

Actividad in Vitro de 5 Antifúngicos Contra Aislados Clínicos y Ambientales de *Pichia anomala*

IN VITRO ACTIVITY OF 5 ANTIFUNGAL AGAINST ENVIRONMENTAL AND CLINICAL ISOLATES OF *PICHIA ANOMALA*

Reyes E^{1,2}; Godoy P¹; Silva IR³; Brevis P⁴; Nieto E⁵; Fischman O¹

1.- División de Microbiología e Inmunología. Universidad Federal de São Paulo, Brazil.

2.- Laboratorio de Micología de la Fundación Científica y Tecnológica de la Asociación Chilena de Seguridad. Santiago, Chile.

3.- Clínica Odontológica R & S. Santiago, Chile.

4.- Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Microbiología, Universidad de Talca. Talca, Chile.

5.- Laboratorio Clínico ACHS-ARAUCO, Santiago, Chile.

RESUMEN

Las infecciones fúngicas han aumentado en el último tiempo, entre ellas, las infecciones por levaduras emergentes, cuyos patrones de sensibilidad no han sido estudiados debido a la inexistencia de patrones de temperatura y medios de cultivo apropiados para realizar test de sensibilidad. El presente trabajo, fue propuesto como un modelo experimental de *Pichia anomala*, aislada de pacientes con MICs superiores que los aislados ambientales, siendo la anfotericina B el antifúngico con la mejor actividad antifúngica.

(Reyes E, Godoy P, Silva IR, Brevis P, Nieto E, Fischman O. 2005. Actividad in Vitro de 5 antifúngicos contra aislados clínicos y ambientales de *Pichia anomala*. Cienc Trab. 7(15):17-20).

Descriptores: LEVADURAS; MICOSIS; PICHIA; AGENTES ANTIFÚNGICOS.

ABSTRACT

Fungal infections have increased in the last time, among them infections by emergent yeasts, whose sensibility patterns have not been studied due to the non-existence of temperature patterns and appropriate culture medium to do sensibility test. The present work has been proposed as an experimental model of *Pichia anomala*, isolated from patients and environment. The results show that conditions of 30 to 35 °C were indifferent, the appropriate culture medium was demonstrated to be RPMI-1040, and the isolated strains from patients had MICs superior than the environmental isolates, being anfotericin B the antifungal with the best antifungal activity of all those tested.

Descriptors: YEASTS; MYCOSES; PICHIA; ANTIFUNGAL AGENTS.

INTRODUCCIÓN

Pichia anomala ha sido descrita como un miembro transitorio y normal del tracto gastrointestinal en el humano, además de haber sido encontrada en plantas, suelo, frutas y animales (Saëz 1979, Sand y Van-Grinsven 1976, Frantz y Mertvetsova 1986, Moses et al. 1991, Murphy et al. 1986). Ella es una levadura ubicada taxonómicamente en la división Ascomycota, siendo identificada por la producción de ascosporos y por su típico patrón bioquímico. Los ascos pueden ser globosos o alargados y contener uno a cuatro ascosporos. Pseudohifas pueden estar presentes. Esta levadura ha sido aislada de diferentes partes de la

naturaleza (Toro y Piontelli 1985, Pagnoca y Mendoca-Hagler 1989, Middelhoven et al. 1990); además, ha sido utilizada como modelo de estudio en biología y genética molecular. Sin embargo, tradicionalmente ha sido considerada no patógena. No obstante lo anterior, relatos recientes muestran un creciente número de casos de infecciones en pacientes que presentan factores predisponentes como larga hospitalización, inmunosupresión, terapia antibiótica de amplio espectro y uso de catéter (Ma et al. 2000, Bakir et al. 2004, Haron et al. 1988, Qadri et al. 1988, Dickensheets 1989, Kawakami et al. 1998, Yamada et al. 1995, Alter y Farley 1994, Sekhon, et al. 1992, Odone et al. 1996, Thuler et al. 1997, Chakrabarti et al. 2002, Kalenic et al. 2001). Los tratamientos para esta levadura aún no se han descrito y la pequeña información evaluada en la literatura no permite seleccionar las drogas de elección para infecciones de este microorganismo (Torres-Rodríguez 1996, Bakir et al. 2004, Kurtzman y Fell 1998, National Committee For Clinical Laboratory Standards. 1993, Rodero et al. 1997, Kalenic et al. 2001).

El propósito de este trabajo fue contribuir a la estandarización de la actividad antifúngica *in vitro* de cinco antifúngicos: fluconazol, ketoconazol, anfotericina B y 5-fluorocitocina, contra 30 aislados de *P. anomala* mediante la utilización de las técnicas de microdilución y macrodilución en caldo descritas por el NCCLS, reconocidas internacionalmente.

Correspondencia:

Eugenio Reyes Arenas

Dirección Laboratorio de Micología

Fundación Científica y Tecnológica de la Asociación Chilena de Seguridad

Vicuña Mackena N° 200, 2do Piso, Providencia, Santiago, Chile

Tel: (56-2) 685 3604 • Fax: (56-2) 685 3192

e-mail: fctera@achs.cl

Recibido: Enero 2005 / Aceptado: Enero 2005

MATERIAL Y MÉTODOS

30 muestras fueron usadas en este trabajo (Bakir et al. 2004), aisladas de pacientes y (Ma et al. 2000) ambientales. La identificación de las levaduras fue realizada de acuerdo a las técnicas de rutina en micología médica que incluyó características macroscópicas, microscópicas, patrón bioquímico, producción y forma de los ascosporos (Kurtzman y Fell 1998).

Previamente a la realización de los test de sensibilidad fueron construidas las curvas de crecimiento de la levadura. Esta prueba fue realizada con el objetivo de encontrar el medio y la temperatura más adecuada para el crecimiento de las muestras de *Pichia anomala*.

Inóculos de *Pichia anomala* y de una cepa ATCC de *Candida parapsilosis* fueron cultivadas en un matraz de erlenmeyer, conteniendo medio a analizar RPMI-1640, Antibiotic medium III y Yeast Peptone Dextrose (YEPD) en agitación a temperatura constante; lecturas en espectrofotómetro fueron hechas cada una hora hasta alcanzar la fase estacionaria; los análisis fueron realizados en duplicado.

TEST DE SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO

Macrodilución: el test de macrodilución en caldo fue realizado de acuerdo a los estándares del NCCLS-USA (Frantz y Mertvetsova 1986). El tamaño del inóculo utilizado fue medido espectrofotométricamente. Concentraciones de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células por mL fueron utilizadas. Los medios de cultivo fueron RPMI 1640 con/L glutamina sin bicarbonato de sodio, tamponado a pH 7.0 con buffer MOPS 0,165 M (American Biorganics, Niagara Falls, NY). A 0,9 mL de la solución del inóculo el medio fue dispensado en un tubo plástico estéril conteniendo 0,1 mL del antifúngico concentrado 10 veces. El tubo de control de crecimiento sin la droga fue incluido cada vez que se realizó la prueba. Los racks contenidos en los tubos plásticos fueron incubados a 35 °C por 48 hrs. Los criterios para la lectura de las concentraciones mínimas inhibitorias fueron las más bajas concentraciones que produjeron al menos el 80% de inhibición comparadas con el tubo de control. Para esto se diluyó el tubo control para producir un estándar con un 80% de inhibición.

Microdilución: Los aislados fueron testeados por el método de microdilución en caldo de acuerdo a las normas estandarizadas propuestas por el documento NCCLS, M27-A y M27-A2 (1997, 2002). Las drogas utilizadas Anfotericina B (ICN Biomedicals Inc) fluconazol (Pfizer Inc., New York, NY, USA), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, USA) y ketoconazol (Janssen Pharmaceutica) fueron usadas para obtener un rango de dilución final de 0,3 - 160 µg/mL 0,125 a 64 µg/mL, 0,007 a 4 µg/mL, y 0,015 a 8 µg/mL respectivamente. Brevemente el test de microdilución en caldo fue realizado en placas de ELISA con fondo plano de 96 pocillos (Nuncclon, Delta, Nunc., InterMed, Denmark), contenido medio RPMI-1640 (American Biorganics, Niagara Falls, NY) con L-glutamina, sin bicarbonato, y tamponado con buffer MOPS a pH 7,0. Las microplacas conteniendo el doble de la concentración final de los antifúngicos fueron mantenidas a -70 oC por no más de 3 semanas antes de uso. En el día del ensayo, la suspensión del inóculo ajustada a una concentración 0,5 Mc Farland mediante un espectrofotómetro a una longitud de honda de 530 nm. Un volumen de 100 uL de esta

suspensión se dispensa en cada pocillo resultando en una concentración de entre 0,5 y $2,5 \times 10^3$ células/mL. Las placas fueron incubadas a las temperaturas de 30 y 35 °C durante 24, 48 y 72 hrs. Tamaño, viabilidad y pureza del inóculo fueron controlados por cultivo de alícuotas de la suspensión en placas de agar Sabouraud- dextrosa como también fue utilizado un organismo de control (*C. parapsilosis* ATCC 22019) que fue incluido cada vez que se realizó un experimento para chequear la actividad antifúngica de las drogas.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) fueron definidas como las mínimas concentraciones necesarias para producir un decrecimiento evidente en la turbidez cuando se compara con el pocillo control (libre de la droga) (Barchiesi et al. 1994).

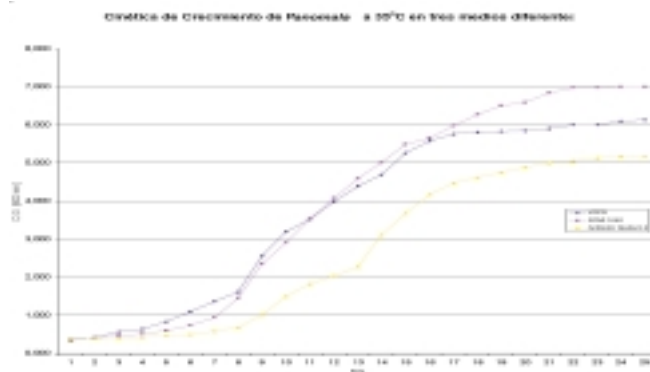
Para la definición del Breakpoint para los MICs de fluconazol e itraconazol fue utilizado el propuesto por Rex et al (1997) y por M27-A2 (2002), considerando los aislados con MICs ≤ 8 µg/mL para fluconazol, $\leq 0,0125$ µg/mL para itraconazol, ≤ 4 para 5 fluorocitocina como sensibles; aislados con MICs entre 16 y 32 µg/mL para fluconazol, 8-16 µg/mL para 5 fluorocitocina y entre 0,25 y 0,5 µg/mL para itraconazol como intermedio o susceptibilidad dosis dependiente (DDS). Los aislados con MICs ≥ 64 µg/mL para fluconazol y ≥ 1 µg/mL para itraconazol como resistentes. Debido a la carencia de definiciones consensuadas de "breakpoints" para los MICs de ketoconazol, fueron establecidos valores arbitrarios, siendo susceptibles los aislados con MICs $\leq 0,125$ µg/mL, DDS para los aislados con MICs entre 0,25 y 0,5 µg/mL y resistentes los aislados con MICs ≥ 1 µg/mL (Maenza et al. 1996, Rodríguez-Tudela et al. 1995, St-Germain et al. 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

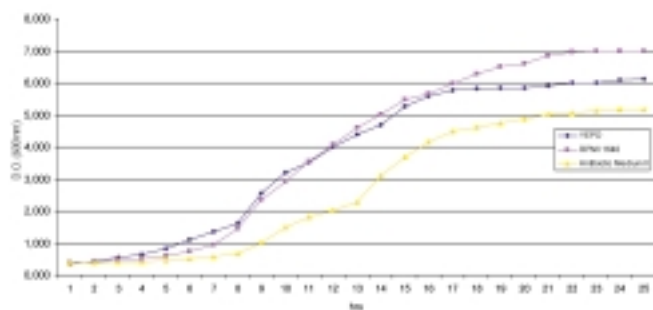
Las curvas de crecimiento de *Pichia anomala* realizada en concomitancia a la de *C. Parapsilosis* ATCC 2019. Los datos obtenidos revelaron que tanto las cepas ambientales y clínicas de *P. anomala* no mostraron diferencia en sus cinéticas, en las temperaturas analizadas; sin embargo, la curva de crecimiento de la cepa ATCC de *C. parapsilosis* fue más rápida respecto a las obtenidas por *P. anomala*, y las cinéticas de crecimiento utilizando RPMI-1640, fue el más adecuado comparándolo con antibiotic medium III y el medio YEPD. (Gráficos 1 y 4).

Gráficos 1 y 2.

Cinéticas de crecimiento de la cepa ATCC de *P. anomala* a dos diferentes temperaturas, 30 y 35 °C, utilizando tres diferentes medios de cultivo.

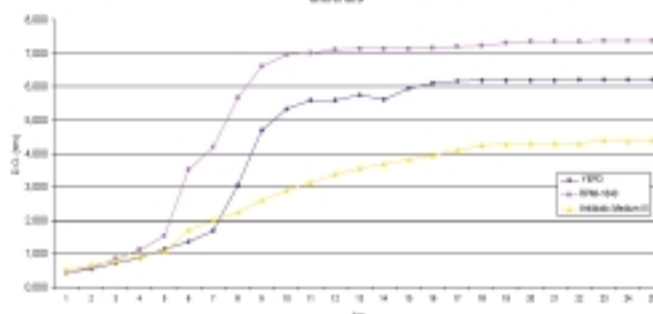


Cinética de Crecimiento de *P. anomala* a 38°C en tres medios diferentes

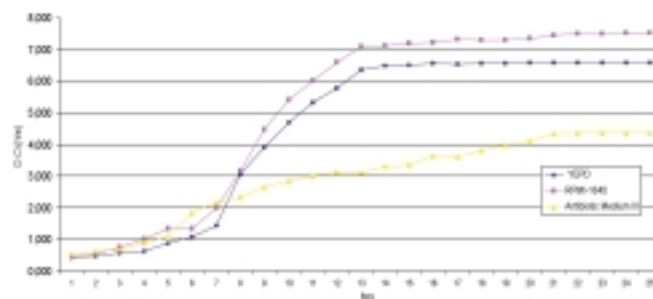


Gráficos 3 y 4. Cinéticas de crecimiento de la cepa ATCC de *Candida parapsilosis* 22019 a dos diferentes temperaturas, 30 y 35 °C, utilizando tres diferentes medios de cultivo.

Curva de Crecimiento de *Candida parapsilosis* (cepa ATCC 22019) a 35°C en tres medios diferentes



Curva de Crecimiento de *Candida parapsilosis* (cepa ATCC 22019) a 30 °C en tres medios diferentes



MICs obtenidos por el método de microdilución en caldo fueron comparados con los obtenidos por el método de macrodilución. El método de microdilución no exhibió acentuadas diferencias respecto a las obtenidas por el método de macrodilución en caldo. Las Tablas 1 y 2 muestran un análisis comparativo de nuestra investigación describiendo los resultados obtenidos después de 48 hrs. de incubación. Los valores fueron semejantes entre los dos métodos. De acuerdo a esto, el método de microdilución en caldo puede ser utilizado en forma segura en el estudio de sensibilidad de muestras de *P. Anomala* tanto de origen ambiental como clínico.

Tabla 1. Caracterización de los patrones de sensibilidad de las muestras de *P. anomala* analizadas por macrodilución a las 48 hrs. de lectura para cuatro drogas antifúngicas.

Drogas antifúngicas	Muestras Sensibles	Intermedias o DDS	Muestras Resistentes	Total
Fluconazol	21 (70%)	9 (30%)	0	30 (100%)
Itraconazol	9 (30%)	14 (46,6%)	7 (23,3%)	30 (100%)
Ketoconazol	5 (16,6%)	14 (46,6%)	11 (36,6%)	30 (100%)
5-fluorocitocina	15 (50%)	1 (3,3%)	14 (46,6%)	30 (100%)

Tabla 2. Caracterización del patrón de sensibilidad de muestras de *P. anomala* analizadas por microdilución en lecturas de 48 hrs. frente a cuatro drogas antifúngicas.

Drogas antifúngicas	Muestras Sensibles	Intermedias o DDS	Muestras Resistentes	Total
Fluconazol	22 (73,3%)	8 (26,6%)	0	30 (100%)
Itraconazol	13 (43,3%)	17 (56,6%)	0	30 (100%)
Ketoconazol	13 (43,3%)	15 (50%)	2 (6,6%)	30 (100%)
5-fluorocitocina	15 (50%)	0	15 (50%)	30 (100%)

Si bien la estandarización de las técnicas de sensibilidad por los métodos de macrodilución y microdilución en caldo, recomendados por el NCCLS, ha sido conseguida hace más de 10 años, sólo pocos autores han utilizado esta metodología para analizar los patrones de sensibilidad en un gran número de levaduras para diferentes antifúngicos; sólo Rodero et al (1997), Kane et al (2002), Bakir et al (2004) utilizaron un método estandarizado, pero fueron analizados en pocas muestras de *P. anomala* (Bakir et al. 2004, Rodero et al. 1997, Kane et al. 2002).

Los patrones de sensibilidad de las muestras aisladas de pacientes para fluconazol revelaron altos valores de MICs respecto a los aislados ambientales. De acuerdo al reducido número de trabajos descritos en la literatura a nuestro alcance, ninguno observó ni describió este hecho. No obstante lo anterior, ninguna de las cepas aisladas en nuestro estudio apareció resistente a este antifúngico.

Nosotros, además, observamos algún grado de resistencia a itraconazol y ketoconazol (70% y 83%, respectivamente).

Estos resultados sugieren que las infecciones sistémicas debido a *P. anomala* no puede ser tratadas empíricamente sin haber sido determinado el patrón de susceptibilidad a las drogas. Esta afirmación está en acuerdo con lo expresado por otros autores.

Entre los diferentes trabajos en la literatura publicados durante 1991 y 2004 (comparaciones entre microdilución y macrodilución), de acuerdo a los parámetros del NCCLS, ninguno de los autores incluyó muestras de *C. pelliculosa* o *P. anomala*.

REFERENCIAS

- Alter SJ, Farley J. 1994. Development of *Hansenula anomala* infection in a child receiving fluconazole therapy. *Pediatr Infect Dis J* 13:158-59.
- Bakir M, Cerikcioglu N, Tirtir A, Berrak S, Ozek E, Canpolat C. 2004. *Pichia anomala* fungaemia in immunocompromised children. *Mycoses* Jun;47(5-6):231-5.
- Chakrabarti A, Mohan B, Shrivastava SK, Marak RS, Ghosh A, Ray P. 2002. Change in distribution & antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candidaemia cases in a tertiary care centre during 1996-2000. *Indian J Med Res Jul*;116:5-12.
- Dickensheets DL. 1989. *Hansenula anomala* infection. *Rev Infect Dis* 11:507-508.
- Frantz TG, Mertvetsova OA. 1986. Yeast associations with mosquitoes of the genus *Aedes* Mg. (Diptera, culicidae) in the Tom-Ob river region. *Biol Nauki* 4:94-8.
- Haron E, Anaissie E, Dumphy F, Mccredie K, Fainstein V. 1988. *Hansenula anomala* fungemia. *Rev Infect Dis* 10:1182-6.
- Kalenic S, Jandrljic M, Vegar V, Zuech N, Sekulic A, Mlinaric-Missoni E. 2001. *Hansenula anomala* outbreak at a surgical intensive care unit: a search for risk factors. *Eur J Epidemiol* 17(5):491-6.
- Kane SL, Dasta JF, Cook CH. 2002. Amphotericin B lipid complex for *Hansenula anomala* pneumonia. *Ann Pharmacother* Jan;36(1):59-62.
- Kawakami S, Ono Y, Miyazawa Y, Yamaguchi H. 1998. Survey of fungemia cases during the past seventeen years at Teikyo University Hospital Kansenshogaku Zasshi Feb;72(2):105-13.
- Kurtzman CP, Fell JW. 1998. *The Yeasts, a taxonomic study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier. 1055 p.
- Ma JS, Chen PY, Chen CH, Chi CS. 2000. Neonatal fungemia caused by *Hansenula anomala*: a case report. *J Microbiol Immunol Infect* Dec;33(4):267-70.
- Mestroni SC, Bava AJ. 2003. *Hansenula anomala* fungemia *Rev Argent Microbiol Jan-Mar*;35(1):54-6.
- Middelhoven WJ, Jong IM, Winter M. 1990. Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other vegetable crops. *Antonie van Leeuwenhoek* 57(3):153-8.
- Moses A, Maayan S, Shvil Y, Dudin A, Ariel I, Thalji A, Polcheck I. 1991. *Hansenula anomala* infection in children: from asymptomatic colonization to tissue invasion. *Pediatric Infect Dis J* 10:400-2.
- Murphy N, Buchanam CR, Damjanovic V, Whitaker R, Hart CA, Cooke RWI. 1986. Infection and colonization of neonates by *Hansenula anomala*. *Lancet* 1:291-3.
- National Committee For Clinical Laboratory Standars. 1993. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Standard. NCCLS, 12:1-22. Publication of M27-P.
- National Committee For Clinical Laboratory Standars. 1997. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Tentative Standard. NCCLS, 17: 1-29. Publication of M27-P.
- National Committee For Clinical Laboratory Standars. 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Tentative Standard. NCCLS, 15: 1-29. Publication of M27-A2.
- Odone FV, Aquino MZ, Vaccari EMH, Lacaz CS, Cristófani LM, Brito JLBC, et al. 1996. B Fungemia por *Hansenula anomala* em criança portadora de neuroblastoma, submetida a transplante autólogo de medula óssea. *Arq Bras Med* 70:33-6.
- Pagnoca FG, Mendoça-Hagler AN. 1989. Yeasts associated with the shrimp *Penaeus schnitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. *Yeast* 5:S479-83.
- Rodero LM, Boutureira M, Demkura H, Burkett A, Fernández C, Losso M et al. 1997. Yeast infections: causative agents and their antifungal resistance in hospitalized pediatric patients and HIVpositive *Rev Argent. Microbiol* 29:7-15.
- Qadri SMH, Al Daley F, Strampfer MJ, Cunha BA. 1988. Urinary tract infection caused by *Hansenula anomala*. *Mycopathologia* 104:99-101.
- Saëz H. 1979. Evolution journaliere puis hebdomadaire de la flore digestive a levures d'un grand Panda. *Mycopathol Mycol Appl* 3:(69):179-85.
- Sand FEM, Van-Grinsven AM. 1976. Comparison between the yeast flora of middle Eastern and Western European soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 42:523-32.
- Sekhon, A.S.; Kowalewska, K.; Garg, A.K.; Vaudry, W. 1992. *Hansenula anomala* fungemia in na infant with gastric and cardiac complications with a review of the literature. *Eur J Epidemiol* 8:(2) 305-8.
- Thuler LC, Faivichenco S, Velasco E, Martins CA, Nascimento CR, Castolho IA. 1997. Fungaemia caused by *Hansenula anomala*-an outbreak in a cancer hospital. *Mycoses* 40:193-6.
- Toro MA, Piontelli EL. 1985. B Yeast communities in sandy soils: (a beach of V region, Chile) II. *Bol Micol* 2:109-18.
- Torres-Rodriguez JM. 1996. New emergent opportunistic fungi. *Rev Iberoam Micol* 13:S30-8.
- Yamada S, Maruoka T, Nagai K, Tsumurs N, Yamada T, Sakata Y, et al. 1995. Catheter-related Infections by *Hansenula anomala* in Children. *Scand J Infect Dis* 27:85-7.