

Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal

Alicia I. Arechavala, Mario H. Bianchi, Ana María Robles, Gabriela Santiso y Ricardo Negróni

Unidad Micología, Hospital de Infecciosas F.J.Muñiz, Buenos Aires, Argentina

Resumen

La candidiasis vulvovaginal aguda afecta a una elevada proporción de mujeres en edad fértil y es la segunda causa de vulvovaginitis después de la vaginosis bacteriana debida al complejo GAM (*Gardnerella vaginalis*-*Anaerobios-Mycoplasma*).

La especie de *Candida* que se aísla con mayor asiduidad de las secreciones vaginales es *Candida albicans*. Sin embargo, la aparición de más de una especie de levadura en la misma muestra, o de otras con mayor resistencia frente a las medicaciones de uso habitual, hacen necesaria la identificación correcta a nivel de especie del microorganismo aislado y la determinación del patrón de sensibilidad antifúngica.

En este estudio se incluyeron 100 aislamientos provenientes de 94 pacientes con vulvovaginitis micótica aguda. La identificación de las cepas demostró que el 86% correspondía a *C. albicans*, el 6% a *Candida glabrata*, y el resto se identificaron como *Candida inconspicua* (3%), *Candida krusei* (2%), y *Candida intermedia*, *Candida holmii* y *Trichosporon asahii* con un único aislamiento cada una (1%).

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas de fluconazol y de albaconazol para estas levaduras. *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. inconspicua* fueron las especies con mayor resistencia a fluconazol, en tanto que todas las cepas de *C. albicans* fueron sensibles. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de albaconazol fue mucho menor en todos los aislamientos.

Palabras clave

Candidiasis vulvovaginal, Fluconazol, Albaconazol

Identification and susceptibility against fluconazole and albaconazole of 100 yeasts' strains isolated from vaginal discharge

Summary

Vulvovaginal candidiasis is a condition that affects a great number of fertile women. It is considered the second cause of genital infection after vaginosis due to GAM complex.

Candida albicans is the most frequent isolated species from vaginal discharge. However, sometimes more than one yeast species could be found in the same clinical sample or appear other different yeast that are more resistant to antifungal drugs. Nowadays, it is necessary to identify properly up to species level the isolated microorganism and to determine the antifungal susceptibility profile.

One hundred strains obtained from vaginal discharge of 94 patients suffering acute vulvovaginal candidiasis were studied. The identification of the isolates showed: *C. albicans* 86%, *Candida glabrata* 6%, *Candida inconspicua* 3%, *Candida krusei* 2% and *Candida intermedia*, *Candida holmii* and *Trichosporon asahii* one case each.

Minimal inhibitory concentrations (MIC) of all the yeasts against fluconazole and albaconazole were performed. *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. inconspicua* were the most resistant against fluconazole, on the other hand *C. albicans* was susceptible to this drug. All the isolates presented MIC against albaconazole much lower than fluconazole.

Key words

Vulvovaginal candidiasis, Fluconazole, Albaconazole

Dirección para correspondencia:

Dra. Alicia Arechavala
Unidad Micología
Hospital de Infecciosas F.J.Muñiz
Uspallata 2272-1282
Buenos Aires, Argentina
E-mail: hnmicologia@intramed.net

Introducción

Candida spp. forma parte de la biota normal del organismo, especialmente en la piel y las mucosas. La colonización del tracto genital femenino es de aproximadamente el 20% en mujeres sanas, y este valor es aún mayor en las embarazadas [8,9,18].

La candidiasis vaginal aguda afecta a una elevada proporción de mujeres en edad fértil; cerca del 75% cursa al menos un episodio de candidiasis aguda. Es la segunda causa de vulvovaginitis aguda después de la vaginosis bacteriana inespecífica por complejo GAM (*Gardnerella vaginalis*-*Anaerobios*-*Mycoplasma*) [3,7]. La diabetes, el uso de anticonceptivos orales y los tratamientos con antibióticos de amplio espectro son factores predisponentes [2,6,7,18,27,29].

La especie que se aísla con más asiduidad de las secreciones vaginales continúa siendo *C. albicans*, aunque pueden aparecer cepas de otras especies del género *Candida* e, incluso, dos o más especies diferentes simultáneamente en un proceso infeccioso [3,16,18-23,25,26].

Los tratamientos con antifúngicos orales, en especial con fluconazol, son habituales. Sin embargo, se observan fracasos terapéuticos con este fármaco, fundamentalmente porque algunas de las especies que aparecen son resistentes a este triazólico (*Candida krusei*) o poseen sensibilidad disminuida al mismo (*Candida glabrata*). [3,9,16,22,25,27].

En la actualidad se están desarrollando nuevos derivados triazólicos, como el albaconazol, que tiene espectro de acción sobre levaduras y puede administrarse por vía oral y, por lo tanto, podría ser una alternativa de utilidad en esta afección [5]. Por este motivo nos propusimos evaluar la sensibilidad al fluconazol y al albaconazol de 100 cepas de diversas especies de *Candida* y otras levaduras aisladas de flujos vaginales de pacientes con candidiasis vaginal aguda.

Materiales y métodos

Cepas. Se estudiaron 100 aislamientos de levaduras provenientes de 94 muestras de flujo vaginal de mujeres que habían sufrido un episodio de candidiasis vulvovaginal aguda. Las pacientes tenían edades comprendidas entre los 20 y los 64 años (media de 34,7 años), eran VIH negativas y ninguna estaba embarazada.

Las muestras fueron sembradas en tubos con agar miel de Sabouraud (peptona 10 g, extracto de levadura 5 g,

miel 40 g y agar 18 g) y en placas con CHROMagar *Candida*® (CHROMagar, Francia) que permite poner en evidencia la presencia de más de una especie de levadura en la misma muestra, a la vez que orienta acerca de la especie aislada.

Todas las cepas fueron identificadas de acuerdo con los procedimientos habituales en nuestro laboratorio [3,11]. Una única colonia aislada se resembró en agar glucosado de Sabouraud sin antibióticos y, a partir del nuevo cultivo, se realizó la identificación. Para el reconocimiento de *C. albicans* se tuvieron en cuenta los siguientes resultados: aparición de colonias verdes en CHROMagar, visualización al microscopio de tubos germinativos y producción de clamidoconidias en agar leche [10], crecimiento a 45 °C, ausencia de clamidoconidias en medio de Staib [28], y asimilación de D-xilosa. La identificación de las demás especies se basó en el color en el medio cromogénico, el aspecto micromorfológico en agar harina de maíz con Tween 80, llevándose a cabo la identificación definitiva con el método API ID 32C® (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia).

Todas las cepas fueron mantenidas en medio de Sabouraud (períodos no superiores a una semana) hasta el momento de realizar las pruebas de sensibilidad.

Pruebas de sensibilidad. Se realizaron siguiendo el documento M27-A2 del CLSI modificado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) por la técnica de microdilución en medio líquido [17].

Medio de cultivo: Se utilizó RPMI 1640 (Gibco®) adicionado con glucosa hasta la concentración del 2% y tamponado con MOPS 0,165mM, a pH 7.

Antifúngicos: Se utilizaron fluconazol (Pfizer, Inglaterra) y albaconazol (Uriach, España). El fluconazol se disolvió en agua y el albaconazol en dimetilsulfóxido (DMSO). Las diluciones de ambos se realizaron de acuerdo con los procedimientos del documento M27-A2, las concentraciones finales variaron entre 0,12 µg/ml y 64 µg/ml para fluconazol y entre 0,03 µg/ml y 16 µg/ml para albaconazol.

Para la preparación del inóculo se utilizaron subcultivos en medio de Sabouraud glucosado, de 24 h a 35 °C. La concentración final fue de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/ml. Como control se utilizaron las cepas ATCC de *C. krusei* 6258 y *C. parapsilosis* 22019.

Las lecturas fueron realizadas visualmente a las 24 h y 48 h de incubación a 35 °C, y se consideró como CMI a la menor concentración que demostró una inhibición marcada del crecimiento (disminución de más del 50%) con respecto al control a las 48 h.

Tabla. Resultados de la CMI de fluconazol y albaconazol de los 100 aislamientos de levaduras de flujo vaginal.

Especie aislada	n	CMI ₅₀ µg/ml		CMI ₉₀ µg/ml		Rango* µg/ml	
		FCZ	ABZ	FCZ	ABZ	FCZ	ABZ
<i>C. albicans</i>	86	0,25	≤0,03	0,5	≤0,03	≤0,125 - 2	≤0,03 - 0,5
<i>C. glabrata</i>	6	32	0,5	≥64	2	0,25 - ≥64	0,06 - 2
<i>C. inconspicua</i>	3					16 - ≥64	0,06
<i>C. krusei</i>	2					32 - ≥64	0,06 - 0,25
<i>C. intermedia</i>	1					0,25	≤0,03
<i>C. holmii</i>	1					0,5	≤0,03
<i>Trichosporon asahii</i>	1					0,25	0,06

n = número de aislamientos; FCZ = fluconazol; ABZ = albaconazol.

* En el caso de los aislamientos únicos, en lugar de rango se incluye el valor de CMI hallado.

Resultados y discusión

Las levaduras aisladas de exudados vaginales correspondieron a las siguientes especies: *C. albicans*, 86 casos; *C. glabrata*, seis; *Candida inconspicua*, tres; *C. krusei*, dos; y *Candida intermedia*, *Candida holmii* y *Trichosporon asahii* con un aislamiento cada una. En seis muestras se aislaron dos especies diferentes de *Candida* simultáneamente: *C. albicans* y *C. glabrata* en cuatro de ellas, y *C. albicans* y *C. krusei* en las dos restantes.

En este trabajo se observó, como ya ha sido demostrado en publicaciones anteriores, que *C. albicans* es la especie aislada con más frecuencia en muestras de pacientes con candidiasis vaginal aguda; en este caso alcanza una frecuencia del 86%. Esta proporción coincide con los estudios de Saporiti et al. (87,5%) en Argentina [25], Paulisch et al. (87,9%) en Austria [20], y es superior al valor hallado en Brasil por Lopes Consolaro et al. (60%) [12] y por Mujica et al. (76,8%) en Buenos Aires [15].

En segundo término se observó un 6% de *C. glabrata*, que es un porcentaje inferior al observado en un trabajo anterior [3], pero coincide con lo encontrado por otros autores [20]. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en la India en pacientes diabéticas, el número de portadoras de *C. glabrata* duplicaba el de las de *C. albicans* [22]. En el Hospital Juárez de México se aisló *C. glabrata* en el 35,9% de las pacientes, *C. albicans* en el 39% y *C. tropicalis* en el 16,2%, de un total de 631 aislamientos [23].

En el presente estudio también aparecen especies poco habituales, como *C. inconspicua*, *C. intermedia* y *C. holmii*. La presencia de especies diferentes a *C. albicans* fue observada mayoritariamente en mujeres asintomáticas en un estudio realizado en Paraná, Brasil [12]; contrariamente, en nuestro trabajo todas las pacientes eran sintomáticas y en todos los casos se evidenció la presencia de elementos levaduriformes en los exámenes microscópicos directos.

El aislamiento de dos especies de *Candida* en la misma muestra se detectó en seis casos mediante la utilización del medio con sustratos cromogénicos. Esto también fue encontrado en investigaciones previas [4,23].

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos se muestran en la tabla. No se encontraron diferencias en las lecturas a 24 h y 48 h, considerando como definitivos los resultados de la última lectura.

Las CMI₅₀ y CMI₉₀ de *C. albicans* para el fluconazol fueron de 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml respectivamente, en tanto que para el albaconazol ambas fueron ≤ 0,03 µg/ml; los valores hallados para los seis aislamientos de *C. glabrata* fueron 32 µg/ml y ≥ 64 µg/ml para fluconazol, y 0,5 µg/ml y 2 µg/ml para albaconazol. Estos datos no fueron calculados para las otras especies, debido al escaso número de aislamientos.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad muestran que las cepas de *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. inconspicua* son las más resistentes al fluconazol, como se ha demostrado en diversos trabajos [1,4,6,22,24]. Las CMI de albaconazol son muy inferiores, aunque todavía no se ha establecido el punto de corte que determine la sensibilidad a este antifúngico. Estos hallazgos concuerdan con otros estudios sobre sensibilidad de diversas especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, en los que se demuestra que estas levaduras tienen alta sensibilidad a este antifúngico [1,13,14].

Si bien el número de aislamientos es bajo, consideramos que el albaconazol podría ser una alternativa útil para el tratamiento de las candidiasis vaginales, sobre todo cuando éstas son debidas a especies resistentes al fluconazol.

Bibliografía

1. Alves SH, Da Matta DA, Azevedo AC, Loreto ES, Boff E, Santurio JM, Guarro J. In vitro activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. *Mycoses* 2006; 49: 220-225.
2. Barrenetxea Ziarrusta G. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 22-24.
3. Buscemi L, Arechavala A, Negrón R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del Hospital de Infecciosas F.J. Muñoz. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 177-181.
4. Cardona Castro N, Revankar SG, Ortiz P, Cuervo C, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Patterson TF. Proteinase detection, DNA typing and antimycotic susceptibility of *Candida* isolates from Colombian women with vulvovaginal candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 89-94.
5. Chen A, Sobel JD. Emerging azole antifungals. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005; 10: 21-33.
6. Costa M, Lisboa Fernandes O de F, Rodrigues Silva MR. Candidiase vulvovaginal: aspectos clínicos, tratamento oral e susceptibilidade "in vitro". *Rev Patol Trop* 2003; 32: 145-162.
7. Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE, Koutsky LA, Eschenbach DA, Colmes KK. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 757-765.
8. Foxman B. The epidemiology of vulvovaginal candidiasis: Risk factors. *Amer J Publ Health* 1990; 80: 329-331.
9. García Heredia, M, García SD, Copolillo EF, Cora Eliseth M, Barata AD, Vay CA, Torres RA, Tiraboschi N, Famiglietti AMR. Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. *Rev Arg Microbiol* 2006; 38: 9-12.
10. Jitsuron S, Kiamsini S, Pattararagron N. Milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida*. *Mycopathologia* 1993; 123: 95-98.
11. Linares Sicilia MJ, Solís Cuesta F. Identificación de levaduras. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2001: 11-1 11-11.
12. Lopes Consolaro ME, Aline Albertoni T, Shizue Yoshida C, Mazucheli J, Peralta RM, Estivalet Svidzinski TI. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa, Parana, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 202-205.
13. Miller JL, Schell WA, Wills EA, Toffaletti DL, Boyce M, Benjamin DK Jr, Bartroli J, Perfect JR. In vitro and in vivo efficacies of the new triazole albaconazole against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents And Chemother* 2004; 48: 384-387.
14. Morera López Y, Torres Rodríguez JM, Jimenez Cabello T, Baro Tomas, T. *Cryptococcus gattii*: in vitro susceptibility to the new antifungal albaconazole versus fluconazole and voriconazole. *Med Mycol* 2005; 43: 505-510.
15. Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. *Rev Arg Microbiol* 2004; 36: 107-112.
16. Muriel MA, Vizcaino MJ, Bilbao R, Herruzo R. Identificación de levaduras y sensibilidad "in vitro" a diversos antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 120-124.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, Second Edition M27-A2. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
18. Nikolov A, Shopova E, Museva A, Dimitrov A. Vaginal candida infection in the third trimester of pregnancy. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2006; 45: 7-9.
19. Okungbowa FI, Isikhumhen OS, Debe APO. The distribution frequency of *Candida* species in the genitourinary tract among symptomatic individuals in Nigerian cities. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 60-63.
20. Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E, Buzina W. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. *Mycoses* 2006; 49: 471-475.
21. Pirotta MV, Garland S. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3213-3217.
22. Ray D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Goswami D, Mandal P, Sreenivas V, Kochupillai N. Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. *Diabetes Care* 2007; 30: 312-317.
23. Rivera-Sanchez R, Flores Paz R, Arriaga Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24: 634-636.
24. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 83-92.
25. Saporiti AM, Gomez D, Levalle S, Galeano M, Davel G, Vivot W, Rodero L. Candidiasis vaginal: etiología y perfil de sensibilidad frente a agentes antifúngicos de uso clínico. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 217-222.
26. Sobel JD. Vulvovaginitis due to *Candida glabrata*: an emerging problem. *Mycoses* 1998; 41 (Suppl 2): S18-S22.
27. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, Reed BD, Summers PR. Vulvovaginal candidiasis epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 203-211.
28. Staib P, Morschhauser J. Chlamydo-spore formation on Staib agar as a species specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses* 1999; 42: 521-524.
29. Tabrizi SN, Pirotta MV, Rudland E, Garland SM. Detection of *Candida* species by PCR in self-collected vaginal swabs of women after taking antibiotics. *Mycoses* 2006; 49: 523-524.