

Lidia García-Agudo  
Pedro García-Martos  
Pilar Marín-Casanova  
Manuel Rodríguez-Iglesias

## Sensibilidad a fluconazol de levaduras de interés clínico: nuevos puntos de corte

Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz

---

### RESUMEN

**Introducción.** Recientemente, Pfaller y colaboradores (Drug Resist Updat 2010; 13:180-95), han propuesto nuevos puntos de corte para determinar la sensibilidad *in vitro* a fluconazol de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. El objetivo de este trabajo ha sido establecer las variaciones de sensibilidad de estas especies al aplicar estos puntos de corte, en relación con los del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

**Métodos.** Analizamos 112 cepas de *Candida*: 49 *C. albicans*, 40 *C. parapsilosis* y 23 *C. tropicalis*. La sensibilidad a fluconazol se ensayó por el método *Sensititre YeastOne*. Los puntos de corte para categorizar la concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron los del CLSI y los propuestos por Pfaller y colaboradores.

**Resultados.** Según los criterios del CLSI, todas las cepas fueron sensibles a fluconazol. Las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> fueron 0,5 mg/L y 2 mg/L para *C. albicans* y *C. parapsilosis*, 0,5 mg/L y 1 mg/L para *C. tropicalis*. Con los nuevos criterios, 109 (97%) cepas fueron sensibles. Solamente se apreciaron variaciones en *C. albicans* (6% sensibles dosis dependientes).

**Conclusiones.** Al aplicar los puntos de corte recomendados por Pfaller y colaboradores, y los del EUCAST, el número de cepas sensibles a fluconazol disminuye en relación con los criterios del CLSI, especialmente de *C. albicans*.

**Palabras clave:** Fluconazol. *Candida*. Levaduras. Sensibilidad. Antifúngicos.

### Susceptibility to fluconazole of clinical interest yeasts: new breakpoints

#### ABSTRACT

**Introduction.** Recently, Pfaller et al (Drug Resist Update 2010; 13:180-95), have proposed new breakpoints for determining the *in vitro* susceptibility to fluconazole of *Candida albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. The aim of this study was to establish the variations in sensitivity of these species applying these breakpoints, in relation to those of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

**Methods.** We analyzed 112 strains of *Candida*: 49 *C. albicans*, 40 *C. parapsilosis* and 23 *C. tropicalis*. Susceptibility to fluconazole was performed by the method *Sensititre YeastOne*. The breakpoints used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) were identified by CLSI and the ones proposed by Pfaller et al.

**Results.** According to the CLSI criteria, all isolates were susceptible to fluconazole. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 0.5 mg/L and 2 mg/L for *C. albicans* and *C. parapsilosis*, 0.5 mg/L and 1 mg/L for *C. tropicalis*. With the new criteria, 109 (97%) strains were susceptible. Variations were seen in *C. albicans*, with 3 strains (6%) susceptible dose-dependent.

**Conclusions.** When applying the breakpoints recommended by Pfaller et al, and EUCAST, the number of fluconazole-susceptible strains decreased according to the CLSI criteria, especially *C. albicans*.

**Key words:** Fluconazole. *Candida*. Yeasts. Susceptibility. Antifungal agents.

---

### INTRODUCCIÓN

Las infecciones por levaduras han adquirido una gran importancia en las últimas décadas por su mayor frecuencia y por el incremento de la resistencia a los antifúngicos, especialmente a los derivados azólicos y, en particular, a fluconazol<sup>1-3</sup>. *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* son las especies más frecuentes en infecciones humanas y presentan una sensibilidad variable a fluconazol<sup>4,5</sup>. Los estudios de sensibilidad son imprescindibles

---

Correspondencia:  
Dr. Pedro García Martos  
Avenida Ana de Viya, 13-2B  
11009 Cádiz (Spain)  
Tfno.: 956003068  
Fax: 956003080  
E-mail: pedromartos@hotmail.com

antes de instaurar un tratamiento. Actualmente, el método de referencia M27-A3 propuesto por el (CLSI) permite obtener resultados fiables y reproducibles<sup>6,7</sup>. El método comercial de microdilución en caldo es más asequible a los laboratorios clínicos y muestra una excelente correlación con el método de referencia<sup>5,8</sup>.

Los puntos de corte propuestos por el CLSI para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de fluconazol en los estudios de sensibilidad son:  $\leq 8$  mg/L para las cepas sensibles, 16-32 mg/L para las cepas dosis dependientes y  $\geq 64$  mg/L para las cepas resistentes<sup>6,7</sup>. Sin embargo, el EUCAST (*European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) recomienda, en el caso, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*  $\leq 2$  mg/L para las cepas sensibles, 4 mg/L para las cepas dosis dependientes y  $> 4$  mg/L para las cepas resistentes<sup>9</sup>. Recientemente, Pfaller y colaboradores<sup>10</sup> han propuesto nuevos puntos de corte para fluconazol:  $\leq 2$  mg/L para las cepas sensibles, 4 mg/L para las cepas dosis dependientes, y  $\geq 8$  mg/L para las cepas resistentes, en el caso de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*  $\leq 32$  mg/L para las cepas sensibles dosis dependientes y  $\geq 64$  mg/L para las cepas resistentes, con respecto a *C. glabrata*.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la sensibilidad a fluconazol de las especies de interés clínico aplicando los nuevos puntos de corte indicados y comprobar las variaciones de sensibilidad con respecto a los criterios del CLSI.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Analizamos 112 cepas de aisladas de diversas muestras clínicas pertenecientes a las siguientes especies: 49 *C. albicans*, 40 *C. parapsilosis* y 23 *C. tropicalis*. Las cepas fueron identificadas utilizando métodos convencionales y el sistema comercial de asimilación de compuestos de carbono ID 32C®, (bioMérieux, France). La sensibilidad a fluconazol se realizó por el método comercial Sensititre YeastOne® (AccuMed International Ltd, UK), con diluciones crecientes de 0,125 a 256 mg/L, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el estudio se incluyó como control la cepa *C. albicans* ATCC 68548. Los paneles se incubaron a 35°C durante 48 horas antes de realizar la lectura definitiva, interpretando el cambio de color de azul a rojo o púrpura como crecimiento inhibido. Los puntos de corte utilizados para categorizar las CMIs fueron los recogidos en el documento M27-A3 del CLSI, los del EUCAST y los nuevos propuestos por Pfaller y colaboradores.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> frente a fluconazol de las distintas especies de *Candida*. Como se observa en dicha tabla, la CMI<sub>50</sub> fue 0,5 mg/L para las tres especies ensayadas, y la CMI<sub>90</sub> fue 2 mg/L para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y 1 mg/L para *C.*

**Tabla 1** Sensibilidad a fluconazol de especies de *Candida* de interés clínico según CLSI<sup>6,7</sup>, EUCAST<sup>9</sup> y Pfaller y colaboradores<sup>10</sup> (CMI en mg/L)

	<i>C. albicans</i> (n=49)	<i>C. parapsilosis</i> (n=40)	<i>C. tropicalis</i> (n=23)
Intervalo	0,125 - 4	0,03 - 2	0,5 - 2
CMI <sub>50</sub>	0,5	0,5	0,5
CMI <sub>90</sub>	2	2	1
<b>Sensibles</b>			
CLSI $\leq 8$ mg/L	100%	100%	100%
EUCAST $\leq 2$ mg/L	94%	100%	100%
Pfaller y cols. $\leq 2$ mg/L	94%	100%	100%
<b>Dosis dependientes</b>			
CLSI 16-32 mg/L	0	0	0
EUCAST 4 mg/L	6%	0	0
Pfaller y cols. 4 mg/L	6%	0	0
<b>Resistentes</b>			
CLSI $\geq 64$ mg/L	0	0	0
EUCAST $> 4$ mg/L	0	0	0
Pfaller y cols. $\geq 8$ mg/L	0	0	0

*tropicalis*. De acuerdo con estos datos, según los criterios del CLSI, las 112 (100%) cepas estudiadas fueron sensibles a fluconazol; pero al aplicar los nuevos criterios propuestos por Pfaller y colaboradores, fueron 109 (97%) las cepas sensibles a fluconazol. Solamente se apreciaron variaciones en los resultados obtenidos para *C. albicans*, pues detectamos 3 (6%) cepas sensibles dosis dependientes considerando los nuevos criterios y los propuestos por el EUCAST.

## DISCUSIÓN

Fluconazol es un triazol con demostrada eficacia para el tratamiento de las infecciones por levaduras<sup>11,12</sup>. La resistencia descrita en el género *Candida* es baja en la mayoría de los trabajos publicados, a pesar de la variabilidad geográfica, con excepción de *C. krusei* y *C. glabrata* que son especies con resistencia o sensibilidad disminuida a este fármaco<sup>4,5,13-15</sup>.

La mayoría de los autores utilizan en los estudios de sensibilidad a fluconazol los puntos de corte propuestos por el CLSI para interpretar los resultados<sup>6,7</sup>, pero los miembros del EUCAST consideran estos puntos de corte demasiado elevados y proponen otros de acuerdo con análisis poblacionales y el comportamiento clínico del antifúngico<sup>9</sup>. Pfaller y colaboradores<sup>10</sup>, tomando en cuenta los mecanismos de resistencia a fluconazol y la resistencia cruzada con otros azoles, así como los puntos de corte del CLSI y del EUCAST, los perfiles epidemiológicos de distribución de las CMLs y la correlación clínica, sugieren una modificación de los puntos de corte para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, más en concordancia con los establecidos por el EUCAST.

Al aplicar estos nuevos puntos de corte, el número de cepas sensibles a fluconazol disminuiría en relación con los criterios del CLSI. En un estudio multicéntrico llevado a cabo en nuestro país<sup>5</sup>, la resistencia a fluconazol casi se duplicó al considerar los criterios de Pfaller y colaboradores. En nuestro estudio, la sensibilidad de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y apenas se modifica en este sentido; solamente un pequeño porcentaje de cepas de cambia de sensible a sensible dosis dependiente.

Se ha comprobado que los puntos de corte propuestos para fluconazol por Pfaller y colaboradores ofrecen una mejor correlación de la sensibilidad con la respuesta clínica en las especies de interés clínico señaladas, por lo que el CLSI va a modificar sus puntos de corte para este antifúngico, estableciendo valores similares a los propuestos por estos autores.

## FINANCIACIÓN

Este estudio no ha recibido financiación por parte de organismos públicos ni privados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Antoniadou A, Torres HA, Lewis RE, Thornby J, Bodey GP, Tarrand JP, et al. Candidemia in a tertiary care center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. *Medicine* 2003; 82:309-21.
2. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:359-66.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Azole antifungal drug cross-resistance: mechanisms, epidemiology, and clinical significance. *J Invasive Fungal Infect* 2007; 1:74-92.
4. Almirante B, Cuenca-Estrella M. Candidemia: impacto de los estudios epidemiológicos en la terapéutica y en el pronóstico de una infección grave. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29:325-7.
5. Pemán J, Cantón E, Miñana JJ, Florez JA, Echeverría J, Ortega DN, et al. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol* 2011; 28:91-9.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Document M27-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third Informational Supplement. Document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
8. Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Holliday N, Killian SB. Multicenter comparison of the Sensititre Yeast One colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42:718-21.
9. Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chrystanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document EDef7. 1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:398-405.
10. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist Updat* 2010; 13:180-95.
11. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (Suppl. 1):1-10.
12. Barberán J, Mensa J, Fariñas C, Llinares P, Serrano R, Menéndez R, et al. Recomendaciones de tratamiento antifúngico en pacientes con bajo grado de inmunodepresión. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21:127-42.
13. García-Martos P, Domínguez I, Marín P, García-Agudo R, Aoufi S, Mira, J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19:249-56.
14. Tortorano AM, Pemán J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:317-22.
15. Cisterna R, Ezpeleta G, Tellería O, Guinea J, Regueiro B, García-Rodríguez J, et al. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. *J Clin Microbiol* 2010; 48:4200-6.