 2000;6:101-3.
- Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Verweij PE. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2002;40:2876-85.
- Martín-Mazuelos E, Pemán J, Valverde A, Chaves M, Serrano MC, Cantón E. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel and Etest with the NCCLS M38-A method to determine the activity of amphotericin B and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:365-70.
- Sánchez-Sousa A, Álvarez ME, Maíz L, Escobar H, Baquero F. *Aspergillus fumigatus* susceptibility testing by colorimetric microdilution. *J Mycol Med* 1999;9:103-6.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Approved Standard M38-A NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
- Chrysanthou E. *In vitro* susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. Acquired resistance to itraconazole. *Scand J Infect Dis* 1997;29:509-12.
- Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1364-8.
- Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johson EM, Warnock DW. Correlation between *in-vitro* susceptibility testing to itraconazole and *in-vivo* outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:401-14.
- Odds FC, Van Gerven F, Espinel-Ingroff A, et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:282-8.
- Clancy CJ, Nguyen MH. *In vitro* efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:573-5.

13. Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:741-5.
14. Wildfeuer A, Seidl HP, Paule I, Haberreiter A. *In vitro* evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvina. *Mycoses* 1998;41:309-19.
15. Tawara S, Ikeda F, Maki K, Morishita Y, Otomo K, Teratani N, et al. *In vitro* activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:57-62.
16. Moore CB, Walls CM, Denning DW. *In vitro* activity of the new triazole BMS-207147 against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:441-3.
17. Dannaoui E, Persat F, Monier MF, Borel MAP, Picot S. *In vitro* susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:553-5.
18. Verweij PE, Mensink M, Rijs AJ, Donnelly JP, Meis JF, Denning DW. *In vitro* activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:389-92.
19. Abraham OC, Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH. *In vitro* susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:7-11.
20. Murphy M, Bernard EM, Ishimaru T, Armstrong D. Activity of voriconazole (UK-109,496) against clinical isolates *Aspergillus* species and its effectiveness in an experimental model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:696-8.
21. Rath PM. Susceptibility of *Aspergillus* strains from culture collections to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:567-70.
22. Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Siddat M, López-Jodra O, Jiménez T. *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;11:25-31.
23. Verweij PE, Oakley KL, Morrissey J, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of LY303366 against amphotericin B-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* in a murine model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:873-8.
24. Dannaoui E, Borel E, Persat F, Piens MA, Picot S. Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus* in a murine model of disseminated aspergillosis. *J Med Microbiol* 2000;49:601-6.
25. Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Rijs AJ, De Vries-Hospers HG, Meis JF. Nationwide survey of *in vitro* activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. *J Clin Microbiol* 2002;40:2648-50.
26. Dannaoui E, Borel E, Monier MF, Piens MA, Picot S, Persat F. Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:333-40.
27. Cuencia-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Mellado E, Martínez-Suárez JV, Monzón A. Comparison of the *in vitro* activity of voriconazole (UK-109,496), itraconazole and amphotericin B against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:531-3.
28. Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:556-7.