Distribución y susceptibilidad a fluconazol de levaduras del género *Candida* aisladas en pacientes hospitalizados y ambulatorios

Claudio Alburquerque O., Germán Hermosilla D. y Cecilia Tapia P.

Species distribution and fluconazole susceptibility of yeasts of genus *Candida* isolated from hospitalized and ambulatory patients

Most surveillance studies have included invasive candidiasis from hospitalized patients. However, no national study has evaluated the species distribution and susceptibility to fluconazole of *Candida* species isolated from hospitalized and ambulatory patients. A total of 166 strains were collected consecutively during a 6 month period. Strains were isolated from vaginal fluid (73.5%), urine (7.8%), lower respiratory tract samples (7.8%), blood cultures (4.2%), sterile fluids (2.4%) and wounds (1.8%). Most of the isolates were obtained from ambulatory patients (71.1%). The species found were *Candida albicans* (78.9%), *C. glabrata* (8.4%), *C. tropicalis* (6.0%), *C. famata* (1.8%), *C. krusei* (1.8%), *C. parapsilosis* (1.8%) and *C. sake* (1.2%). Fluconazole susceptibility was: 92.3% for *C. albicans*, 85.7 % for *C. glabrata* (most strains being dose-dependent susceptible), 100% for *C. parapsilosis* and 80% for *C. tropicalis*. Only susceptible strains were isolated from hospitalized children, whereas more resistant strains were isolated from ambulatory adults, mainly from vaginal fluid. In order to identify probable reservoirs of less susceptible strains such as *C. glabrata*, it would be necessary to include ambulatory isolates in future surveillance studies.

Key words: Species distribution, *Candida*, fluconazole, ambulatory, reservoir.

Palabras clave: Distribución de especies, *Candida*, fluconazol, ambulatorio, reservorio.

Clínica Dávila, Santiago, Chile

Unidad de Microbiología (CAO, CTP)

Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago

Instituto de Ciencias Biomédicas

Programa de Microbiología y

Micología (CAO, GHD, CTP)

Fuente de financiamiento:

BecaPG/50/2005, Depto. de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile

Recibido: 23 de junio de 2008

Aceptado: 20 de abril de 2009

Correspondencia a:

Cecilia Tapia Paredes

cecilia.tapia@davila.cl

Introducción

Desde 1980 los hongos han emergido como importantes oportunistas, que afectan especialmente a pacientes inmunocomprometidos^{1,2}. Dentro de los agentes productores de micosis en este tipo de pacientes, la especie más frecuentemente aislada es *Candida albicans*; sin embargo, otras especies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* han emergido como agentes causales de candidiasis, siendo algunas de ellas resistentes a algunos antifúngicos^{2,3}. En estudios de vigilancia chilenos se ha descrito un aumento del aislamiento de especies no-*albicans* en los últimos años en infecciones fúngicas invasoras^{4,5}. Estos datos concuerdan con otros estudios de vigilancia en Norteamérica y Latinoamérica, donde se ha observado que las especies de *Candida* no-*albicans*, presentan cambios epidemiológicos continuos en su frecuencia con una tendencia al aislamiento de especies más resistentes a antifúngicos^{2,6}.

A pesar de que estos cambios se han descrito en candidiasis invasora y afectan a pacientes internados en

unidades críticas, también se han detectado cambios en pacientes de otros servicios clínicos y en pacientes de la comunidad^{2,7,8}.

Es importante destacar que los reportes epidemiológicos se han realizado en candidiasis invasora⁶⁻¹¹ y en algunas candidiasis superficiales como candidiasis orofaríngea en pacientes con SIDA^{12,13} y candidiasis vulvovaginal, por separado^{14,15}.

Clínica Dávila es una institución que atiende tanto a pacientes hospitalizados como ambulatorios. Recibe en promedio 2.300 cultivos mensuales, de los cuales 68,8% corresponden a urocultivos, 23,9% a cultivos corrientes, 6,2% a flujos vaginales y 1,8% a cultivos de hongos, aislándose del total de cultivos mensuales entre 25 y 30 levaduras del género *Candida* (1% de aislamiento).

No existen estudios que describan la distribución de especies y susceptibilidad a fluconazol de cepas de *Candida* aisladas tanto en pacientes hospitalizados como ambulatorios, por lo que en este estudio se realiza un análisis global de todas las cepas obtenidas en un período de seis meses considerando el tipo de muestra y los datos demográficos de los pacientes.

Material y Métodos

Cepas: Se estudiaron 166 aislados pertenecientes a un cepario recolectado entre enero y junio de 2007, de manera consecutiva, abarcando todas las cepas de *Candida* aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados y ambulatorios atendidos en Clínica Dávila. Se consideraron pacientes hospitalizados aquellos que se encontraran internados en alguno de los servicios de Clínica Dávila al momento de la toma de muestra del cultivo y como ambulatorios, aquellos que consultaron en el Centro Médico de la institución. Se obtuvieron retrospectivamente los antecedentes demográficos generales de los pacientes, los cuales fueron analizados manteniendo en estricta confidencialidad su identidad. Se realizó un análisis descriptivo de los aislados de acuerdo al tipo de muestra, al sexo y a la edad de los pacientes.

Las cepas fueron descongeladas y sembradas en agar Sabouraud glucosado e incubadas 24 a 48 hrs a 37 °C.

Identificación de levaduras del género *Candida*: Las especies de levaduras se identificaron según procedimientos empleados en micología médica, analizando las características fisiológicas de las levaduras (tubo germinal y microcultivo), agar cromogénico (ChromAgar *Candida*®)¹⁶ y API ID 32C®¹⁷.

Medición de la concentración inhibitoria mínima: Las cepas congeladas en glicerol fueron sembradas en agar Sabouraud glucosado e incubadas por 18 hrs. Se midieron las CIMs de las colonias aisladas a fluconazol mediante microdilución en caldo del estándar europeo del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-ASFT)¹⁸ utilizando como control las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Cada cepa fue clasificada frente a cada fármaco como sensible (S), sensible dosis dependiente (SDD) y resistente (R), según los criterios establecidos por el estándar del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documento M27-A2²⁰ (Tabla 1).

Análisis estadístico: Se realizó con la prueba chi cuadrado (χ^2) con una significancia estadística de $p < 0,05$ utilizando el programa STATA 7.0

Resultados

El 71,1% de las cepas de *Candida* se aislaron de pacientes ambulatorios y 28,9% de pacientes hospitalizados. Del total de pacientes 84,3% correspondieron a mujeres y 15,7% a hombres. La mayoría de las levaduras se aislaron de adultos ($n = 157$) y sólo 9 aislados pertenecieron a

niños, siendo la mayoría de los niños de edad inferior a un año.

Se recuperó *Candida* de flujo vaginal (73,5%), orina (7,8%), muestras respiratorias bajas (7,8%), hemocultivos (4,2%), líquidos estériles (2,4%) y heridas (1,8%). Las muestras no agrupadas en las anteriores correspondieron a 2,4%.

El mayor porcentaje de levaduras recuperadas en mujeres fue obtenido de flujo vaginal y sólo 12,9% correspondió a otros sitios. De un total de 44 muestras no vaginales, 26 (59,0%) correspondieron a aislados provenientes de hombres y 18 (41,0%) de mujeres. En hombres se aisló *Candida* con mayor frecuencia de muestras respiratorias bajas (34,6%) que en mujeres (22,2%), mientras que en mujeres, se aisló *Candida* más frecuentemente en orina (38,8%) respecto a hombres (23,1%) ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Las localizaciones más frecuentes en pacientes bajo un año de edad fueron sangre (57,2%) y orina (42,8%).

Tabla 1. Puntos de corte para fluconazol de *Candida* sp, de acuerdo al documento M27-A2 del estándar del CLSI*

Categoría	Fluconazol ($\mu\text{g/ml}$)
Sensible	≤ 8
Sensible dosis dependiente	16-32
Resistente	≥ 64

* Clinical and Laboratory Standards Institute.

Tabla 2. Distribución de muestras con aislados de *Candida* sp según sexo

Muestras	Sexo	
	Mujeres	Hombres
Flujo vaginal	122	-
Otras muestras:	18	26
	n (%)*	n (%)*
Respiratoria baja	4 (22,2)	9 (34,6)
Orina	7 (38,8)	6 (3,6)
Sangre	2 (11,1)	5 (3,0)
Líquido estéril	1 (5,6)	3 (1,8)
Herida	1 (5,6)	2 (1,2)
Otros	3 (16,7)	1 (0,6)

* Porcentaje calculado respecto a muestras no vaginales en mujeres y en hombres por separado.

Sin considerar los flujos vaginales, en los adultos las muestras más frecuentes fueron respiratorias bajas y orinas (Tabla 3), abarcando 59,0% de las muestras (26/44).

Del total de cepas analizadas 78,9% correspondieron a *Candida albicans*, 8,4% a *C. glabrata*, 6,0% a *C. tropicalis*, 1,8% a *C. famata*, 1,8% a *C. krusei*, 1,8% a *C. parapsilosis* y 1,2% a *C. sake*. *Candida glabrata* fue la segunda especie en frecuencia y se aisló preferentemente de flujo vaginal y orina, mientras que *C. parapsilosis* fue aislada con mayor frecuencia de sangre.

Tanto en pacientes ambulatorios como hospitalizados, los rangos de susceptibilidad global de las cepas a fluconazol estuvieron entre 0,125 µg/mL y 64 µg/mL. Los porcentajes de susceptibilidad a fluconazol fueron: 92,3% en *C. albicans*, 85,7% en *C. glabrata* (de las cuales, 78,6% fueron sensibles dosis dependiente), 100% en *C. parapsilosis* y 80% en *C. tropicalis* (Tabla 4). En todos los

Tabla 3. Distribución de los aislados de *Candida* sp según grupo etario en muestras no vaginales

Muestra	Edad (años)			
	0-1		1-15	
	n	(%)*	n	(%)*
Respiratoria baja	0	(0,0)	0	(0,0)
Orina	3	(42,8)	0	(0,0)
Sangre	4	(57,2)	0	(0,0)
Líquidos estériles	0	(0,0)	0	(0,0)
Heridas	0	(0,0)	0	(0,0)
Otros	0	(0,0)	1	(100,0)
Total	7	(100,0)	1	(100,0)

* Porcentaje calculado respecto al grupo etario.

Tabla 4. Distribución de susceptibilidad a fluconazol de las especies de *Candida* según el tipo de muestra

Especie	Categoría	Vaginal	Herida	Líquido estéril	Orina	Respiratoria baja	Sangre	Otras	Total n (%)
<i>C. albicans</i>	S	98	1	-	8	8	4	2	121 (92,3)
	SDD	7	1	-	1	-	-	-	9 (6,8)
	R	1	-	-	-	-	-	-	1 (0,8)
<i>C. glabrata</i>	S	1	-	-	-	-	-	-	1 (7,1)
	SDD	8	-	-	2	1	-	-	11 (78,6)
	R	2	-	-	-	-	-	-	2 (14,3)
<i>C. tropicalis</i>	S	2	1	2	1	2	-	-	8 (80,0)
	SDD	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	R	-	-	1	-	1	-	-	2 (20,0)
<i>C. famata</i>	S	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	SDD	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	R	1	-	1	1	-	-	-	3 (100,0)
<i>C. krusei</i>	S	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	SDD	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	R	1	-	-	-	1	1	-	3 (100,0)
<i>C. parapsilosis</i>	S	-	-	-	-	-	2	1	3 (100,0)
	SDD	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	R	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
<i>C. sake</i>	S	1	-	-	-	-	-	1	2 (100,0)
	SDD	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)
	R	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,0)

S= sensible; SDD= sensible dosis dependiente; R= resistente.

pacientes bajo 15 años de edad se aislaron cepas sensibles, mientras que todas las cepas resistentes se obtuvieron en pacientes adultos, de los cuales, 5/9 cepas resistentes (55,5%) procedían de flujo vaginal.

Discusión

Dado que las infecciones fúngicas han aumentado el último tiempo concomitantemente con un aumento de pacientes de riesgo, su vigilancia, provee importante información sobre la incidencia y las tendencias de estas infecciones. Estos estudios de vigilancia se realizan usualmente en infecciones fúngicas invasoras, sin considerar la presencia de levaduras del género *Candida* en infecciones superficiales, que pueden representar potenciales reservorios de infecciones invasoras.

En nuestro estudio, la mayoría de los aislados de levaduras del género *Candida* se recuperaron de pacientes ambulatorios (71,1%), fundamentalmente de muestras vaginales. Aunque los flujos vaginales sólo corresponden a 6,2% del total de cultivos, el aislamiento de *Candida* es mayor en este tipo de muestra, por tratarse de un microorganismo comensal.

Un estudio reciente demostró que las cepas de *Candida* aisladas de pacientes con infección del tracto urinario en unidades de cuidados intensivos eran clonalmente idénticas a las obtenidas de muestra vaginal²¹, lo cual, apoya la idea de que la mayoría de las infecciones por *Candida* en pacientes hospitalizados son endógenas, lo cual podría explicar la mayor prevalencia de candiduria en mujeres, respecto a hombres en este estudio (Tabla 2).

Otros autores han hecho ver la importancia de vigilar también las infecciones fúngicas en pacientes ambulatorios que, aunque no comprometen la vida del paciente, representan la microbiota presente, pudiendo traducirse en una infección invasora si se presentan las condiciones de una infección oportunista².

Sin considerar las muestras de flujo vaginal, los dos tipos de muestras que continúan en frecuencia son las respiratorias bajas y las de orina (Tabla 2), aisladas fundamentalmente de pacientes hospitalizados. Aunque el rol patógeno de levaduras en muestras respiratorias bajas es discutido, pues las neumonías por *Candida* son inusuales²², en pacientes hospitalizados la vía respiratoria podría actuar como reservorio del agente.

La segunda especie aislada, en frecuencia, después de *C. albicans*, fue *C. glabrata* (8,4%), recuperada principalmente de flujos vaginales. Otras especies aisladas con menor frecuencia fueron *C. tropicalis* (6,0%), *C. krusei* (1,8%), *C. famata* (1,8%) y *C. parapsilosis* (1,8%); esta última se recuperó exclusivamente de muestras pediátricas (niños bajo un año de edad), lo que se ha descrito previamente en otros estudios⁵.

En relación a la susceptibilidad a fluconazol, la mayoría de las cepas de *C. albicans* fueron sensibles a fluconazol, mientras que *C. glabrata* mostró una menor susceptibilidad a fluconazol, siendo 76,8% de las cepas sensibles dosis dependiente (SDD). También la mayoría de estas cepas se aislaron de flujo vaginal. *Candida parapsilosis* no mostró resistencia a fluconazol lo que coincide con un estudio nacional previo⁵. *Candida tropicalis* mostró un porcentaje no despreciable de resistencia (20%) lo cual había sido descrito previamente⁵. Tanto, *C. krusei* como *C. famata* aisladas en este estudio presentaron 100% de resistencia a fluconazol. La resistencia de *C. krusei* es intrínseca a azoles, mientras que ocasionalmente cepas de *C. famata* pueden presentar resistencia primaria a estos antifúngicos^{2,21}.

En todos los pacientes bajo 15 años de edad, los aislados fueron sensibles a fluconazol. En pacientes adultos se aislaron muestras resistentes, fundamentalmente de flujo vaginal. La microbiota vaginal es un reservorio importante de levaduras del género *Candida*; por lo tanto, debiera considerarse la vigilancia de este tipo de infecciones.

Este estudio muestra la realidad de una institución que atiende tanto a pacientes hospitalizados como ambulatorios, comprobándose que la mayor parte de las muestras desde donde se aíslan levaduras del género *Candida* provienen de pacientes ambulatorios, adultos y corresponden principalmente a flujos vaginales presentando algunas especies menor susceptibilidad a fluconazol, como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. famata* (Tabla 4).

La distribución de especies y la resistencia a azoles, varía de acuerdo al sexo, edad y procedencia de los pacientes. El conocimiento de la distribución de especies y susceptibilidad a azoles en pacientes ambulatorios podría ser útil, considerando que podrían representar reservorios de infecciones fúngicas invasoras. Estudios futuros, que incluyan el análisis de la historia clínica de los pacientes ambulatorios y un seguimiento de estos, podrán intentar comprobar esta hipótesis.

Resumen

La mayoría de los estudios de vigilancia de levaduras del género *Candida* se realizan en candidiasis invasora en pacientes hospitalizados; sin embargo, no existen estudios que evalúen simultáneamente la distribución global de especies y susceptibilidad a fluconazol de cepas de *Candida* aisladas de pacientes hospitalizados y ambulatorios. Se analizaron 166 cepas de *Candida*, recolectadas consecutivamente en un período de 6 meses, las cuales fueron aisladas de flujo vaginal (73,5%), orina (7,8%), muestras respiratorias bajas (7,8%), hemocultivos (4,2%), líquidos estériles (2,4%) y heridas (1,8%). Un 71,1% provenía de pacientes ambulatorios. La especies aisladas

fueron *Candida albicans* (78,9%), *C. glabrata* (8,4%), *C. tropicalis* (6,0%), *C. famata* (1,8%), *C. krusei* (1,8%), *C. parapsilosis* (1,8%) y *C. sake* (1,2%). Los porcentajes de sensibilidad a fluconazol fueron: 92,3% para *C. albicans*, 85,7% para *C. glabrata* (siendo la mayoría sensible dosis dependiente), 100% para *C. parapsilosis* y 80% para *C.*

tropicalis. En los niños, todos hospitalizados, se aislaron sólo cepas sensibles, mientras que en adultos ambulatorios se aislaron más cepas resistentes, fundamentalmente de flujo vaginal. Considerar cepas ambulatorias en futuros estudios de vigilancia permitirían dar cuenta de probables reservorios de cepas más resistentes, como *C. glabrata*.

Referencias

- 1.- Calderone R A. *Candida* and Candidiasis. Editorial ASM Press, Washington DC. 2002. Págs. 37-53.
- 2.- Pfaller M A, Diekema D J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
- 3.- Martínez-Suárez J V, Rodríguez-Tudela J L. La resistencia a antifúngicos en los hongos patógenos oportunistas (II). Imidazoles y triazoles. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14: 490-8.
- 4.- Silva V, Díaz M C, Febré N, and Chilean invasive infection group. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med Mycol* 2004; 42: 333-9.
- 5.- Alvarado D, Díaz M C, Silva V. Identificación y susceptibilidad antifúngica de *Candida* spp. aisladas de micosis invasora. Influencia del porcentaje de inhibición del crecimiento para la determinación de la CIM. *Rev Méd Chile* 2002; 130; 4: 416-23.
- 6.- Pfaller M A, Jones R N, Doern G, Sader H S, Hollis R J, Messer S A, for the Sentry Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1886-9.
- 7.- Hajjeh R A, Sofair A N, Harrison L H, Lyon G M, Arthington-Skaggs B A, Mirza S A, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1519-27.
- 8.- Kao A, Brandt M, Pruitt W R, Conn L, Perkins B, Stephens D, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: result of population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1164-70.
- 9.- Rodero L, Davel G, Córdoba S, Soria M, Cantero C, Hochenfeller F. Multicenter study on nosocomial candidiasis in the Republic of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 1999; 31: 114-19.
- 10.- Pfaller M A, Jones R N, Doern G V, Sader H S, Messer S A, Houston A, et al, and The Sentry Participant Group. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 747-51.
- 11.- Colombo A L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. *Braz J Infect Dis* 2000; 3: 113-8.
- 12.- Barchiesi F, Arzeni D, Del Prete M S, Sinico A, Falconi di Francesco L, Pasticci M B, et al. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 541-8.
- 13.- Walmsley S, King S, McGeer A, Ye Y, Richardson S. Oropharyngeal candidiasis in patients with immunodeficiency virus: correlation of clinical outcome with *in vitro* resistance, serum azole levels and immunosuppression. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1554-61.
- 14.- Sobel J D, Zervos M, Reed B D, Hooton T, Soper D, Nyirjesky P, et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 34-8.
- 15.- Sobel J D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369: 1961-71.
- 16.- Odds F C, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-9.
- 17.- Ramani R, Gromadzki S, Pincus D H, Salkin I F, Chaturvedi. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeasts isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3396-8.
- 18.- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (ASFT) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1-8.
- 19.- EUCAST Technical Note on fluconazole. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 193-5.
- 20.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- 21.- Silva V, Hermosilla G, Abarca C. Nosocomial candiduria in women undergoing urinary catheterization. Clonal relationship between strains isolated from vaginal tract and urine. *Med Mycol* 2007; 45: 645-51.
- 22.- Hidalgo A. Radiología de las infecciones fúngicas invasoras del aparato respiratorio. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 14-18.