

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* FRENTE A ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS AISLADAS DE MICOSIS INVASIVAS.

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON MENCIÓN EN
BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE.

AUTOR:

Daniel Alvarado Pérez

TUTORES: Profesor, Doctor Víctor Silva, Programa de Microbiología y Micología del
ICBM.

Profesora Asistente T.M., María Cristina Díaz, Programa de Microbiología y
Micología del ICBM.

AÑO 2000

..	1
..	3
AGRADECIMIENTOS .	5
RESUMEN .	7
INTRODUCCIÓN .	9
HIPÓTESIS .	15
OBJETIVOS . .	17
OBJETIVOS GENERALES: . .	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: . .	17
MATERIALES Y MÉTODO .	19
Determinación del perfil de sensibilidad “<i>in vitro</i>”: .	20
Drogas: . .	20
Medio de cultivo: . .	21
Inóculo: .	21
Control de Calidad: . .	22
Incubación: .	22
Lectura: .	22
Criterios de susceptibilidad de las levaduras frente a las drogas antifúngicas. .	22
RESULTADOS . .	25
DISCUSIÓN .	31
CONCLUSIONES . .	35
BIBLIOGRAFÍA .	37

DEDICATORIA

Para mi Familia, mi mayor orgullo y a mi princesa encantada.....

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Daniel y Mariana por su amor y fé inelaudicable.

A Carlita, por enseñarme a ser más feliz.

A mis hermanos Christian y Juan Pablo, porque todavía juegan conmigo.

A mi sobrino Nicolás, duendecito de esperanza.

A mis tutores y amigos, profesor, Doctor Víctor Silva, profesora María Cristina Díaz y Don Ricardo Contreras por su guía, buena voluntad y sentido del humor.

A mis queridas profesoras Leonor Armanet y Juana Vargas, por sus consejos y paciencia.

Y por sobre todo a Dios, que siempre ha estado conmigo.

RESUMEN

En los últimos 20 años se ha observado un aumento progresivo de infecciones invasivas y sistémicas causadas por hongos, siendo estas infecciones causa importante de morbilidad, principalmente en pacientes hospitalizados e inmunodeprimidos. Las levaduras del género *Candida* son los principales agentes asociados a estos cuadros y al ser parte de la microbiota del hombre son considerados patógenos oportunistas. En la década de los 90, se ha observado además, un cambio en el patrón de los agentes etiológicos, asociados probablemente al apareamiento de especies y selección de cepas menos susceptibles a determinadas drogas antifúngicas. Por tal motivo, el diagnóstico específico del agente y la determinación del perfil de susceptibilidad “in vitro” trae consecuencias prácticas para el clínico, en la elección rápida y certera de una mejor conducta terapéutica.

Objetivo: Debido a los escasos antecedentes sobre esta realidad en nuestro medio, proponemos las especies de levaduras aisladas de infecciones invasoras o sistémicas en pacientes internados en unidades críticas de centros hospitalarios chilenos y determinar el perfil de sensibilidad “in vitro”, obteniendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a diversos antifúngicos.

Materiales y Métodos: Se estudiaron 50 cepas de cinco especies del género *Candida* aisladas de infecciones invasoras, las cuales fueron identificadas según los procedimientos estándares usados en Micología Médica. La determinación del perfil de sensibilidad “in vitro” fue realizada por el método de microdilución en caldo según las normas de NCCLS (1997), frente a anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol; considerando la CIM como el 80 % de inhibición del crecimiento para azólicos y 100 % de inhibición para anfotericina B.

Resultados: Todas las cepas presentaron CIM con valores # de 1 µg/ml, clasificando a las cepas como sensibles. Para ketoconazol hubo un 80% de cepas sensibles con valores # de 0.125 µg/ml, resistencia y sensibilidad dosis dependiente (SDD) se observó en 2 y 8 cepas respectivamente. Con itraconazol hubo un 64% de cepas sensibles con valores # de 0.125 µg/ml, 8 cepas se mostraron resistentes y 10 presentaron CIM considerados SDD. Frente a fluconazol hubo un 74% de sensibilidad con valores # de 16 µg/ml, 7 cepas presentaron resistencia.

Se observó resistencia simultánea frente a itraconazol y a fluconazol en un 10% de las cepas, correspondiendo a 3 *C. albicans*, 1 *C. glabrata* y 1 *C. lusitanae*.

Conclusiones: A partir de los resultados obtenidos podemos demostrar que en Chile existen varias especies de levaduras del género *Candida* aisladas de infecciones invasoras, siendo *C. albicans* la especie más frecuente (52%), seguida de *C. parapsilosis* (26%).

Las 50 cepas de levaduras se mostraron sensibles frente a la anfotericina B. Las cepas de *C. albicans*, presentaron el rango más amplio de CIM frente al ketoconazol e itraconazol, con valores de 0.03 a 16 µg/ml, las otras especies de *Candida* presentaron valores más estrechos. El rango mayor de CIM, frente a fluconazol lo presentó *C. tropicalis* con valores de 0.25 a 128 µg/ml.

INTRODUCCIÓN

Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden formar parte de la microbiota humana. Bajo ciertas circunstancias los hongos pueden ser agentes etiológicos de infección (VARTIVARIAN,1992). Las infecciones producidas por hongos se denominan micosis y estas pueden ser superficiales, subcutáneas, profundas y sistémicas (KWON- CHUNG & BENNETT, 1992).

La capacidad de producir infecciones depende de la virulencia del agente, tamaño del inóculo y el estado inmunológico del huésped (KOBAYASHI & MEDOFF, 1994).

En los últimos años ha ocurrido un aumento continuo en el número de infecciones producidas por hongos. En 1950, el aislamiento de estos agentes en la sangre era reportado como un suceso raro y la mayoría de las infecciones diseminadas eran producidas por una cantidad limitada de especies (HAZEN,1960). Factores como la edad extrema, enfermedad de base, neutropenia, terapia inmunosupresora, terapia antibacteriana prolongada, procedimientos quirúrgicos invasivos, así como la selección de cepas más virulentas de hongos han influido para el gran aumento de infecciones oportunistas producidas por estos agentes (ODDS,1980; ANAISSIE,1992; FEBRE et al. 1999). Los grandes responsables del aumento de las micosis graves son las levaduras, principalmente las especies del género *Candida*, estas se encuentran en el hombre como microbiota normal del tracto gastrointestinal, incluyendo orofarínge, recto y perineo así como en el tracto urinario y genital femenino (DEMBRY et al. 1994). *Candida spp.* pueden ser causa de cuadros clínicos que varían de infecciones simples a procesos invasivos graves, siendo considerados patógenos oportunistas letales (MAZER et al. 1982).

Candida albicans es la especie tipo del género siendo la más frecuentemente aislada en los diversos tipos de candidosis (KOIVIKKO et al. 1988). Candidosis intrahospitalaria aumentó más de 3 veces en la década de los 80 (RICHARDSON & WARNOCK 1993). BANERJEE et al. (1991) estudiando infección sanguínea en unidades de terapia intensiva en 124 hospitales que participaron del programa "National Nosocomial Infection Surveillance System" (NNISS) entre 1980 a 1989, registraron 25.000 infecciones fúngicas del torrente sanguíneo, de las cuales los procesos debido a *Candida* spp. sufrieron aumento en hospitales universitarios de pequeño y gran tamaño en 219 y 487%, respectivamente, y en 370% en hospitales no universitarios de gran tamaño. El incremento de infecciones por levaduras del género *Candida* fué mayor que el de *S. aureus*, *Enterococcus* spp. y bacilos aerobios Gram negativos. *C. albicans* es responsable del 10 al 15% de las infecciones nosocomiales con aislamiento primario en hemocultivos (PFALLER & WENZEL, 1992). En este lapso de tiempo, la tasa de infección fúngica intrahospitalaria aumentó de 2,0 a 3,8 cada 1.000 pacientes, siendo especies de *Candida* los agentes responsables por el 78% del total de infecciones nosocomiales causadas por hongos (BECK-SAGE & JARVIS, 1993). Candidosis sistémica puede ocurrir en pacientes con cáncer y transplantados de órgano bajo terapia inmunosupresiva (CLIFT, 1984, QUINTILIANI et al. 1984). La incidencia de fungemia y candidosis diseminada varía según el grupo de pacientes. Datos de necropsias realizadas en pacientes con cáncer de diversos centros de Europa, Canadá y Japón, demuestran que infecciones fúngicas ocurrieron en 25% del total de pacientes con leucemia, 12% con linfoma y 5% en casos de tumores sólidos (BODEY et al. 1992). GOODMAN et al. (1992) verifican que los pacientes sometidos a trasplantes de médula ósea presentan infecciones fúngicas entre 10,4 a 21,2%. La tasa de micosis en pacientes transplantados varía del 0 al 42%, dependiendo del servicio, órgano transplantado y del procedimiento realizado (PAYA, 1993).

En algunos centros norteamericanos, *Candida* spp. es el tercer agente más frecuentemente aislado de cultivos de sangre en pacientes hospitalizados (SUGAR, 1995). En pacientes neutropénicos la presencia de levaduras en dos o más sitios de mucosa, puede predecir enfermedad invasiva en el 60% de los casos (SANFORD et al. 1980). En Chile se realizó recientemente un estudio multicéntrico, en el cual se observó sólo un 0,66% de infección fúngica profunda a partir de 450 episodios de neutropenia febril en niños con cáncer (SANTOLAYA et al. 1997). Infecciones fúngicas del tracto urinario también han aumentado en los últimos años, siendo especies de *Candida* los agentes más prevalentes en ambos sexos (WENZEL, 1993), en pacientes sondados e internados en UTI prevalecen estas infecciones en mujeres (FEBRÉ et al. 1999).

Además de *C. albicans*, se relata un aumento progresivo de infecciones graves causadas por diversas levaduras como *Trichosporon* spp, *Rhodotorula* spp, *Malassezia* spp, *Saccharomyces cerevisiae* y principalmente diversas especies del género *Candida* no - *albicans* (HAZEN, 1995). Se observa que *C. albicans* es responsable de aproximadamente el 50% de infecciones invasivas o sistémicas (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Las otras especies que le siguen en prevalencia son *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* (HUNG et al. 1996; NG et al. 1998; RODERO et al. 1999; PFALLER et al. 1999).

C. tropicalis ha sido consignado como el principal patógeno de micosis diseminada en pacientes inmunodeprimidos (WINGARD et al. 1991).

Actualmente *C. parapsilosis* es el segundo agente, después de *C. albicans* aislado de candidiasis invasiva en Europa, Canadá y Sud América (PFALLER et al. 1998).

La patogenia de *Candida spp.* depende de factores tales como capacidad de adhesión, producción de pseudohifas, enzimas, potencial de variabilidad antigénica e hidrofobicidad (TORRES-RODRIGUEZ & CANCELLER, 1993; SENET & ROBERT, 1995). Existen tres condiciones de mayor importancia en la virulencia de *Candida spp.*, una es la capacidad de adherencia a la superficie celular, esto implica el reconocimiento de las células del huésped a través de moléculas de adhesinas presentes en la superficie la levadura. Las principales fuerzas responsables de la adherencia serían electrostáticas e hidrofóbicas, siendo reportado en *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (TORRES-RODRIGUEZ & CANCELLER, 1993). SUDIM & ROGER, (1982) describen adherencia de diversas especies de *Candida* en materiales inertes de interés médico como plástico, PVC y nylon, a través de proteínas plasmáticas de la pared celular micótica, denominada biopelícula. El segundo factor, es la actividad enzimática que ha sido relacionada principalmente a la producción de proteinasas y fosfolipasas (SENET & ROBERT 1995). El tercer factor es el poder de variabilidad cromosómica y antigénica que presenta *C. albicans* en su capacidad de evadir mecanismos de defensa del huésped (POLAIN et al. 1980),.

Las micosis invasivas son de difícil tratamiento, siendo anfotericina B la droga de elección, dado su amplio espectro y acción fungicida. Sin embargo, este antifúngico presenta varias desventajas, es nefrotóxico, ingresa al Sistema Nervioso Central, afecta el globo ocular y además su costo es muy alto; a pesar de esto la anfotericina B es la terapia empírica de las micosis invasivas (REX et al. 1995). Los agentes antimicóticos de origen azólicos, especialmente ketoconazol, itraconazol y fluconazol son una buena alternativa en el tratamiento de las fungemias, estos agentes tienen un amplio espectro de actividad. A diferencia de la anfotericina B que se administra sólo por vía intravenosa, los derivados azólicos se administran por vía oral y son menos tóxicos, pero solamente tienen una acción fungostática contra la mayoría de los hongos patógenos (GRANT & CLISSOLD, 1989; SUGAR 1995). Las drogas antifúngicas están dirigidas contra alguna vía de la síntesis de membrana de los hongos, actuando en el ergosterol, que es el análogo del colesterol en las células de los mamíferos. El ergosterol cumple una función fundamental en la fluidez y la integridad de la membrana. Los polienos dentro de los cuales está la anfotericina B y nistatina, se intercalan dentro de la membrana fúngica formando un canal por el cual los componentes celulares, especialmente el potasio, se filtran destruyendo la gradiente de protones dentro de la membrana. Los azoles en cambio inhiben la biosíntesis del ergosterol, ya que actúan contra la enzima lanosterol desmetilasa (BODEY, 1992 ; WHITE et al. 1998).

La resistencia “*in vitro*”, en un aislamiento de levadura, puede definirse como primaria o secundaria. Un microorganismo que es resistente a una droga previo a la exposición de esta, se describe como resistencia primaria o intrínseca. La resistencia secundaria, se manifiesta en respuesta a la exposición de un antifúngico (WHITE et al. 1998). Posteriormente, se ha observado en pacientes bajo tratamiento con fluconazol, aumento

de infecciones por *C. glabrata* y *C. krusei*, siendo esta última especie, naturalmente resistente al triazólico (WINGARD et al. 1993; REX et al. 1995). VAN ELDERE et al. (1996) estableció que algunas levaduras consideradas patógenos oportunistas emergentes presentan Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) elevadas para determinados antimicóticos.

Varios grupos relatan que cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. dublinensis* tienen elevados CIM frente a fluconazol, ketoconazol e itraconazol (PFALLER et al. 1998; CEBALLOS et al. 1999; FEBRÉ et al. 1999).

El creciente surgimiento de levaduras resistentes es un fenómeno esperado ya que el tratamiento con antimicóticos es realizado por períodos prolongados (REX et al. 1995). Este fenómeno se ha observado en cepas de *C. albicans* de serotipo A, *C. glabrata* y , principalmente *C. krusei*, aisladas de pacientes con SIDA, (SILVA et al. 1998) y en levaduras aisladas de infección urinaria en pacientes cateterizados e internados en UTI (FEBRÉ et al. 1999). Estudios recientes han revelado que el resultado de la clínica y evolución de la levadura dependen de su susceptibilidad “*in vitro*” (BARCHIESI, 1995 (1); WHITE et al. 1998). El desarrollo de resistencia a los azólicos en cepas de *C. albicans* ha sido estudiado mediante técnicas bioquímicas y moleculares. Mediante análisis del DNA genómico en aislados obtenidos pre- y post-tratamiento con drogas azólicas, registran que los microorganismos resistentes a estas, surgen por la mutación de una cepa previamente sensible, esto indica que se producen cepas de levaduras menos sensibles que otras, con variados niveles de suceptibilidad a los antifúngicos (PFALLER et al. 1994; BARCHIESI et al. 1995 (2)). WHITE et al. (1997) observaron en un paciente con HIV que desarrolló 14 episodios de candidiasis oral, tratado con fluconazol en altas dosis, que los aislamientos correspondían a la misma cepa, de modo que la resistencia al anmicótico estaría asociada a pequeños cambios genéticos.

La alteración en el patrón etiológico de las micosis trae consecuencias prácticas para la prescripción de la conducta terapéutica y refuerza a la vez la necesidad de los laboratorios de dominar metodologías para el aislamiento e identificación correcta de las especies de hongos asociadas a cuadros clínicos, por esto que el diagnóstico precoz de infección fúngica invasora representa un gran desafío (RINALDI, 1991).

Según PFALLER (1995) la tipificación molecular ha sido una herramienta valiosísima para el diagnóstico definitivo de especies. Técnicas como “electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)”, “reacción de polimerasa en cadena (PCR)”, y “amplificación de DNA polimórfico randomizado– (RAPD)”, han auxiliado el desarrollo de estudios epidemiológicos en la detección de hongos emergentes en infecciones intrahospitalarias, lo que ha permitido una simple, rápida y sensible discriminación de cepas previamente aisladas (DEMBRY et al. 1994).

A raíz de toda la documentación descrita del fenómeno de resistencia primaria y adquirida de levaduras frente a antifúngicos, así como la disponibilidad de alternativas terapéuticas a anfotericina B queda en evidencia la importancia de realizar estudios de suceptibilidad “*in vitro*” para auxiliar al clínico en el diagnóstico precoz de micosis invasiva y la definición del mejor esquema terapéutico. Sin embargo en Chile, pocos centros identifican las especies de levaduras y ninguno determina rutinariamente el perfil de sensibilidad de las levaduras aisladas de pacientes críticos. Además, no existe un centro

de referencia nacional que norme o asista las necesidades de vigilancia de resistencia en estos microorganismos.

Por tal motivo nos proponemos identificar las especies de levaduras y estudiar la sensibilidad "*in vitro*" de estos agentes aislados a partir de material clínico representativo de micosis invasivas o sistémicas provenientes de pacientes pediátricos y adultos internados en centros hospitalarios de Chile, utilizando la técnica de microdilución en caldo, estandarizada por la NCCLS (1997).

HIPÓTESIS

En Chile los estudios microbiológicos en levaduras agentes de infección invasora o sistémica son limitados y la frecuencia reportada es inferior a los datos internacionales. La aplicación en algunos centros, de métodos de mayor sensibilidad en el aislamiento y reconocimiento del agente a partir del material clínico, ha contribuido al diagnóstico precoz de estas micosis invasivas. En estudios extranjeros, realizados principalmente en países desarrollados, se relata un aumento de aislamiento de levaduras resistentes o que presentan elevados CIM frente a los distintos antimicóticos. En base a los antecedentes expuestos, pretendemos demostrar la presencia de distintas especies con variados perfiles de sensibilidad antifúngica en las levaduras asociadas a infecciones invasoras o sistémicas en pacientes internados en unidades críticas de Hospitales Chilenos, predominando las cepas con rangos considerados sensibles. Sin embargo, esperamos determinar cepas que presenten CIM elevadas, frente a los azólicos de uso frecuente, identificando levaduras resistentes en nuestro medio.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

Identificar las especies de levaduras responsables de candidosis invasoras y determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* en levaduras del género *Candida* aisladas de infecciones invasivas o sistémicas, a partir de pacientes internados en unidades críticas de centros hospitalarios chilenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Caracterizar a nivel de especie las levaduras aisladas de infecciones invasivas, según método estandarizado.

Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM), CIM₅₀ y CIM₉₀ de anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol para las distintas cepas de levaduras por el método de microdilución en caldo.

MATERIALES Y MÉTODO

Entre Enero y Junio del 2000 se estudiaron un total de 50 levaduras aisladas de muestras clínicas representativas de infecciones fúngicas invasoras o sistémicas de pacientes internados en unidades críticas de centros hospitalarios del país. Los hospitales que facilitaron las cepas fueron: Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Hospital Roberto del Río, Hospital San José - CDT Eloisa Díaz, Hospital Barros Luco Trudeau , y el Hospital Gustavo Fricke de Viña del Mar.

Todas las muestras clínicas, como sangre, lavado bronqueoalveolar (LBA), punción renal, fístula y catéter entre otras fueron recolectadas previa solicitud del médico tratante, durante la hospitalización del paciente.

El criterio de inclusión de cepas aisladas de LBA, (por ser un lugar no estéril), se consideró en base de los siguientes aspectos:

Clínicos: Cuadro pulmonar sugestivo de infección.

Microbiológicos: Aislamiento de levaduras sobre 10^5 UFC/ml , sin la presencia de otro microorganismo patógeno. El crecimiento polimicrobiano o desarrollo de escaso número de levaduras no fue considerado representativo de infección del tracto respiratorio.

Las muestras fueron tomadas por personal de cada unidad asistencial y el aislamiento del agente se realizó en los respectivos laboratorios de microbiología de cada centro hospitalario. Las levaduras fueron remitidas para su caracterización a nivel de especie y sensibilidad "*in vitro*", a los laboratorios de Micología del Programa de

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD IN VITRO FRENTE A ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS AISLADAS DE MICOSIS INVASIVAS.

Microbiología y Micología ,Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Las especies de levaduras se identificaron según los procedimientos estándares empleados en Micología Médica, analizando las características fisiológicas, bioquímicas y micromorfológicas de cada cepa (KURTZMAN & FELL, 1998).

Las levaduras fueron cultivadas durante 24 a 48 horas en agar Sabouraud-glucosa, luego se realizó la prueba de tubo germinal en 0,5 ml de plasma fresco humano siendo incubado a 37° C durante 2 horas.

Paralelamente se realizó un auxonograma para determinar el patrón de asimilación de la cepa a distintos hidratos de carbono. La prueba de auxonograma se realizó de la siguiente forma: En un medio C, libre de azúcares fundido y mantenido a una temperatura de 50° C, se agregó un inóculo de la cepa en estudio, con turbidez de 2.0 MacFarland, el cual fué vertido en una placa de Petri de 150 mm de diámetro. Luego de la solidificación, se agregaron en posición equidistante, 15 discos impregnados con un diferente carbohidrato, para finalmente incubar la placa a 25°C durante 24 a 48 horas. Además se realizó la técnica de microcultivo en agar arroz más Twen 80 al 1%, para analizar las características microscópicas de la levadura, siendo incubada a 25°C durante 48 a 72 horas.

Luego de ser identificadas, las cepas fueron mantenidas en discos de gelatina deshidratados (SILVA et al.,1997), para la posterior determinación del perfil de sensibilidad “*in vitro*.”

Determinación del perfil de sensibilidad “*in vitro*”:

La técnica utilizada fué la de microdilución en caldo, estandarizada por el National Coommittee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M-27, 1997). Esta técnica cuantitativa, tiene como principio el probar la inhibición de crecimiento de un inóculo de levadura, a concentraciones definidas de una droga específica, para así poder determinar la menor concentración de la droga capaz de inhibir el crecimiento de la levadura, conocido como concentración inhibitoria mínima (CIM).

Drogas:

Las drogas antifúngicas a evaluar fueron las de administración sistémica disponibles en Chile: anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Los antifúngicos se obtuvieron a partir de cada laboratorio que tiene su respectiva patente, Skuib, Janssen y Pfizer, respectivamente en su presentación original de polvo.

La solución madre de ketoconazol fué preparada diluyendo la droga en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 7,68 mg/ ml. Itraconazol,

fluconazol y anfotericina B fueron diluidos en DMSO, consiguiendo una concentración de 0,96 mg/ml para las tres drogas. Estas soluciones madres se conservaron a -20°C . Posteriormente, al momento de ocupar las drogas, se tomaron 500 μl de las soluciones madres y se llevaron a 10 ml con agua destilada (dilución 1:200), siendo esta dilución considerada solución stock. Se realizaron 10 diluciones de la droga en tubos partiendo con 2 ml de la solución stock como droga pura, luego en el segundo tubo se dispensó 1ml de la droga diluida y se agregó 1ml de DMSO, se agitó en vortex y posteriormente se tomó 1 ml de la droga diluida 1:2 y se colocó en el tercer tubo que ya tiene 1ml de DMSO quedando con una dilución de (1:4), así se realizó sucesivamente hasta el tubo 10 que contiene la última dilución (1:512). Finalmente se cargaron las microplacas estériles, que poseen 96 pocillos de fondo plano, con 50 μl de las distintas concentraciones de la droga que presentaban los siguientes rangos: fluconazol 0,05 - 128 $\mu\text{g/ml}$, itraconazol 0,03 - 160 $\mu\text{g/ml}$, ketoconazol 0,03 -160 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina B 0,03 - 160 $\mu\text{g/ml}$.

En cada celda de la columna 11 se dispensó la menor concentración de la droga, luego en la columna 10 se colocó la siguiente concentración de la droga, continuando con las siguientes columnas, hasta llegar a la más concentrada en la columna número 2.

Medio de cultivo:

Se diluyó el medio RPMI 1640 con L-glutamina en agua destilada en la concentración de 46,5 g/L, se agregó glucosa para llegar al 2%, luego se tamponó con MOPS a pH 7.0, posteriormente se esterilizó por filtración y luego se almacenó a 4°C hasta su uso.

Inóculo:

Las levaduras fueron subcultivadas en tubos con agar Sabouraud glucosado, incubándose a 35° durante 24 y 48 horas. Este procedimiento fué repetido consecutivamente dos veces antes de realizar el ensayo. El inóculo se preparó con colonias de levaduras que tenían 24 horas de incubación. Las levaduras se suspendieron en 5 ml de solución salina estéril (8,5 g/l de NaCl). La suspensión se agitó en vortex por 15 segundos, posteriormente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm de modo que el inóculo diera un valor entre 0.13 y 0.14 de densidad óptica (DO). Esta absorbancia es equivalente al patrón de turbidez 0.5 MacFarland, cuya cantidad de levaduras es de 1.5×10^6 por ml.

El inóculo fué diluido 1:50 en agua destilada estéril y posteriormente 1:20 en medio RPMI 1640 para su uso. Luego se agregó 100 μl del inóculo en las placas de microtitulación que contenían las drogas en distintas concentraciones.

La concentración final obtenida de levaduras por pocillo fué 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/ml. Los pocillos de la columna 12 son controles de crecimiento que contienen el solvente

más inóculo en RPMI 1640. Los orificios de la columna 1 son controles negativos para lectura, conteniendo sólo agua destilada.

Control de Calidad:

En cada microplaca usada, la primera y segunda fila se cargaron con cepas control ATCC cuyas CIM son conocidas para las cuatro drogas antifúngicas probadas, correspondiendo la primera a *C. krusei*, N° 1258 y la segunda a *C. parapsilosis*, N° 1789, las 6 filas restantes se cargaron con las cepas en estudio.

Incubación:

Las microplacas conteniendo las distintas concentraciones de antifúngicos y el inóculo de las cepas, fueron incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas.

Lectura:

La disminución de por lo menos 80% del crecimiento para las cepas estudiadas con azólicos y la ausencia de crecimiento con anfotericina B, fué evaluada visualmente comparándose con los pocillos controles. Además la lectura de las placas se realizó en un lector de ELISA a 405 nm de absorbancia, a las 24 y 48 horas, para corroborar los resultados. La menor concentración capaz de inhibir el 80 % del crecimiento del microorganismo, es identificada como la CIM para cada azólico. La ausencia total de crecimiento en la menor concentración de anfotericina B, será considerada CIM para esta droga. Los CIM₅₀ y CIM₉₀ para cada antifúngico fueron determinadas por especies de levaduras. La susceptibilidad de las cepas frente a cada droga fué clasificada como sensible (S), sensibilidad dosis dependiente (SDD) y resistente (R), según los criterios establecidos por NCCLS, M-27, 1997.

Criterios de susceptibilidad de las levaduras frente a las drogas antifúngicas.

Criterios	Fluconazol g/mL	Itraconazol g/mL	Ketoconazol g/mL	Anfotericina B g/mL
Sensible	8	0,125	0,125	1
SDD	16 a 32	0,25 a 0,5	0,25 a 0,5	/
Resistente	64	1	1	2

Se considera una cepa Susceptibilidad Dosis Dependiente (SDD), cuando presenta CIM entre los rangos considerados sensibles y resistentes, traduciéndose en la posibilidad de tratamiento con el antimicótico, pero en dosis elevadas.

RESULTADOS

Entre Enero y Junio del 2000, fueron estudiadas un total de 50 cepas de levaduras aisladas de distintas muestras clínicas representativas de micosis invasoras en pacientes internados en unidades críticas de hospitales chilenos, a las cuales, luego de ser identificadas a nivel de especie, se les determinó el perfil de sensibilidad “in vitro” frente a los distintos antifúngicos de administración sistémica disponibles en nuestro país.

La figura 1 muestra la distribución en porcentajes de la totalidad de cepas de levaduras estudiadas según el origen del aislamiento. De las 50 cepas aisladas, 36 (72%) provienen de hemocultivos, seguidos de 10 obtenidas de LBA (20%) y 2 de catéter (4%).

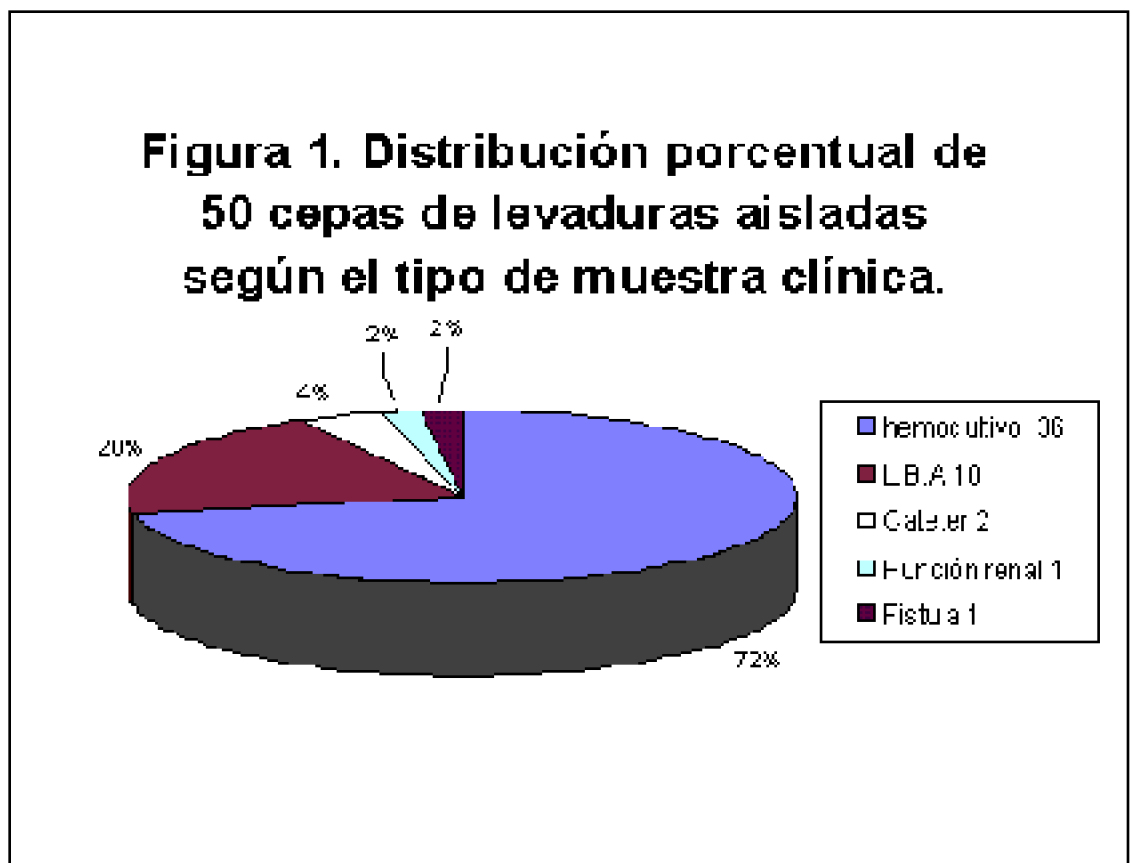


Figura 1

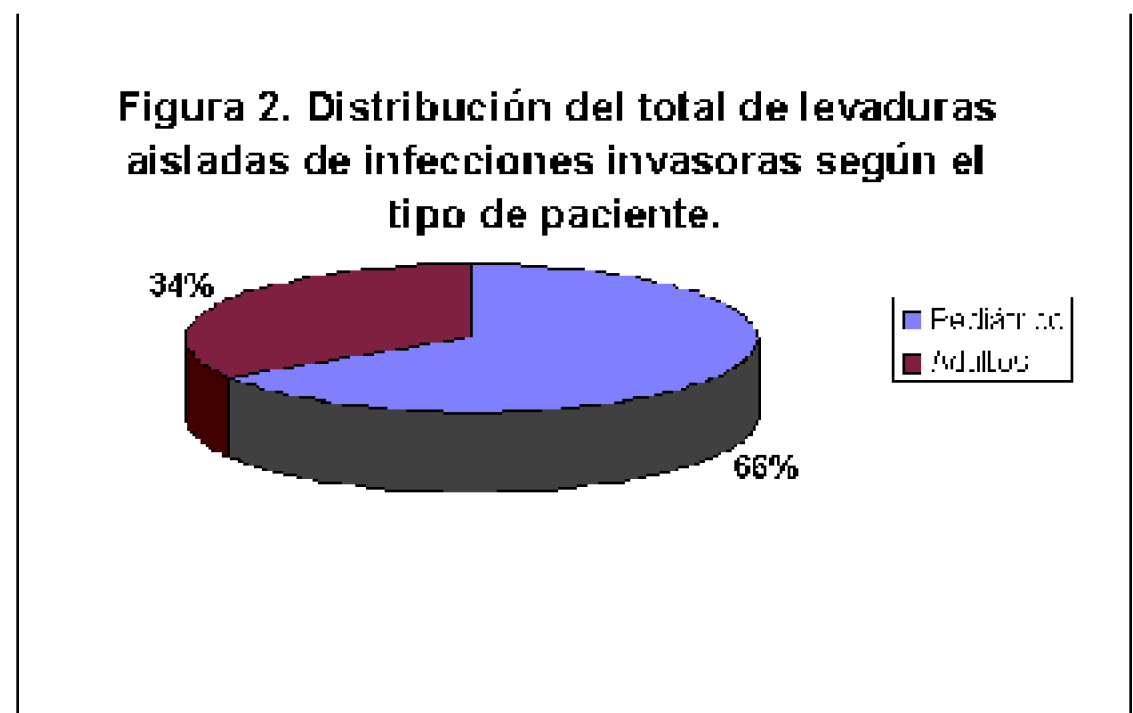


Figura 2

En la figura 2, se describe el grupo de pacientes al cual pertenecen las levaduras, siendo más frecuentes las cepas aisladas de pacientes pediátricos, en el cual están incluidas las muestras provenientes de niños menores de 10 años, el otro grupo pertenece a los adultos conformado por pacientes con edades superiores a 20 años. No se presentaron aislamientos en personas de 10 a 20 años, en este estudio.

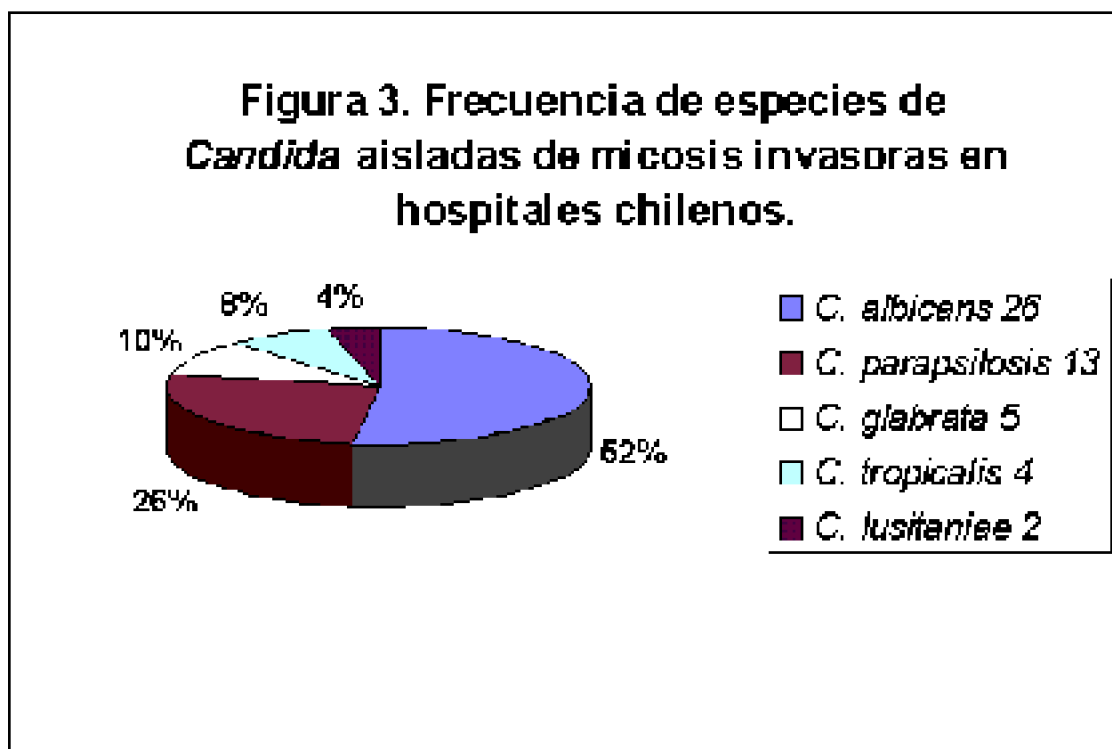


Figura 3

En la figura 3, se presentan las distintas especies de *Candida* identificadas, de las cuales 26 (52 %), fueron *C. albicans*, seguidas de *C. parapsilosis* con 13 cepas (26 %), *C. glabrata* con 5 (10 %), *C. tropicalis* 4 (8%) y *C.lusitanae* 2 (4) %.

Tabla 4. Distribución de especies de *Candida* aisladas de micosis invasoras en hospitales chilenos según tipo de muestra clínica.

Especie	Hemocultivo	LBA*	Catéter	PR*	Fístula
	n	N	n	n	n
<i>C. albicans</i>	16	7	1	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	11	1	1	0	0
<i>C. glabrata</i>	5	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	4	0	0	0	0
<i>C. lusitanae</i>	0	2	0	0	0
Total	36	10	2	1	1

*LBA: Lavado bronqueoalveolar *PR: Punción renal

En la tabla 4, se observa la distribución de especies de *Candida* según la procedencia de muestra clínica. De las 36 cepas obtenidas de hemocultivo, 16

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD IN VITRO FRENTE A ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS AISLADAS DE MICOSIS INVASIVAS.

corresponden a *C. albicans*, 11 son *C. parapsilosis* y la totalidad de las cepas de *C. glabrata* (5) y *C. tropicalis* (4). *C. parapsilosis* es proporcionalmente más frecuente en en hemocultivos que y 1 *C. parapsilosis*. Del total de cepas provenientes de catéter (2), 1 correspondió a *C. albicans* y otra a *C. parapsilosis*.

Tabla 5. Perfil de sensibilidad frente a Anfotericina B según especie de *Candida* y CIM ($\mu\text{g/ml}$), en cepas aisladas en hospitales chilenos.

Especie	n	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>C. albicans</i>	26	0.25 – 1	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	13	0.5 – 1	1	1
<i>C. glabrata</i>	5	0.5 – 1	1	1
<i>C. tropicalis</i>	4	1 – 1	1	1
<i>C. lusitaniae</i>	2	1 – 1	1	1

En la tabla 5 observamos que todas las cepas de las distintas especies de levaduras, presentaron valores de susceptibilidad frente a anfotericina B, iguales o inferiores a $1\mu\text{g/ml}$, considerándose sensibles para este antifúngico. *C. parapsilosis* presenta $0.25\mu\text{g/ml}$ como la concentración con mayor frecuencia.

Especie	n	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>C. albicans</i>	26	0.03 – 16	0.125	0.5
<i>C. parapsilosis</i>	13	0.03 – 0.125	0.03	0.06
<i>C. glabrata</i>	5	0.03 – 0.125	0.06	0.125
<i>C. tropicalis</i>	4	0.03 – 0.125	0.03	0.125
<i>C. lusitaniae</i>	2	0.06 – 0.125	0.06	0.125

La tabla 6, describe a las cepas de *C. albicans* con un amplio rango de CIM frente a ketoconazol, presentando valores entre 0.03 a $16\mu\text{g/ml}$, siendo esta última concentración considerada resistente, la moda fué de $0.06\mu\text{g/ml}$. Las otras especies de *Candida* mostraron rangos más estrechos, observándose valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ iguales o inferiores a $0.125\mu\text{g/ml}$.

Tabla 7. Perfil de sensibilidad frente a Itraconazol según especies de *Candida* y CIM ($\mu\text{g/ml}$) en cepas aisladas en hospitales chilenos.

Especie	n	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>C. albicans</i>	26	0.03 – 16	0.06	1
<i>C. parapsilosis</i>	13	0.03 – 1	0.06	0.25
<i>C. glabrata</i>	5	0.125 – 1	0.5	1
<i>C. tropicalis</i>	4	0.03 – 0.25	0.03	0.25
<i>C. lusitaniae</i>	2	1 – 2	1	2

Se puede ver en la tabla 7 que las cepas de *C. albicans* muestran el mayor rango de CIM frente al itraconazol, con valores entre 0.03 a $16\mu\text{g/ml}$ siendo la concentración de mayor frecuencia $0,03\mu\text{g/ml}$. Cabe resaltar que las 2 cepas de *C. lusitaniae* muestran

CIM resistentes a esta droga. Las CIM₉₀ de *C. albicans* y *C. glabrata* presentan niveles considerados resistentes frente al itraconazol.

Tabla 8. Perfil de sensibilidad frente a Fluconazol según especie de *Candida* y CIM µg/ml en cepas aisladas en hospitales chilenos.

Especie	N	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>C. albicans</i>	26	0.25 – 64	4	64
<i>C. parapsilosis</i>	13	0.25 – 32	0.25	0.5
<i>C. glabrata</i>	5	0.25 – 64	0.5	64
<i>C. tropicalis</i>	4	0.25 – 128	0.5	128
<i>C. lusitaniae</i>	2	32 – 64	32	64

En la tabla 8, se observa que las cepas pertenecientes a *C. tropicalis*, muestran el mayor rango de CIM cuyos niveles fluctuaron entre 0.25 a 128 µg/ml frente a fluconazol, seguidos por *C. albicans* y *C. glabrata* con valores de 0.25 a 64 µg/ml.

Resaltamos que los CIM₉₀ para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* presentan CIM iguales o superiores a 64 µg/ml, lo cual es considerado resistente. Esto muestra que hay una mayor diversidad de especies que presentan cepas con elevados CIM para fluconazol.

Tabla 9. Distribución de especies de *Candida*, según el patrón de susceptibilidad frente a los azólicos.

Especie	n	Imidazol Ketoconazol			Triazoles Itraconazol			Fluconazol		
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C. albicans</i>	26	16	8	2	17	5	4	18	4	4
<i>C. parapsilosis</i>	13	13	0	0	11	1	1	12	1	0
<i>C. glabrata</i>	5	5	0	0	1	3	1	4	0	1
<i>C. tropicalis</i>	4	4	0	0	3	1	0	3	0	1
<i>C. lusitaniae</i>	2	2	0	0	0	0	2	0	1	1
Total	50	40	8	2	32	10	8	37	6	7

S: Sensible SDD: Susceptibilidad Dosis Dependiente R: Resistente

De las 26 cepas de *C. albicans*, 16 (80 %) fueron sensibles a ketoconazol, 8 (16 %) presentaron patrones SDD, y 2 (4 %) fueron resistentes. Todas las otras especies se mostraron sensibles a esta droga.

Frente a itraconazol, 32 (64 %) cepas de levaduras fueron sensibles y 8 (16 %) cepas fueron resistentes, siendo 4 *C. albicans*, las 2 cepas aisladas de *C. lusitaniae*, 1 *C. parapsilosis* y 1 *C. glabrata*. Las diez (20 %) cepas restantes presentaron sensibilidad considerada SDD.

Treinta y siete (74 %) cepas resultaron sensibles al fluconazol y 8 (14 %) evidenciaron susceptibilidad en rangos de resistencia correspondiendo a 4 *C. albicans* y una cepa por cada especie de *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae*. Seis (14 %) cepas presentaron patrón SDD.

Se observó resistencia en forma simultánea frente a itraconazol como a fluconazol en

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD IN VITRO FRENTE A ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS AISLADAS DE MICOSIS INVASIVAS.

5 cepas, correspondiendo a 3 *C. albicans*, 1 *C. glabrata* y 1 *C. lusitaniae*.

Tabla 10. Distribución de cepas según el tipo de paciente y patrón de sensibilidad, frente a los azólicos.

Tipo de paciente						
Azólico	Pediátrico (33)			Adulto (17)		
	S	SDD	R	S	SDD	R
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Ketoconazol	28 (85)	5 (13)	—	12 (70)	3 (18)	2 (12)
Itraconazol	23 (70)	7 (21)	3 (9)	9 (53)	3 (18)	5 (29)
Fluconazol	27 (82)	2 (6)	4 (12)	10 (59)	4 (23)	3 (18)

S: Sensible SDD: Susceptibilidad Dosis Dependiente R: Resistente

En la tabla 10 se muestra el perfil de sensibilidad de las levaduras aisladas en pacientes adultos y pediátricos. Frente a ketoconazol, observamos resistencia sólo en las cepas aisladas de adultos. Al confrontar los datos con itraconazol, vemos que las cepas de pacientes pediátricos resultaron ser más sensibles (70 %) que las levaduras aisladas de adultos (53 %). La resistencia detectada en las cepas de pacientes adultos (29 %) fué superior a las cepas aisladas de pacientes pediátricos (9 %), sin embargo este fenómeno muestra solamente una tendencia, ya que no obtuvimos diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$). La sensibilidad de las levaduras de pacientes pediátricos (82 %) es mayor que la de los pacientes adultos (59 %) frente a fluconazol. Se observa un porcentaje similar de cepas resistentes en ambos grupos, sin embargo un porcentaje mayor (23 %) de cepas aisladas en adultos presentaron patrones SDD, en relación a las cepas provenientes de pacientes pediátricos (6 %).

DISCUSIÓN

Las infecciones producidas por hongos han aumentado considerablemente en los últimos años (ANAISSIE,1992; FEBRÉ et al. 1999), concomitantemente con un cambio epidemiológico importante en base al patrón etiológico de la candidosis invasora, donde *C. albicans* continúa siendo la especie más frecuentemente aislada, sin que su frecuencia supere el 50% (KOIVIKKO et al. 1988), siendo seguida por diversas especies del género cuya predominancia variará según la región geográfica (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; HUNG et al. 1996; NG et al. 1998; PFALLER et al. 1999).

En nuestro estudio, analizamos 50 cepas de levaduras del género *Candida* aisladas de micosis invasoras en pacientes internados en unidades críticas de hospitales chilenos desde Enero a Junio del 2000. Del total de cepas de levaduras, sobre el 70% provenían de hemocultivos (tabla 1), siendo el principal tipo de paciente con candidemia el grupo pediátrico correspondiendo al 66% (tabla 2). La especie más frecuente fué *C. albicans* con 52%, seguida de *C. parapsilosis* (26%), *C. glabrata* (10%), *C. tropicalis* (4%) y *C. lusitaniae* (4%) (tabla 3). Estos datos son similares a los reportados por YAMAMURA et al. (1996); RODERO et al. (1999) y PFALLER et al. (1999), quienes detectan en países de Europa, Canadá y Sud América a *C. albicans* con una frecuencia cercana al 50%, seguida de *C. parapsilosis*. Sin embargo, nuestros resultados son contradictorios a los relatados en estudios epidemiológicos en USA, donde *C. glabrata* es la segunda especie prevalente en infecciones invasivas (SANFORD, 1993; GUBBINS et al. 1993). Difiere además de el estudio realizado por ARAJ et al. (1998), donde muestra a *C. tropicalis* como la segunda especie más frecuente en el Líbano.

Según el material clínico de procedencia de la levadura (tabla 4), *C. albicans* predomina en muestras de sangre y LBA, con 16 y 7 cepas respectivamente. Por otro lado de las 12 cepas pertenecientes a *C. parapsilosis*, 11 fueron recuperadas de hemocultivo. Las 4 cepas de *C. tropicalis* y las 5 de *C. glabrata*, provienen de este tipo de muestra. *C. lusitaniae* sólo se aisló de LBA. Este predominio de las especies de *Candida* por tipo de muestra, concuerda en parte con lo descrito por FRASER et al. (1992).

Conjuntamente con estos cambios epidemiológicos, se ha demostrado el surgimiento de resistencia en especies de *Candida*, frente a los antimicóticos de administración sistémica (REX et al. 1995; PFALLER et al. 1999; FEBRÉ et al. 1999). Diversos grupos relatan la existencia de levaduras naturalmente resistentes a drogas como *C. krusei* frente a fluconazol o *C. lusitaniae* con anfotericina B (HADFIELD et al. 1987; WINGARD et al. 1993; REX et al. 1995). Existen cepas que paulatinamente se tornan menos sensibles a los antimicóticos (REX et al. 1995; MARR et al. 1997). La alteración en el patrón de sensibilidad en las levaduras, acarrea consecuencias importantes en la prescripción y conducta terapéutica a seguir por el médico tratante en los casos de infecciones fúngicas graves (RINALDI, 1991).

En este trabajo, todas las cepas de las distintas especies de levaduras, resultaron ser sensibles a anfotericina B (tabla 5), con valores iguales o inferiores a 1 µg/ml, lo que es equivalente a estudios realizados por GALLIS et al. (1990); y QUINDÓS et al. (1999). Además, se confirma lo relatado por SEIDENFELD et al. (1983) y HADFIELD et al. (1987) quienes plantean que la resistencia a anfotericina B es poco frecuente y está limitada sólo a algunas especies como *C. guilliermondii*, *C. lipolitica* y *C. lusitaniae*. Sin embargo nuestros datos, muestran que las 2 cepas de *C. lusitaniae* son sensibles a este fármaco.

Las cepas de *C. albicans* mostraron un rango amplio de CIM frente al ketoconazol, con valores que van de 0.03 a 16 µg/ml, las otras especies de *Candida* presentaron rangos con menor variación, siendo 0.125 µg/ml la CIM más elevada (tabla 6). Frente al itraconazol se obtuvieron valores de CIM más altos, siendo nuevamente *C. albicans* la especie que presentó el rango más amplio, con valores entre 0.03 a 16 µg/ml, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. lusitaniae*, mostraron rangos que incluyeron valores considerados resistentes (1 µg/ml), las 2 cepas de *C. lusitaniae* presentaron CIM₉₀ con valores de resistencia, al igual que *C. albicans* y *C. glabrata* (tabla 7).

Fluconazol fué el antifúngico que presentó los mayores valores de CIM, donde *C. tropicalis* tuvo el mayor rango, con niveles que variaron entre 0.25 a 128 µg/ml, seguida de *C. albicans* y *C. glabrata* con valores entre 0.25 a 64 µg/ml. Los CIM₉₀ de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae*, tuvieron valores iguales o superiores a 64 µg/ml, (tabla 8).

Al agrupar los resultados de las CIM en las cepas estudiadas, según los criterios de sensibilidad, observamos que 2 de 26 cepas de *C. albicans*, presentaron CIM considerados resistentes frente a ketoconazol. Ocho de las 50 cepas fueron resistentes a itraconazol, siendo 4 *C. albicans*, 2 *C. lusitaniae*, 1 *C. parapsilosis* y 1 *C. glabrata*. Para fluconazol, 7 de las 50 cepas presentaron resistencia, de las cuales 4 fueron *C. albicans*, 1 *C. glabrata*, 1 *C. tropicalis* y 1 *C. lusitaniae* (tabla 9).

Los resultados de CIM obtenidos, son concordantes con los trabajos realizados por diversos grupos que relatan el aumento de cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* que presentaron elevados valores de CIM frente a ketoconazol, itraconazol y fluconazol (REX et al. 1995; WHITE et al. 1998; PFALLER et al. 1998; CEBALLOS et al. 1999; FEBRÉ et al. 1999).

Según los resultados de nuestro trabajo el 64% de las cepas fué sensible a itraconazol, 74 % a fluconazol, 80% con ketoconazol y el 100% presentó sensibilidad frente a anfotericina B. Estos resultados son diferentes a los reportados por QUINDÓS et al. (1999), quienes realizaron un estudio multicéntrico que incluyó 325 levaduras obtenidas de pacientes internados en unidades críticas en 12 hospitales de España, detectando altos valores de sensibilidad frente a los triazoles, obteniendo porcentajes iguales o superiores al 90%. Además la resistencia frente a estos triazoles no supero el 4%, lo que confirmó la realidad de España en cuanto a la baja resistencia frente a antifúngicos de uso habitual, reportado previamente por ARÉVALO et al. (1992). Sin embargo nuestros resultados se asemejan a los publicados por SUGAR (1995); en un estudio multicéntrico en USA y con los de ARAJ et al. (1998), quienes estudiaron 70 cepas de micosis invasivas en el Líbano, obteniendo un rango de resistencia del 4 al 17%; nuestro rango varió del 4% al 16%, dependiendo de la especie. Esto confirma lo descrito por REX et al. (1995), en el sentido de que hay un aumento en el aislamiento de cepas resistentes de *C. albicans* en pacientes provenientes de unidades críticas. Además, MARR et al. (1997), relata que cepas de *C. albicans* adquieren resistencia a los azoles tras una breve exposición a estos, pudiendo hacerse resistentes después de 23 días de terapia. Para algunos autores, *C. glabrata* es una especie altamente resistente a fluconazol (VOSS et al. 1994; REX et al. 1995; ARIAS et al. 1996). Por otro lado se describe que *C. tropicalis* presenta elevada resistencia frente a fluconazol (WINGARD et al. 1991).

Cabe resaltar la presencia de 5 cepas con resistencia simultánea a los antifúngicos itraconazol y fluconazol, fenómeno no reportado previamente en nuestro país. De estas cepas 3 correspondieron a *C. albicans*, 1 *C. glabrata* y 1 *C. lusitaniae* (tabla 9), esto concuerda con los recientes informes sobre resistencia del Programa Internacional de Vigilancia de las Candidosis (SENTRY) en USA y Europa (PFALLER et al. 1998, 1999).

Cuando analizamos los datos de la sensibilidad de las levaduras aisladas según el tipo de paciente, observamos que las cepas aisladas de adultos, fueron menos sensibles a los azólicos que las cepas provenientes de pacientes pediátricos. Esta diferencia a pesar de no ser estadísticamente significativa ($p > 0.05$), es más notoria en el itraconazol, donde 8 cepas (29%) de adultos fueron resistentes versus 3 cepas (9%) del grupo pediátrico. El perfil de sensibilidad frente a ketoconazol en las levaduras aisladas de pacientes adultos y pediátricos es similar. Sólo hubo resistencia en 2 cepas aisladas de pacientes adultos. No pudo realizarse evaluación estadística en esta tabla ya que el número de cepas resistentes provenientes de pacientes pediátricos fué cero. En el caso del fluconazol, se observó un mayor porcentaje de sensibilidad en las levaduras de pacientes pediátricos (82%) que en adultos (59%), sin embargo el porcentaje de cepas resistentes fué muy similar entre los pacientes pediátricos y adultos (tabla 10).

A raíz de los resultados obtenidos, podemos decir que en Chile la presencia del

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD IN VITRO FRENTE A ANTIFÚNGICOS EN LEVADURAS AISLADAS DE MICOSIS INVASIVAS.

fenómeno de resistencia es una realidad, además hemos detectado la presencia de cepas con resistencia simultánea a dos drogas antifúngicas, lo cual es un antecedente muy importante que confirma la importancia de llegar al diagnóstico preciso de especie y determinar el perfil de sensibilidad en levaduras aisladas de micosis invasoras de pacientes críticos en forma rutinaria. Esto permitirá auxiliar al médico tratante en el diagnóstico certero de una micosis invasiva y la elección de una adecuada terapia antifúngica.

CONCLUSIONES

1. A partir de los resultados obtenidos podemos demostrar que en Chile existen varias especies de levaduras del género *Candida*, causantes de infecciones invasivas, siendo *C. albicans* la especie más frecuente (52%), seguida de *C. parapsilosis* (26%).
2. El total de levaduras se mostraron sensibles frente a la anfotericina B, con CIM50 y CIM90 iguales a 1 µg/ml.
3. Las cepas de *C. albicans*, presentaron el rango más amplio de CIM frente al ketoconazol, con valores de 0.03 a 16 µg/ml, siendo esta concentración resistente. Dos cepas (4 %) fueron resistentes a este azólico.
4. *C. albicans* presentó el mayor rango de CIM frente al itraconazol, incluyendo valores de 0.03 a 16 µg/ml, siendo este último resistente. Ocho cepas (16 %) resultaron ser resistentes a este antifúngico.
5. Fluconazol presentó la mayor diversidad de especies con elevados CIM, el rango mayor de CIM, frente a fluconazol lo presentó *C. tropicalis* con valores de 0.25 a 128 µg/ml, seguida de *C. albicans* y *C. glabrata*. Siete cepas (14 %) fueron resistentes a esta droga.
6. Hubo 5 cepas con resistencia simultánea a itraconazol y a fluconazol, las cuales fueron 3 *C. albicans*, 1 *C. glabrata* y 1 *C. lusitanae*.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANAÏSSIE, E. - Opportunist mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer and review. **Clin. Infect. Dis.** **14** (Suppl. 1): S43-53, 1992.
2. ARAJ, G.F.; DAHER, N.K.; TABBARAH, L.A. - Antifungal susceptibility of *Candida* isolates at the American University of Beirut Medical Center. **Int. J. Antimicrob. Nov.** **10**: 291-296, 1998.
3. ARÉVALO, M.P.; ARIAS, A.; ANDREU, A.; SIERRA, A. - Sensibilidad *in vitro* de 378 aislados de *Cándida albicans* frente a anfotericina B, fluconazol e itraconazol. **Rev. Iberoam. de Micología**, **9**: 94-96, 1992.
4. ARIAS, A.; AREVALO, M.P.; ANDREU, A.; RODRIGUEZ, C.; AND SIERRA, A. - *Candida glabrata*: in vitro susceptibility of 84 isolates to eight antifungal agents. **Chemotherapy** **42**: 107-11, 1996.
5. BANARJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARONE, W.J.; and the NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM, 1991. - Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. **Am. J. Med.** **91** (Suppl. 3B): 86S-89S, 1991.
- 6.1) BARCHIESI, F.A.L.; COLOMBO, D.A.; MCOUGH; AND M.G.; RINALDI. - Comparativ study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by usin the National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed Standard. **J.Clin. Microbiol.** **32**: 2494-2500, 1995.

- 7.2) BARCHIESI, F.A.; HOLLIS, R.J.; MEGOUGA, D.A.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G.; AND PFALLER, M.A.- DNA subtypes and fluconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.** **20** : 634-640, 1995.
8. BECK-SAGÉ, C.M.; JARVIS, W.R. AND NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTION SURVEILLANCE SYSTEM.- Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. **J. Infect. Dis.** **167**: 1247-1251, 1993.
9. BODEY, G.P.; BUETELMANN, B.; DUGOID, W.; GIBBS, D.; HANAK, H.; HOTCHI, M.; MALL, G.; MARTINO, P.; MEUNIER, F.; MILLIKEN, S.; NAE, S.; OKUDAIRA, M.; SCEVOLA, D., VAN'T, W.J.- Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.** **11**: 99-109, 1992.
10. CEBALLOS, A.; GAITAN, L.A.; ORIHUELA, F.; OLEA, D.; CEBALLOS, L.; Y QUINDOS, G.- Resistencia "in vitro" a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el HIV y sin candidosis oral. **Rev. Iberoam. Micol.** **16** : 194-197, 1999.
11. CLIFT, R.A.- Candidiasis in the transplant patient. **Am. J. Med.** **77**: 34-38, 1984.
12. DEMBRY, L.M.; VASQUEZ, J.A.; ZERVOS, M.J.- DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.** **15**: 48-53, 1994.
13. FEBRÉ, N.; SILVA, V.; MEDEIROS, E.A.; WEY, S.B.; COLOMBO, A.L. and FISCHMAN, O.F.- Microbiological Characteristics of Yeasts Isolated from Urinary Tracts of Intensive Care Unit Patients, Undergoing Urinary Centralization. **Journal of Clinic Microbiology**, vol **37**: 1584-1586, 1999.
14. FRASER, V.J.; JONES, M.; DUNKEL, J.; STORFER, S.; MEDOFF, G; DUNAGAN, C.W. – Candidemia in tertiary care hospital: Epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. **Clin. Infect. Dis.** **15**: 414-421, 1992.
15. GALLIS, H.A.; DREW, R.H.; PICKARD, W.W. - Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis.** **12**: 308-329, 1990.
16. GOODMAN, J.L.; D.J. IVINSTON; B.FOX; R.A.GREENFELD; P.H. CHANDRASEKAR; H. KAISER; H. KAISER; R.K. SHADUCK; T.C.SHEA; P.STIFF; D.J. FRIEDMAN; W.G. POWDERLY; J.L. SILBER; H. HOROWITZ; A. LICHTIN; S.N. WOLFF; K.F. MORGAN; S.M. SILVER; D. WEISDORF; W.G. HO; G. GILBERT; AND D. BUEL.-A control trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. **N.Engl. J. Med.** **326**: 842-851, 1992.
17. GRANT, S.M.; AND CLISSOLD, S.D. - Itraconazole: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, a therapeutic use in superficial and systemic mycosis. **Drug.** **37**: 310-344, 1989.
18. GUBBINS, P.O.; PSCITELLI, S.C.; DANZIGER, L.H. – *Candida* urinary tract infections: A comprehensive review of their diagnosis and management. **Parmacotherapy.** **13**: 110-127, 1993.
19. HAZEN, E.L; AND REED, F.C.- Laboratory Identification of Pathogenic Fungi Simplified. Thomas, Springfield, Illinois. 1960.
20. HAZEN, K.C.- New and emerging yeasts pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** **8**: 462-478, 1995.

-
21. HUNG, C.C.; CHAN, Y.C.; CHANG, S.C., LUH, K.T.; HSIE, W.C.- Nosocomial Candidemia in a University Hospital in Taiwan. **J. Forms. Med. Assoc.** **95**: 19-28, 1996.
22. KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G.- Introducción a los hongos y micosis. En: SCHAEFER, MEDOFF, EISENTEIN y GUERRA. Microbiología, mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2 da Ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana. 46: 595-601, 1994.
23. KOIVIKKO, A.; KALIMO, K.; NIEMINEN, E.; AND VIANDER, M.- Relationship of immediate and delayed hypersensitivity to nasopharyngeal and intestinal growth of *Candida albicans* in allergic subjects. **Allergy** **43**: 192-200, 1988.
24. KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. - **The yeasts: a taxonomic study** . 6. Ed. Amsterdam, Elsevier, 1055p, 1998
25. KWON-CHUNG, K.J & BENNETT; J.E.- **Medical Micology**. London, Philadelphia, p 886, 1992.
26. MARR, K.A.; WHITE, T.C.; VAN BURIK, J.A.H.; BOURDEN, R.A.- Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in patient undergoing marrow transplantation. **Clin. Infect. Dis.** **25**: 908-910, 1997.
27. MAZER, D.G.; ALVARADO, C.J.; HASSMIR, C.A.; ZILZ, M.A.-Relation of the inanimate hospital environment to endemic nosocomial infection. **N. Engl. J. Med.** **307**: 1562-1566, 1982.
28. MEYER, R. D.- Current role of therapy with amphotericin B. **Clin. Infect. Dis.** **14** (Suppl. 1): S 154-160, 1992.
29. NG, X.P.; MADANY.M., SAW, T.L.; BAK. A.; SOO-HOO, T.S.- *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. **Micopathología** **144**: 135-140, 1998.
30. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.- Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa. 1997.
31. ODDS, F.C.- Laboratory evaluation of antifungal agents a comparative study of five imidazole derivations of clinical importance. **J. Antimicrob. Chemother.** **6**: 749-761. 1980.
32. PAYA, C.V.- Fungal infections in solid-organ transplantation. **Clin. Infect. Dis.** **16**: 677-688, 1993.
33. PFALLER, M.A; AND R. WENZEL.- Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **11**: 287-291, 1992.
34. PFALLER, M.A; J. RHINE-CHELBERG; S.W. REDDING; J. SMITH; G. FARINACCI; A. W. FOTHERGILL; AND M. G. RINALDI.- Variations in fluconazole susceptibility and electroforetic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. **J. Clin. Microbiol.** **32**: 59-64. 1994.
35. PFALLER, M.A.- Epidemiology fungal infections. The promise of molecular typing. **Clin. Infect. Dis.** **20**: 11535-1539, 1995.
36. PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; SADER, H.S.; HOLLIS, R.J.; AND 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.** **36**: 1886-1889, 1998.
37. PFALLER, M.A.; SONER, R.N.; DOEN, G.V.; FLUIT, A.C.; VERHOEL, J.; SADER, H.S.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.; COFFMAN, S.; HOLLIS, R.J.- International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: Species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** **35**: 19-25, 1999.
38. QUINDOS, G.; ABARCAL.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; AREVALO, M.P.; BORNAY, F.J.; CASALS, J.B.; HERNANDEZ, J.M.; IGLESIAS, MARTIN-MAZUELOSE.; PEREIRO, M.; REZUSTA, A.; RUBIO, M.C.; SALESA, R.; SAN MILLAN, R. AND TORRES RODRIGUEZ.- Multicenter survey of "in vitro" antifungal resistance in yeasts of medical importance isolated from Spanish patients. **Rev. Iberoam. Micol.** **16**: 97-100, 1999.
39. QUINTILIANI, R.; OWENS, N.J.; QUERCIA, R.A.; KLIMEK, J.J.; NIGHTINGALE, C.H.- Treatment and prevention of oropharyngeal candidiasis. **Am. J. Med.** **77**: 44-84, 1984.
40. REX, J.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A.- Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.** **39**: 1-8, 1995.
41. REX, J.; CHESTER, R.; COOPER, J.R.; MERZ, C.R.; GALGANI, W.G.; AND ANAÏSSIE, E. J.- Detection of amphotericin B resistant in *Candida* isolates a broth – based system. **Antimicrob. Agents. Chemother.** **39**: 906-909, 1995.
42. RINALDI, M.G.- Problems in the diagnosis of invasive fungal diseases. **Rev. Infect. Dis.** **13**: 439-495, 1991.
43. RICHARDSON, M.D; and D.W. WARNOCK. - **Fungal Infection. Diagnosis and management** . M.D. RICHARDSON AND D.W. WARNOCK.- Deep Candidiasis. Blackwell. Scientific Publications, Oxford; England . p. 103-124. 1993
44. RODERO, L.; DAVEL, G.; CORDOBA, S.; SORIA, M.; CANTERO, C.; HOCHENFELLER, F.;- Multicenter study on nosocomial candidiasis in the Republic of Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.** **31**: 114-9, 1999.
45. SANFORD, G.R.; MERZ, W.G.; WINGARD, J.R.; CHARACHE, P.; SARAL, R.- The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections. **J. Infect. Dis.** **142**: 503-509, 1980.
46. SANFORD, J.P.-The enigma of candiduria: Evolution of bladder irrigation with amphotericin B for management. From anecdote to dogma and lesson from Machiavelli-**Clin. Infect Dis.** **16**: 145-147, 1993.
47. SANTOLAYA, M.E; ALVAREZ, A.M.; BECKER, A.; COFRÉ, J.; ENRIQUEZ, N.; PAYÁ, E.; SALGADO, C.; TORDECILLA, J., VARAS; M., VILLAROEL, M.; VIVIANI, T., ZUBIETA, M.- Definición de distintos grupos de riesgo de los episodios de neutropenia febril en niños con cáncer. In: III Congreso de Infectología del Cono Sur y XIV Congreso Chileno de Infectología, Valdivia, Chile, P-29, 1997.
48. SEIDENFELD, S.M., COOPER, B.H.; SMITH, J.W.; LUBY, J.P. – Amphotericin B

- tolerance: a characteristic of *Candida parapsilosis* not shared by other *Candida* species. **J. Infect. Dis.** **147**: 116-119, 1983.
49. SENET, J.M. & ROBERT, R.- Physiopathologie des candidosis. **J. Mycol. Med.** **5**: 145-166, 1995.
50. SILVA, V.; PIRES, M.F. & FISCHMAN, O.- "In vitro" maintenance of the dermatophytes in gelatin discs: Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Parma, Italy. P.399, 178, 1997.
51. SILVA, V.; CONCEICAO, M.O.; PIPOLO, E.M.; FISCHMANN, O.; COLOMBO, O.- Serotipificación y antibiograma de *C.albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes con AIDS, sus familiares y controles. In: XIV Congreso Chileno de Infectología, Santiago, Chile, 1998.C-45.
52. SUDIN, R.L.; ROGERS, A.L.- Inhibitions of adherence of *Candida albicans*, to human epithelial cells. **Mycopathology**, **77**: 23-26, 1982.
53. SUGAR, A.M.- Fluconazole versus amphotericin B in the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Abstract 67, 7 th. European Congress of Clinical Microbiology and Infections Diseases, Vienna, 1995.
54. TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; CANCELER, A.- Factores de patogenicidad en *Candida*. **Rev. Iber. Micol. (suppl.3)** : 2-7, 1993.
55. VAN ELDERE, J.; JOOSTEN, L., VERHAGHE, A.; SUEMONT, I.- Fluconazole and Anphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committe for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. **J. Clin. Microbiol.** **34**(suppl. 4): 842-847, 1996.
56. VARTIVARIAN, S.E.- Virulence properties and neoinmune pathogenic mechanism of fungi. **Clin. Infect. Dis.** **14**(supp.1): S30-S36, 1992.
57. VOSS, A.; MEIS, J.F.G.M.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A.A.- Fluconazole in the management of fungal urinary tract infections. **Infection**, **22**: (suppl.4) 247-251, 1994.
58. WENZEL, R.P.- Prevention and control of nosocomial infections. **Williams, New York, N.Y, 2 ed.** 1993.
59. WHITE, T.C.; PFALLER, M.C.; RINALDI, M.G.; SMITH, J. AND REDDIG, S.W.- Stable of azole drug reistance asociated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. **Oral. Dis.** **3 (Suppl.1)**: 5102-5109, 1997.
60. WHITE, T.C.; MARR, K.A.; AND BOWDEN, R.A.- Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** **11**: 382-402, 1998.
61. WINGARD, J.R.; W.G. MERZ; M.G. RINALDI; AND R. SAND.- Increase in *Candida tropicalis* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **N.Engl.J. Med.** **325**: 1274-1277, 1991.
62. WINGARD, J.R.; MERZ, W.G., RINALDI, M.G.; MILLER, C.B.; KARP, J.E., SARAL, R.- Association of *Torulopsis glabrata* infectons with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. **Antimicrob. Agents Chemometer.** **37**: 1847-1849, 1993.
63. YAMAMURA, D.L; ROTSTEIN, C., NICOLLE, L.E.; IOANNOUS.- Candidemia at

selected Canadian Sites results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. **Eur. J. Hematol. Suppl. 57:** 12-17, 1996.