

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Sensibilidad *in vitro* a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida spp*

Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu,¹ Lic. Yamilé Echemendía Medina,² Dra. Tahamara Cartaya González³ y Téc. Dianeya Mendoza Llanes⁴

RESUMEN

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de nistatina, uno de los antifúngicos más empleados en esta micosis, frente a 68 cepas de *Candida* aisladas de exudados vaginales. *Candida albicans* representó 75 % del total de cepas, mientras que *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* se encontraron con mucha menor frecuencia. Los factores predisponentes que más se presentaron fueron el embarazo y el tratamiento con antibacterianos, mientras que la leucorrea y el prurito caracterizaron los síntomas en la mayoría de los casos. Los valores de CMI obtenidos con la utilización de un método de dilución en caldo casitona, estuvieron en un rango de 0,5-8 µg/mL y la media geométrica fue de 1,36 µg/mL. Para *C. albicans*, la CMI₉₀ fue de 4 µg/mL, dada por 2 cepas que mostraron los valores más altos de CMI (8 µg/mL). De manera general, las cepas mostraron valores bajos de CMI, esto sugiere que los fallos terapéuticos no son inherentes a la aparición de cepas resistentes.

DeCS: CANDIDA/aislamiento & purificación; RESISTENCIA MICROBIANA A LAS DROGAS; CANDIDIASIS VULVOVAGINAL/diagnostico; CANDIDIASIS VULVOVAGINAL/quimioterapia; NISTATINA/uso terapéutico; TESTS DE SENSIBILIDAD MICROBIANA; IN VITRO.

En las últimas décadas la incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente. Aunque estas infecciones pueden presentarse en hospederos normales, la mayoría de ellas se desarrollan en individuos inmunocomprometidos, como son los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o los que han recibido trasplantes de órganos, tratamientos con citostáticos y corticoides, así como tratamientos prolongados con antibacterianos de amplio espectro.¹⁻³

Entre las micosis, probablemente la candidiasis sea la de más amplia distribución y es considerada

también la principal micosis oportunista. Una de sus formas clínicas más comunes es la vaginitis por *Candida* o candidiasis vaginal, que constituye una causa común de morbilidad en las mujeres.⁴

La nistatina es uno de los principales agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal y es quizás, el más utilizado en Cuba; sin embargo, con frecuencia se presentan casos de mujeres que padecen vaginitis crónica por *Candida*, las cuales responden solo parcialmente al tratamiento antifúngico tópico y pueden tener ataques recurrentes severos. Muchas veces las razones de esta recurrencia no llegan a

¹ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Licenciada en Microbiología. IPK.

³ Especialista de I Grado en Microbiología. Hospital Ginecoobstétrico "América Arias", Ciudad de La Habana.

⁴ Técnico Medio. IPK.

precisarse, lo que hace sugerir un fallo terapéutico no inherente al hongo o la aparición de cepas con sensibilidad disminuida o resistentes a la droga.

Por estas razones, el presente trabajo se desarrolló con el objetivo de identificar las especies de levaduras aisladas a partir de exudados vaginales, conocer los principales factores predisponentes y los síntomas más frecuentes en los casos de candidiasis vaginal estudiados y determinar la concentración mínima inhibitoria de nistatina, mediante un micrométodo de dilución en caldo casitona, de las cepas de *Candida* aisladas.

MÉTODOS

Se estudiaron 68 cepas de *Candida* procedentes de exudados vaginales de pacientes que acudieron a la consulta de ginecología del Hospital Ginecoobstétrico “América Arias” de Ciudad de La Habana, en el período comprendido entre diciembre de 1998 y marzo de 1999. A cada paciente se le realizó una encuesta que recogía los factores predisponentes y los síntomas, además de los datos generales.

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Todas las cepas a identificar fueron sembradas en agar Sabouraud con cloranfenicol e incubadas a 37 °C durante 24 h. A partir de estos cultivos se realizó su identificación mediante las pruebas de formación de tubos germinativos, la filamentación en agar harina de maíz con *Tween* 80 y la asimilación de carbohidratos.⁵

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS

Preparación del inóculo

Todas las cepas se cultivaron en agar Sabouraud con cloranfenicol, durante 48 h a 37 °C. A partir de estos cultivos se tomaron 5 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro, que fueron resuspendidas en 5 mL de agua destilada estéril y se ajustó la concentración celular hasta alcanzar una densidad equivalente a la del tubo 0,5 de la escala de McFarland.⁶

De esta suspensión se tomaron 50 µL y se añadieron a tubos que contenían 5 mL de medio líquido de casitona estéril. La concentración final de estos tubos con medio de cultivo fue alrededor de 1×10^4 UFC/mL. Como cepa control fue utilizada la cepa *C. albicans* ATCC 90028.

Diluciones del antifúngico

Se preparó una solución madre de nistatina de 2 mg/mL en dimetilsulfóxido, a partir de esta fue preparada una solución de 1 280 µg/mL con agua destilada estéril, que fue utilizada para realizar diluciones dobles seriadas, en placas de microtitulación de 96 pocillos, a partir de la columna 2 y hasta la 11. La distribución final obtenida en las columnas de la placa fue de 64 µg/mL hasta 0,125 µg/mL (20 µL/pocillo).⁶

Inoculación de las placas

De la suspensión de inóculo preparada se distribuyeron 180 µL por pozo, desde la columna 12 hasta la 2 y se realizó por duplicado para cepa. La concentración final del microorganismo en cada pocillo fue de aproximadamente 9×10^3 UFC/mL. En la columna 1 fueron distribuidos 180 µL de medio sin inocular en cada pocillo y quedó como control negativo de crecimiento. En la columna 12 no se adicionó antifúngico, por lo tanto quedó como control positivo de crecimiento. El volumen final de cada pocillo de la placa fue de 200 µL. Las placas fueron incubadas posteriormente en cámara húmeda y oscuridad a 37 °C durante 24 h.⁶

Determinación del punto final

Como valor de CMI se tomó la menor concentración de antifúngico frente a la cual las cepas estudiadas no mostraron crecimiento visible. El criterio de crecimiento fue una turbidez definida o un solo botón sedimentado que se compararon con las características de crecimiento en el pocillo control de la columna 12.⁶

Análisis estadístico

Se determinaron los rangos y las medias geométricas de los valores de CMI obtenidos. Se

determinaron los porcentajes acumulativos de CMI para *C. albicans* y el total de las cepas, y se obtuvieron la CMI₅₀ y la CMI₉₀ (concentración mínima inhibitoria de 50 y 90 % de las cepas, respectivamente).

RESULTADOS

Las 68 cepas aisladas correspondieron a 68 pacientes, que según encuestas realizadas mostraron asociados los factores predisponentes que se indican en la tabla 1.

TABLA 1. Factores predisponentes encontrados en 68 pacientes con aislamientos vaginales de *Candida*

Factores predisponentes	Número (%)
Embarazo	20 (29,4)
Uso de dispositivos intrauterinos	14 (20,6)
Terapia con antibacterianos*	13(19,1)
Anemia	6 (8,8)
Utilización de esteroides	1 (1,5)
Uso de anticonceptivos orales	1 (1,5)

*En un período cercano a la toma del exudado vaginal.

Los síntomas clínicos encontrados, en orden de frecuencia fueron: leucorrea 42 (61,8 %), prurito 17 (25 %), dispareunia 8 (11,8 %) y disuria 3 (4,4 %). No se encontraron signos característicos de la candidiasis vaginal.

De las 68 pacientes, 41 habían presentado con anterioridad episodios repetidos de candidiasis vaginal (60,3 %). De ellos, 27 fueron tratadas con óvulos de nistatina (39,7 %), 9 con clotrimazol y 5 recibieron tratamiento combinado de nistatina y clotrimazol; las 27 restantes no habían recibido tratamiento antimicótico previo.

En la tabla 2 se muestra el número de cepas por especies con sus respectivos rangos y medias geométricas de las CMI de nistatina, así como las CMI₅₀ y CMI₉₀. De las cepas de *C. albicans*, 50 % fue inhibido a una concentración de 1 µg/mL (CMI₅₀), mientras que 90 % de las cepas fue inhibido a concentraciones de 4 µg/mL (CMI₉₀). El 100 % de inhibición del resto de las cepas diferentes de *C. albicans* (*Candida* “no” *albicans*) se alcanzó a concentraciones de 2 µg/mL. Mientras que se necesitaron concentraciones de 8 µg/mL para inhibir 100 % de las cepas de *C. albicans*. Los valores del rango y la media geométrica de la totalidad de las 68 cepas fueron de 0,5-8 µg/mL y de 1,36 µg/mL, respectivamente. La cepa control utilizada mostró un comportamiento estable, en un rango de 0,5-1 µg/mL.

DISCUSIÓN

Entre las especies identificadas pertenecientes al género *Candida* se encuentran *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, y *C. lusitaniae*. El esquema de identificación utilizado permitió la identificación hasta especie de 61 de las cepas estudiadas, solo 7 cepas fueron identificadas hasta género, por lo que sería conveniente la utilización de una batería más amplia de carbohidratos en la realización del auxonograma o recurrir a otras pruebas bioquímicas como la fermentación de carbohidratos o zimograma.

Coincidiendo con lo reportado por otros autores, *C. albicans* fue la especie predominante en estos aislamientos vaginales (75 %). Los trabajos realizados por otros autores plantean que *C. albicans* es la causa más común de candidiasis

TABLA 2. Rango, media geométrica (MG) de CMI (µg/mL) y valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ de nistatina de las especies de *Candida* encontradas

Especies	No. de cepas	Rango (µg/mL)	MG (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	51	0,5-8	1,42	1	4
<i>C. parapsilosis</i>	3	1-2	1,26	-	-
<i>C. glabrata</i>	3	1-2	1,26	-	-
<i>C. krusei</i>	3	1-2	1,26	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	1	-	-	-	-
<i>Candida</i> spp.	7	0,5-2	1,10	-	-
Total	68	0,5-8	1,36	1	2

vaginal, casi 80 % de los casos, mientras que otras especies de *Candida* permanecen como responsables de 12-15 % de estas infecciones.⁷⁻¹⁰

Los principales síntomas de la candidiasis encontrados en este trabajo coinciden con los reportados por otros autores, los cuales plantean que, en orden de frecuencia, los síntomas que más comúnmente se presentan son leucorrea, prurito, dispareunia y disuria.^{11,12}

En el caso de los factores predisponentes los resultados obtenidos se corresponden con lo informado en la literatura especializada, porque el embarazo aparece como el factor de riesgo más importante, seguido de la terapia con antibacterianos y el uso de anticonceptivos.¹² La nistatina, al igual que los compuestos azólicos, es considerada por muchos como el medicamento de elección para el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal y aunque la prescripción de medicamentos en las mujeres embarazadas requiere de un cuidadoso análisis entre la necesidad de tratamiento de la madre y el riesgo de daño fetal, en la actualidad se considera este antifúngico como un fármaco seguro durante todos los períodos del embarazo y la posibilidad de algún tipo de afectación en el feto es muy poco probable.¹³ La diabetes no apareció como un factor de riesgo importante, ya que estas pacientes asisten a otra consulta de ginecología especializada.

La lectura de las placas se realizó visualmente, porque la nistatina por su carácter fungicida provoca una inhibición total del crecimiento, lo que facilita la determinación visual de la CMI. La presencia o no de un botón bien definido es el criterio cualitativo escogido por muchos autores para determinar la CMI, en particular en el caso de los polienos.¹⁴

En concordancia con lo observado por Hussain-Qadri y otros,¹⁵ que determinaron las CMI de la nistatina frente a aislamientos de *Candida* spp. mediante un macrométodo de dilución en caldo, donde 99 % de los aislamientos fue inhibido por concentraciones menores o iguales que 8 µg/mL. En el presente trabajo, 100 % de los aislamientos también se inhibió a concentraciones menores o iguales que 8 µg/mL. Al igual que los resultados obtenidos por estos autores, en este trabajo el mayor porcentaje del total de cepas fue inhibido por concentraciones menores o iguales que 4 µg/mL (97,1 % de las cepas).

La nistatina constituye la opción terapéutica utilizada con mayor frecuencia en Cuba para el tratamiento de la candidiasis vaginal. En muchos casos las pacientes se automedican, lo que implica que siguen un desarrollo inadecuado de tratamiento y esto conduce, a su vez, a fallos terapéuticos. Existen pocos trabajos publicados sobre la sensibilidad *in vitro* a la nistatina, por lo que los criterios de resistencia y sensibilidad son aspectos que no están claramente definidos. Según varios autores, la aparición de resistencia *in vitro* a la nistatina es un evento que aparece con muy poca frecuencia;^{15,16} aunque no existe un criterio definido de resistencia se puede decir que en este trabajo no se encontraron cepas con valores de CMI mayores que 16 µg/mL, criterio que asumen Hussain-Qadri y otros, para definir la resistencia de 4 aislamientos de *C. albicans* y *C. tropicalis*.¹⁵

Resulta evidente que solo la correlación entre los resultados *in vitro* con los obtenidos *in vivo* permitirá conocer en realidad la resistencia a las drogas. Se ha definido como “resistencia clínica” a la persistencia de los signos y síntomas de una micosis a pesar de un esquema curativo usual. No siempre esta resistencia clínica es causada por el microorganismo, es por esto que se prefiere emplear los términos de “resistencia” cuando el fenómeno es atribuible al microorganismo (el hongo) y “fracaso terapéutico” cuando su origen no es inherente a este agente causal.^{17,18}

El presente estudio (aunque preliminar) permite sugerir que las causas de los fallos terapéuticos de la nistatina, dados por las frecuentes recidivas con que se presentan las candidiasis vaginales, no son atribuibles a las cepas, porque estas, de manera general, mostraron una media geométrica de CMI de 1,36 µg/mL, dentro de un rango de 0,5-8 µg/mL, que pueden considerarse bajos.

SUMMARY

The minimum inhibitory concentration (MIC) of nistatine, one of the most used antifungal agents for this micosis, was determined in 68 *Candida* strains isolated from vaginal smears. *Candida albicans* represented 75% of the total strains whereas *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. glabrata* were much less frequently

found. The predisposing factors were pregnancy and antibacterial treatment whereas leukorrhea and itching were the prevailing symptoms in most of the cases. MIC values from the use of a broth dilution method ranged from 0,5-8mg/mL and the geometric mean was 1.36 mg/mL. For *C. albicans*, MIC was 4mg/mL due to two strains that showed the highest MIC values (8mg/mL). Similarly, the strains showed low MIC values, this means that therapeutic failures are not inherent to the emergence of resistant strains.

Subject headings: CANDIDA/isolation & purification; DRUG RESISTANCE, MICROBIAL; CANDIDIASIS, VULVOVAGINAL/diagnosis; CANDIDIASIS, VULVOVAGINAL/drug therapy; NISTATINE/therapeutic use; MICROBIAL SENSITIVITY TESTS; IN VITRO.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grigoriu D, Delacrétaiz J. Candidiasis genitales y perigenitales. Shaffhausen: Cilag SA; 1979.
2. Espinel-Ingroff A, Kish CW, Kerkering JM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN *et al.* Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992;30:3138-45.
3. Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:85-9.
4. Pike WJ, Clarke J, Lacey CJN, Hunter PA, Evans GV. Candida cell wall mannan in the vagina and its association with the signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 1991;29:305-12.
5. McGinnis MR. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York. Academic Press, 1998.
6. Fernández Andreu CM, González Miranda M, Illnait Zaragoza MT, Martínez Machín G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50:48-53.
7. Odds FC. Candida infections; an overview. *Crit Rev Microbiol* 1987;15(Issue 1):1-5.
8. Horowitz BJ, Giaquinta D, Ito S. Envolving pathogens in vulvovaginal candidiasis: Implications for patient care. *J Clin Pharmacol* 1992;32:248-65.
9. Lynch ME, Sobel JD. Comparative *in vitro* activity of antimycotic agents against pathogenic vaginal yeast isolates. *J Med Vet Mycol* 1994;32:267-74.
10. Herbrecht R, Letscher V, Kurtz JE, Waller J, Koenig H. Amphotericin B lipid complex in the management of emerging fungal pathogens. *J Infect Dis* 1997;(Suppl. 1):42-6.
11. López-Martínez R, Ruiz-Sánchez D, Vertiz-Chávez E. Vaginal candidosis. Opportunistic factors and clinical correlation in 600 patients. *Mycopathologia* 1984;85:167-70.
12. Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD. Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 1988;26:277-83.
13. King CT, Roger PD, Cleary JD, Chapman SW. Antifungal therapy during pregnancy. *Clin Infect Dis* 1998;27:1151-60.
14. Rodero LL, Davel GO, Vivot W, Canteros CE, Fernández C. Pruebas de sensibilidad *in vitro* para levaduras: Evaluación de un micrométodo. *Rev Argent Micol* 1995;27:81-9.
15. Hussain Qadri SMH, Flournoy DJ, Qadri SGM, Ramírez EG. Susceptibility of clinical isolates of yeast to antifungal agents. *Mycopathologia* 1986;95:183-7.
16. Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2 ed. London: Ballière Tindall, 1988.
17. Rippon JW. *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 2 ed. Philadelphia: WB. Saunders Co; 1988.
18. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JM, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, *et al.* Development of interpretative breakpoint for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole and Candida infections. *Clin Infect Dis* 1997;24:235-47.

Recibido:9 de mayo del 2000. Aprobado: 24 de abril del 2001.
Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico:ciipk@ipk.sld.cu