

# **Cándida albicans aisladas de exudados vaginales: pruebas de susceptibilidad a distintos antifúngicos azólicos**

Nardin, María E. \*\*; Fabiano, Silvia\*; Mollerach, Analía\*\*; Fontanet, Edgardo\*\*;  
Méndez, Emilce\*\*; Ahumada, Carlos\*\*; Lurá, María C.\*

\*\*Hospital "José María Cullen". Av. Freyre 2150. Santa Fe (3000) Argentina \* Hospital "Juan B. Iturraspe".

**RESUMEN:** El incremento de las infecciones causadas por especies diferentes a *Cándida albicans* provocó la aparición de cepas resistentes a las drogas frecuentemente utilizadas. El objetivo del presente trabajo fue conocer el comportamiento de hongos levaduriformes en nuestro medio frente a distintos azoles, utilizando la técnica de dilución en agar, ya que es un método más sencillo, reproducible y con punto final de fácil lectura respecto al de dilución en caldo propuesto por el NCCLS. Se estudiaron 120 cepas de *Cándida albicans*, obtenidas de exudados genitales a las que se les realizó la prueba de sensibilidad en medio sólido a miconazol (MCZ), ketoconazol (KTZ) e itraconazol (ITZ). Los valores de CIM<sub>90</sub> para KTZ y MCZ inhibieron la mayoría de las cepas debido a que los valores más frecuentemente obtenidos fueron 2 y 4 mg/l, respectivamente, mientras que para ITZ la CIM<sub>90</sub> fue 1 mg/l. Los resultados del presente trabajo permiten conocer el comportamiento de las levaduras en nuestro medio frente a distintos azoles.

**SUMMARY:** An increase on the frequency of infections produced by different species of *Candida albicans* caused the appearance of resistant strains to commonly used drugs. The objective of this work was to know the yeast type fungi behaviour in our environment against to different azoles drugs with sensibility test in solid medium, because it is a simple method with a reproductive result than the reference method proposed by NCCLS. 120 strains of *Candida albicans* were studied. They were obtained from genital exudates that underwent sensibility test in solid medium of miconazole (MCZ), ketoconazole (KTZ) and itraconazole (ITZ). The MIC<sub>90</sub> results for KTZ and MCZ inhibited most of the strain due to the fact that the more frequent values obtained were 2 and 4 mg/l, while the MIC<sub>90</sub> for the ITZ was 1 mg/l. The results of the present paper allow us to know the yeasts behavior in our environment against different azoles.

## **Introducción**

Los avances en el desarrollo de nuevos antibióticos, drogas antineoplásicas, los procesos de inmunomodulación y el advenimiento de los trasplantes de órganos, han contribuido a una mayor sobrevida en algunas enfermedades. Sin embargo, es un hecho comprobado que la administración de drogas inmunosupresoras en tratamientos prolongados aumenta el riesgo de adquirir infecciones fúngicas invasivas. El mayor impacto se debe a la pandemia del SIDA, enfermedad en la cual la candidiasis ha sido descrita como la infección oportunista más frecuente. (1,2).

En los últimos años, el uso de antifúngicos como profilaxis o durante tratamientos prolongados, ha provocado un cambio, no sólo por la mayor frecuencia de infecciones causadas por diferentes especies de *Cándida*, sino también por la aparición de cepas resistentes a las drogas habitualmente utilizadas (1).

La técnica propuesta por el NCCLS para determinar la susceptibilidad a los antifúngicos (dilución en caldo) (3) resulta "tediosa" por lo que no puede ser utilizada en forma rutinaria por laboratorios de baja y mediana complejidad. El objetivo del presente

trabajo fue conocer el comportamiento de los hongos levaduriformes en nuestro medio frente a distintos azoles utilizando una metodología más sencilla, con resultados reproducibles y punto final de fácil lectura.

## **Materiales y métodos**

El trabajo se realizó con cepas de *Cándida albicans* obtenidas de exudados genitales, las cuales fueron identificadas por la prueba de filamentización a 37° C (tubo germinativo) y la inducción de clamidoconidias.

Las cepas de referencia utilizadas fueron: *Cándida krusei* ATCC 951705 y *Cándida parapsilosis* ATCC 951706.

Se realizó la prueba de susceptibilidad en medio sólido a las cepas incógnitas y a las cepas ATCC utilizando el medio de cultivo aconsejado por Bianchi y col que contiene: glucosa (2%), peptona (1%) y agar-agar (2%) con pH final 7. (4,5)

Los antifúngicos ensayados fueron: miconazol (MCZ), ketoconazol (KTZ) itraconazol (ITZ) (JANSSEN-CILAG). Se prepararon soluciones madres de cada uno de ellos con una concentración de 1.280

mg/L, utilizando como solvente dimetilsulfóxido (DMS). A partir de éstas se obtuvieron las soluciones de trabajo en progresión geométrica desde 80 hasta 0,15 mg/L utilizando como disolvente agua destilada para MCZ y alcohol isopropílico para KTZ e ITZ.

Las placas fueron preparadas agregando 2 ml de cada dilución del antifúngico a 18 ml de medio de cultivo, obteniéndose en cada placa concentraciones finales 10 veces menor a la de la solución de trabajo (8 a 0,015 mg/L).

Para cada cepa el inóculo se realizó a partir de un cultivo en agar Sabouraud incubado a 28° C durante 48 h. Se resuspendieron 4 a 5 colonias de levaduras en 4 ml de agua destilada estéril hasta lograr una turbidez similar al 0,5 de la escala de Mc Farland. Posteriormente se realizó una dilución 1/10 de cada inóculo. Se colocaron 0,5ml de cada una de estas diluciones en cada pocillo de la placa de siembra del multiinoculador de Steers. (6). Luego de la inoculación en cada placa la concentración del inóculo final fue de  $1 \times 10^4$  UFC/ml por punta de inocular.

Las placas se incubaron a 37° C durante 48 h. (5,14).

Se consideró como CIM a la mínima concentración del antifúngico que inhibió el crecimiento visible de las levaduras y como CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> a la mínima concentración del antifúngico que inhibió el 50 y 90 % de las cepas respectivamente.

Todos los datos obtenidos se procesaron estadísticamente con el programa SPSS VER: 6.1.3./95.

## Resultados y discusión

Los valores de CIM para las cepas de referencia estuvieron dentro de los rangos establecidos por el NCCLS. (Tabla 1).

De las cepas estudiadas a 120 se les determinó la sensibilidad a MCZ y sólo a 45 a KTZ e ITZ. Los resultados de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> obtenidos se observan en la Tabla 2.

Los valores de CIM para MCZ y KTZ mostraron una variancia significativa (0,75 y 3,13 respectivamente). Sería suficiente elegir la CIM<sub>90</sub> de ambos azoles para inhibir la mayoría de las cepas, debido a que los valores más frecuentemente obtenidos fueron 2 y 4 mg/L respectivamente. (Gráfico 1) Mientras que para ITZ se requiere sólo el valor de la CIM<sub>50</sub> ya que el valor más frecuente (modo) fue de 0,25 mg/L.

Tanto los estudios realizados por Rex y cols. (7-9), como los de Odds (10-13) y el NCCLS (14), advierten sobre la dificultad de correlacionar las sensibilidades obtenidas "in vitro" con las respuestas clínicas. Las concentraciones establecidas como puntos de corte por Rodero y cols. (15,16) en un intento de estandarizar valores de referencia, resultan controvertidas, ya que se refieren a valores séricos y no tisulares.

En el Gráfico 1 se observa la variabilidad del conjunto de datos la cual es mayor para KTZ y menor para ITZ.

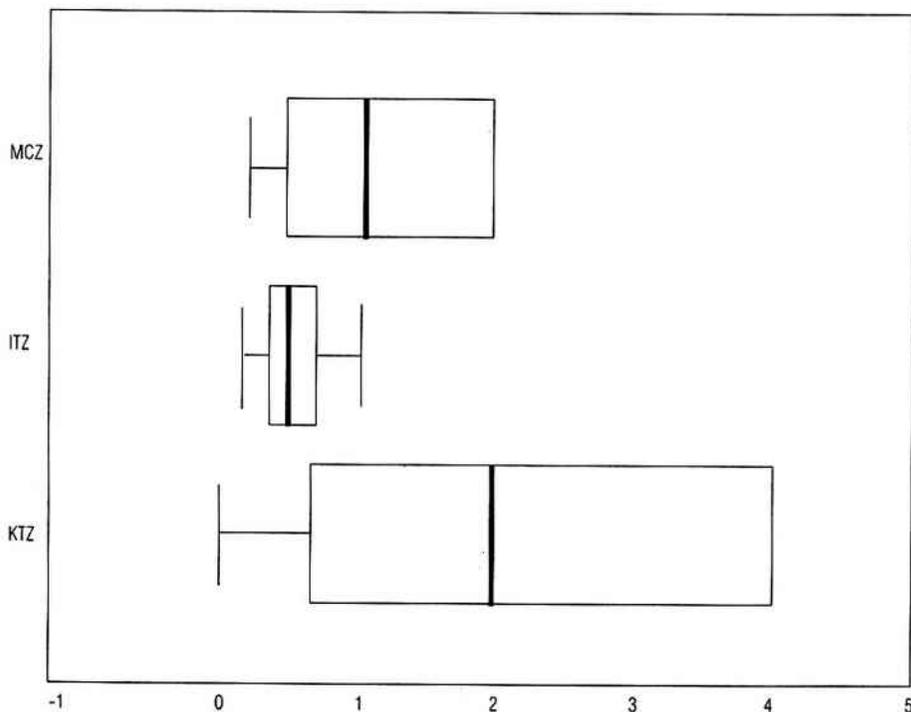
Las medianas están representadas por las líneas gruesas dentro de las cajas.

**Tabla 1:** Valores de CIM de las cepas de referencia.

	MCZ CIM (mg/L)	KTZ CIM (mg/L)	ITZ CIM (mg/L)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 951706	0,5	≤ 0,015	≤ 0,015
<i>C. krusei</i> ATCC 951705	0,125	0,25	≤ 0,015

**Tabla 2:** Resultados de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> obtenidos para *Cándida albicans*.

ANTIFUNGICOS	CIM50 (mg/L)	CIM90 (mg/L)
MCZ (n = 120)	1	2
KTZ (n = 45)	1	4
ITZ (n = 45)	0,25	1

**Gráfico 1:** Caja y extensión para la CIM de cada imidazol.

En este gráfico se observa la variabilidad del conjunto de datos la cual es mayor para KTZ y menor para ITZ. Las medianas están representadas por las líneas gruesas dentro de las cajas.

## Conclusiones

Se considera de suma importancia continuar con las pruebas de susceptibilidad debido a la constante aparición de infecciones fúngicas que podrían provocar el surgimiento de cepas resistentes.

A pesar de que el método de dilución en medio sólido para levaduras no ha sido estandarizado esta técnica posee ventajas respecto al de dilución en caldo ya que tiene un punto final de fácil lectura porque se detecta mejor la inhibición del crecimiento, es sencillo y reproducible; y permite determinar la CIM a un gran número de cepas utilizando un sólo set de placas, mientras que el método de referencia utiliza un set de tubos para cada cepa.

## Agradecimiento

Al Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos Malbrán" por facilitar las cepas ATCC.

A la Dra. Cristina Iovannitti, quien gentilmente nos facilitara las normas NCCLS 1995.

## Bibliografía

- 1- Walsh, T. J. and A. Pizzo. 1988 Treatment of systemic fungal infections: recent progress and current problems. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* 7: 460-475.
- 2- F. C. ODDS, G. Dams, G. Just and P. Lewi. 1996 "Susceptibilities of *Candida spp* to Antifungal Agents Visualized by two-Dimensional Scatterplots of Relative Growth". *Antimicrob. Agents and Chemot.* 40 (3) 588-994.

- 3- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts". Proposed Standard NCCLS Document MP 27-P Villanova, Pennsylvania, **Vol: 12**, Nº 2512:25.
- 4- Bianchi, M.; Arechavala, A.; Robles, A. 1995. "Determinación de la CIM de cepas de *Cándida* frente al Miconazol mediante un método de dilución en agar." VII Congreso de Micología. XVII Jornadas Argentinas de Micología. Rosario. Argentina.
- 5- Bava, A. J. 1993 "Cryptococcosis en la República Argentina", tesis de Doctorado, Rev. Arg. de Micología, **XVI (3)**: 3-41.
- 6- Ballows. "Prueba de susceptibilidad a los antibióticos. Técnicas actualizadas." Capítulo: 6: 62-70.
- 7- Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Barry, A. L.; Nelson P.W.; Webb C. D. 1995. "Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia". *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 40-44.
- 8- Rex, J. H.; Rinaldi, M. G.; Pfaller, M. A.. Minireview. 1995. "Resistance of *Cándida* species to fluconazol". *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1-8.
- 9- Rex J. H.; Pfaller M. A.; Rinaldi M. G.; Polak, A.; Galgiani, J. N. 1993. "Antifungal susceptibility testing". *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 37-381.
- 10- Odds, F. C. 1992. "Antifungal susceptibility testing of *Cándida* spp by relative growth measurement at single concentrations of antifungal agents". *Antimicrob. Agent Chemother* **36**: 1727-1737.
- 11- Odds, F. C. 1993. "Resistance of yeasts to azole derivate antifungals". *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 467-471.
- 12- Odds, F. C. 1996. "Resistance of clinically important yeasts to antifungal Agents International". *J. Antimicrob. Agents* **6**: 145-147.
- 13- Odds, F. C.; Vranckx, L.; Woestenborghs, F. 1995. "Antifungal susceptibility testing of yeast: evaluation of technical variables for test automation". *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2051-2060.
- 14- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts". Tentative Standard. Document MP 27-T. Vol: **15**, Nº 10, 12:25.
- 15- Rodero, L.; Boutureira, M.; Demkura, H.; Burkett, A.; Fernandez, C.; Losso, M.; Jauregui Rueda, Monticelli, R.; Vitale, R.; Canteros, C.; Hoehenfellner, F.; Vivot, W.; Davel, G. 1997. "Infecciones por levaduras: agentes causales y su resistencia a antifúngicos en pacientes pediátricos hospitalizados y en adultos HIV positivos". *Rev. Arg. de Microbiología* **29**: 7-15.
- 16- Rodero, L.; Davel, G.; Vivot, W.; Canteros, C.; Fernández, C. 1995. Pruebas de sensibilidad "in vitro" para levaduras: Evaluación de un micrométodo. *Rev. Arg. Microb.* **27**: 81-89.