

5

EL CASO DE INFECCIOSAS

Estudio comparativo de la sensibilidad in Vitro a los antimicóticos de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis crónica y aguda

Olga Lucía Valencia *

Catalina de Bedout *

Beatriz Lucía Gómez *

Ángela Restrepo *

RESUMEN

En el presente estudio se analizaron las CIM y las CLM de 20 aislamientos de *C. albicans*, obtenidas de pacientes con vaginitis aguda y crónica. Los antimicóticos y las concentraciones usadas fueron las siguientes: anfotericina B (0.03 - 16 μ /ml), ketoconazol (0.03 - 16 μ /ml), fluconazol (0.125 - 64 μ /ml) e itraconazol (0.018 - 10 μ /ml). La técnica empleada fue la macro-dilución en tubo del NCCLS, de Estados Unidos. Los resultados indicaron que las CIM de todos los aislamientos, tanto de casos agudos como de crónicos, estaban dentro del rango de sensibilidad aceptado para la prueba y que aún las con-

.....
* Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Separatas: Carrera 72 A No. 78B-141, A.A. 73-78 Medellín, Colombia, S.A.

centraciones más bajas eran inhibitorias. Por el contrario, ninguno de los aislamientos alcanzó su CLM con las concentraciones de fluconazol y de itraconazol empleadas; sin embargo, con el ketoconazol, se alcanzaron concentraciones letales para la mitad de los aislamientos obtenidos de los casos agudos y de los crónicos. Algo similar se observó con la anfotericina B, ya que el 75 y el 90% de los aislamientos de casos agudos y crónicos, respectivamente, alcanzaron su CLM.

Estos resultados indican que en la candidiasis vaginal, la cronicidad y la recurrencia no son debidas a resistencia del agente etiológico a los antimicóticos empleados en el tratamiento. Debe recordarse, sin embargo, que la mayoría de los antimicóticos son fungistáticos y que la cooperación de las defensas inmunes del paciente, es necesaria para obtener su curación; por ello las fallas terapéuticas podrían también atribuirse al paciente. A pesar de lo anterior, las altas CLM obtenidas, podrían sugerir un cambio de antimicótico, o el uso de una combinación de los mismos, con el objeto de alcanzar éxito en la terapia.

Palabras clave: Vaginitis, Candida Albicans, Antimicóticos.

ABSTRACT

In the present study we analyzed the MIC's and the MLC's of 20 *C. albicans* isolates obtained from patients with acute and chronic vaginitis; antimycotics and concentrations tested were amphotericin B (0.03 - 16 μ /ml), ketoconazole (0.03 - 16 μ /ml), fluconazole (0.125 - 64 μ /ml) and itraconazole (0.018 - 10 μ /ml). The technique used was the macro-dilution procedure recommended by the NCCLS. Results indicated that the MIC's of all isolates, acute and chronic, fall in the range of sensitivity indicated for the test and that even the lowest concentrations used, proved inhibitory. Contrariwise, none of the isolates achieved MLC values with fluconazole or itraconazole; half of the *C. albicans* isolates from the acute and half from the chronic cases, were killed by ketoconazole; a higher proportion of isolates (75% acute, 90% chronic), also reached MLC's values with amphotericin B.

It appears then, that chronicity and recurrence are not due to resistance to the antimycotics used for therapy of these disorders. Most of the antimycotics are fungistatic and the host's immune response is needed to overcome the infection; consequently, treatment failures could also be attributed to the patient itself. Nonetheless, high MLC's values may suggest a change of drug or a combination of drugs, in order to have more possibilities of success.

Key words: Vaginitis, *C. albicans*, antimycotics.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una afección de las mucosas causada por diferentes especies de levadura del género *Candida*, pero con predominio de *C. albicans*, la cual es aislada del 85-90% de los casos (2, 13).

La CVV es una de las afecciones más comúnmente observada en la práctica médica y se estima que un 75% de todas las mujeres experimenta un episodio de CVV en su vida (2, 13). De éstas, aproximadamente el 5% desarrollan posteriormente, candidiasis vaginal recurrente (CVR), la cual afecta considerablemente la calidad de vida de las pacientes que la sufren (2, 13). La CVR se define como la presencia de 4 o más episodios de candidiasis vaginal al año (2, 13).

Algunos de los factores predisponentes a la enfermedad, son bien conocidos (embarazo, diabetes, remplazo hormonal, inmunosupresión iatrogénica) (13). Sin embargo, la CVR es, en la mayoría de los casos, una enfermedad idopática y se desconocen las razones por las cuales se presenta la recurrencia (2, 5, 13). Por lo tanto, se cuestiona si la enfermedad se debe a factores del hospedero mismo o a la resistencia del agente etiológico a los antimicóticos empleados para el tratamiento (2, 5, 13).

Se han realizado numerosos estudios en mujeres con CVR, en búsqueda de alteraciones de orden inmune (2, 11, 13). A pesar de que se han implicado fallas en la inmunidad mediada por células en la recurrencia, diversos trabajos no apoyan este postulado (2).

Por otra parte, pocos estudios se han dirigido a la determinación de la resistencia a los antimicóticos, de los aislamientos de *Candida* obtenidos de secreciones vaginales, Lynch y Sobel (5) no encontraron que existiese tal resistencia en los aislamientos de *C. albicans* obtenidos de mujeres con CVR; sin embargo, se notó un patrón especial de resistencia en especies diferentes a *C. albicans* (5).

Con respecto a la actividad *in vitro* de los antimicóticos y los resultados del tratamiento, se ha demostrado una correlación significativa entre ambos eventos (3, 10, 11, 12). En los últimos años, se han documentado casos en los cuales la resistencia a determinado antimicótico se ha correlacionado con fallas terapéuticas (4, 5, 11).

El presente estudio se realizó con el fin de contribuir al esclarecimiento de la posible resistencia antifúngica de *C. albicans* aislada de pacientes con vaginitis, con la falta de respuesta a la terapia específica. Se evaluó la actividad *in vitro* de la anfotericina B, el itraconazol, el ketoconazol y el fluconazol, frente a varios aislamientos precedentes tanto de pacientes con CVV aguda como crónica.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 20 pacientes que fueron remitidas al Laboratorio de Micología de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), durante el período 1994 - 1995, para confirmar el diagnóstico clínico de candidiasis vaginal. Se seleccionaron 10 pacientes con la forma aguda y 10 con la forma recurrente.

De cada paciente se obtuvo una muestra de flujo vaginal, a la cual se le realizaron tanto exámenes directos (KOH-Gram) como cultivos, estos últimos en los medios de agar Sabouraud simple y modificado con ciclohexamida y antibióticos (Mycosel agar, BBL, Beckton Dickinson and Company Cockeysville, USA). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (20 - 24° C) por 48 horas. Al obtener el crecimiento de colonias compatibles con *Candida*, se procedió a practicar la prueba de tubo germinal para identificar la especie como *C. albicans*.

Las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos fueron realizadas de acuerdo con los estándares propuestos en las publicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que emplea el método de macrodilución en caldo (6). El inóculo de la levadura fue estandarizado por el método espectrofotométrico recomendado por Pfaller y cols. (7, 8), a una concentración de 10^3 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) y preparado en el medio RPMI-1640 (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO. USA).

Los antimicóticos utilizados fueron fluconazol IV, 200 mg. (Pfizer, Groton, CT), ketoconazol e itraconazol puros, en polvo (Janssen Pharmaceutica, Inc. Beerse, Bélgica) y anfotericina B (E. R. Squibb & Sons, Princeton, NJ. USA).

La solución IV de fluconazol fue diluida en agua destilada y se utilizó un rango de 0.125 - 64 $\mu\text{g/ml}$; el ketoconazol fue disuelto inicialmente en 0.2 M de HCl y luego diluido en agua destilada estéril, para

abarcar rangos de 0.03 a 16 $\mu\text{g/ml}$; el itraconazol fue disuelto y diluido en Carbowax PEG 400 (Fisher Scientific Company, NJ. USA), con rangos de 0.018 a 10 $\mu\text{g/ml}$; la anfotericina B fue disuelta y diluida en agua destilada estéril, con rangos de 0.03 a 16 $\mu\text{g/ml}$. Todas las drogas fueron almacenadas a - 20° C hasta el momento de su uso.

Se prepararon diluciones seriadas de cada antimicótico en un volumen de 0.1 ml, al que se le agregaron 0.9 ml del inóculo estandarizado como quedó descrito.

Para cada aislamiento se incluyeron controles de crecimiento de la levadura en el medio RPMI-1640 y en el reactivo de dilución (PEG 400). Como control de calidad se utilizaron las cepas de referencia de *C. albicans*, ATCC 90028 y ATCC 90029.

Los tubos así preparados fueron incubados a 37° C y leídos por cambio de turbidez del cultivo a las 24 y 48 horas, según recomendaciones del NCCLS (6).

Para los azoles, la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue definida como el primer tubo en el que se demostrara un 80% de reducción del crecimiento con respecto al control y para la anfotericina B, el correspondiente al 100% de inhibición.

Para obtener la concentración letal mínima (CLM), se sembró en cajas de Petri con el medio de Sabouraud agar, 0.1 ml a partir del tubo donde se había obtenido la CIM; se incubó el cultivo a 30° C por 24 - 48 horas. Para los azoles la CLM se determinó como el crecimiento de ≤ 5 UFC/ml y para la anfotericina B, como la ausencia total de crecimiento.

RESULTADOS

La sensibilidad de los diferentes aislamientos de *C. albicans* a los 3 derivados azólicos ensayados, se presenta en las figuras 2, 3 y

4. Se observan importantes diferencias entre los valores correspondientes de la CIM y la CLM (Tabla 1).

TABLA 1.

**SENSIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICÓTICOS
EN AISLAMIENTOS DE *C. ALBICANS* DE 20 PACIENTES CON
VAGINITIS AGUDA O CRÓNICA**

Antimicótico	CIM			CLM		
	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	No. de aislamientos con CIM indicada		Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	No. de aislamientos con CLM indicada	
		Vaginitis Crónica	Vaginitis Aguda		Vaginitis Crónica	Vaginitis Aguda
Ketoconazol	0.03	3	5	16	5	5
	0.06	5	4	>16	5	5
	0.125	2	1	--	--	--
Fluconazol	0.125	1	1	>64	10	10
	0.25	2	3	--	--	--
	0.5	5	5	--	--	--
	1.0	1	1	--	--	--
Itraconazol	0.018	2	5	>10	10	10
	0.035	1	0	--	--	--
	0.07	6	3	--	--	--
	0.15	1	2	--	--	--
Anfotericina B	0.5	3	4	0.5	2	1
	1.0	7	4	1.0	6	3
	2.0	0	2	2.0	1	4
				>16	1	2

Fig. 1

SENSIBILIDAD A LA ANFOTERICINA B DE 20 AISLAMIENTOS DE *C. albicans* DE VAGINITIS AGUDA Y RECURRENTE

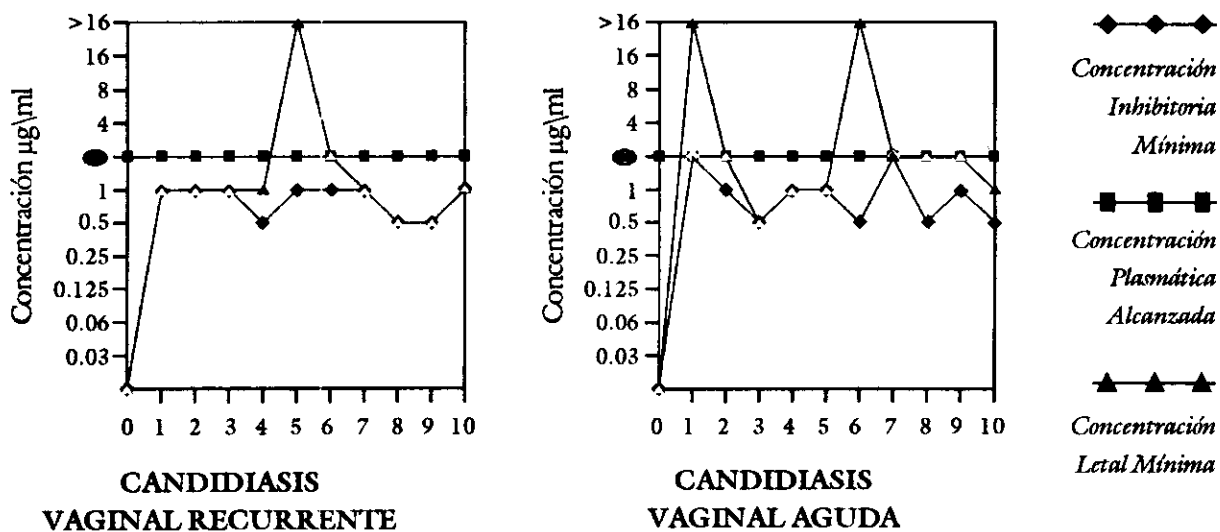


Fig. 2

SENSIBILIDAD AL KETOCONAZOL DE 20 AISLAMIENTOS DE *C. albicans* DE VAGINITIS AGUDA Y RECURRENTE

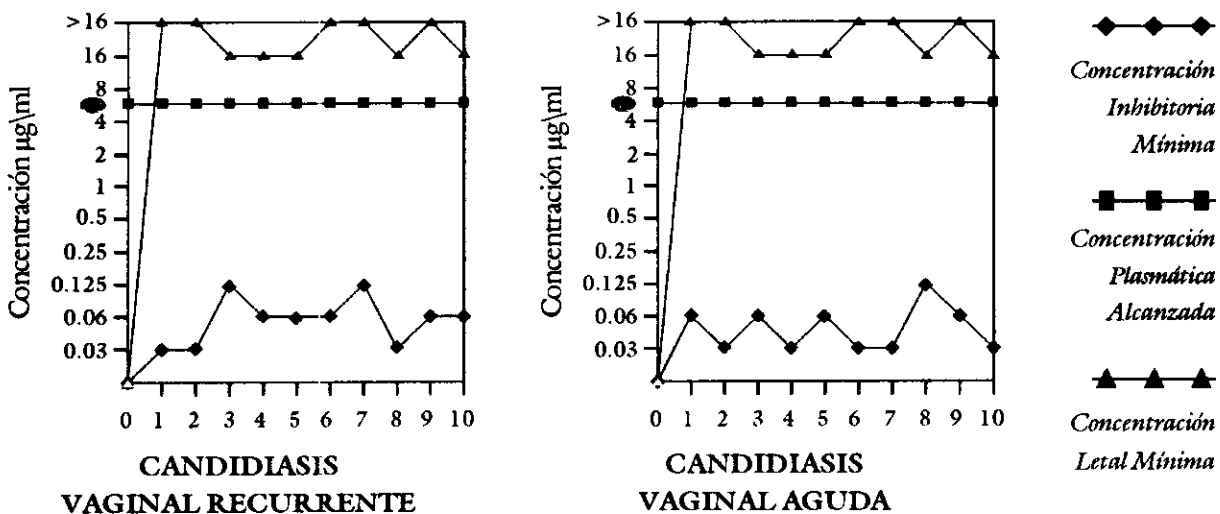


Fig. 3

SENSIBILIDAD AL FLUCONAZOL DE 20 AISLAMIENTOS DE *C. albicans* DE VAGINITIS AGUDA Y RECURRENTE

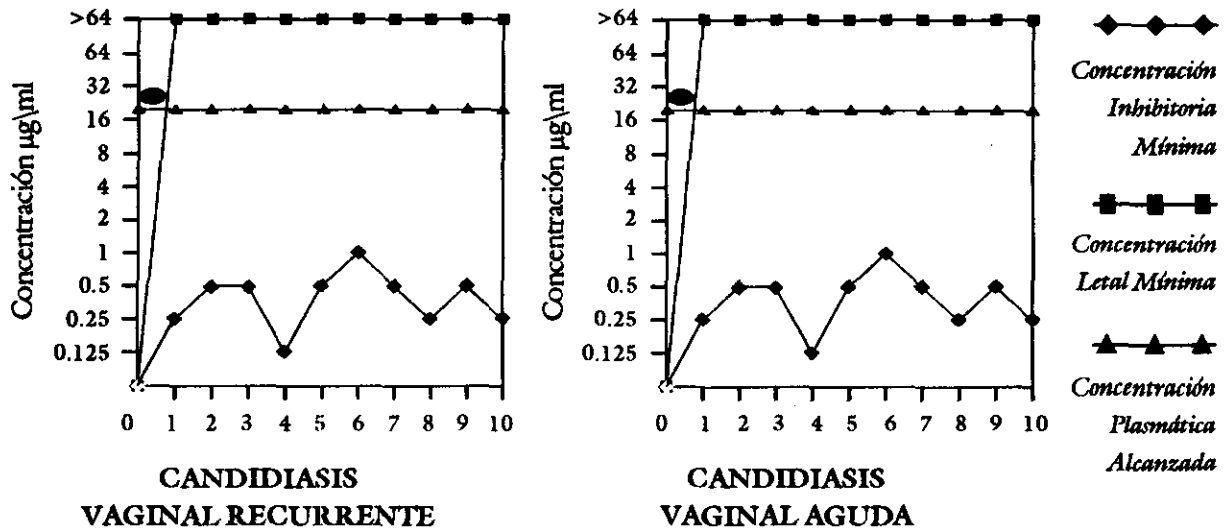
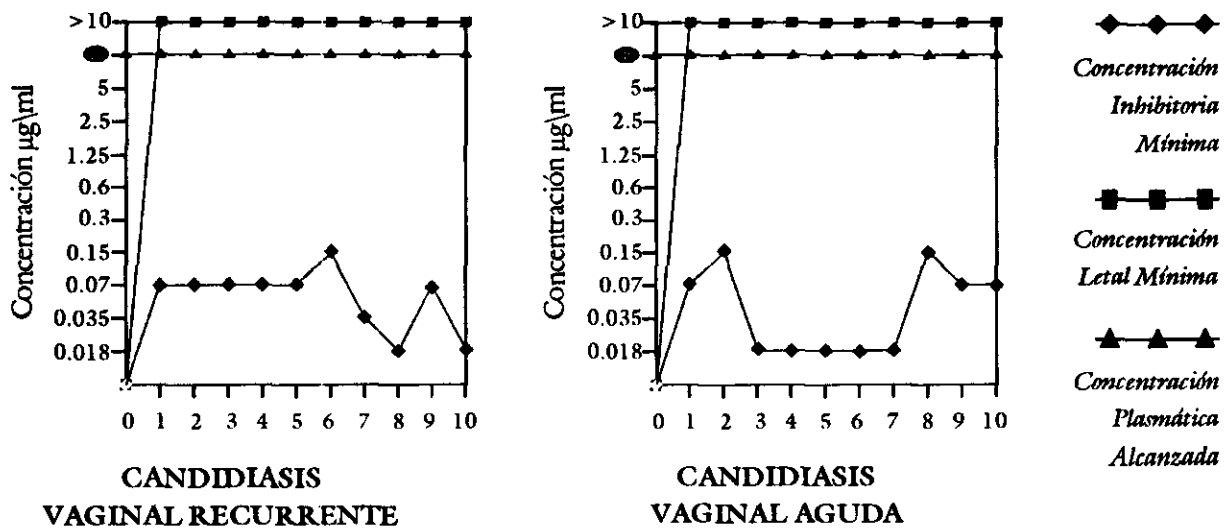


Fig. 4

SENSIBILIDAD AL ITRACONAZOL DE 20 AISLAMIENTOS DE *C. albicans* DE VAGINITIS AGUDA Y RECURRENTE



Se anotó una excepción con la anfotericina B (Fig. 1), pues en 11 de los 20 aislamientos (4 agudas, 7 recurrentes), la CIM se alcanzó en el mismo punto de la CLM. Igualmente, en 3 aislamientos (1 recurrente y 2 agudos), la CIM estuvo por encima de los niveles plasmáticos alcanzados por la droga y en otros 4 (3 agudos, 1 recurrente), tal concentración correspondió con el límite de los niveles plasmáticos.

En comparación con las concentraciones plasmáticas conocidas y a juzgar por la CIM, todas las cepas fueron sensibles a bajas concentraciones de ketoconazol, fluconazol e itraconazol. Sin embargo, ninguna de las 20 cepas consiguió una CLM con fluconazol o itraconazol. Tal concentración se obtuvo solamente para el ketoconazol, tanto en el 50% de las candidiasis agudas como de las formas recurrentes.

COMENTARIOS

En el presente estudio, ninguno de los 20 aislamientos de *C. albicans* analizado mostró resistencia a los diferentes antimicóticos empleados, e inclusive, las concentraciones más bajas fueron suficientes para inhibir adecuadamente el crecimiento de las levaduras.

No se obtuvieron diferencias entre los aislamientos provenientes de pacientes con formas agudas o crónicas, hallazgos que coinciden con los anotados por Lynch y Sobel (3).

Por consiguiente, los datos sugieren que no existe una resistencia directa del germen

a los antimicóticos; deben explorarse, entonces, otros factores que incluyan la relación hospedero - *Candida* (1).

Se ha demostrado que *C. albicans* puede adquirir resistencia a los azoles, especialmente en pacientes con infección por VIH, sometidos a tratamientos prolongados con azoles sistémicos (9, 10). La resistencia a fluconazol no ha sido reportada en pacientes inmunocompetentes. Sólo se ha descrito un caso de vaginitis por *C. albicans* resistente a azoles y en una mujer sana (11). Sin embargo, falta por aclarar si la paciente fue infectada por una cepa resistente a los azoles o si desarrolló la resistencia durante la terapia.

Si bien la correlación entre la CLM y la eficacia del tratamiento en el paciente, no corren paralelos (5, 12), el hallazgo de una CLM más alta que la concentración plasmática alcanzada, debería alertar al médico tratante sobre la necesidad de considerar otros medicamentos o emplear una combinación de ellos, con el objeto de controlar más efectivamente el proceso micótico crónico.

Además, debe precisarse que *in vivo*, muchos de los antibióticos son sólo fungistáticos, no fungicidas, por lo que es necesario el apoyo del sistema inmune del paciente en la destrucción del germen.

AGRADECIMIENTOS

La colaboración de los doctores Bernardo Agudelo J. y Juan Alberto Serna Z. al remitirnos sus pacientes, es reconocida con agradecimiento. ■

REFERENCIAS

1. Ashman, R.B., Papadimitriou, J.M. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol. Rev.* 1995; 4: 646 - 672.
2. Fidel, P.L., Sobel, J.D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 335 - 348.
3. Grannoum, M.A. Is antifungal susceptibility testing useful in guiding fluconazole therapy? *Clin Infect Dis* 22 (Suppl. 2): 1996; S161 - S165.
4. Iwata, K. Drug resistance in human pathogenic fungi. *Europ J Epidemiol* 8: 1992; 407 - 421.
5. Lynch, M.E., Sobel, J.D. Comparative in vitro activity of antimycotic agents against pathogenic vaginal yeast isolates. *J Med Vet Mycol.* 1994; 32: 267 - 274.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast. Proposed Standard. Document M - 27 - P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA. 1992.
7. Odds, F.C. Resistance of clinically important yeasts to antifungal agents. *Internat J Antimicrob Agents* 1996; 6: 145 - 147.
8. Pfaller, M.A. and Rinaldi, M.G. Antifungal susceptibility testing. *Inf Dis Clin North America.* 1993; 7: 345 - 444.
9. Pfaller, M.A. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 1992 - 1996.
10. Rodríguez - Tudela J. L., Martínez - Suárez, J.O., Dronda, F., Laguna, F., Chaves, F., Valencia, E. Correlation of in vitro susceptibility test results with clinical response: a study of azole therapy in AIDS patients. *J Antimicrob Chemoth* 1995; 35: 793 - 804.
11. Sobel, J.D. Symptomatic vulvovaginitis due to fluconazole - resistant *Candida albicans* in a female who was not infected with human immuno - deficiency virus. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 726 - 727.
12. Walsh, T., Melcher, G. Rinaldi, M. et al. *Trichosporum beigelli*: emerging pathogen resistant to amphotericin B *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1616 - 1622.
13. Working Group of the British Society for Medical Mycology. Management of genital candidiasis *Brit Med J* 1995; 3101: 1241 - 1244.