

UNIVERSIDAD DE CARABOBO NÚCLEO ARAGUA, VENEZUELA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos vaginales de *Candida* frente a clotrimazol y nistatina

Dra. Vilma Llovera Suárez¹ y Dr. Carlos M. Fernández Andreu²

RESUMEN

Se determinó la susceptibilidad *in vitro* frente a clotrimazol y nistatina de 123 aislamientos de *Candida*, obtenidos mediante exudados vaginales de 404 mujeres que asistieron al Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro" de Ciudad de La Habana. De acuerdo con el número de colonias obtenidas en el aislamiento primario, las cepas fueron separadas en 2 categorías: colonización e infección. Para cada cepa se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antifúngico, mediante un método de microdilución en caldo casitona. Las medias geométricas de los valores de CMI fueron mayores frente a nistatina (1,08 mg/mL) que frente a clotrimazol (0,22 mg/mL), aunque los rangos fueron similares (€ 0,125-16 mg/mL). Para *Candida albicans*, que fue la especie aislada con mayor frecuencia (54,5 %); las medias geométricas de los valores de la CMI fueron de 0,17 y 0,16 mg/mL para clotrimazol y de 0,71 y 0,92 mg/mL para nistatina, en ambas categorías. *C. glabrata* mostró el valor de CMI más elevado (16 mg/mL) frente a ambos antifúngicos. Solo los aislamientos de *C. lusitaniae* mostraron diferencia significativa ($p < 0,01$) entre los valores de CMI de nistatina de acuerdo con el número de colonias en el aislamiento primario. En aislamientos procedentes de mujeres tratadas con clotrimazol y/o nistatina en episodios anteriores de candidiasis, se observaron valores más elevados de las medias de CMI frente a nistatina que frente a clotrimazol; aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

DeCS: TEST DE SENSIBILIDAD MICROBIANA/ métodos; CANDIDA; CLOTRIMAZOL; NISTATINA; IN VITRO.

Con la aparición de las primeras cepas de *Candida albicans* que no respondían a los tratamientos antimicóticos, surgió la necesidad de la realización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* a estas drogas.^{1,2}

En diferentes estudios realizados se ha observado que algunas cepas de *C. albicans* pueden cambiar de sensibles a resistentes después de la administración de drogas antimicóticas;³ en particular, se ha señalado que una exposición previa a fluconazol hace que las cepas se tornen resistentes a anfotericina B, lo cual pudiera tener grandes implicaciones clínicas.^{4,5}

En los últimos años se ha reportado un incremento de las infecciones orales y vaginales recurrentes causadas por *Candida*, lo que ha sido

asociado a diferentes biotipos de *C. albicans* para cada episodio y/o al cambio del fenotipo de la colonia en la infección vaginal; y a la vez relacionado con el recuento de linfocitos T CD4⁺ en pacientes inmunocomprometidos.⁶ Adicionalmente, otros reportes señalan que los cambios en el biotipo se acompañan por cambios en la sensibilidad y el desarrollo de resistencia a los agentes antifúngicos cuando se han aplicado tratamientos por tiempo prolongado.⁷

En este sentido, Leite y otros (1997), en un estudio para evaluar la similitud de cepas de *C. albicans* aisladas de mujeres embarazadas con vaginitis recurrente mediante morfotipo, genotipo y resistencia a los antifúngicos, concluyen que la recurrencia de la enfermedad está

¹ Profesora Agregada. Universidad de Carabobo Núcleo Aragua, Venezuela.

² Investigador Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

determinada por la persistencia de un genotipo único que sufre cambios morfológicos y conductuales en presencia de agentes antifúngicos debido a presión selectiva.³

En Cuba, las infecciones vaginales por *Candida* generalmente son tratadas con nistatina o clotrimazol, por ser los antifúngicos más asequibles; sin embargo, se observan recidivas en muchos casos. Por otra parte, son pocos los estudios realizados en el país para conocer la sensibilidad *in vitro* de las cepas a estos agentes.⁸⁻¹⁰ Por esas razones, este estudio se propone determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de clotrimazol y nistatina en cepas de *Candida* aisladas de exudados vaginales e investigar su relación con la administración previa de antimicóticos.

MÉTODOS

El estudio se realizó a 123 cepas de *Candida* aisladas de una población de 404 mujeres que acudieron al Laboratorio de Microbiología del Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro" de Ciudad de La Habana durante los meses de julio y agosto de 1999, referidas de las consultas de ginecología y obstetricia para practicarles exudado vaginal. De cada paciente se recogieron datos clínicos y epidemiológicos relacionados con el motivo de consulta.

Para el aislamiento primario, cada exudado fue sembrado en placas de agar Sabouraud cloranfenicol e incubadas por 48-72 h a 28 °C. Se realizó un recuento del número de colonias obtenidas, lo que permitió clasificarlas en 2 categorías de acuerdo con el criterio de *Higashide* y otros: colonización (hasta 10 colonias) e infección (más de 10 colonias).¹¹ Las colonias de levaduras fueron subcultivadas en agar Sabouraud e identificadas mediante la producción de tubos germinativos y clamidoconidias y la prueba de asimilación de carbohidratos.¹²

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Cepa control: se utilizó la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 90028.¹⁰

Antifúngicos: nistatina en polvo con actividad de 4 166 UI/mg y clotrimazol en polvo

con actividad de 100 %. Como solvente se utilizó dimetilsulfóxido.

Medio de cultivo: caldo casitona (Difco).

Soporte: placas estériles de poliestireno para microtitulación de 96 pocillos con fondo en U para nistatina y fondo plano para clotrimazol.

Preparación del inóculo: a partir de los aislamientos en agar Sabouraud, se preparó una suspensión celular en agua destilada estéril según el patrón 0,5 de la escala de McFarland, equivalente a 10⁶ UFC/mL; de ahí se tomaron 100 mL y se transfirieron a tubos que contenían 10 mL de caldo casitona para obtener una concentración celular de 10⁴ UFC/mL.⁸

Dilución del antifúngico: se prepararon diluciones dobles seriadas de cada antifúngico en agua destilada, desde 64 mg/mL hasta 0,125 mg/mL. En cada pocillo se añadieron 20 mL de la dilución correspondiente.

Inoculación: cada pocillo fue inoculado con 180 mL de la suspensión celular, para quedar una concentración final de 9 x 10³ UFC/mL. A la columna 1 solo se le añadieron 180 mL de caldo casitona estéril y quedó como control del medio de cultivo y el blanco para la lectura espectrofotométrica. La columna 12 (sin droga) quedó como control de crecimiento de la cepa probada. Las placas una vez inoculadas fueron incubadas en cámara húmeda y oscuridad a 35 °C durante 24 h.⁸ Cada cepa fue evaluada por duplicado.

Determinación del punto final: se consideró la CMI como la menor concentración del antifúngico que inhibió el crecimiento de la cepa en estudio, determinado de manera visual para nistatina. La lectura de clotrimazol se realizó en espectrofotómetro iEMS reader (Labsystems, Barcelona) a 405 nm; determinando la concentración del antifúngico capaz de inhibir 80 % del crecimiento en comparación con el control positivo.¹³

Análisis estadístico: para cada una de las lecturas realizadas (visual y automatizada), se determinaron las medias geométricas (MG) de los valores de CMI obtenidos, el rango, las concentraciones de la droga capaces de inhibir 50 y 90 % de las cepas (CMI₅₀ y CMI₉₀, respectivamente). Las medias geométricas fueron comparadas mediante la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de significación de p ≤ 0,05; las

proporciones fueron comparadas mediante chi cuadrado (X^2) con corrección de Yates y sin esta, utilizando el mismo nivel de significación estadística en el programa EpiInfo.

RESULTADOS

De las 404 mujeres a quienes se les practicó el exudado vaginal durante el estudio, se encontró que 138 de ellas (34,2 %) tuvieron crecimiento de hongos levaduriformes en el medio de agar Sabouraud cloranfenicol; de estos, 123 fueron identificados como especies de *Candida* (89,1 %). Las especies más frecuentemente aisladas fueron: *C. albicans* (54,5 %), seguida de *C. glabrata* (19,5 %) y *C. lusitaniae* (8,1 %). En la categoría colonización se agruparon 60 de estos (48,8 %) y en la categoría infección se registró un total de 63 aislamientos (51,2 %).

En la tabla 1 se muestra la distribución de los valores de CMI frente a clotrimazol de los aislamientos de *Candida* agrupados por especies y en las categorías ya mencionadas. De manera general, 44 aislamientos en la categoría colonización

(73,3 %) y 49 en la categoría infección (77,7 %) mostraron un valor de CMI \leq 0,125 mg/mL; sin embargo, 2 aislamientos de *C. glabrata* (uno de cada categoría) alcanzaron los valores más altos de CMI (16 mg/mL).

En la tabla 2 se resumen los valores de las MG y rangos de CMI de clotrimazol, así como, las CMI₅₀ y CMI₉₀ de los aislamientos de las diferentes especies de *Candida*. En el total de los aislamientos de las categorías colonización e infección se observaron valores semejantes en las medias geométricas de CMI (0,23 μ g/mL y 0,22 μ g/mL, respectivamente), rango (\leq 0,125 - 16 μ g/mL) y CMI₅₀ (\leq 0,125 μ g/mL); sin embargo, la CMI₉₀ en la categoría infección (2 μ g/mL) es mayor que en colonización (1 μ g/mL). Los aislamientos de *C. glabrata* mostraron los valores de CMI más elevados en ambas categorías y el rango más amplio entre todas las especies. *C. parapsilosis* también tuvo una CMI₉₀ de 2 μ g/mL en la categoría infección. Los valores más bajos de la MG y rangos fueron encontrados en *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. kefyr* y las 4 cepas de *Candida* spp. Las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* mostraron valores

TABLA 1. Distribución de los valores de CMI (mg/mL) de clotrimazol en las especies de *Candida*, según las categorías de colonización e infección

Categoría colonización									
Especies	CMI (mg/mL)								
	\leq 0,125	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	Total
<i>C. albicans</i>	27	2	1	1	2				33
<i>C. glabrata</i>	3	1	1	4				1	10
<i>C. lusitaniae</i>	5								5
<i>C. parapsilosis</i>	4								4
<i>C. tropicalis</i>	3		1						4
<i>C. humicola</i>			1	1					2
<i>C. krusei</i>	1								1
<i>Candida</i> spp	1								1
Total	44	3	4	6	2			1	60
Categoría infección									
Especies	CMI (mg/mL)								
	\leq 0,125	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	Total
<i>C. albicans</i>	28	1	3	1	1				34
<i>C. glabrata</i>	8				4		1	1	14
<i>C. lusitaniae</i>	5								5
<i>C. parapsilosis</i>	2				1				3
<i>C. tropicalis</i>	2		1						3
<i>C. kefyr</i>	1								1
<i>Candida</i> spp	3								3
Total	49	1	4	1	6		1	1	63

de medias, rangos, CMI₅₀ y CMI₉₀, iguales en ambas categorías. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los valores de CMI de las diferentes especies agrupadas en las categorías colonización e infección.

La distribución de los valores de CMI frente a nistatina se muestran en la tabla 3 donde en general, estos son más elevados en casi todas las especies en relación con clotrimazol; así, 36 % de las cepas de *C. albicans* en la categoría de colonización y 44 % en la categoría de infección mostraron una

CMI de 1 µg/mL, lo que también se observa en *C. lusitaniae* (60 %) y *C. parapsilosis* (66,6 %) en la categoría infección; sin embargo, en estas 2 especies en la categoría colonización los valores de CMI son iguales o superiores a 1 µg/mL. En *C. glabrata* los valores están distribuidos de 0,25 a 2 µg/mL en la categoría colonización, mientras que en la categoría infección alcanzan 16 µg/mL.

Con respecto a la nistatina (tabla 4), se registraron valores de medias y rangos mayores en la categoría infección en los aislamientos de

TABLA 2. Distribución de los resultados de las medias geométricas (MG), rangos, CMI₅₀ y CMI₉₀ (µg/mL) de clotrimazol en las especies de *Candida* aisladas

Especies	Colonización n = 60				Infección n = 63			
	MG	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	MG	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>C. albicans</i>	0,17	£ 0,125-2	£ 0,125	0,25	0,16	£ 0,125-2	£ 0,125	0,25
<i>C. glabrata</i>	0,57	£ 0,125-16	0,50	1	0,52	£ 0,125-16	£ 0,125	2
<i>C. lusitaniae</i>	0,12	£ 0,125	£ 0,125	£ 0,125	0,12	£ 0,125	£ 0,125	£ 0,125
<i>C. parapsilosis</i>	0,12	£ 0,125	£ 0,125	£ 0,125	0,31	£ 0,125-2	£ 0,125	2
<i>C. tropicalis</i>	0,17	£ 0,125 -0,50	£ 0,125	0,50	0,19	£ 0,125 -0,50	£ 0,125	0,50
<i>C. humicola</i>	0,50	0,50-1	0,50	1				
<i>C. kefyr</i>					-	£ 0,125		
<i>C. krusei</i>	-	£ 0,125						
<i>Candida</i> spp.	-	< 0,125			0,12	£ 0,125		
Total	0,23	£ 0,125-16	£ 0,125	1	0,22	£ 0,125-16	£ 0,125	2

TABLA 3. Distribución de los valores de CMI (mg/mL) de nistatina en las especies de *Candida*, según las categorías de colonización e infección

Categoría colonización									
Especies	CMI (mg/mL)								Total
	£ 0,125	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	
<i>C. albicans</i>	4	1	9	12	7				33
<i>C. glabrata</i>		2	2	3	3				10
<i>C. lusitaniae</i>				1	3	1			5
<i>C. parapsilosis</i>				3	1				4
<i>C. tropicalis</i>		1	2	1					4
<i>C. humicola</i>	5	1							2
<i>C. krusei</i>		1							1
<i>Candida</i> spp.									1
Total	5	6	13	6	15			1	60
Categoría infección									
Especies	CMI (mg/mL)								Total
	£ 0,125	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	
<i>C. albicans</i>	1	3	6	15	7	2			34
<i>C. glabrata</i>	2	2	5	2	2			1	14
<i>C. lusitaniae</i>			2	3					5
<i>C. parapsilosis</i>				2		1			3
<i>C. tropicalis</i>			2	1					3
<i>C. kefyr</i>			1						1
<i>Candida</i> spp.	1	1			1				3
Total	4	6	16	23	10	3		1	63

TABLA 4. Distribución de los resultados de las medias geométricas (MG), rangos, CMI₅₀ y CMI₉₀ (µg/mL) de nistatina en las especies de *Candida* aisladas

Especies	Colonización n = 60				Infección n = 63			
	MG	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	MG	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>C. albicans</i>	0,71	£ 0,125-2	1	2	0,92	£ 0,125-4	1	2
<i>C. glabrata</i>	0,81	0,25-2	1	2	0,63	£ 0,125-16	0,50	2
<i>C. lusitaniae</i>	3,19**	1-4	2	4	0,75**	0,50-1	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	1,49	1-2	1	2	1,58	1-4	1	4
<i>C. tropicalis</i>	0,12	0,25-1	0,50	1	0,62	0,50-1	0,50	1
<i>C. humicola</i>	0,18	£ 0,125-0,25	£ 0,125	0,25				
<i>C. kefyri</i>					-	0,50		
<i>C. krusei</i>	-	0,25						
<i>Candida</i> spp.	1,99	2			0,39	£ 0,125-2	0,25	2
Total	1,08	£ 0,125-4	1	2	0,77	£ 0,125-16	1	2

** Diferencia significativa (p £ 0,01) entre ambas categorías.

TABLA 5. Relación de las CMI (µg/mL) de clotrimazol en aislamientos vaginales de *Candida*, procedentes de pacientes con tratamientos previos en episodios anteriores de infección vaginal

Terapia previa (n)	Colonización		Infección	
	n	MG	n	MG
Nistatina (23)	13	0,17	10	0,32
Clotrimazol (27)	14	0,11	13	0,21
Nistatina + clotrimazol (26)	9	0,17	17	0,23
Antibacterianos (18)	9	0,21	9	0,20
Ninguna (29)	15	0,30	14	0,15
Total (123)	60	-	63	-

n: número de aislamientos obtenidos de pacientes previamente tratadas.

MG: media geométrica de las concentraciones inhibitorias mínimas.

C. albicans, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; en cambio, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* y *Candida* spp tuvieron medias geométricas superiores en la categoría colonización. Con respecto a la CMI₅₀ y la CMI₉₀, estas fueron iguales en ambas categorías para *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *Candida* spp; solo *C. lusitaniae* tuvo valores menores en infección y *C. parapsilosis* que tuvo el mayor valor de CMI₉₀ en infección. Los valores más elevados de MG se registraron en *C. lusitaniae* y *Candida* spp. en colonización y *C. parapsilosis* en ambas categorías; el rango más amplio y elevado se registró en *C. glabrata*. Solo se encontró diferencia significativa (p £ 0,01) entre las MG de ambas categorías en los aislamientos de *C. lusitaniae* (3,19 y 0,75 mg/mL).

Al analizar la relación entre la aplicación de terapia con antifúngicos tópicos y antibacterianos

TABLA 6. Relación de las CMI (µg/mL) de nistatina en aislamientos vaginales de *Candida*, procedentes de pacientes con tratamientos previos en episodios anteriores de infección vaginal

Terapia previa (n)	Colonización		Infección	
	n	MG	n	MG
Nistatina (23)	13	0,89	10	0,70
Clotrimazol (27)	14	0,77	13	1,53
Nistatina + clotrimazol (26)	9	0,79	17	1,0
Antibacterianos (18)	9	0,73	9	0,50
Ninguna (29)	15	0,65	14	0,74
Total (123)	60	-	63	-

n: número de aislamientos obtenidos de pacientes previamente tratadas.

MG: media geométrica de las concentraciones inhibitorias mínimas.

orales en episodios previos de infección vaginal, en relación con el resultado de los valores de CMI de los aislamientos obtenidos frente a clotrimazol (tabla 5), se encontró, que 27 aislamientos procedían de mujeres tratadas con clotrimazol, 26 con nistatina más clotrimazol, 23 con nistatina y 18 con antibacterianos; la MG fue ligeramente más elevada en la categoría infección en los aislamientos pertenecientes a las mujeres que se habían tratado con antimicóticos. No hubo significación estadística entre las categorías de aislamiento y la aplicación o no de tratamiento previo.

Analizando la misma relación con respecto a nistatina (tabla 6) se registraron los valores más elevados de la MG (1,53 µg/mL) en la categoría infección en los aislamientos de las mujeres que recibieron terapia previa con clotrimazol y en la

categoría colonización la media más elevada fue de 0,89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los correspondientes a las mujeres que recibieron nistatina. Se observó que, en general, las MG fueron más elevadas que las registradas en el ensayo con clotrimazol. No hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar las categorías de los aislamientos con la aplicación previa de algún tratamiento.

En relación con la la aplicación de tratamientos previos con antimicóticos, datos registrados en la encuesta confirman que en 76 de los 123 aislamientos de *Candida* (61,7 %) las mujeres habían utilizado algún tratamiento con antifúngico en episodios anteriores de candidiasis y muchos (46,3 %) ocurrieron en un lapso menor de 1 año antes de la consulta; de las pacientes que se aplicaron tratamiento, 40 aislamientos correspondían a la categoría infección (52,6 %) y 36 a colonización (47,4 %). En ambas categorías predominó la aplicación del tratamiento individual (sin incluir a la pareja).

DISCUSIÓN

Hasta la fecha el clotrimazol ha sido utilizado como agente de referencia para evaluar antimicóticos de nuevas generaciones y esquemas de tratamiento con azoles en mujeres con candidiasis vaginal. Aunque se han realizado algunos estudios para determinar las CMI de clotrimazol en levaduras,¹⁴⁻¹⁸ no se encontró ninguno que relacionara el número de colonias aisladas en cultivo primario con los resultados de las CMI.

Aun cuando para clotrimazol no se han establecido valores de corte que indiquen sensibilidad o resistencia, llaman la atención los valores elevados de CMI de *C. glabrata* en ambas categorías, si se toma en cuenta que este antifúngico se ha empleado ampliamente en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal, y que por otra parte, la frecuencia de aparición de esta especie ha ido en aumento desde hace alrededor de 10 años.¹⁹

Los resultados de la determinación de las CMI de clotrimazol muestran valores más elevados en las MG, el rango, la CMI₅₀ y la CMI₉₀ de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* en comparación con los registrados por Torres-Rodríguez y otros,¹⁵ quienes utilizaron la

metodología del NCCLS en una serie de 124 aislamientos y obtuvieron un rango entre 0,03 y 2 mg/mL para estas especies. Asimismo, las CMI₅₀ y CMI₉₀ son mayores que las publicadas por Lynch y Sobell¹⁴ en 2 series de 177 y 200 aislamientos, utilizando una técnica de macrodilución en caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB), cuyo valor fue de 0,01 a 0,02 mg/mL para las mismas especies excepto, *C. glabrata* que osciló entre 0,01 y 0,78 mg/mL. Los aislamientos de *C. lusitaniae* también muestran valores de la CMI₅₀ y CMI₉₀ mayores que los de ese mismo estudio. En otro trabajo sobre las CMI de clotrimazol en 26 cepas de diferentes especies de *Candida*, utilizando el caldo YNB se obtuvo un rango de 0,062-8 mg/mL,¹⁶ valor un poco más bajo que el rango para el total de los aislamientos cubanos; sin embargo, Hussain y otros encontraron valores de CMI en medio YNB iguales a los encontrados aquí (16 mg/mL) para *C. glabrata* y valores más elevados para *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*.¹⁸

Es interesante observar que la mayoría de los rangos de CMI frente a nistatina de las diferentes especies de *Candida* son mayores que los de las mismas especies frente al clotrimazol. Algunas investigaciones revelan que cuando las cepas son expuestas repetidamente a nistatina *in vitro*, estas tienden a incrementar el valor de la CMI.¹ Por otra parte, también se ha comunicado el antagonismo entre azoles y anfotericina B, que tal vez podría ser extensivo a nistatina la cual pertenece al mismo grupo de antifúngicos.^{4,5} Este razonamiento podría sustentarse en que algunas de las mujeres notificaron usar un óvulo de nistatina o clotrimazol como tratamiento preventivo al concluir la menstruación porque declararon padecer episodios frecuentes de candidiasis vulvovaginal y, probablemente, esta puede ser una práctica muy extendida en la población.

Los valores de las medias geométricas, rango, CMI₅₀ y CMI₉₀ de nistatina son menores que los reportados por Fernández Andreu y otros, aunque el rango obtenido en su estudio fue más estrecho pero su límite superior fue de 8 mg/mL, mientras que en el presente estudio fue de 16 mg/mL.¹⁰ El rango para las mismas especies en una investigación llevada a cabo por Haller y Plempel¹⁶ también es igual o menor, en contraste, Hussain y

otros¹⁸ comunican rangos más elevados para todas las especies, excepto para *C. glabrata*.

Al observar que los valores de las medias y rangos de las CMI de nistatina son más elevados que los obtenidos para clotrimazol, en general, resalta una CMI de 16,0 mg/mL entre los aislamientos de mujeres que usaron previamente clotrimazol o nistatina + clotrimazol, pertenecientes a la especie *C. glabrata*, en concordancia con lo expuesto antes por otros autores.^{14,15,19} También podría pensarse en la resistencia cruzada entre compuestos azólicos ya descrita en esta especie,¹⁹ o que dosis acumulativas de estos mismos compuestos estén favoreciendo la aparición de especies de *Candida* con CMI elevadas y es probable que difíciles de tratar clínicamente, como también se ha comprobado en cepas causantes de candidiasis orofaríngea.²⁰

Este constituye el primer estudio realizado en Cuba para determinar la sensibilidad al clotrimazol y el segundo frente a la nistatina en aislamientos vaginales de *Candida*. Los resultados sugieren la necesidad de mantener una vigilancia que permita detectar la aparición de cepas resistentes causantes de fallos terapéuticos o recidivas.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Caridad Almanza y al personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro" y del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", en Ciudad de La Habana, por toda la colaboración y el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

SUMMARY

The susceptibility *in vitro* of 123 isolates of *Candida* against clotrimazole and nystatin was determined. The isolates were obtained by vaginal smears from 404 women that attended "Ramón González Coro" Gynecobstetric Hospital, in Havana City. According to the number of colonies obtained in the primary isolation, the strains were separated into 2 categories: colonization and infection. The inhibitory minimum concentration (IMC) was determined for each antifungal by a method of microdilution in casitone broth. The geometrical means of the IMC values were higher against nystatin (1.08 mg/mL) than against clotrimazole (0.22 mg/mL), even though the features were similar (\bar{x} 0.125-16 mg/mL). For *Candida albicans*, that was the most frequently isolated species (54.5 %), the geometrical means of the IMC values were 0.17 and 0.16 mg/mL for clotrimazole and 0.71 and 0.92 for nystatin, in both categories. *C. glabrata* showed

the highest IMC values (16 mg/mL) against antifungals. Only the isolates of *C. lusitanae* showed a significant difference ($p < 0.001$) between the IMC values of nystatin according to the number of colonies in the primary isolation. In isolates from women treated with clotrimazole and/or nystatin in previous episodes of candidiasis, there were observed more elevated values of the means of IMC against nystatin than against clotrimazole, although this difference was not statistically remarkable.

Subject headings: MICROBIAL SENSITIVITY TESTS/ /methods; CANDIDA; CLOTRIMAZOLE; NYSTATIN; IN VITRO.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carrillo-Muñoz AJ, Abarca-Salat L, Quindós G, Arévalo C. Pruebas de estudio de sensibilidad a los antifúngicos. I Factores y variables que influyen en su realización en el laboratorio. Revisión. Rev Iberoam Micol 1994;16:92-6.
2. Odds F. Resistencia a los antifúngicos de las levaduras de interés clínico. Rev Clin Esp 1995;195(Supl 3):56-7.
3. Leite C, Rodrigues C, Mazzocato T, Franceschini S. Phenotype and genotype of *Candida albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis. Mycopathologia 1997;137:87-94.
4. Vasquez J, Arganoza M, Boikov D, Yoon S, Sobell J, Akins R. Stable phenotypic resistance of *Candida* Species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. J Clin Microbiol 1998;36(9):2690-5.
5. Polak A. The past, present and future of antimycotic combination therapy. Mycoses 1999;42:355-70.
6. Burns D, Tuomala R, Chang B-H, Hershov R, Minkoff H, Rodriguez E, et al. Vaginal colonization or infection with *Candida albicans* in human immunodeficiency virus-infected women during pregnancy and during the postpartum period. Clin Infect Dis 1997;24:201-10.
7. Espinel-Ingroff A, Kish C Jr, Kerkering T, Fromtling R, Bartizal K, Galgiani J, et al. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. J Clin Microbiol 1992;30(12):3138-45.
8. 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(1):48-53.
9. Fernández Andreu CM, Lemus Molina D, Martínez Machín G. Sensibilidad de aislamientos clínicos de *Candida albicans* frente a la 5-fluorocitosina. Rev Cubana Med Trop 2000;52(3):191-6.
10. Fernández Andreu CM, Echemendía Medina Y, Cartaya González T, Mendoza Llanes D. Sensibilidad *in vitro* a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida* spp. Rev Cubana Med Trop 2001;53(3):194-8.
11. Higashide K, Aman R, Yamamuro O. Clinical characteristic correlated with different fungi causing vulvovaginal mycosis. Mycoses 1988;31(4):213-25.
12. Koneman R. Diagnóstico Microbiológico. 3ªed. México DF: Editorial Panamericana;1998.
13. Van Eldere J, Joosten I, Verhaeghe A, Surmont I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. J Clin Microbiol 1996;34(4):842-7.
14. Lynch M, Sobel J. Comparative *in vitro* activity of antimycotic agents against pathogenic vaginal yeast isolates. J Med Vet Mycol 1994;32:267-74.

15. Torres-Rodríguez JM, Méndez R, López-Jodra O, Morera Y, Espasa M, Jiménez T, et al. *In vitro* susceptibilities of clinical yeast isolates to the new antifungal eberconazole compared with their susceptibilities to clotrimazole and ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(5):1258-9.
16. Haller I, Plempel M. Experimental *in vitro* and *in vivo* comparison of modern antimycotics. *Curr Med Res Opin* 1977/78;5(4):315-27.
17. Haller I. Mode of action of clotrimazole: Implications for therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152(part 2):939-94
18. Hussain S, Flournoy D, Qadri S, Ramirez E. Susceptibility of clinical isolates of yeasts to antifungal agents. *Mycopathologia* 1986;95:183-7.
19. Fidel P Jr, Vazquez J, Sobel J. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):80-96.
20. Dromer F, Improvisi L, Dupont B, Eliaszewicz M, Pialoux G, Fournier S, et al. Oral transmission of *Candida albicans* between partners in HIV-infected couples could contribute to dissemination of fluconazole-resistant isolates. *AIDS* 1997;11(9):1095-101.

Recibido: 2 de junio de 2003. Aprobado: 17 de julio de 2003.
Dra. Vilma Llovera Suárez. Universidad de Carabobo Núcleo Aragua, Av. Ruiz Pineda, Barrio La Morita II, Maracay, Estado Aragua, Venezuela.
Correo electrónico: federicollovera@cantv.net.ve; ciipk@ipk.sld.cu