

Actividad *in vitro* de caspofungina frente a aislados clínicos de *Candida* resistentes a fluconazol en pacientes con infección por el VIH

Victoria Ortiz de la Tabla-Ducasse^a, Mar Masiá-Canuto^b, Coral Martín-González^a y Félix Gutiérrez-Rodero^b

^aSección de Microbiología. Hospital Universitario de San Juan. San Juan. Alicante. España. ^bUnidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario de Elche. Alicante. España.

INTRODUCCIÓN. El tratamiento de las infecciones mucosas producidas por especies de *Candida* resistentes al fluconazol en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es problemático. Las equinocandinas tienen actividad fungicida frente a la mayoría de las especies de *Candida*. El objetivo de este trabajo fue investigar la actividad *in vitro* de caspofungina frente a cepas de *Candida* resistentes al fluconazol aisladas de pacientes infectados por el VIH.

MÉTODOS. Se evaluó la actividad *in vitro* de caspofungina frente a los 28 aislados de *Candida* resistentes al fluconazol obtenidos de una cohorte de 174 pacientes infectados por el VIH. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante el método de microdilución en caldo estandarizado, según las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

RESULTADOS. El intervalo de la CIM para caspofungina fue de $\leq 0,06$ a $1 \mu\text{g/ml}$. Las CIM a las que se inhibieron el 50% (CIM₅₀) y el 90% (CIM₉₀) de los aislados fueron de $0,25$ y $0,5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para *C. albicans* ($n = 11$), el intervalo de las CIM fue $\leq 0,06$ a $0,5 \mu\text{g/ml}$ y para *C. glabrata* ($n = 11$) de $< 0,06$ a $1 \mu\text{g/ml}$. Las CIM para las dos cepas de *C. krusei* fueron de $0,125$ y $1 \mu\text{g/ml}$. El intervalo de la CIM para *C. tropicalis* y *C. inconspicua* fue de $0,25$ a $0,5 \mu\text{g/ml}$.

CONCLUSIÓN. La caspofungina fue muy activa *in vitro* frente a cepas de *Candida* resistentes al fluconazol de pacientes infectados por el VIH. La CIM₅₀ y los intervalos de CIM fueron ligeramente mayores para *C. glabrata* que para *C. albicans*.

Palabras clave: Antifúngicos. Caspofungina. Actividad *in vitro*. Resistencia al fluconazol.

In vitro activity of caspofungin against fluconazole-resistant *Candida* isolates from patients with HIV infection

INTRODUCTION. Antifungal therapy for mucosal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida* species is problematic. The aim of this study was to investigate the *in vitro* activity of caspofungin against *Candida* strains with reduced susceptibility to fluconazole isolated from HIV-infected patients.

METHODS. The *in vitro* activity of caspofungin was assessed in 28 fluconazole-resistant *Candida* isolates obtained from the oral cavity of a cohort of 174 consecutive HIV-infected patients. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by a standardized broth microdilution method, as recommended by the NCCLS.

RESULTS. Overall, caspofungin MICs ranged from $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ to $1 \mu\text{g/ml}$. MICs at which 50% (MIC₅₀) and 90% (MIC₉₀) of isolates were inhibited were $0.25 \mu\text{g/ml}$ and $0.5 \mu\text{g/ml}$, respectively. MICs ranged from $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ to $0.5 \mu\text{g/ml}$ for *Candida albicans* ($n = 11$), and $< 0.06 \mu\text{g/ml}$ to $1 \mu\text{g/ml}$ for *Candida glabrata* ($n = 11$). MICs for the two strains of *Candida krusei* were $0.125 \mu\text{g/ml}$ and $1 \mu\text{g/ml}$. The range of MICs for *Candida tropicalis* and *Candida inconspicua* strains was $0.25 \mu\text{g/ml}$ to $0.5 \mu\text{g/ml}$.

CONCLUSION. Caspofungin was very active *in vitro* against a variety of fluconazole-resistant *Candida* strains recovered from a clinical cohort of HIV-infected patients. The MIC₅₀ values and MIC ranges were slightly higher for *Candida glabrata* than for *Candida albicans*.

Key words: Antifungal agents. Caspofungin. *In vitro* activity. Fluconazole-resistance.

Introducción

La resistencia a los antifúngicos ha suscitado un considerable interés y preocupación en los últimos años¹. En particular, las candidiasis mucosas en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las candidemias producidas por especies de *Candida* resistentes a los fármacos azólicos constituyen un problema clínico significativo con implicaciones terapéuticas

Correspondencia: Dr. V. Ortiz de la Tabla-Ducasse. Sección de Microbiología. Hospital Universitario de San Juan. Ctra. de Valencia, s/n. 03550 San Juan. Alicante. España. Correo electrónico: ortiz_vic@gva.es.

Manuscrito recibido el 10-9-2003; aceptado el 28-11-2003.

por las limitadas opciones disponibles^{2,3}. Los nuevos medicamentos antifúngicos constituyen una estrategia atractiva para tratar las infecciones producidas por hongos resistentes¹.

Los equinocandinas son una nueva clase de fármacos antifúngicos que inhiben la síntesis de 1,3-β-D-glucano, desencadenando la lisis de las células fúngicas en crecimiento⁴. Por su diferente modo de acción y su estructura molecular es improbable que exista resistencia cruzada entre los fármacos azólicos y las equinocandinas. La caspofungina es una equinocandina con un amplio espectro de actividad antifúngica⁵ que ha sido recientemente comercializada en Estados Unidos y en Europa para el tratamiento de los pacientes con infecciones invasoras por *Aspergillus* spp. y *Candida* spp. Los estudios previos han demostrado que la caspofungina es activa frente a *Candida* spp. incluyendo aislados resistentes a los azoles⁶⁻¹⁰. Sin embargo, el número de cepas clínicas resistentes a azoles analizado es todavía escaso y existe una información limitada sobre las características de los pacientes de los que procedían las cepas estudiadas.

Para conocer la actividad de la caspofungina frente a las cepas de *Candida* resistentes a azoles, se requirieron estudios adicionales que abarquen todo el espectro clínico de la candidiasis resistente. El objetivo de este trabajo fue investigar la actividad *in vitro* de la caspofungina frente a cepas de *Candida* spp. con sensibilidad reducida al fluconazol aisladas de pacientes con infección por el VIH.

Material y métodos

Se estudió la sensibilidad a la caspofungina en un total de 28 cepas de *Candida* spp. con sensibilidad disminuida al fluconazol (tabla 1). Estas cepas representaban todos los aislamientos orofaríngeos de *Candida* spp. con sensibilidad disminuida al fluconazol aislados de una cohorte de 174 pacientes consecutivos con infección por el VIH incluidos en un estudio transversal para investigar los factores de riesgo para el desarrollo de colonización o infección por cepas de *Candida* resistentes al fluconazol¹¹. La identificación de las levaduras aisladas se realizó por procedimientos microbiológicos convencionales, que incluyeron pruebas de asimilación de azúcares mediante el sistema API 20C AUX (BioMérieux, Francia)¹². La distribución por especies de los 28 aislados fue la siguiente: *C. albicans*, 11; *C. glabrata*, 11; *C. krusei*, 2; *C. tropicalis*, 2; *C. inconspicua*, 2.

La sensibilidad al fluconazol se estudió mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹³, usando como medio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 con MOPS 0,165 M. Los resultados se interpretaron según los criterios publicados por Rex et al¹⁴. De las 28 cepas, 18 fueron clasificadas como resistentes al fluconazol (concentración inhibitoria mínima [CIM] ≥ 64 µg/ml) y 10 como sensibles al fluconazol dependiendo de la dosis (CIM, 16 a 32 µg/ml) de acuerdo con los límites propuestos por el NCCLS¹³.

Las cepas se almacenaron a -70 °C y fueron subcultivadas al menos dos veces en placas de agar glucosado de Sabouraud (BioMérieux, Francia), e incubadas a 35 °C durante 24-48 h antes de ser analizadas.

La caspofungina fue suministrada por Merck Research Laboratories (Whitehouse Station, N.J., EE.UU.) como polvo estándar. Se preparó una solución madre a una concentración de 640 µg/ml en agua destilada estéril, que fue posteriormente diluida con medio RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 con 0,165 M ácido morfolinopropanesulfónico (MOPS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EE.UU.) y dispensada en placas de microdilución de 96 pocillos. Las placas con alícuotas de 0,1 ml de la solución apropiada del fármaco (el doble de la concen-

TABLA 1. Distribución de las 28 cepas de *Candida* spp. con sensibilidad reducida al fluconazol clasificadas según la CIM

Microorganismos	Número de cepas
Resistentes al fluconazol (CIM ≥ 64 µg/ml)	18
<i>C. glabrata</i>	8
<i>C. albicans</i>	7
<i>C. tropicalis</i>	2
<i>C. krusei</i>	1
Sensibles al fluconazol dependiendo de la dosis (CIM, 16-32 µg/ml)	10
<i>C. albicans</i>	4
<i>C. glabrata</i>	3
<i>C. inconspicua</i>	2
<i>C. krusei</i>	1

CIM: concentración inhibitoria mínima.

tración final) en cada pocillo fueron selladas y almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Las pruebas de sensibilidad antifúngica se realizaron mediante el método de microdilución en caldo estandarizado, según las recomendaciones del NCCLS¹³. El test se efectuó empleando diluciones dobles para obtener un rango de concentración final de caspofungina de 0,06 a 32 µg/ml. Las levaduras se recuperaron de cultivos de 48 h en agar glucosado de Sabouraud a 35 °C. Las placas de microdilución se incubaron a 35 °C y se leyeron visualmente a las 48 h. La CIM para la caspofungina se definió como la concentración más baja del fármaco que inhibió completamente el crecimiento. El control de calidad de las pruebas se efectuó según lo descrito por el NCCLS en el documento M27-A2¹³ usando *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Se probó también un aislado de *Cryptococcus neoformans* como control de resistencia a la caspofungina dada la conocida falta de sensibilidad de este microorganismo a las equinocandinas.

Resultados

Los resultados de las CIM de caspofungina a las 48 h para las cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol y para las sensibles en función de la dosis se exponen en la tabla 2. Globalmente, el intervalo de las CIM osciló de ≤ 0,06 a 1 µg/ml. Las CIM a las que se inhibieron el 50%

TABLA 2. Actividad *in vitro* de la caspofungina frente a las 28 cepas de *Candida* spp. con sensibilidad reducida al fluconazol

Microorganismos	Número de cepas	CIM a fluconazol (µg/ml) (intervalo)	CIM a caspofungina (µg/ml)	
			Intervalo	Media geométrica
<i>C. albicans</i> -R	7	> 64	0,125-0,5	0,28
<i>C. albicans</i> -SDD	4	16-32	≤ 0,06-0,25	0,17
<i>C. glabrata</i> -R	8	64-> 64	≤ 0,06-1	0,44
<i>C. glabrata</i> -SDD	3	16-32	0,125-0,5	0,29
<i>C. krusei</i>	2	32-> 64	0,25-1	0,62
<i>C. tropicalis</i>	2	> 64	0,25-0,5	0,37
<i>C. inconspicua</i>	2	16-32	0,25-0,5	0,37
Total	28	16-> 64	< 0,06-1	0,35

CIM: concentración inhibitoria mínima; R: resistente a fluconazol (CIM ≥ 64 µg/ml); SDD: sensible al fluconazol dependiendo de la dosis (CIM, 16-32 µg/ml).

(CIM₅₀) y el 90% (CIM₉₀) de los aislados fueron 0,25 y 0,5 µg/ml, respectivamente.

Para *C. albicans* (n = 11), el intervalo de las CIM de caspofungina fue de igual o inferior a 0,06 a 0,5 µg/ml. Las CIM₅₀ y CIM₉₀ de caspofungina para *C. albicans* tendieron a ser ligeramente más altas para las cepas resistentes al fluconazol que para las sensibles en función de la dosis (media geométrica 0,28 y 0,17 µg/ml, respectivamente). Para *C. glabrata* (n = 11), las CIM de caspofungina oscilaron entre menos de 0,06 y 1 µg/ml. Las CIM₅₀ para las cepas resistentes al fluconazol y para las sensibles dependiendo de la dosis en las cepas de *C. glabrata* fueron de 0,5 y 0,25 µg/ml (media geométrica, 0,44 y 0,29 µg/ml), respectivamente. Las CIM para caspofungina de las dos cepas de *C. krusei* fueron de 0,25 y 1 µg/ml. *C. tropicalis* y *C. inconspicua* tuvieron las mismas CIM con intervalos entre 0,25 y 0,5 µg/ml.

Para las cepas control se obtuvo un rango de CIM de 0,25-1 µg/ml para *C. krusei* ATCC 6258 y de 0,125-0,5 µg/ml para *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Discusión

Este estudio muestra que la caspofungina es muy activa *in vitro* frente a una muestra de cepas de *Candida* con sensibilidad reducida al fluconazol aisladas de una cohorte clínica de pacientes con infección por el VIH. Una diferencia importante entre nuestro trabajo y los estudios previos es el origen de las cepas de *Candida* analizadas. En este trabajo se han estudiado todas las cepas con sensibilidad reducida al fluconazol obtenidas de pacientes consecutivos con infección por VIH con un espectro clínico amplio de esta enfermedad¹¹.

Todas las cepas estudiadas se inhibieron con una concentración de caspofungina de 1 µg/ml o menor. Las especies de *Candida* resistentes al fluconazol que se aislaron con más frecuencia fueron *C. albicans* y *C. glabrata*, frente a las cuales la caspofungina demostró ser muy activa *in vitro*, con una CIM₉₀ ≤ 0,5 µg/ml. Aunque las CIM tendieron a ser ligeramente más elevadas para las cepas resistentes al fluconazol que para las sensibles en función de la dosis, estos resultados deben interpretarse con cautela debido al reducido número de cepas estudiadas. En los trabajos realizados hasta ahora no se ha observado que las cepas resistentes al fluconazol presenten resistencia cruzada a las equinocandinas^{7,9}. En nuestro estudio, la caspofungina mostró una buena actividad frente a las cepas con CIM al fluconazol ≥ 64 µg/ml, hallazgos coincidentes con los datos publicados por otros investigadores que han observado también una buena actividad *in vitro* de la caspofungina frente a muchas cepas de *Candida* resistentes al fluconazol⁶⁻¹⁰, incluyendo cepas de *C. albicans* de pacientes con sida con diferentes mecanismos de resistencia a los azoles⁹.

En contraste con la excelente actividad de caspofungina frente a *C. albicans*, algunos estudios *in vitro* han mostrado que es menos activa frente a otras especies, como *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*^{5-8,10}. En nuestro estudio, las CIM₅₀ y los intervalos de las CIM fueron ligeramente mayores para *C. glabrata* que para *C. albicans*. Las CIM más elevadas se observaron en dos cepas, una de *C. krusei* y la otra de *C. glabrata*, que necesitaron

1 µg/ml para ser inhibidas. Aunque los criterios para la interpretación de los resultados *in vitro* para caspofungina todavía no se han definido, las CIM observadas en este estudio están por debajo del rango de las concentraciones séricas que pueden alcanzarse con caspofungina en seres humanos¹⁵. Merece destacarse la excelente actividad que mostró la caspofungina frente a las dos cepas de *C. tropicalis* cuyas CIM al fluconazol eran ≥ 64 µg/ml.

En definitiva, en el presente estudio se observó una buena actividad *in vitro* de la caspofungina frente a todos los aislamientos orofaríngeos de *Candida* spp. resistentes al fluconazol procedentes de una amplia muestra de pacientes con infección por el VIH. Estos resultados y los datos de eficacia obtenidos en los ensayos clínicos realizados hasta ahora¹⁶⁻¹⁸ indican que la caspofungina podría constituir una opción terapéutica para la candidiasis mucosa resistente a azoles en pacientes con SIDA.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente con una beca de Merck & Co., Inc y del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 97/0916).

Bibliografía

- Masiá Canuto M, Gutiérrez Rodero F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2002;2:550-63.
- Maenza JR, Merz WG, Romagnoli MJ, Keruly JC, Moore RD, Gallant JE. Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clin Infect Dis* 1997;24:28-34.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:747-51.
- Debono M, Gordee RS. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:471-97.
- Bartizal K, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM, et al. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2326-32.
- Barchiesi F, Schimizzi AM, Fothergill AW, Scalise G, Rinaldi MG. *In vitro* activity of the new echinocandin antifungal, MK-0991, against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:302-4.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. *In vitro* activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1068-71.
- Vázquez JA, Lynch M, Boikov D, Sobel JD. *In vitro* activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1612-4.
- Bachmann SP, Patterson TF, López-Ribot JL. *In vitro* activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol* 2002;40:2228-30.
- Espinel-Ingroff A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* 1998;36:2950-6.
- Masiá M, Gutiérrez F, Ortiz de la Tabla V, Hernández I, Martín C, Sánchez A, et al. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:593-601.
- Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. En: Murray PR et al, editors. *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed. Washington: ASM, 2003; p. 1693-711.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Approved standard. Document M27-A2. Wayne: NCCLS, 2002.
- Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghanoum MA, et al. Development of interpretative breakpoints for antifungal

- susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin Infect Dis 1997;24:235-47.
15. Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. Antimicrob Agents and Chemother 2002;46:739-45.
 16. Arathoon EG, Gotuzzo E, Noriega LM, Berman RS, DiNubile MJ, Sable CA. Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:451-7.
 17. Villanueva A, Gotuzzo E, Arathoon E, Noriega L, Kartsonis N, Lupinaca R, et al. A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. Am J Med 2002;113:294-9.
 18. Kartsonis N, DiNubile M, Bartizal K, Scott P, Ryan D, Sable C. Efficacy of caspofungin in the treatment of esophageal candidiasis resistant to fluconazol. J Acquir Immune Defic Syndr 2002;31:183-7.