

M. T. Blanco
J. Cañadas
P. García-Martos
P. Marín
A. García-Tapia
M. J. Rodríguez

Actividad *in vitro* de posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol frente a *Candida glabrata*

Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Puerta del Mar
Cádiz (España)

El propósito del presente trabajo ha sido determinar la actividad *in vitro* del nuevo antifúngico triazol posaconazol frente a 123 aislamientos de levaduras de interés clínico. La susceptibilidad fue testada mediante el método comercial de microdilución Sensititre YeastOne. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron establecidas de acuerdo con los criterios recomendados. Los resultados de la actividad de posaconazol frente a *Candida glabrata* fueron comparados con los de fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol. Las especies más sensibles a posaconazol fueron *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*. La especie menos sensible fue *C. glabrata*. El porcentaje de cepas con CMI ≥ 1 mg/l para posaconazol fue del 9%, todas ellas *C. glabrata*. Las especies con CMI $\geq 0,5$ mg/l para itraconazol supusieron un 36% (41 *C. glabrata*, 1 *C. krusei*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. ciferrii*). Las cepas de *C. glabrata* resistentes a fluconazol, ketoconazol y voriconazol fueron el 8%, 4% y 4%, respectivamente. Posaconazol muestra una buena actividad frente a la mayoría de las especies de *Candida*; sin embargo, frente a *C. glabrata* es similar a itraconazol y menos activo que ketoconazol y voriconazol.

Palabras clave:
Posaconazol. Levaduras. *Candida glabrata*.

Rev Esp Quimioter 2009;22(3):139-143

In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and voriconazole against *Candida glabrata*

This study has been conducted to assess the *in vitro* activity of the novel triazole antifungal agent posaconazole against 123 clinically important isolates of yeasts. Susceptibility was tested using the Sensititre YeastOne microdilution commercial method. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined at the recommended endpoints and time intervals. The activity of posaconazo-

le against *Candida glabrata* was compared with those of fluconazole, itraconazole, ketoconazole and voriconazole. The most susceptible species to posaconazole were *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. dubliniensis*. *Candida glabrata* was the least susceptible. The percentage of strains with MIC for posaconazole ≥ 1 mg/L was 9%, all of them were *C. glabrata*. The species with MIC for itraconazole ≥ 0.5 mg/L were 36% (41 *C. glabrata*, 1 *C. krusei*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. ciferrii*). *Candida glabrata* strains resistant to fluconazole, ketoconazole and voriconazole were 8%, 4% and 4%, respectively. Posaconazole exhibited good activity to the majority of *Candida* species. However, it was similar to itraconazole and less active than ketoconazole and voriconazole against *C. glabrata*.

Key words:
Posaconazole. Yeasts. *Candida glabrata*.

INTRODUCCIÓN

Candida glabrata es una levadura que se aísla cada vez con mayor frecuencia en infecciones humanas localizadas y sistémicas¹⁻³. Por otra parte, esta especie presenta un especial interés clínico por su frecuente resistencia a los derivados azólicos^{4,5}. Posaconazol es un nuevo triazol de segunda generación de estructura similar a itraconazol, con amplio espectro sobre levaduras y hongos filamentosos. Su actividad frente a levaduras ha sido estudiada por diversos autores con resultados concordantes⁶⁻⁹. Frente a *C. glabrata* posaconazol parece presentar una actividad inferior a la observada en otras especies. El objetivo de nuestro estudio ha sido determinar la actividad *in vitro* de posaconazol frente a diversas levaduras de interés clínico y un número significativo de cepas de *C. glabrata* y compararla con la de otros azoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ensayaron un total de 123 cepas de *Candida* pertenecientes a las siguientes especies: 48 *C. glabrata*, 16 *C. albicans*, 14 *C. parapsilosis*, 12 *C. krusei*, 11 *C. tropicalis*, 4 *C. lusita-*

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

Tabla 1 Sensibilidad a derivados azólicos de 123 cepas de *Candida* (CMI en mg/l)

Especies (n.º)	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Sensibles dosis dependiente (%)	Resistentes (%)
<i>C. glabrata</i> (48)					
Posaconazol	0,125 - ≥ 8	0,5	1	-	-
Fluconazol	1 - ≥ 256	16	32	54	8
Itraconazol	0,125 - ≥ 16	0,5	1	85	12
Ketoconazol	0,03 - 2	0,25	0,5	2	4
Voriconazol	0,03 - 2	0,25	0,5	4	0
<i>C. albicans</i> (16)					
Posaconazol	0,008 - 0,25	0,016	0,125	-	-
Fluconazol	0,125 - 4	0,5	2	0	0
Itraconazol	0,008 - 0,25	0,03	0,125	6	0
Ketoconazol	≤ 0,008 - 0,06	≤ 0,008	0,06	0	0
Voriconazol	≤ 0,008 - 0,06	≤ 0,008	0,06	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (14)					
Posaconazol	0,008 - 0,06	0,03	0,03	-	-
Fluconazol	0,03 - 2	0,5	2	0	0
Itraconazol	0,008 - 0,125	0,03	0,125	0	0
Ketoconazol	≤ 0,008 - 0,06	0,016	0,03	0	0
Voriconazol	≤ 0,008 - 0,06	0,008	0,03	0	0
<i>C. krusei</i> (12)					
Posaconazol	0,03 - 0,25	0,125	0,25	-	-
Fluconazol	16 - 32	32	32	100	0
Itraconazol	0,06 - 0,5	0,25	0,25	75	0
Ketoconazol	0,06 - 0,5	0,25	0,25	0	0
Voriconazol	0,125 - 0,25	0,125	0,250	0	0
<i>C. tropicalis</i> (11)					
Posaconazol	0,03 - 0,25	0,03	0,125	-	-
Fluconazol	0,5 - 2	0,5	1	0	0
Itraconazol	0,06 - 0,25	0,06	0,25	18	0
Ketoconazol	≤ 0,008 - 0,06	0,008	0,03	0	0
Voriconazol	0,016 - 0,06	0,03	0,06	0	0
Otras (22)					
Posaconazol	0,008 - 0,5	0,25	0,25	-	-
Fluconazol	0,25 - 64	2	16	4	4
Itraconazol	0,008 - 1	0,06	0,25	32	4
Ketoconazol	≤ 0,008 - 0,5	0,03	0,25	0	0
Voriconazol	≤ 0,008 - 0,25	0,06	0,25	0	0

CMI: concentración mínima inhibitoria.

Tabla 2 Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 48 cepas de *C. glabrata* frente a derivados azólicos (CMI en mg/l)

Antifúngicos/ CMI	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Posaconazol	-	-	1	5	31	9	-	-	2	-	-	-	-	-
Fluconazol	-	-	-	-	-	1	-	3	14	20	6	2	1	1
Itraconazol	-	-	1	6	35	4	-	-	-	2	-	-	-	-
Ketoconazol	1	9	3	19	13	1	2	-	-	-	-	-	-	-
Voriconazol	1	8	11	20	6	-	2	-	-	-	-	-	-	-

niae, 4 *C. lipolytica*, 3 *C. guilliermondii*, 3 *C. dubliniensis*, 2 *C. famata*, 2 *C. pelliculosa*, 1 *C. ciferrii*, 1 *C. holmii*, 1 *C. rugosa* y 1 *C. zeylanoides*, aisladas a partir de muestras clínicas de diferentes pacientes atendidos en el Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz. Las 48 cepas de *C. glabrata* procedían de las siguientes muestras: 17 de exudado vaginal, 10 de orina, 9 de secreciones respiratorias, 5 de exudado oral, 4 de sangre, 2 de exudado de herida quirúrgica y 1 de exudado ótico. Todas las cepas fueron identificadas de acuerdo con el perfil de asimilación de compuestos de carbono mediante el sistema comercial ID 32C (Biomérieux, Francia) y el morfotipo en el medio cromogénico CHROM-agar *Candida* (Beckton-Dickinson, Francia). Para la determinación de la sensibilidad se empleó el método comercial de microdilución Sensititre YeastOne (Trek Diagnostics System, UK), el cual ha demostrado una excelente correlación con el método de referencia M27-A2 del CLSI¹⁰, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los antifúngicos probados fueron: posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol. El rango de concentraciones investigadas para posaconazol fue de 0,008 a 8 mg/l. En todas las determinaciones se utilizaron las cepas *C. krusei* ATCC 6228 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 como control de calidad. Los criterios de interpretación de las cepas como sensibles o resistentes fueron los recomendados por el *Clinical and Laboratory Standar Institute* (CLSI) en el documento M27-A2, excepto para posaconazol por no estar establecidos.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las CMI₅₀ y CMI₉₀ de las distintas especies de *Candida* estudiadas frente a posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol. Como se observa en dicha tabla, *C. glabrata* es la especie que presenta las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más altas frente a posaconazol (CMI₅₀ ≥ 0,5 mg/l y CMI₉₀ ≥ 1 mg/l). La frecuencia global de aislamientos con CMI ≥ 1 mg/l para posaconazol fue del 9%, todos correspondientes a *C. glabrata*. Las cepas de *C. glabrata* menos susceptibles fueron las procedentes de sangre (50%

de las cepas con CMI ≥ 8 mg/l y 25% con CMI = 1 mg/l), de orina (50% con CMI = 1 mg/l) y de exudado vaginal (18% con CMI = 1 mg/l).

Detectamos 44 cepas con CMI ≥ 16 mg/l frente a fluconazol (30 *C. glabrata*, 12 *C. krusei*, 1 *C. guilliermondii* y 1 *C. ciferrii*), 44 cepas con CMI ≥ 0,5 mg/l frente a itraconazol (41 *C. glabrata*, 1 *C. krusei*, 1 *C. guilliermondii* y 1 *C. ciferrii*), 3 cepas de *C. glabrata* con CMI ≥ 1 mg/l frente a ketoconazol y 2 cepas de *C. glabrata* con CMI ≥ 2 mg/l frente a voriconazol.

En la tabla 2 se refleja la distribución de las 48 cepas de *C. glabrata* de acuerdo con sus CMI, comparando posaconazol con el resto de azoles. En el caso de posaconazol, solamente 6 cepas presentaron CMI ≤ 0,25 mg/l y 2 cepas CMI ≥ 8 mg/l; la CMI del resto de las cepas estuvo comprendida entre 0,5 y 1 mg/l (83%). El 81% de las cepas presentó este mismo intervalo de CMI frente a itraconazol. Un 71% de las cepas mostró una CMI entre 8 y 16 mg/l frente a fluconazol. La CMI frente a ketoconazol y voriconazol se mantuvo por debajo de 1 mg/l en el 94% y 96% de las cepas, respectivamente.

DISCUSIÓN

Aunque se ha considerado a *Candida glabrata* menos patógena que otras especies por la ausencia de algunos factores de virulencia, como la producción de pseudohifas, existen evidencias que demuestran una rápida diseminación de las infecciones ocasionadas por esta especie en pacientes inmunodeprimidos, con una elevada tasa de mortalidad. Se ha demostrado que *C. glabrata* produce proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, lo que asegura su capacidad de adherencia a las células del huésped, además de otros factores de virulencia, como el cambio fenotípico de las colonias y la producción de biopelículas¹¹.

Las infecciones por *C. glabrata* han aumentado notablemente en la última década, constituyendo en la actualidad la segunda especie en candidosis y una causa importante de mor-

bimortalidad. Esta especie es muy ubicua en la cavidad oral, vagina, piel y otras áreas anatómicas de sujetos sanos. Constituye una importante causa de candidosis vulvovaginal, infección del tracto urinario, candidemia e infección sistémica grave en pacientes críticos, inmunodeprimidos y con neoplasias. También se han descrito brotes de infección nosocomial en unidades de cuidados intensivos^{1-3,11}.

Candida glabrata es, generalmente, sensible a los derivados poliénicos, pero no a los azoles. Se ha comunicado resistencia *in vitro* a fluconazol e itraconazol, y falta de respuesta en pacientes tratados con estos antifúngicos. La resistencia es debida a un incremento en la síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y la existencia de una bomba de eflujo activa para el fluconazol^{4,5}. La aparición de resistencia cruzada con otros azoles no es infrecuente. Este problema hace que las infecciones por *C. glabrata* sean difíciles de tratar y aconseja la realización de antifungograma.

Posaconazol presenta una excelente actividad frente a la mayoría de las especies de *Candida*, incluidas las cepas con resistencia a fluconazol, resultados que coinciden a grandes rasgos con los publicados por otros autores^{6-10,12-15}. Las especies más sensibles a posaconazol en nuestra serie fueron *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*, mientras que las cepas de *C. glabrata* fueron las que mostraron CMI más elevadas, especialmente las procedentes de sangre y orina. Las CMI $\geq 0,5$ mg/l a posaconazol corresponden en su mayoría a cepas de *C. glabrata* (87%), pues sólo una cepa de *C. guilliermondii* y otra de *C. ciferrii* presentan esta CMI; las CMI ≥ 1 mg/L las encontramos únicamente en cepas de *C. glabrata*.

Al comparar la sensibilidad a posaconazol con la de otros azoles, se constata que las cepas resistentes a éstos presentan generalmente CMI altas a posaconazol^{7,14,15}. En general, posaconazol se muestra más activo que fluconazol¹³, semejante a itraconazol y menos activo que ketoconazol y voriconazol^{6-9,14}. En el caso de *C. glabrata* observamos que las CMI a posaconazol son superponibles a las de itraconazol, ya que las cepas que se inhiben con concentraciones altas de itraconazol también se inhiben con concentraciones altas de posaconazol^{7,16}.

Aunque para posaconazol no se han establecido aún puntos de corte de sensibilidad, según nuestros resultados *in vitro* podríamos concluir que este antifúngico se comporta de manera muy similar a itraconazol, por lo que podría considerarse la posibilidad de aplicar los mismos puntos de corte para clasificar las cepas como sensibles o resistentes.

Diversos autores proponen el uso de posaconazol como una buena opción para la profilaxis de infecciones fúngicas invasoras en pacientes inmunocomprometidos^{17,18}. Sin embargo, su utilización como profilaxis o como tratamiento en las infecciones por *C. glabrata* parece desaconsejable¹⁹ y, según los resultados de nuestro estudio, requeriría un estudio previo de sensibilidad *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* blood-stream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005;43:1829-35.
2. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35:627-30.
3. Buitron Garcia R, Romero Cabello R, Cruz Talonia F, Bonifaz A, Zarama Marquez F. Study on *Candida* non-*albicans* species and its relation to recurrent vulvovaginal candidiasis. *Ginecol Obstet Mex* 2002;70:431-6.
4. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:668-79.
5. Ruan SY, Chu CC, Hsueh PR. *In vitro* susceptibilities of invasive isolates of *Candida* species: rapid increase in rates of fluconazole susceptible-dose dependent *Candida glabrata* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2919-22.
6. Cantón E, Peman J, Espinel-Ingroff A, Martín-Mazuelos E, Carrillo-Muñoz A, Martínez JP. Comparison of disc diffusion assay with the CLSI reference method (M27-A2) for testing *in vitro* posaconazole activity against common and uncommon yeast. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:135-8.
7. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R et al. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2009-15.
8. Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Falusi E, Gergely L, Majoros L. Posaconazole susceptibility testing against *Candida* species: comparison of broth microdilution and E-test methods. *Mycoses* 2007;50:178-82.
9. Spreghini E, Maida CM, Tomassetti S, Orlando F, Giannini D, Miliaci ME et al. Posaconazole against *Candida glabrata* isolates with various susceptibilities to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1929-33.
10. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Jones RN. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole and ravuconazole. *J Clin Microbiol* 2004;42:4577-80.
11. Fidel P L Jr, Vázquez J A, Sobel J D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:80-96.
12. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: results from a global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol* 2008;46:559-9.
13. Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DI, Rinaldi MG, Graybill JR. *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1581-2.
14. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-Head comparison of the ac-

- tivities of currently available antifungal agents against 3,378 spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:917-21.
15. Cantón E, Pemán J, Orero A, Viudes A, Gil J, Rubio MC et al. Actividad *in vitro* de posaconazol frente a levaduras aisladas en hemocultivo. *Rev Esp Quimioterap* 2002;15:335-40.
 16. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. In vitro activities of posaconazole (Sch 56592) compared with those of itraconazole and fluconazole against 3,685 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2862-4.
 17. Frampton JE, Scott LJ. Posaconazole: a review of its use in the prophylaxis of invasive fungal infections. *Drugs* 2008;68:993-1016.
 18. Ulmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007;356:335-47.
 19. Ustun C, Dereemer DL, Steele JC Jr, Forseen C, Fisher JF, Jillella AP. Fatal *Aspergillus fumigatus* and *Candida glabrata* infections with posaconazole prophylaxis after stem cell transplantation. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:365-6.