

## Original

# Sensibilidad a antifúngicos de especies de *Acremonium* mediante los métodos *E-test*<sup>®</sup> y *Sensititre*<sup>®</sup>

A. Saldarreaga<sup>1</sup>, P. García-Martos<sup>1</sup>, J. Ruiz-Aragón<sup>1</sup>, L. García-Agudo<sup>1</sup>, M. Montes de Oca<sup>2</sup>, J.L. Puerto<sup>1</sup> y P. Marín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología y <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz

### RESUMEN

Los hongos filamentosos han surgido como causa importante de infecciones graves, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. En los últimos años han aumentado el número y la variedad de infecciones causadas por especies de *Acremonium*. Como ocurre para la mayoría de los patógenos emergentes, todavía tiene que realizarse un adecuado enfoque terapéutico para las especies de *Acremonium*. Utilizamos dos métodos para determinar la sensibilidad in vitro a amfotericina B, itraconazol y fluconazol en 15 aislamientos clínicos de *Acremonium* pertenecientes a ocho especies diferentes. La CMI se determinó según el protocolo M38-A del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), utilizando los métodos de microdilución *Sensititre*<sup>®</sup> y *E-test*<sup>®</sup>. La amfotericina B fue eficaz in vitro para pocas especies por el método *Sensititre*<sup>®</sup>; sin embargo, se obtuvieron altas CMI por el método *E-test*<sup>®</sup>. El fluconazol y el itraconazol fueron ineficaces por ambos métodos. Las especies de *Acremonium* generalmente son resistentes a la mayoría de los antifúngicos más usados. Por estas razones se recomienda realizar pruebas de sensibilidad de *Acremonium* como apoyo para la correcta elección terapéutica en las infecciones causadas por este hongo filamentosos.

**Palabras clave:** Infección fúngica - *Acremonium* - Antifúngicos - Pruebas de sensibilidad

## *Antifungal susceptibility of Acremonium species using E-test<sup>®</sup> and Sensititre<sup>®</sup>*

### SUMMARY

Filamentous fungi have become a common cause of severe infections, especially in immunocompromised patients. In recent years, the number and diversity of the infections caused by *Acremonium* species have increased and numerous species have been implicated. As is the case for most emerging pathogens, the optimal therapeutic approach to *Acremonium* species remains to be determined. We used two methods to determine the in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and fluconazole for 15 clinical isolates of eight different species of *Acremonium*. The MICs were determined according to protocol M38-A of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) document, using the *Sensititre*<sup>®</sup> and *E-test*<sup>®</sup> microdilution methods. Amphotericin B was effective in vitro for few species using the *Sensititre*<sup>®</sup> method. However, high MICs were obtained with *E-test*<sup>®</sup>. Fluconazole and itraconazole were ineffective according to both methods. *Acremonium* species are generally resistant to the most commonly used antifungal agents. Consequently, *Acremonium* susceptibility testing is recommended to assist in choosing adequate treatment of infections caused by this filamentous fungus.

**Key words:** Fungal infection - *Acremonium* - Antifungal - Susceptibility test



## INTRODUCCIÓN

Las infecciones por hongos filamentosos han experimentado un incremento importante desde hace una década, especialmente en los pacientes inmunodeprimidos, implicándose en ellas nuevas especies patógenas que antes no eran consideradas agentes etiológicos de micosis sistémicas (1-5). En muchas ocasiones este hecho constituye un problema clínico a causa de la alta resistencia de estos hongos a los antifúngicos (2-7).

*Acremonium* es un hongo cosmopolita, muy frecuente en el suelo y en restos de vegetales en descomposición. Algunas especies son patógenas oportunistas para el hombre y los animales. El micetoma de granos blancos y las infecciones oculares, sobre todo queratitis, son las infecciones más frecuentes; de forma ocasional se observan casos de onicomicosis, osteomielitis, sinusitis, artritis, peritonitis, neumonía, meningitis, endocarditis, infección diseminada y cerebritis. *A. alabamense*, *A. atrogriseum*, *A. blochii*, *A. curvulum*, *A. falciforme*, *A. hyalinulum*, *A. kiliense*, *A. potronii*, *A. recifei*, *A. roseogriseum* y *A. strictum* son las especies de interés clínico (8-11).

Debido a que las infecciones por *Acremonium* son raras, se han realizado muy pocos estudios para conocer su sensibilidad a los antifúngicos, y con un escaso número de cepas. Hasta hace unos años las pruebas de sensibilidad para hongos filamentosos no estaban desarrolladas de forma satisfactoria, pero el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) publicó en el año 2002 el documento M38-A, en el cual se recogen las directrices a seguir para la determinación de la sensibilidad en este grupo de hongos (12). Algunos autores han ensayado los métodos comerciales *E-test*® (AB Biodisk, Sweden) y *Sensititre YeastOne*® (Accumed International, UK) en comparación con el método de referencia del NCCLS, obteniendo una buena concordancia (13-19). El objeto de nuestro trabajo ha sido determinar la sensibilidad de algunas especies del género *Acremonium* a los antifúngicos de uso habitual, comparando dichos métodos comerciales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudiamos un total de 15 cepas del género *Acremonium* de origen clínico, aisladas de diversas muestras (dos de esputo, una de sangre, ocho de piel y cuatro de uñas), pertenecientes a ocho especies (tres *A. curvulum*, tres *A. potronii*, tres *A. strictum*, dos *A. blochii*, una *A. hyalinulum*, una *A. kiliense*, una *A. recifei* y una *A. roseogriseum*), y dos cepas de hongos relacionados con este género: una de *Phialemonium obovatum* y otra de *Cylindrocarpon destructans*.

También incorporamos en el estudio una cepa de *Aspergillus flavus* ATCC 204304 como control.

Se determinó la sensibilidad de estas cepas frente a amfotericina B, itraconazol y voriconazol, mediante los métodos *E-test*® y *Sensititre YeastOne*®, siguiendo las instrucciones del fabricante. El método *E-test*® es cuantitativo de difusión en agar, y utiliza tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico; el método *Sensititre YeastOne*® consiste en una microplaca que contiene seis antifúngicos a diluciones crecientes, con un indicador de crecimiento de óxido-reducción (colorante Alamar Blue) que facilita la lectura de los puntos finales por un cambio de color, de azul (negativo) a rojo (positivo).

El inóculo se preparó tras cultivo de las cepas en agar de Sabouraud durante siete días a 30 °C. La superficie del agar fue inundada con 1 ml de solución salina estéril conteniendo un 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 se filtró a través de gasa estéril de cuatro dobleces para eliminar las hifas acompañantes, y se diluyó para ajustar la concentración del inóculo en un espectrofotómetro a 530 nm hasta obtener una transmitancia del 80% al 82%, equivalente a una concentración de  $4 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  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.

El medio de cultivo para el método *E-test*® fue agar RPMI 1640 con un 2% de glucosa. Las placas se inocularon con una torunda de forma masiva, dejando secar durante 10 a 15 minutos antes de aplicar las tiras con el antifúngico sobre la superficie del agar. La incubación se realizó a 35 °C durante 48 horas. La inoculación de los pocillos de la placa *Sensititre*® se efectuó con 100 µl de esta suspensión. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 y 72 horas, antes de realizar la lectura definitiva. Todas las pruebas se realizaron por duplicado para evitar errores de técnica. Como CMI se consideró la concentración más baja que produjo ausencia de crecimiento.

## RESULTADOS

Con el método *Sensititre*®, la diferencia de CMI entre las 48 y 72 horas no fue significativa para la interpretación, pues en las cepas que crecieron a las 48 horas esta CMI no experimentó variaciones apreciables.

En las Tablas 1 y 2 se expresan los resultados obtenidos con los métodos *E-test*® y *Sensititre*® para los diferentes antifúngicos. Todas las especies tuvieron CMI muy altas para el itraconazol con los dos métodos, a excepción de *C. destructans*. Las CMI de amfotericina B fueron muy ele-

**Tabla 1. Sensibilidad de especies de *Acremonium* mediante el método *E-test*<sup>®</sup>, expresada en mg/l (48 horas).**

Especie	Cepas	Amfotericina B	Itraconazol	Voriconazol
<i>A. curvulum</i>	3	24-≥32	≥32	2-4
<i>A. potroni</i>	3	≥32	≥32	0,5-1,5
<i>A. strictum</i>	3	≥32	≥32	0,38-0,75
<i>A. blochii</i>	2	≥32	≥32	0,5-0,75
<i>A. hyalinulum</i>	1	≥32	≥32	0,5
<i>A. kiliense</i>	1	≥32	≥32	0,38
<i>A. recifei</i>	1	≥32	≥32	0,5
<i>A. roseogriseum</i>	1	≥32	≥32	0,75
<i>P. obovatum</i>	1	≥32	≥32	0,38
<i>C. destructans</i>	1	0,023	1,5	0,125

**Tabla 2. Sensibilidad de especies de *Acremonium* mediante el método *Sensititre*<sup>®</sup>, expresada en mg/l (72 horas).**

Especie	Cepas	Amfotericina B	Itraconazol	Voriconazol
<i>A. curvulum</i>	3	1-2	≥16	1-2
<i>A. potroni</i>	3	4-8	≥16	0,125-0,5
<i>A. strictum</i>	3	2-4	≥16	0,25-0,5
<i>A. blochii</i>	2	2	≥16	0,25
<i>A. hyalinulum</i>	1	≥16	≥16	0,5
<i>A. kiliense</i>	1	16	≥16	0,25
<i>A. recifei</i>	1	1	≥16	0,25
<i>A. roseogriseum</i>	1	4	4	0,5
<i>P. obovatum</i>	1	8	2	0,125
<i>C. destructans</i>	1	0,25	0,25	0,06

vadas por el método *E-test*<sup>®</sup>, excepto en el caso de *C. destructans*; por el método *Sensititre*<sup>®</sup> fueron variables dependiendo de la especie, aunque solamente *A. curvulum* y *A. recifei* presentaron CMI ≤1 mg/l. Con voriconazol, las CMI obtenidas por el método *Sensititre*<sup>®</sup> estuvieron comprendidas entre 0,125 y 2 mg/l, y solamente *A. curvulum* presentó CMI ≥1 mg/l; por el método *E-test*<sup>®</sup> estas CMI oscilaron entre 0,38 y 4 mg/l, pero fueron tres especies las que mostraron CMI ≥1 mg/l. Las CMI para *A. flavus* estuvieron dentro de los márgenes esperados.

## DISCUSIÓN

Los dos métodos ensayados parecen de utilidad para determinar la sensibilidad de hongos filamentosos a amfotericina B, itraconazol y voriconazol, aunque, como es sabido, las pruebas de sensibilidad para estos hongos son controvertidas y los resultados *in vitro* pueden no correla-

cionarse con la respuesta clínica (20-22). Según los pocos datos publicados, la sensibilidad de *Acremonium* a los antifúngicos es, en general, casi nula. Se afirma que el fluconazol y la 5-fluorocitosina son totalmente ineficaces, que otros azoles como el ketoconazol, el itraconazol y el saperconazol muestran escasa actividad, dependiendo de la especie, y que sólo la amfotericina B, el voriconazol y la terbinafina poseen cierta actividad *in vitro* (8, 9).

Según nuestros resultados, con el método *E-test*<sup>®</sup> la actividad *in vitro* de la amfotericina B y el itraconazol es nula frente a todas las especies de *Acremonium* estudiadas, pero no sucede lo mismo con el voriconazol, que manifiesta una excelente actividad para la mayoría de las especies. Con el método *Sensititre*<sup>®</sup> la amfotericina B muestra cierta actividad frente a gran parte de las especies de *Acremonium* y el voriconazol es eficaz para todas menos *A. curvulum*; sin embargo, la actividad del itraconazol es muy escasa y limitada a *A. roseogriseum*.

La diferencia de resultados que detectamos con ambos métodos al determinar la sensibilidad de especies de *Acremonium* no tiene excesiva relevancia, si bien es notable y debe considerarse a la hora de elegir uno u otro para la práctica clínica. Comparando nuestros datos con los reflejados en la literatura, observamos que los correspondientes al método Sensititre® concuerdan en mayor medida con los descritos en los escasos estudios de sensibilidad disponibles (9, 14, 23), por lo que pensamos que este método es más recomendable para la determinación de la sensibilidad en el género *Acremonium*.

En las infecciones por *Acremonium* existe poca experiencia sobre la efectividad de los antifúngicos, y las pautas de tratamiento no están bien definidas. Aunque la sensibilidad a la mayoría de los antifúngicos es reducida, para las infecciones complicadas se recomienda amfotericina B, sola o asociada con derivados azólicos (8, 9). En este sentido es interesante realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos existentes y verificar la actividad de los nuevos azoles (voriconazol, ravuconazol) frente a especies de *Acremonium* (24). Nuestro estudio confirma que el voriconazol puede ser una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones por *Acremonium*, ya que este antifúngico ofrece los mejores resultados de sensibilidad *in vitro*.

---

**Correspondencia:** Abel Saldarreaga Marín, C/Pintor Zuloaga 35, 6º D, 11010 Cádiz. Tel.: 629350213. Fax: 956003081. e-mail: abesalda@hotmail.com

---

## BIBLIOGRAFÍA

- De Battle, J., Motje, M., Guardia, R., Ortiz, R. *Disseminated infection caused by Scedosporium prolificans in a patient with acute multilineal leukemia*. J Clin Microbiol 2000; 38: 1694-1695.
- Guarro, J., Gené, J. *Opportunistic fusarial infections in humans*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14: 741-754.
- Richter, S., Cormican, M.G., Pfaller, M.A. y cols. *Fatal disseminated Trichoderma longibrachiatum infection in a adult bone marrow transplant patient: Species identification and review of literature*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1154-1160.
- Verweij, P.E., Van de Bergh, M.F.Q., Rath, P.M., DePauw, B.E., Voss, A., Meis, J.F.G.M. *Invasive aspergillosis caused by Aspergillus ustus: Case report and review*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1606-1609.
- Gavin, P.J., Sutton, D.A., Katz, B.Z. *Fatal endocarditis in a neonate caused by the dematiaceous fungus Phialemonium obovatum: Case report and review of the literature*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2207-2212.
- Denning, D.W., Venkateswarlu, K., Oakley, L. y cols. *Itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1364-1368.
- Iwen, P.C., Rupp, M.E., Langnas, L.N., Reed, E.C., Hinrichs, S.H. *Invasive pulmonary aspergillosis due to Aspergillus terreus: 12-year experience and review of the literature*. Clin Infect Dis 1998; 26: 1178-1184.
- Fincher, R.M., Fisher, J.F., Lowell, R.D., Newman, C.L., Espinel-Ingroff, A., Shadomy, H.J. *Infection due to the fungus Acremonium (Cephalosporium)*. Medicine (Balt.) 1991; 70: 398-409.
- Guarro, J., Gams, W., Pujol, I., Gené, J. *Acremonium species: New emerging fungal opportunists in vitro antifungal susceptibilities and review*. Clin Infect Dis 1997; 25: 1222-1229.
- Schell, W.A., Perfect, J.R. *Fatal disseminated Acremonium strictum infection in a neutropenic host*. J Clin Microbiol 1996; 34: 1333-1336.
- Roilides, E., Bibashi, E., Acritidou, E. y cols. *Acremonium fungemia in two immunocompromised children*. Pediatric Infect Dis J 1995; 14: 548-550.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa 2002.
- Meletiadis, J., Mouton, J.W., Meis, J.F., Bouman, B.A., Verweij, P.E. *Comparison of the E-test® and the Sensititre® colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2876-2885.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Mills, K., Bolström, A. *In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of E-test® and reference microdilution methods for determining itraconazole MIC*. J Clin Microbiol 2000; 38: 3359-3361.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Karlsson, A., Bolström, A. *Evaluation of the E-test® method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeasts isolates by using three different agar media*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2586-2589.
- Skezely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W. *Comparison of E-test® and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1480-1483.
- Espinel-Ingroff, A. *Comparison of the E-test® with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi*. J Clin Microbiol 2001; 39: 1360-1367.
- Linares, M.J., Muñoz, J. F., Solís, F., Rodríguez, F.C., Valero, A., Casal, M. *Study of the susceptibility of yeast isolates of clinical interests to five antifungal agents using the E-test®*. Rev Esp Quimioterap 1998; 11: 64-69.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Quindós, G., Gasser, I. y cols. *Determinación de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos de levaduras de interés médico*. Rev Esp Quimioter 1999; 12: 126-135.
- Denning, D.W., Radford, S.A., Oakley, K.L., Hall, L., Johnson, E.M., Warnock, D.W. *Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of Aspergillus fumigatus infection*. J Antimicrob Chemother 1997; 40: 401-414.
- Espinel-Ingroff, A., Barlett, M., Chaturvedi, V. y cols. *Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in Aspergillus spp: NCCLS collaborative evaluation*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1828-1835.
- Odds, F.C., Van Gerven, F., Espinel-Ingroff, A. y cols. *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: 282-288.
- Wildfeuer, A., Seidl, H.P., Paule, I., Habereiter, A. *In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin*. Mycoses 1998; 41: 309-319.
- Espinel-Ingroff, A. *Clinical utility of in vitro antifungal susceptibility testing*. Rev Esp Quimioterap 2000; 13: 161-166.