

Original breve

Maria Cristina Diaz¹
Rossanna Camponovo²
Ingrid Araya²
Ann Cerda³
María Paola Santander³
Alfonso-Javier Carrillo-
Muñoz⁴

Identificación y sensibilidad antifúngica *in vitro* de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina

¹Universidad de Chile, Facultad de Medicina, ICBM, Programa de Microbiología y Micología (MCD), Chile.

²Laboratorio Integramédica, Santiago, Chile (RC,IA).

³Alumnas Escuela Tecnología Médica, Santiago, Chile (AC,MPS).

⁴Dpto. Microbiología-Micología, ACIAM, Barcelona, España.

RESUMEN

Objetivo. Identificar especie y determinar la sensibilidad *in vitro* a clotrimazol, fluconazol y nistatina de 145 aislamientos de *Candida* spp.

Material y métodos. Se utilizó un método de microdilución en caldo (M27-A3) para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) y además las CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antifúngicos. De los 145 aislamientos, 126 correspondieron a *C. albicans*, 16 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis* y 1 *C. tropicalis*.

Resultados. La CMI₅₀ y CMI₉₀ de fluconazol frente a *C. albicans* fueron de 0,25 mg/L y 1 mg/L y para *C. glabrata* de 8 y 16 mg/L, respectivamente. Cinco aislados de *C. albicans* y un aislado de *C. tropicalis* fueron resistentes a fluconazol (M27-S4). Las CIM₅₀ y CIM₉₀ de clotrimazol frente a *C. albicans* fueron 0,03 mg/L y 0,06 mg/L y para *C. glabrata* de 0,25 mg/L y 1 mg/L, mientras que para nistatina fueron de 1 mg/L y de 2 mg/L, respectivamente para *C. albicans* y *C. glabrata*. Cinco aislados de *C. glabrata* y 1 de *C. tropicalis* fueron resistentes a clotrimazol.

Conclusión. En este estudio, *C. albicans* es la levadura más frecuentemente aislada, seguida de *C. glabrata*. Los antifúngicos evaluados resultaron ser activos *in vitro* para las cepas aisladas, excepto en 6 aislados para fluconazol y 6 para clotrimazol.

Palabras clave: *Candida*, candidiasis, vulvovaginal, sensibilidad, clotrimazol, fluconazol, nistatina

Identification and *in vitro* antifungal susceptibility of vaginal *Candida* spp. isolates to fluconazole, clotrimazole, and nystatin

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to identify and determine the *in vitro* antifungal susceptibility testing to clotrimazole, fluconazole, and nystatin of 145 clinical isolates of *Candida* spp.

Material and methods. M27-A3 microdilution method was used to determine minimal inhibitory concentrations (MIC) and partial MICs (MIC₅₀ and MIC₉₀) of drugs. A total of 145 isolates were studied, 126 were *C. albicans*, 16 *C. glabrata*, 2 *C. parapsilosis* y 1 *C. tropicalis*.

Results. MIC₅₀ and MIC₉₀ for FLZ against *C. albicans* were 0.25 mg/L and 1 mg/L respectively and for *C. glabrata* was achieved at 8 mg/L and 16 mg/L for fluconazole. Five isolates of *C. albicans* and one isolate of *C. tropicalis* were *in vitro* resistant to fluconazole (M27-S4). In *C. albicans* MIC₅₀ and MIC₉₀ for clotrimazole were of 0.03 mg/L and 0.06 mg/L, respectively. These values for *C. glabrata* were 0.25 mg/L and 1 mg/L, respectively. Five *C. glabrata* and 1 *C. tropicalis* were *in vitro* resistant to clotrimazole. MIC₅₀ and MIC₉₀ of nystatin were of 1 mg/L and 2 mg/L, respectively for *C. albicans* and *C. glabrata*.

Conclusion. In this study, *C. albicans* is the most frequently isolated yeast, followed by *C. glabrata*. The antifungals tested were found to be *in vitro* active for the isolates, except for 6 isolates for fluconazole and 6 to clotrimazole.

Key words: *Candida*, vulvovaginal candidiasis, susceptibility, clotrimazole, fluconazole, nystatin.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones producidas por especies del género *Candida*, denominadas candidiasis, pueden afectar a diversos ór-

Correspondencia:
Alfonso-Javier Carrillo-Muñoz.
Dpto. Microbiología-Micología. ACIAM. Barcelona. P.O. Box 10178.
E-08080 Barcelona.
E-mail: acarrillo@aciam.es

ganos y tejidos del organismo humano. Las presentaciones clínicas pueden ser superficiales e invasoras, destacando entre ellas la candidiasis vulvovaginal aguda o recurrente como una de las infecciones superficiales más frecuentes del tracto genital femenino¹⁻³. Se estima que aproximadamente un 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal en su vida y un 10% de ellas la padecen en forma recurrente, existiendo variaciones geográficas en estos porcentajes⁴⁻⁸. Pese a que *Candida albicans* es el agente etiológico más frecuente en este tipo de infecciones, estudios recientes permiten considerar un aumento del número de aislamientos correspondientes a otras especies¹⁻⁸. Por otro lado, la aparición de resistencia en aislamientos de *C. albicans* a fluconazol, que es el tratamiento de elección en pacientes con candidiasis vulvovaginal puede constituir un problema a la vez que especies distintas a *C. albicans* aisladas presentan resistencia natural a fluconazol⁷. El objetivo de este estudio fue identificar la especie y determinar su sensibilidad *in vitro* a tres antifúngicos, fluconazol (FLZ), clotrimazol (CLZ) y nistatina (NYS) de uso frecuente tanto por vía oral como tópica.

MATERIAL Y METODOS

En este estudio descriptivo se seleccionaron al azar 145 cepas de *Candida* spp. aisladas de muestras de flujo vaginal recibidas para cultivo durante un mes en un laboratorio de Santiago, que fueron remitidas al laboratorio de Micología Médica del Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, para su identificación y estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Todos los aislamientos eran procedentes de diferentes pacientes, la identificación se realizó de acuerdo a los procedimientos estándares empleados en micología médica y la sensibilidad *in vitro* a tres antifúngicos, de uso común en ginecología FLZ, CLZ y NYS se determinó por el método de microdilución en medio líquido (M27-A3)⁹⁻¹¹. Así se obtuvieron los rangos de CMI para cada uno de los antifúngicos y además las concentraciones inhibitorias parciales (CMI₅₀ y CMI₉₀), correspondientes a las concentraciones mínimas que inhibieron el 50% y 90% respectivamente de los aislamientos estudiados.

Los criterios usados para determinar los puntos de corte (M27-S4), correspondieron a FLZ, sensible (S) ≤ 2 mg/L, sensible dependiente de la dosis (SDD) 4 mg/L y resistente (R) ≥ 8 mg/L para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; *C. glabrata*, SDD ≤ 32 mg/L y R ≥ 64 mg/L¹⁰. En cambio para CLZ y NYS los criterios de corte de interpretación no figuran en los documentos, siendo aceptados los valores descritos en la literatura para anfotericina B en el caso de NYS (S ≤ 2 mg/L) y en el de CLZ (R $\geq 0,5$ mg/L)^{12,13}.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos con las cepas control estuvieron dentro de los rangos especificados por el documento del CLSI (M27-A3) para FLZ^{9,10}. En la tabla 1 se presentan los rangos de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀ obtenidos para los antifúngicos ensayados frente a las distintas especies de *Candida* identificadas. Aunque existieron diferencias entre la sensibilidad *in vitro* según la especie ensayada, cinco aislamientos de *C. albicans* y uno de *C. tropicalis* fueron resistentes a FLZ (3,4%) según los criterios de clasificación de la sensibilidad expresados en el documento del M27-S4¹⁰. Un total de seis aislamientos (4,13%), cinco de *C. glabrata* y uno de *C. tropicalis* resultaron ser resistentes *in vitro* a CLZ.

DISCUSIÓN

C. albicans es el agente etiológico implicado en los cuadros de candidiasis vulvovaginal con mayor frecuencia sin embargo, se ha descrito recientemente un aumento de otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei* o *C. tropicalis* como responsables de esta patología infecciosa^{6,9,14}. El fármaco de elección para el tratamiento de este cuadro clínico es FLZ, a pesar de la aparición de la resistencia *in vitro* de *C. albicans* así como la presencia de cierta resistencia intrínseca *in vitro* en *C. krusei* y a la vez del aumento en la CMI de los azoles en *C. glabrata*. Estas razones pueden estar en la base de los nuevos criterios de puntos de corte más restrictivos expresados en el documento M27-S4¹⁵.

Los datos obtenidos en este estudio, a partir de 145 aislamientos de *Candida* spp. procedentes de muestras de flujo

Tabla 1 Distribución de las especies de *Candida* y actividad antifúngica *in vitro* (mg/L) de fluconazol, clotrimazol y nistatina (CMI₅₀, CMI₉₀ y rango de CMI)

Especie	Fluconazol			Clotrimazol			Nistatina					
	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	M27-S4			CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango
				S	SDD	R						
<i>Candida albicans</i> (n=126)	0,25	1	0,25-8	114	8	5	0,03	0,06	0,03-0,5	1	2	0,5-2
<i>Candida glabrata</i> (n=16)	8	16	0,25-32	-	16	-	0,25	1	0,03-1	1	2	0,15-2
<i>Candida parapsilosis</i> (n=2)	-	-	0,25	2	-	-	-	-	0,03	-	-	0,25-1
<i>Candida tropicalis</i> (n=1)	-	-	32	-	-	1	-	-	1	-	-	2
Total (n=145)	0,25	1	0,25-32	116	24	6	0,03	0,06	0,03-1	1	2	0,5-2

S = sensible; SDD = sensible dependiente de la dosis; R = resistente.

vaginal recibidas para cultivo confirman que *C. albicans* fue el principal agente etiológico involucrado, con una frecuencia del 86,9%, seguido por *C. glabrata* (11%), *C. parapsilosis* (1,37%) y *C. tropicalis* (0,68%) (tabla 1).

Tanto *C. albicans* como *C. glabrata*, mostraron un amplio rango de CMI frente a FLZ. La CMI₉₀ de FLZ frente a *C. glabrata* fue notablemente mayor en comparación con *C. albicans* (tabla 1). Al categorizar los resultados de las CMI en los aislamientos estudiados, según los criterios de susceptibilidad frente a FLZ, aparecieron 5 aislados de *C. albicans* y uno *C. tropicalis* que fueron resistentes *in vitro*. La CMI₉₀ para FLZ fue 1 mg/L, con un 90% de *C. albicans* sensibles. Además los 16 *C. glabrata* fueron sensibles dosis dependientes a este antifúngico (tabla 1) existiendo diferencias con otros estudios sin duda debido a la aplicación de criterios más restrictivos M27-S4¹⁶. El único aislado de *C. tropicalis* estudiado, resultó ser resistente *in vitro* a FLZ según el criterio de interpretación (CMI = 32 mg/L). Los 2 aislamientos de *C. parapsilosis* encontrados fueron sensibles a FLZ (CMI = 0,25 mg/L).

Seis aislados presentaron una CMI $\leq 0,5$ a CLZ mg/L (5 *C. glabrata* y 1 *C. tropicalis*), siendo el rango más amplio de CMI el obtenido con *C. glabrata*. Sin embargo, la CMI₅₀ y CMI₉₀ de CLZ para las distintas especies de *Candida*, resultó ser notablemente menor en comparación con la de FLZ y NYS (tabla 1).

La CMI de NYS mostró los rangos de menor variación entre *C. albicans* y *C. glabrata* que además estuvo inhibido en la totalidad de los casos a CMI ≤ 2 mg/L puede afirmarse que en el presente estudio no se encontraron aislamientos de *Candida* spp. resistentes a NYS.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que existe una amplia variedad de especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la más frecuente, seguida por *C. glabrata*; hallazgos que coinciden ampliamente con lo reportado en estudios realizados con aislamientos en otros países^{16,17}. Se hace necesario un estudio posterior de carácter clínico que permita dar respuesta a interrogantes en torno a la aparición de fenómenos de resistencia relacionados con fenómenos de re-infección, recidiva o la existencia de un tratamiento previo con alguno de estos antifúngicos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

FINANCIACIÓN

Laboratorio de Micología, Programa de Microbiología y Micología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Chile

BIBLIOGRAFÍA

- Kalkanci A, Güzel AB, Jabban II, Aydin M, Ilkit M, Kuştimur S. *Candida* vaginitis in non-pregnant patients: a study of antifungal susceptibility testing and virulence factors. J Obstet Gynaecol 2013;33:378-83.
- Hong E, Dixit S, Fidel PL, Bradford J, Fischer G. Vulvovaginal candidiasis as a chronic disease: diagnostic criteria and definition. J Low Genit Tract Dis 2014;18: 31-8
- Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey. J Low Genit Tract Dis 2013;17:340-5.
- Sobel JD. Vulvovaginal Candidosis. Lancet 2007;369:1961-71.
- Chew SY, Than LT. Vulvovaginal candidosis: contemporary challenges and the future of prophylactic and therapeutic approaches. Mycoses 2016: (in press).
- Kennedy MA, Sobel JD. Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-*albicans Candida* Species: New Insights. Curr Infect Dis Rep 2010;12:465-70
- Fosch S, Fogolín N, Azzaroni E, Pairetti N, Dana L, Minacori H, et al. Vulvovaginitis: correlación con factores predisponentes, manifestaciones clínicas y estudios microbiológicos. Rev Argent Microbiol 2006;38:202-5.
- Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. Crit Rev Microbiol 2015 21:1-23
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. M27-S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth International supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cantón E, Martín-Mazuelos E, Espinel-ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Rev Iberoam Micol 2007:1-6.
- Pelletier R, Peter J, Antin C, González C, Wood L, Walsh T. Emergence of resistance of *Candida albicans* to clotrimazole in human immunodeficiency virus-infected children: in vitro and clinical correlation. J Clin Microbiol 2000;38:1563-8.
- Arredondo-García JL, Amábile-Cuevas CF, RedMic2 Study Group. Susceptibility of Mexican isolates of yeasts and moulds to amphotericin B and triazole antifungals. J Infect Dev Ctries 2009;3:398-401.
- Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. Obstet Gynecol 2012;120:1407-14.
- Khan ZU, Ahmad S, Al-Obaid I, Al-Sweih NA, Joseph L, Farhat D. Emergence of resistance to amphotericin B and triazoles in *Candida glabrata* vaginal isolates in a case of recurrent vaginitis. J Chemother 2008;20:488-9.
- Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:34-8.

17. Arechavala AI, Bianchi MH, Robles AM, Santiso G, Negroni R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. Rev Iberoam Micol 2007;24:305-8.