

## Artículo original

## Estudio *in vitro* de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD

María José Gutiérrez-Martínez,\* Javier Araiza-Santibáñez,\* Marco Antonio Hernández,\* Jesús Miguel Chávez-Mayol,\*\* Olga Martha Rodríguez-Piñeyro,\*\* Alexandro Bonifaz\*

### RESUMEN

**Antecedentes:** las candidosis son micosis causadas por levaduras oportunistas del género *Candida*. El aumento de pacientes inmunodeprimidos y del tratamiento indiscriminado con antimicóticos pueden generar respuestas terapéuticas inadecuadas y resistencia, circunstancias que deben evaluarse mediante pruebas *in vitro*.

**Objetivos:** conocer la respuesta *in vitro* frente a: 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y miconazol de especies de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos del Hospital General de México OD.

**Material y método:** estudio experimental, transversal, horizontal, descriptivo efectuado con muestras de pacientes de diferentes servicios del Hospital General de México OD. Las muestras biológicas se recolectaron para diagnosticar candidosis con examen directo, cultivos y tipificación con medios CHROMagar-Candida® y agar Harina de maíz + Tween 80. Se realizaron pruebas de sensibilidad con el equipo comercial FUNGITEST® (BIO-RAD®).

**Resultados:** los resultados de susceptibilidad frente a los antimicóticos probados fue variable y, en algunos casos, se comprobó resistencia adquirida. Se encontraron casos de resistencia intrínseca a 5-fluorocitosina, casi todas las cepas fueron altamente sensibles a anfotericina B y la respuesta frente a los azoles tuvo variaciones entre las diferentes especies de *Candida*.

**Conclusiones:** se demuestra la importancia de evaluar la respuesta *in vitro* de los antimicóticos y la variabilidad de resistencia en *Candida* spp.

**Palabras clave:** *Candida* sp, *Candida albicans*, antimicótico, resistencia, prueba de sensibilidad, *in vitro*.

### ABSTRACT

**Background:** candidiasis are mycoses caused by opportunists yeasts of *Candida* genus, the immunosuppressed patients' increase, as well as the indiscriminate managing of antimycotics could generate inadequate therapeutic response and resistance, which must be evaluated by *in vitro* tests.

**Objective:** to know the *in vitro* response against to: 5-fluorocytosine, amphotericin B, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and miconazole of *Candida* spp., of clinical isolates of the General Hospital of Mexico OD.

**Material and methods:** biological samples were taken to diagnose candidiasis with direct examination, cultures and identification by CHROMagar-Candida and Corn-meal agar + Tween 80 and sensitivity or susceptibility tests were realized by commercial kit FUNGITEST® (BIO-RAD®).

**Results:** *Candida albicans* was the specie more frequently found of *Candida* genus, the results of susceptibility against to antimycotic proved it was variable and in some cases it was possible to verify acquired resistance. We found cases of intrinsic resistance to 5-fluorocytosine, almost all the strains were highly sensitive to amphotericin B and the response against azoles compounds presented variations between the different species of *Candida*.

**Conclusions:** this study demonstrates the importance of evaluating the *in vitro* response of the antimycotics and the variability response and resistance of *Candida* spp.

**Key words:** *Candida* sp, *Candida albicans*, antimycotic, resistance, sensitive test, *in vitro*

\* Departamento de Micología, servicio de Dermatología.

\*\* Dirección de Servicios de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento. Hospital General de México OD. México, DF.

Correspondencia: Dr. Alexandro Bonifaz. Servicio de Dermatología. Dr. Balmis 148, colonia Doctores. México 06720, DF. Correo electrónico: a\_bonifaz@yahoo.com.mx

Recibido: diciembre 2011. Aceptado: 8 de febrero 2012.

Este artículo debe citarse como: Gutiérrez-Martínez MJ, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Chávez-Mayol JM, Rodríguez-Piñeyro OM, Bonifaz A. Estudio *in vitro* de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. Dermatol Rev Mex 2012;56(2):93-101.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

**L**as candidosis son micosis causadas por levaduras oportunistas del género *Candida*. Sus formas clínicas pueden ser, principalmente, sistémicas, cutáneas, de mucosas, semimucosas y anexos cutáneos como las uñas. Hoy en día son un problema latente de salud pública debido, sobre todo, al aumento de pacientes inmunodeprimidos por diabetes o VIH-SIDA, esto aunado al manejo incontrolable de medicamentos que puede ser causa de una respuesta inadecuada y, por ende, de las complicaciones originadas.<sup>1</sup>

### Resistencia a antimicóticos o antifúngicos

En los últimos años ha aumentado la falla al tratamiento con antimicóticos debido al surgimiento de levaduras resistentes, esto en parte debido a la aparición de nuevas especies patógenas, a la prescripción irracional de antimicóticos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéuticas.<sup>1,2</sup> La resistencia es un cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antimicótico que puede medirse *in vitro* por métodos de laboratorio apropiados. Existen dos tipos generales de resistencia: la intrínseca, que de por sí se tiene al antimicótico antes de que entre en contacto con éste y la adquirida, que induce la levadura cuando coexiste con el antifúngico.<sup>1,3</sup> La resistencia puede ser estable si la cepa mantiene un fenotipo resistente cuando crece sin antimicótico y es genéticamente estable. También puede ser reversible o transitoria cuando la cepa pierde su fenotipo al crecer sin el antimicótico; es decir, es una cepa fenotípicamente resistente pero genotípicamente susceptible. Esto último puede deberse a alteraciones en la expresión genética o en la organización de la cromatina y se cree que se surge después de la exposición a bajas concentraciones de azoles.<sup>3-6</sup> En un estudio realizado por Mondon y su grupo<sup>7</sup> se describe otro tipo de resistencia, llamada heterogénea. Los investigadores explican que en una misma cepa puede haber colonias resistentes y sensibles a un mismo antimicótico. Se encontró un mecanismo de selección donde las resistentes predominaban cada vez más sobre las sensibles y cuando sembraron estas cepas en medios con concentraciones crecientes de antimicótico, en todos los casos hubo crecimiento con un nuevo término de resistencia inducible.<sup>7-9</sup> Este fenómeno y el mecanismo de selección puede ser una explicación del rápido desarrollo de resistencia a los azoles; los casos de diseminación en pacientes con terapia de mantenimiento y enfermedad aún con profilaxis.<sup>3,6-8</sup> También se ha descrito la expresión

“resistencia homogénea” cuando todas las colonias de una cepa son por completo sensibles o resistentes a un mismo antimicótico; incluso la resistencia también puede ser intrínseca o extrínseca.<sup>3,7,8</sup> Otro fenómeno interesante es el de la resistencia cruzada positiva, cuando una cepa es resistente a más de un antimicótico mediada por el mismo factor genético y la resistencia cruzada negativa, cuando un factor regula a un antimicótico pero al mismo tiempo incrementa la sensibilidad a otro.<sup>3,6</sup>

Por todo esto se requiere conocer la frecuencia de especies de *Candida* que se encuentran en las diferentes muestras biológicas de pacientes de los diversos servicios del Hospital General de México. El objetivo de este estudio es: conocer la respuesta de los antimicóticos: 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y miconazol frente a las cepas aisladas; además, saber cuál es su comportamiento y si las cepas se vuelven resistentes o se hacen sensibles y, por último, conocer cómo actúan las cepas luego de haberse iniciado el tratamiento.

### MATERIAL Y MÉTODO

Estudio experimental, transversal, horizontal y descriptivo realizado con muestras de pacientes de diferentes servicios del Hospital General de México OD. Primero se hicieron exámenes directos a las muestras con sospecha de candidosis con KOH 10% en busca de pseudohifas o blastoconidios, o ambos. Después se cultivaron en medios de agar dextrosa Sabouraud (ADS) y ADS con antibióticos, se incubaron durante 48 h a 28°C. A los cultivos con crecimiento característico de colonias levaduriformes se les identificaron las cepas; para esto se sembró una colonia en medio CHROMagar® y agar harina de maíz + Tween 80 al 1%; se identificó cada una de las especies de acuerdo con las características bioquímicas en el primer medio y fisiológicas en el segundo. Después se realizó la prueba de sensibilidad con un método colorimétrico, con el estuche comercial FUNGITEST® (BIO-RAD®),<sup>10</sup> que permite determinar, *in vitro*, la sensibilidad de las levaduras de *Candida* spp y *Cryptococcus* spp con los siguientes antimicóticos: 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y miconazol, a dos diferentes concentraciones que permiten identificar: sensibilidad, resistencia o resistencia-intermedia (dosis-dependiente) de cada cepa estudiada. El estuche contiene una placa con 16 pocillos (dos controles positivos, dos controles

negativos y 12 correspondientes a los seis antimicóticos) de los que se utilizan dos para cada antimicótico: uno para concentración baja y otro para concentración alta. El medio utilizado viene deshidratado en solución tamponada RPMI 1640 y modificado con el indicador de óxido-reducción azul alamar.<sup>10</sup> La prueba de sensibilidad se realizó con colonias de 48 h en medio CHROMagar<sup>®11</sup> para obtener una suspensión con una opacidad 1 Mac Farland en 3 mL de agua estéril; de esta suspensión se tomaron 100 µL y se colocaron en 1.9 mL de agua destilada estéril; de aquí se tomaron 20 µL que se colocaron en 3 mL de medio de suspensión, se inocularon 100 µL en cada pozo en las placas de reacción. Se incubaron durante 48 h a 28°C al término de este lapso se hizo la lectura visual de cada placa. Primero se verificaron los pozos de control positivo (color rosa y crecimiento visible) y negativo (color morado y sin crecimiento), después la lectura de cada pozo con antimicótico, interpretándolos de la siguiente manera: pozo con vire a rosa y crecimiento visible como resistente (R); vire a tono magenta como resistencia-intermedia (I) o sensibilidad-dosis-dependiente (SDD) y color morado como sensible (S).

## RESULTADOS

Se recolectaron 62 muestras biológicas con candidosis confirmada provenientes de: lavado bronquial (13), expectoración (11), orina (7), sangre (7), mucosa oral (5), exudado faríngeo (4), uñas (4), pústulas cutáneas (3), pliegue sub-mamario (2), secreción ótica (2), úlcera palatina (2), mucosa nasal (1) y vulva (1). De estas muestras se aislaron y tipificaron 64 cepas (Figura 1) de las que 64% correspondieron a *C. albicans*, 18.8% a *C. parapsilosis*, 7.8% a *C. krusei*, 4.7% a *C. glabrata*, 3.1% a *C. dubliniensis* y 1.6% a *C. tropicalis*. Los resultados de sensibilidad y resistencia de cada especie están en el Cuadro 1. La lectura de pruebas de sensibilidad e identificación de cepas en medio cromogénico está en las Figuras 2 y 3.

## DISCUSIÓN

Los fenómenos de resistencia suelen ser distintos para cada tipo de antimicótico; así, por ejemplo, puede observarse lo siguiente para cada uno de los utilizados en este estudio:

**5-fluorocitosina (5-FC).** No se indica como monoterapia debido a su rápido desarrollo de resistencia, por

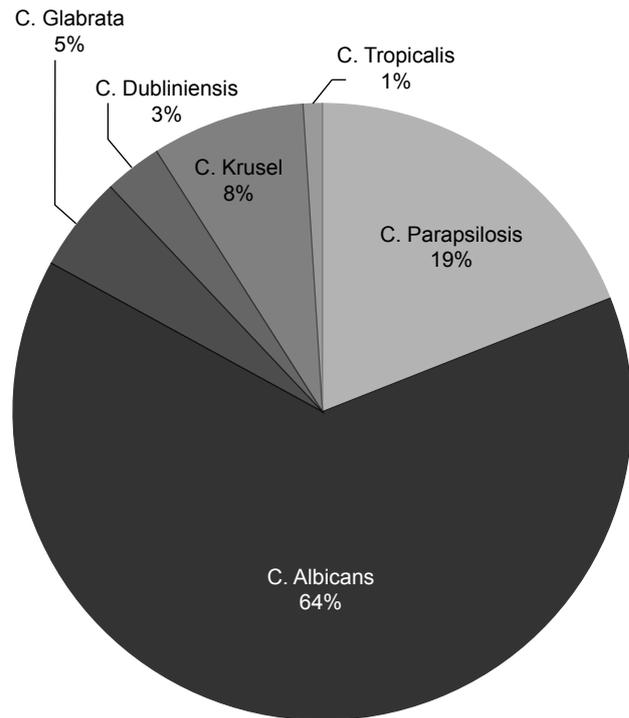
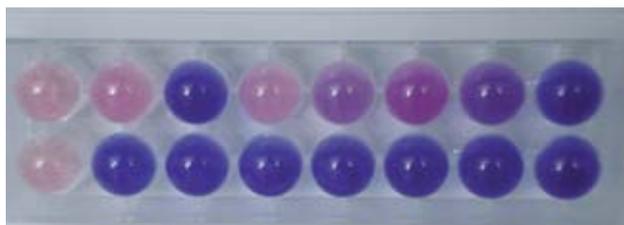


Figura 1.- Distribución de las especies de *Candida* de los diversos aislados.



Figura 2.- Aislamiento de *Candida albicans* y estudio de sensibilidad

carencia, ausencia o mutación de enzimas implicadas en su consumo, metabolismo (resistencia intrínseca) o desregulación en biosíntesis de pirimidina que incrementa su síntesis y sus productos pueden competir con los metabolitos de la 5-FC disminuyendo su actividad (resistencia adquirida).<sup>3,11,6</sup> Existen dos fenotipos de cepas resistentes: tipo 1 (no es a altas concentraciones que surge



**Figura 3.-** Acercamiento a prueba comercial de sensibilidad

resistencia totalmente intrínseca) y tipo 2 (sensible a bajas concentraciones, pero después de una gran exposición a la 5-FC, incluso a altas concentraciones, es resistente, lo que se conoce como resistencia parcial.<sup>12</sup>

**Anfotericina B (AnB).** La resistencia puede ser intrínseca en *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *Trichosporon* sp, o adquirida en aislados patógenos, se asocia con alteraciones en lípidos de membrana y en moléculas de esterol.<sup>3</sup> La

**Cuadro 1.** Respuesta de sensibilidad, resistencia y sensibilidad dosis-dependiente de los aislados clínicos de *Candida* spp. (Continúa en la siguiente página)

	Antifúngico	[µg/mL]	Cepas sensibles (S)		Cepas resistentes (R)		Cepas intermedias (SDD)	
			Cantidad	%	Cantidad	%	Cantidad	%
<i>Candida albicans</i>	5FC	2	40	97.6	1	2.4	0	0.0
		32	40	97.6	1	2.4	0	0.0
	AB	2	40	97.6	0	0.0	1	2.4
		8	41	100	0	0.0	0	0.0
	MCZ	0.5	29	70.7	6	14.6	6	14.6
		8	37	90.2	1	2.4	3	7.3
	KET	0.5	31	75.6	4	9.8	6	14.6
		4	33	80.5	3	7.3	5	12.2
	ITR	0.5	30	73.2	5	12.2	6	14.6
		4	32	78.0	4	9.8	5	12.2
FLU	8	33	80.5	2	4.9	6	14.6	
	64	31	75.6	2	4.9	8	19.5	
<i>Candida parapsilosis</i>	5FC	2	11	91.7	1	8.3	0	0.0
		32	12	100	0	0.0	0	0.0
	AB	2	10	83.3	2	16.7	0	0.0
		8	12	100	0	0.0	0	0.0
	MCZ	0.5	0	0.0	12	100	0	0.0
		8	11	91.7	1	8.3	0	0.0
	KET	0.5	2	16.7	10	83.3	0	0.0
		4	12	100	0	0.0	0	0.0
	ITR	0.5	9	75.0	3	25.0	0	0.0
		4	12	100	0	0.0	0	0.0
FLU	8	11	91.7	1	8.3	0	0.0	
	64	11	91.7	1	8.3	0	0.0	
<i>Candida krusei</i>	5FC	2	3	60.0	1	20.0	1	20.0
		32	2	40.0	3	60.0	0	0.0
	AB	2	4	80.0	1	20.0	0	0.0
		8	4	80.0	0	0.0	1	20.0
	MCZ	0.5	0	0.0	5	100	0	0.0
		8	4	80.0	1	20.0	0	0.0
	KET	0.5	0	0.0	5	100	0	0.0
		4	5	100	0	0.0	0	0.0
	ITR	0.5	0	0.0	4	80.0	1	20.0
		4	5	100	0	0.0	0	0.0
FLU	8	1	20.0	4	80.0	0	0.0	
	64	4	80.0	1	20.0	0	0.0	

**Cuadro 1.** Respuesta de sensibilidad, resistencia y sensibilidad dosis-dependiente de los aislados clínicos de *Candida* spp. (Continuación)

	Antifúngico	[µg/mL]	Cepas sensibles (S)		Cepas resistentes (R)		Cepas intermedias (SDD)	
			Cantidad	%	Cantidad	%	Cantidad	%
<i>Candida glabrata</i>	5FC	2	2	66.7	1	33.3	0	0.0
		32	2	66.7	1	33.3	0	0.0
	AB	2	3	100	0	0.0	0	0.0
		8	2	66.7	0	0.0	1	33.3
	MCZ	0.5	1	33.3	2	66.7	0	0.0
		8	3	100	0	0.0	0	0.0
	KET	0.5	1	33.3	2	66.7	0	0.0
		4	3	100	0	0.0	0	0.0
	ITR	0.5	1	33.3	1	33.3	1	33.3
		4	2	66.7	1	33.3	0	0.0
FLU	8	1	33.3	2	66.7	0	0.0	
	64	2	66.7	1	33.3	0	0.0	
<i>Candida dubliniensis</i>	5FC	2	2	100	0	0.0	0	0.0
		32	2	100	0	0.0	0	0.0
	AB	2	1	50.0	1	50.0	0	0.0
		8	2	100	0	0.0	0	0.0
	MCZ	0.5	0	0.0	2	100	0	0.0
		8	2	100	0	0.0	0	0.0
	KET	0.5	0	0.0	1	50.0	1	50.0
		4	0	0.0	1	50.0	1	50.0
	ITR	0.5	0	0.0	1	50.0	1	50.0
		4	1	50.0	0	0.0	1	50.0
FLU	8	2	100	0	0.0	0	0.0	
	64	2	100	0	0.0	0	0.0	
<i>Candida tropicalis</i>	5FC	2	1	100	0	0.0	0	0.0
		32	1	100	0	0.0	0	0.0
	AB	2	1	100	0	0.0	0	0.0
		8	1	100	0	0.0	0	0.0
	MCZ	0.5	0	0.0	1	100	0	0.0
		8	1	100	0	0.0	0	0.0
	KET	0.5	0	0.0	1	100	0	0.0
		4	0	0.0	1	100	0	0.0
	ITR	0.5	0	0.0	1	100	0	0.0
		4	0	0.0	1	100	0	0.0
FLU	8	0	0.0	1	100	0	0.0	
	64	0	0.0	1	100	0	0.0	

Claves: (S)=Sensibilidad; (R)=Resistencia; (SDD)= Sensibilidad Dosis Dependiente. 5FC= 5 Fluorocitosina; AB=Anfotericina B; MCZ= Miconazol; Ket=Ketoconazol; ITR=Itraconazol; FLU=Fluconazol.

principal causa es la disminución en cantidad de ergosterol en membrana, debido a que la molécula se une en este compuesto AnB para dañar la célula. En pacientes inmunocomprometidos las cepas resistentes se observan debido a que la virulencia disminuye al haber alteraciones

en membrana.<sup>6,13</sup> Otro mecanismo es por la enzima catalasa que, al aumentar su actividad, disminuye el daño oxidativo causado por el antimicótico.<sup>3,6</sup>

**Azoles.** Los primeros casos fueron en *C. albicans* después de un tratamiento prolongado con miconazol y ketoconazol.

A partir del uso de fluconazol para muchos padecimientos ha habido mayor frecuencia. Este fenómeno aparece en pacientes inmunodeficientes con tratamientos prolongados. Los imidazoles difieren de los triazoles en su acción, debido a un efecto diferente en la enzima 14- $\alpha$ -desmetilasa y en otras en la biosíntesis del ergosterol.<sup>3,13</sup>

Los mecanismos de resistencia más importantes son:

- a) Alteración del transporte de antimicóticos por flujo dependiente de ATP. En aislados clínicos se han encontrado bajas concentraciones de azoles por los genes que codifican las cintas de unión a ATP (ABC), se encuentran sobrerregulados en cepas resistentes. Los más importantes son *CDR1*, *CDR2*, *CdCDR1*, *CgCDR1* y *CgCDR2* y *CnAFR*.<sup>3,6,14,15</sup> Este mecanismo puede ser reversible *in vitro* al disminuir la sobrerregulación del gen en ausencia del antimicótico, pero también se ha observado *in vivo*. Esto no se ha reportado en aislados resistentes de pacientes con VIH-SIDA, quizá porque el fenómeno ya es estable.<sup>3,4,6</sup> En todos los tipos de resistencia mencionadas se dice que éste tal vez sea el probable mecanismo.<sup>3-9,14,15</sup>
- b) Alteración de transporte de antimicóticos por flujo dependiente del gradiente de protones de membrana. En cepas con genes *CDR1* sobrerregulados también hay sobrerregulación del gen *CaMDR1* (antes llamado *BEN*), que regula a la familia de los principales facilitadores. En cepas resistentes a fluconazol se suprimió este gen dando una alta sensibilidad a fluconazol y explicando el papel que efectúa en la resistencia.<sup>3,6,14,15</sup>
- c) Alteración en la enzima blanco. La resistencia también es causada por alteración en la enzima Erg11p que desmetila lanosterol en biosíntesis del ergosterol. Esta alteración puede ser de tres tipos:<sup>3,6</sup> sobreexpresión del gen, mutación del gen para que los azoles sean menos y conversión del gen *ERG11* que elimina diferencias alélicas al volverse resistente. La alteración en la afinidad es por mutaciones en el gen *ERG11* que, por cambio conformacional, afecta la unión de azoles.<sup>3</sup> La sobreexpresión de *ERG11* se logra por desregulación en la transcripción o amplificación del gen, también por una exposición a inhibidores de biosíntesis de ergosterol.<sup>14,15</sup>
- d) Alteración en la vía de biosíntesis del ergosterol. En estudios realizados a la composición de estero-

les de aislados resistentes se encontró acumulación de ergosta-7,22-dienol-3 $\beta$ -ol por ausencia de actividad de enzima  $\Delta^{15,16}$ -desaturasa codificada por el gen *ERG3*, también son resistentes a anfotericina B al no tener ergosterol.<sup>3,6</sup> Que una cepa active más de un mecanismo de resistencia explica el incremento de resistencia a azoles y aumento de valores CMI.<sup>3,6</sup> Las levaduras pueden usar vías alternas de resistencia: formación en superficies sintéticas o naturales de *biofilms* o biopelículas (red densa de células diferenciadas formando una capa de matriz extracelular), que son una barrera física para penetración de antifúngicos.<sup>3,12</sup> Además de estos mecanismos hay otros factores que afectan la respuesta del antimicótico por parte de la levadura (género, especie, cepa, tipo de célula, cantidad de células presentes); del antimicótico (dosis, cantidad, frecuencia, dosis acumulativa, absorción, distribución y metabolismo) y del paciente (estado inmune, sitio y severidad de infección, materiales ajenos al organismo y el cumplimiento con el esquema terapéutico).<sup>3,6,13</sup>

De acuerdo con nuestro estudio y el análisis de las respuestas de cada antimicótico, la mayor parte de las cepas de *Candida* spp, fueron sensibles a 5-fluorocitosina (5FC) aunque, por otra parte, al menos una de cada especie fue resistente a éste, excepto *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*. Esto probablemente indica la resistencia intrínseca, pues en México no se encuentra este antimicótico y, por lo tanto, puede suponerse que estas cepas nunca habían tenido contacto con 5FC. Los datos son diferentes a los reportados en la bibliografía, donde la especie más resistente es *C. albicans* con 22% y las demás especies son generalmente sensibles. En este estudio *C. krusei* y *C. glabrata* fueron las más resistentes a este antimicótico hasta en 60.0%.<sup>16</sup>

En el caso de la anfotericina B, en general, todas las cepas fueron sensibles como se esperaba, excepto dos cepas de *C. parapsilosis* (16.7%): una de *C. dubliniensis* (50.0%) y otra más de *C. krusei* (20.0%) que fueron resistentes a baja concentración. Una de *C. albicans* (2.4%) tuvo respuesta intermedia a baja concentración y otra de *C. glabrata* (33.3%) y una de *C. krusei* (20.0%) dieron respuesta intermedia a alta concentración. Es importante porque este antimicótico es el tratamiento de elección para la candidosis sistémica y terapia de rescate para candidosis sin respuesta a azoles y en este estudio pueden

observarse cepas que empiezan a tener ligera resistencia a baja concentración.<sup>17-19</sup>

Con los azoles se apreció un comportamiento muy parecido en la mayor parte de las cepas, casi todas fueron sensibles a éstos pero a concentración alta, lo que quizá habla de las consecuencias del tratamiento profiláctico irracional que se hace con este grupo de antimicóticos, por lo que es necesario administrarlos a altas concentraciones para una buena respuesta terapéutica.

- a) Miconazol tuvo mayor sensibilidad a alta concentración en *C. glabrata* (100%) y mayor resistencia a alta concentración en *C. parapsilosis* (8.3%) y *C. krusei* (20.0%).
- b) Ketoconazol. Las cepas más sensibles a alta concentración fueron *C. parapsilosis* (100%), *C. glabrata* (100%) y *C. krusei* (100%) y las más resistentes también a alta concentración fueron *C. albicans* (7.3%), *C. dubliniensis* (50.0%) y *C. tropicalis* (100%). Estos datos son congruentes con un estudio que muestra que estas especies de *Candida* tienen alta resistencia al ketoconazol y *C. albicans* es la de menor resistencia (50%).<sup>20</sup>
- c) Itraconazol, las cepas de *C. krusei* (100%) y *C. parapsilosis* (100%) fueron las más sensibles a alta concentración y *C. albicans* (9.8%), *C. glabrata* (33.3%) y *C. tropicalis* (100%) fueron las más resistentes a alta concentración; sin embargo, en un estudio realizado con cepas de *Candida* durante 10 años se menciona que las especies más sensibles a este antimicótico fueron *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.<sup>19</sup>
- d) Fluconazol, las cepas *C. parapsilosis* (100%) y *C. dubliniensis* (100%) fueron las más sensibles a alta concentración y *C. albicans* (4.9%), *C. krusei* (20.0%), *C. glabrata* (33.3%) y *C. tropicalis* (100%) fueron las resistentes a alta concentración. En el mismo estudio se mencionó que para el itraconazol las especies más sensibles son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, con coincidencia sólo en la última especie.<sup>19</sup>

En la bibliografía revisada se encontraron otros estudios con características similares a nuestro trabajo, por ejemplo: Carrillo y sus colaboradores<sup>21</sup> al trabajar con cepas de *Candida* de pacientes hospitalizados de Barcelona y Almería; Ritcher y su grupo<sup>22</sup> con levaduras causantes de vulvovaginitis de Iowa; St-Germain y sus coautores<sup>23</sup> con

cepas de candidemia de Québec; Blanco y sus colaboradores<sup>24</sup> con cepas de *C. glabrata* de España; Ozçelik y su grupo<sup>25</sup> con aislados clínicos de Turquía; Sánchez-Vargas y sus coautores<sup>26</sup> con cepas de candidosis oral de pacientes mexicanos con VIH-SIDA; Alexander y su grupo<sup>27</sup> de Carolina del Norte; Carrilo-Muñoz y sus colegas<sup>28</sup> de Barcelona y Pfaller y colaboradores<sup>29</sup> de Iowa, Ohio y Texas.

En los demás resultados hay una gran concordancia entre los estudios, teniendo como mayor diferencia el ketoconazol. Todos los resultados de 5-fluorocitosina y anfotericina B para *C. albicans* fueron prácticamente iguales, mientras que para el fluconazol sí hay diferencia con el valor de este trabajo que está muy por debajo de todos los demás que entre ellos sí son semejantes, quizá porque es el que más se indica para profilaxis en este país y ya ha originado gran resistencia. Con los demás azoles no hay tanta diferencia, aunque resalta la similitud de los datos aquí obtenidos con los del estudio realizado también con aislados clínicos de México. Para *C. parapsilosis* los porcentajes de 5-fluorocitosina, fluconazol y ketoconazol son cercanos o iguales. Pero con los demás antimicóticos hay datos muy dispares, en anfotericina B hay un dato muy bajo contrario a todos los demás, con itraconazol son mucho más variados al haber desde 0.0% hasta 100% y con el miconazol otra vez hay un valor muy bajo. Se nota que los números más alejados a los de este trabajo son del mismo estudio de cepas mexicanas, sucediendo completamente lo contrario que con *C. albicans*. Aún así, los datos de este estudio coincidieron con la mayoría. Con las otras especies no se realizó una comparación debido a que el número de cepas no fue suficiente para efectuar este análisis.

Con *C. albicans* se muestra poca resistencia porque la más alta fue al miconazol que, prácticamente, sólo se indica para casos de candidosis superficiales en forma tópica. Lo importante es que fue la especie con más respuesta intermedia para azoles que originó resistencia y el valor más alto fue el fluconazol que se prescribe comúnmente como profilaxis; es una alerta porque es la especie aislada con más frecuencia de las muestras biológicas, además de ser la principal levadura en microbiota habitual.

Las cepas de *C. parapsilosis* fueron completamente sensibles a alta concentración, excepto miconazol, otra resistencia marcada fue con ketoconazol a baja concentración, que también es uno de los principales antimicóticos de tratamiento y obviamente de profilaxis. El compor-

tamiento de *C. krusei* fue un poco diferente, porque fue totalmente sensible al ketoconazol e itraconazol a alta concentración. Contrario a lo que se sabe en cuanto a la resistencia intrínseca al fluconazol, la minoría de estas cepas la presentó y no 100% que se esperaba. *C. glabrata* fue completamente sensible a alta concentración de miconazol y ketoconazol. Pocas cepas fueron resistentes al itraconazol y fluconazol, aunque se esperaba un valor más alto por la misma razón que la especie anterior. Las cepas de *C. dubliniensis* resultaron con respuesta intermedia al itraconazol y ketoconazol y resistentes al miconazol, contrario a lo que se observó con la cepas de *C. albicans* más sensibles al itraconazol y ketoconazol y menos al miconazol. La única cepa de *C. tropicalis* fue completamente sensible a 5-fluorocitosina y anfotericina B, resistente al itraconazol, ketoconazol y fluconazol y baja concentración de miconazol.

Una de los puntos interesantes a discutir radica en que en los estuches comerciales, como el utilizado, no se incluyen los nuevos antimicóticos como voriconazol, posaconazol y caspofungina y serían de gran importancia tener datos precisos acerca del comportamiento de las cepas de *Candida* frente a éstos.

## CONCLUSIÓN

Es importante analizar y mejorar las medidas profilácticas que se dan a los pacientes porque son las principales causas del desarrollo de resistencia a los antimicóticos y tienen gran influencia en el éxito del tratamiento. También es necesario que las pruebas de sensibilidad se realicen de manera rutinaria y, de preferencia, con la técnica establecida por el CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*), método: M27-A3. Método de microdilución en caldo,<sup>30</sup> que permite obtener una información más precisa de resistencia o sensibilidad, ya que al realizar varias diluciones y no sólo dos como en el método utilizado en este estudio, se pueden identificar concentraciones mínimas inhibitorias de antimicótico, ello permitiría tener una idea del posible tratamiento que se pueda administrar al paciente de una manera más precisa.

Los resultados obtenidos demuestran que este estudio debe continuarse con mayor número de muestras para que pueda conocerse el comportamiento de las levaduras frente a los antimicóticos y proporcionar un mejor y más efectivo tratamiento al paciente y de esta manera no favorecer la resistencia a los antimicóticos prescribiéndolos irracionalmente.

## REFERENCIAS

1. Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 2002;35:1073-1080.
2. Graybill J. Resistencia a los medicamentos antifúngicos. Mecanismos de acción y su impacto en la práctica clínica. <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Cursos/Micosis2003/3/3613>
3. Heitman J. Molecular principles of fungal pathogenesis. ASM Press. Washington, USA, 2006.
4. Calvet HM, Yeaman MR, Filler SG. Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potencial *in vitro* model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:535-539.
5. Marr KA, Lyons CN, Rustad T, Bowden RA, White TC. Rapid, Transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of *CDR*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2584-2589.
6. Vanden H. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:44-49.
7. Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R, et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1856-1861.
8. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston AK, et al. Characterization of heteroresistance of fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:267-272.
9. Marr KA, Lyons CN, Ha K, Rustad TR, White TC. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:52-59.
10. Monografía FUNGITEST® de BIO-RAD®.
11. Bonifaz A, Araiza SJ, De-Pablo P. CROMagar-Candida. Experiencia en la identificación presuntiva de levaduras oportunistas de candidosis oral en pacientes inmunosuprimidos. *Bioquímica* 1998; 23:794-800.
12. Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:171-179.
13. Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeast. *Enfer Infec Microbiol Clin* 2002; 20:462-470.
14. Boker DJ, SwidellsS, Rinaldi MG. Fluconazole resistance *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1993; 17:1018-1021.
15. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1-8.
16. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. Ed. Elsevier Science, Pennsylvania, USA, 2003.
17. Arredondo-García JL, Amábile-Cuevas CF and the RedMic2 Study Group. Susceptibility of Mexican isolates of yeasts and moulds to amphotericin B and triazole antifungals. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3:398-401.
18. Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune T, et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. *BMC Research Notes* 2010; 3:1-7.
19. Labbé AC, Pépin J, Patiño C, Castonguay S, et al. A single-centre 10-years experience with *Candida* bloodstream infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2009; 20:45-50.
20. Nguyen MH, Yu CY. Voriconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Candida* isolates: *in-vitro* efficacy compared

- with that of itraconazole and ketoconazole. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42:253-256.
21. Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Estivill D, Montsant L, *et al.* *In vitro* resistance to fluconazole and itraconazole in clinical isolates of *Candida spp* and *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14:50-54.
  22. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, *et al.* Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2155-2162.
  23. St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, René P, *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2008; 19:55-62.
  24. Blanco MT, Cañadas J, García-Martos P, Marín P, García-Tapia A, Rodríguez J. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and voriconazole against *Candida glabrata*. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22:139-143.
  25. Özçelik B, Kaynak F, Cesur S, Sipahi B, Sultan N. *In vitro* activities of voriconazole as a triazole derivate and caspofungin as a echinocandin were compared with those of some antifungal agents against *Candida* species isolated from clinical specimens. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60:302-304.
  26. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, *et al.* 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.
  27. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, *et al.* Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol* 2007;45: 698-706.
  28. Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Torres J. *In vitro* antifungal activity of sertaconazole, bifonazole, ketoconazole and miconazole against yeasts of the *Candida* genus. *J Antimicrob Chemother* 1996;37: 815-819.
  29. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007;45:3522-3528.
  30. González GM. Pruebas de susceptibilidad antifúngica (Cap. 36). En: Bonifaz A. *Micología médica básica*. McGraw-Hill, 3ª edición, 2009. México DF: pp: 487-493.