

ARTÍCULO ORIGINAL

Sensibilidad y resistencia *in vitro* frente al fluconazol de cepas del complejo *Candida glabrata* aisladas de procesos infecciosos vaginales

Nechesny Kiszko, Olga Gabriela^{1*}; Mereles Rodríguez, Beda Elizabeth¹; Chade, Miriam Estela¹.

¹Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Provincia de Misiones, Argentina.

*Contacto: Nechesny Kiszko, Olga Gabriela, Bonpland 1616, Misiones, Argentina; gabi_nk@hotmail.com.

Resumen

Introducción: la candidiasis vulvovaginal es una afección fúngica que por su frecuencia y difícil tratamiento resulta un problema sanitario de indudable importancia. Los agentes etiológicos principales son hongos levaduriformes del complejo *Candida albicans*, seguidos por el complejo *Candida glabrata*. El tratamiento de elección es el fluconazol. *Candida glabrata* representa un complejo de tres especies fenotípicamente indistinguibles: *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* y *Candida nivariensis*, las dos últimas altamente asociadas a multidrogarresistencia. **Objetivo:** determinar la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol de cepas del complejo *Candida glabrata* aisladas de procesos infecciosos vaginales. **Materiales y métodos:** se estudiaron 15/143 cepas levaduriformes del complejo *Candida glabrata* del cepario del Laboratorio de Micología, provenientes de exudados vaginales de mujeres en edad fértil con sintomatología clínica de infección vulvovaginal. Se identificaron fenotípicamente y proteómicamente. La sensibilidad al fluconazol se estudió mediante métodos cualitativos y cuantitativos, para cotejar la concordancia entre ambos. **Resultados:** las cepas evaluadas resultaron *Candida glabrata sensu stricto*. Mostraron sensibilidad al fluconazol, con halos de inhibición de crecimiento en un rango entre 22 y 30 mm y una CIM₅₀ entre 1 y 16 µg/ml, catalogados como sensibilidad intermedia y sensible dosisdependiente, respectivamente. La concordancia entre ambos métodos fue categórica. **Conclusiones:** ambos métodos demostraron concordancia en la valoración de la sensibilidad al fluconazol, hecho importante, puesto que en laboratorios de baja complejidad es utilizado el método cualitativo. Es necesario, continuar estos estudios con mayor número de cepas que permitan conocer el perfil epidemiológico de la candidiasis vulvovaginal, patología aún no resuelta para la Micología.

Palabras clave: candidiasis vulvovaginal, complejo *Candida glabrata*, fluconazol.

In vitro sensitivity and resistance against fluconazole of strains of the *Candida glabrata* complex isolated from vaginal infectious processes.

Abstract

Introduction: Vulvovaginal candidiasis is a fungal condition. Due to its frequency and difficult treatment, it is a health problem of unquestionable importance. The etiologic agents are yeast fungi of the *Candida albicans* complex, followed by the *Candida glabrata* complex. The treatment of choice is fluconazole. *Candida glabrata* represents a complex of three phenotypically indistinguishable species: *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis*, the last two of which are highly associated with multidrug resistance. **Objective:** To determine the sensitivity *in vitro* against fluconazole of strains of the *Candida glabrata* complex isolated from vaginal infectious processes. **Materials and methods:** 15/143 yeast strains of the *Candida glabrata* complex, taken from vaginal smears from women of childbearing age with clinical symptomatology of vulvovaginal infection were studied. They were identified phenotypically and proteomically. Sensitivity to fluconazole was studied by qualitative and quantitative methods to match the agreement between the two. **Results:** All the strains evaluated were *Candida glabrata sensu stricto*. They showed sensitivity to fluconazole, with growth inhibition halos in a range between 22 and 30mm, and an MIC₅₀ between 1 and 16 µg/ml, catalogued as intermediate sensitivity and dose-dependent sensitivity respectively. The agreement between both methods was categorical. **Conclusions:** Both methods showed concordance in the assessment of sen

sitivity to fluconazole, which is important since the qualitative method is used in laboratories of low complexity. It is necessary to continue these studies with a greater number of strains so as to learn the epidemiological profile of vulvovaginal candidiasis, a pathology not yet resolved for mycology.

Keywords: vulvovaginal candidiasis, *Candida glabrata* complex, fluconazole.

Introducción

El término vulvovaginitis se define como la inflamación del tracto genital femenino bajo. Se manifiesta con una secreción de flujo anómalo, irritante, maloliente o no, que produce malestar local (sensación de prurito y quemazón) y puede o no, acompañarse de disuria y/o dispareunia [1]. Con respecto a las vulvovaginitis infecciosas, se destacan las causadas por bacterias, levaduras, virus, parásitos y otros. La infección vulvovaginal por levaduras del género *Candida* es la segunda causa más frecuente de vulvovaginitis, después de la vaginosis bacteriana [2].

La candidiasis vulvovaginal, por su frecuencia y difícil tratamiento en ocasiones, es un problema sanitario de indudable importancia. Se estima que afecta al 75 % de las mujeres con al menos un episodio durante su vida fértil y, en la mitad de ellas, se reportan dos o tres cuadros infecciosos en un año. Aunque sólo en un 5 % de los casos la enfermedad se vuelve crónica, las recurrencias suponen un reto para los ginecólogos y repercuten negativamente en la calidad de vida de las mujeres que la padecen [3].

C. albicans es el principal agente de las vulvovaginitis micóticas, que constituyen actualmente, hasta el 90 % de los casos de las infecciones. Este hongo es parte de la biota de la vagina, sin embargo, cuando se altera el equilibrio, es capaz de producir candidiasis y, por tanto, hay que tratarlo de inmediato [4]. *C. glabrata* es la segunda especie más frecuentemente aisla-

da, considerada con facilidad para desarrollar resistencia secundaria al fluconazol en pacientes que reciben habitualmente tratamientos con este triazol [5].

Clínicamente, no es posible identificar las especies de *Candida* causantes de vaginitis, ya que los signos y síntomas no siempre son patognomónicos, por lo tanto, son necesarios los estudios microbiológicos [6].

Con base en hallazgos moleculares, se reportó que *C. glabrata* representa un complejo de tres especies fenotípicamente indistinguibles: *C. glabrata sensu stricto*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*, las dos últimas, altamente asociadas a resistencia a múltiples drogas [7].

Es muy importante evitar la automedicación para no seleccionar especies no sensibles a los antifúngicos. En el 20 % de los casos, las mujeres no presentan síntomas, cuando están colonizadas por *Candida*. En pacientes que se automedican, puede aumentar la prevalencia de otras especies no *C. albicans*, que suelen presentar mayor resistencia al tratamiento antifúngico [4].

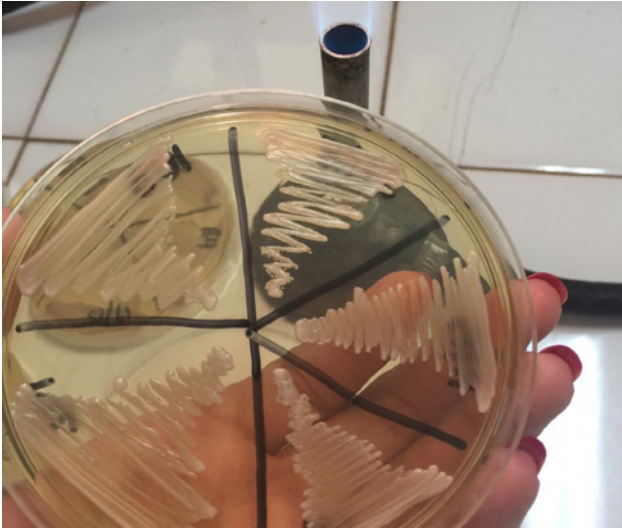
La candidiasis vulvovaginal es una antigua enfermedad que, aún en el mundo moderno, continúa presentando una elevada incidencia. A pesar de los avances terapéuticos, no existen tratamientos efectivos y nuestro conocimiento sobre la patogenia de esta micosis es todavía incompleto [8].

Actualmente, hay disponibles dos estándares para la determinación de resistencia a los antifúngicos propuestos por

Anexo 1. Identificación fenotípica de *C. glabrata*: metodología MALDI-TOF.

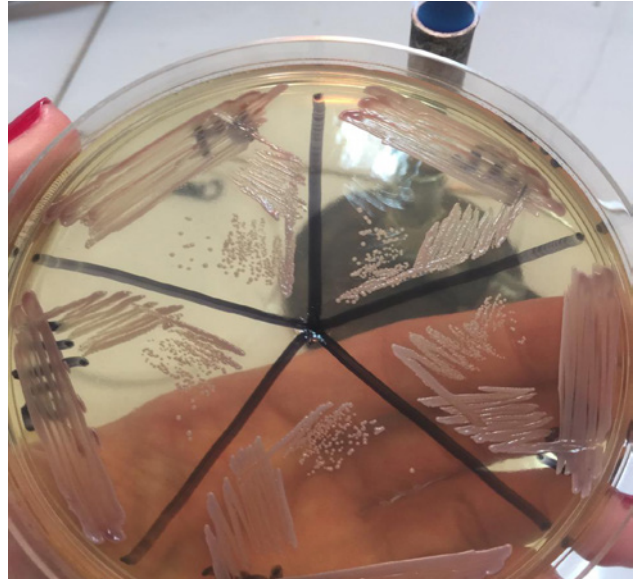
Cepa N°	Especie	Mejor score
1NK	<i>Candida glabrata</i>	2.151
2NK	<i>Candida glabrata</i>	1.928
3NK	<i>Candida glabrata</i>	1.940
4NK	<i>Candida glabrata</i>	1.990
5NK	<i>Candida glabrata</i>	1.856
6NK	<i>Candida glabrata</i>	2.058
7NK	<i>Candida glabrata</i>	1.807
8NK	<i>Candida glabrata</i>	2.001
9NK	<i>Candida glabrata</i>	1.736
10NK	<i>Candida glabrata</i>	2.044
11NK	<i>Candida glabrata</i>	2.272
12NK	<i>Candida glabrata</i>	2.238
13NK	<i>Candida glabrata</i>	2.288
14NK	<i>Candida glabrata</i>	2.406
15NK	<i>Candida glabrata</i>	2.297

Figura 1. Crecimiento de hongos levaduriformes en agar morfología para levaduras.



► CIM₅₀: concentración inhibitoria mínima 50.

Figura 2. Crecimiento de levaduras en el medio CHROMagar Cándida.



el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). De esta manera, es posible conocer el perfil de sensibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a determinados antifúngicos y colaborar con la elección del tratamiento más adecuado y eficaz. A su vez, los estudios de vigilancia local y regional son fundamentales para realizar un seguimiento de las tendencias en la aparición de resistencia [9-11].

El objetivo del trabajo fue determinar la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol de cepas del complejo *Candida glabrata* aisladas de procesos infecciosos vaginales.

Materiales y métodos

Se trabajó con un diseño de tipo descriptivo de corte transversal y retrospectivo. Criterios de inclusión: cepas del complejo *C. glabrata* identificadas en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), obtenidas de exudados vaginales. Criterios de exclusión: cepas de hongos levaduriformes tipo *C. glabrata* aisladas de otras muestras clínicas y cepas de hongos levaduriformes no correspondientes al complejo *C. glabrata*.

Universo: se evaluaron cepas del complejo *C. glabrata* identi

Figura 3. Micromorfología de *C. glabrata* en agar leche.400X Especificar aumento.

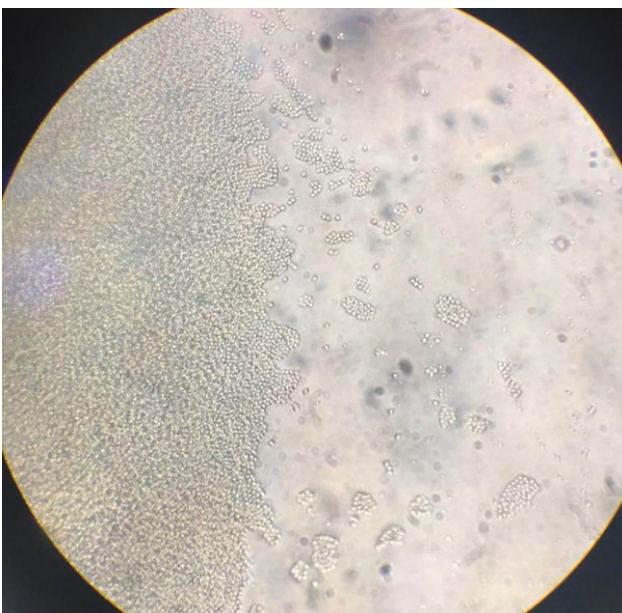


Figura 4. Prueba de asimilación de trehalosa positiva.

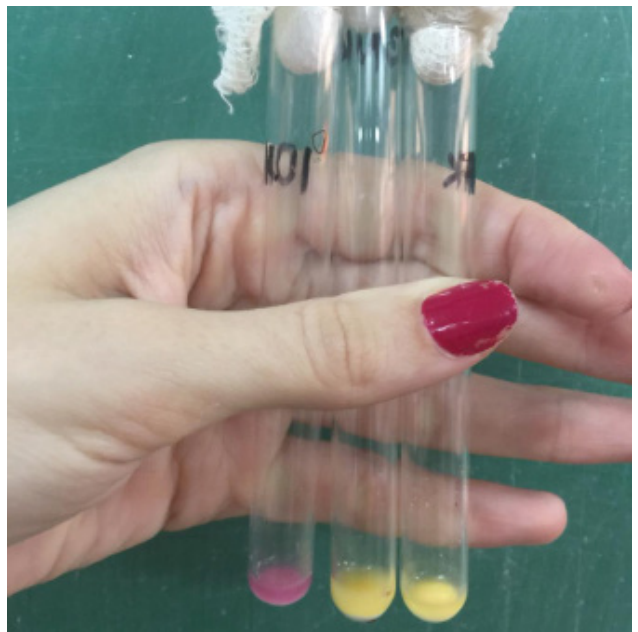


Tabla I. Puntos de corte de los métodos de dilución y difusión del CLSI 2017.

Agente antifúngico	Especies	Puntos de corte de diámetro de zona y categorías interpretativas (mm)			
		S	I	SDD	R
Casposfungina	<i>C. albicans</i>	≥17	15-16	-	≤14
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-
	<i>C. guilliermondii</i>	≥13	11-12	-	≤10
	<i>C. krusei</i>	≥17	15-16	-	≤14
	<i>C. parapsilosis</i>	≥13	20-21	-	≤10
	<i>C. tropicalis</i>	≥17	15-16	-	≤14
Micafungina	<i>C. albicans</i>	≥22	20-21	-	≤19
	<i>C. glabrata</i>	≥30	28-29	-	≤27
	<i>C. guilliermondii</i>	≥16	14-15	-	≤13
	<i>C. krusei</i>	≥22	20-21	-	≤19
	<i>C. parapsilosis</i>	≥16	14-15	-	≤13
	<i>C. tropicalis</i>	≥22	20-21	-	≤19
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	≥17	15-16	-	≤14
	<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≥15	13-14	-	≤12
	<i>C. parapsilosis</i>	≥17	15-16	-	≤14
	<i>C. tropicalis</i>	≥17	15-16	-	≤14
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≥17	-	14-16	≤13
	<i>C. glabrata</i>	-	-	≥15	≤14
	<i>C. krusei</i>	-	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	≥17	-	14-16	≤13
	<i>C. tropicalis</i>	≥17	-	14-16	≤13

► S: sensible, I: sensibilidad intermedia, SDD: sensible dosis dependiente, R: resistente; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute o Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio.

ficadas en el Laboratorio de Micología de la FCEQyN, obtenidas de exudados vaginales de mujeres en edad fértil.

Muestra: se estudiaron 15 cepas viables del complejo *C. glabrata*, pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Micología de la FCEQyN, aisladas de exudados vaginales de mujeres en edad fértil que presentaban sintomatología clínica compatible con infección vulvovaginal.

Verificación de viabilidad y características fenotípicas de las cepas en estudio

A partir del cultivo puro, se iniciaron los estudios sistemáticos de sus características morfológicas, fisiológicas y sexuales bajo condiciones estandarizadas:

- Crecimiento a 28°C y 37°C.
- Siembra en agar cromogénico CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France).
- Estudio de la micromorfología en medio agar leche 2% + Tween 80.

- Cepas control: se utilizaron la cepa *C. glabrata* 90030, perteneciente a la *American Type Culture Collection* (ATCC) y la cepa *C. glabrata* DMic 982882 facilitada por el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán” (INEI).
- Prueba de asimilación de trehalosa: se utilizaron tabletas de trehalosa, Diatabs™ (Rosco) Dinamarca.
- Identificación proteómica: las cepas identificadas fenotípicamente se validaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en el Departamento de Micología del INEI “Dr. Carlos G. Malbrán”.
- Conservación de las cepas: en agar agua y medio de cultivo Castellani por duplicado y refrigeradas a 4 - 8°C.
- Métodos de estudio de sensibilidad: método de difusión en disco, método estandarizado M44-A (CLSI) y técnica de Kirby-Bauer [11].
- Cepas control: *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Tabla II. Puntos de corte vigentes del año 2018 del EDEF 7.3 EUCAST.

Agente antifúngico	CIM (mg/l)	
	Sensible ≤	Resistente >
Anfotericina B	1	1
Anidulafungina	0.064	0.064
Caspofungina	*	*
Fluconazol	0.002	32
Isavuconazol	IE	IE
Itraconazol	IE	IE
Micafungina	0.032	0.032
Posaconazol	IE	IE
Voriconazol	IE	IE

► CIM: concentración inhibitoria mínima; IE: insuficiente evidencia; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing o Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos. *Los aislados que son susceptibles a la anidulafungina, así como a la micafungina, deben considerarse susceptibles a la caspofungina, hasta que se hayan establecido los puntos de corte de la caspofungina. De manera similar, los aislamientos de *C. parapsilosis* intermedios a la anidulafungina y la micafungina pueden considerarse intermedios a la caspofungina. Los puntos de corte EUCAST aún no se han establecido para la caspofungina, debido a la variación significativa entre laboratorios en los rangos de CIM para la caspofungina.

Para interpretar los resultados, se establecieron las siguientes categorías *in vitro*, según el documento estandarizado (Tabla I): 1. Sensible. 2. Intermedio/ Sensible, dependiente de dosis. 3. Resistente [11].

Método para la determinación de la concentración inhibitoria mínima por microdilución de agentes antifúngicos para levaduras. Documento EDEF 7.3.1 EUCAST 2017.

En la tabla II, se muestran los puntos de corte vigentes a partir de 2018, utilizados para la interpretación de los resultados. El documento EDEF 7.3.1, con puntos de corte *breakpoint* v.9.0 considera la categoría Sensibilidad Intermedia (I) según: S<x mg/l; I>x, <y mg/l; R>y mg/l [12].

Análisis estadístico

Se evaluó la concordancia categórica entre el método de dilución (*gold standard*) y el método de difusión [13,14].

Figura 5. Lectura de halos de inhibición de crecimiento de cepas de *C. glabrata* frente a fluconazol.

Resultados

Las cepas de *C. glabrata* de la colección de cultivos del Laboratorio de Micología de la FCEQyN fueron recuperadas en agar morfología para levaduras, y en el medio cromogénico CHROMagar Candida. En el agar morfología para levaduras, se observó crecimiento de colonias cremosas, de bordes enteros, limitadas, poco elevadas y de color blanco, incubadas a 35 ± 2°C durante 24 - 48h (Figura 1). En CHROMagar Candida, las cepas del complejo *C. glabrata* se manifestaron como colonias cremosas de color malva. (Figura 2).

Las características micromorfológicas en agar leche se observaron (Figura 3) como levaduras unicelulares esféricas u ovoides, de paredes delgadas, de 2,5 - 5 µm x 3,5 - 4,5 µm de diámetro, sin pseudomicelio en 400x, compatibles con especies del complejo *C. glabrata*.

En la prueba de asimilación de trehalosa, se observó el viraje de color rosado al amarillo en todas las cepas, lo que

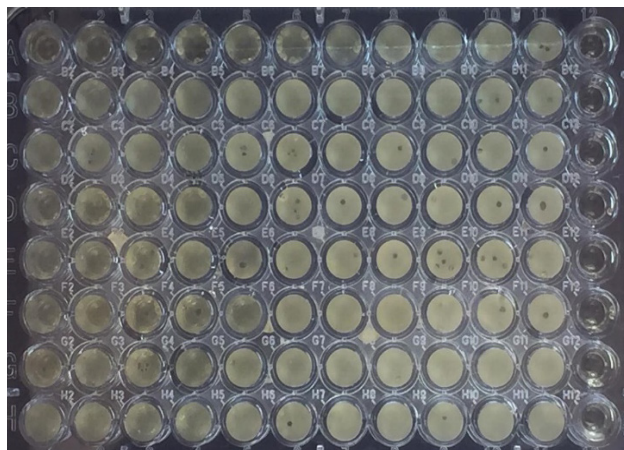
Figura 6. Placa de microdilución con desarrollo levaduriforme.

Tabla III. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento producidos por el FCZ a las diferentes cepas de *C. glabrata*.

Cepa N°	Potencia Tableta de FCZ	Diámetro halo (mm)	Sensible	SDD halo ≥ 15mm	Resistente halo ≤ 14mm
1	25 µg	27	-	X	-
2	25 µg	26	-	X	-
3	25 µg	26	-	X	-
4	25 µg	27	-	X	-
5	25 µg	27	-	X	-
6	25 µg	26	-	X	-
7	25 µg	26	-	X	-
8	25 µg	22	-	X	-
9	25 µg	23	-	X	-
10	25 µg	23	-	X	-
11	25 µg	25	-	X	-
12	25 µg	26	-	X	-
13	25 µg	27	-	X	-
14	25 µg	25	-	X	-
15	25 µg	30	-	X	-

► FCZ: fluconazol; SDD: sensible dosisdependiente.

indica que el microorganismo asimila la trehalosa (Figura 4). Se validaron las identificaciones fenotípicas de las 15 levaduras del complejo *C. glabrata* mediante el método de espectrometría de masas, MALDI-TOF MS en el Departamento de Micología del INEI “Dr. Carlos G. Malbrán”. Los resultados se leyeron y analizaron con el sistema Bruker Microflex LT versión 3.1 (Bruker Daltonics, Alemania). Se consideró un *score* mayor o igual a 1,7 como identificación aceptable de la especie, entre 1,5 y 1,6, identificación aceptable del género y menor o igual a 1,5, como identificación no fiable. El resultado informado por el Departamento de Micología del INEI mostró una concordancia del 100 % entre la identificación fenotípica de *C. glabrata*, realizada en el Laboratorio de Micología de la FCEQyN, y la validación por cromatografía de masas (Anexo 1). Entre las especies objeto de estudio, no se encontraron las especies crípticas *C. nivariensis* y *C. braconensis* pertenecientes al complejo *C. glabrata*.

Evaluación de la sensibilidad por difusión en medio sólido

Se observaron halos nítidos de inhibición de crecimiento, según se muestra en la figura 5. Para las cepas control *C. krusei* ATCC 6258 Y *C. parapsilosis* ATCC 22019, los halos de inhibición resultantes se ajustaron a los requerimientos estandarizados. En la tabla III, se observan los resultados leídos: los halos de inhibición de crecimiento producidos por el fluconazol, para las cepas estudiadas, mostraron un rango de 22 - 30 mm..

Las 15 cepas evaluadas por el método cualitativo fueron categorizadas como sensibles dosisdependientes al fluconazol.

Evaluación de la sensibilidad por microdilución

Los valores de la CIM₅₀ (µg/ml) del fluconazol mostraron un rango de 1-16 µg/ml, con una CIM₅₀ promedio de 8 µg/ml (Figura 6). Los valores encontrados de la CIM₅₀ de *C. glabrata* se muestran en la tabla IV.

Análisis de los datos

La concordancia categórica entre los métodos de dilución y de difusión fue del 100 %. Las cepas de *Candida glabrata sensu stricto* evaluadas fueron sensibles dosis dependientes/intermedio. En este trabajo y para este número de cepas, no se observaron discrepancias *muy mayores, mayores* ni *menores* entre el método de referencia y el método de difusión.

Discusión

La vulvovaginitis por *Cándida* es una de las afecciones vaginales más frecuentes. Al menos el 75% de las mujeres referirá un cuadro único de candidiasis vulvovaginal en su edad fértil y el 40 -45% podrá presentar dos o más episodios en su vida [15, 16].

Las levaduras del género *Cándida* de la colección de cultivos del Laboratorio de Micología de la FCEQyN provenientes de los casos de vulvovaginitis fueron identificadas como complejo *C. albicans*: 79 %, complejo *C. glabrata*: 10 %, *C. tropicalis*: 5 %, complejo *C. parapsilosis*: 3 %, *C. krusei*: 1 %, *Candida* spp.: 2 %. Se observó que el complejo *C. glabrata* ocupa el segundo lugar en frecuencia, después de *C. albicans*, como agente involucrado en estos procesos infecciosos, en coincidencia con numerosas publicaciones [16-18].

Tabla IV. Valores de CIM del fluconazol frente a las cepas de *C. glabrata* evaluadas.

CEPAS N°	CIM ₅₀ (µg/ml)	Categoría
1	16	Intermedia
2	16	Intermedia
3	16	Intermedia
4	4	Intermedia
5	4	Intermedia
6	8	Intermedia
7	16	Intermedia
8	16	Intermedia
9	8	Intermedia
10	4	Intermedia
11	1	Intermedia
12	2	Intermedia
13	8	Intermedia
14	4	Intermedia
15	4	Intermedia

Dentro del complejo *C. glabrata*, se han descrito dos especies crípticas relacionadas filogenéticamente: *C. nivariensis* y *C. bracarensis*. Para la identificación de las especies crípticas del complejo *C. glabrata*, es imprescindible la utilización de métodos moleculares basados sobre el análisis de los genes de las regiones genómicas del ADN ribosómico D1/D2 de las subunidades 26S, ITS1, ITS2 y 5.8S. La espectrometría de masas MALDI-TOF es una excelente alternativa a los métodos convencionales y moleculares, que permite la diferenciación de *C. nivariensis* y *C. bracarensis* [19, 20].

En el presente estudio, las especies crípticas no han sido encontradas; las cepas recuperadas y estudiadas resultaron ser *C. glabrata* s.s. Esta tendencia en la prevalencia de las especies del complejo *C. glabrata* también fue comunicada por Morales [21], en el 2014, al estudiar un total de 117 cepas del complejo *C. glabrata* pertenecientes a la colección de cultivos del Departamento de Micología del INEI "Dr. C. G. Malbrán": el 98 % fueron identificadas como *C. glabrata* s.s.

El uso cada vez más frecuente de drogas azólicas para el tratamiento de infecciones fúngicas oportunistas, como las candidiasis, y la aparición de especies resistentes a los antifúngicos originó la necesidad de determinar la sensibilidad *in vitro* a estos antimicrobianos [11, 22].

El CLSI y el EUCAST estandarizaron métodos de referencia por técnicas de dilución que permiten determinar la CIM de los antifúngicos frente a las levaduras. Sin embargo, estas metodologías son laboriosas y de difícil aplicación en la rutina de los laboratorios de microbiología. Por ello, el CLSI publicó el documento M44-A, que sentó las bases del método de difusión en agar para evaluar la sensibilidad de levaduras del género *Candida* [11, 22-25].

El fluconazol es el fármaco de elección para el tratamiento de las candidiasis en la práctica médica, a pesar de la aparición de resistencia *in vitro* de *C. albicans*, de la resistencia intrínseca de *C. krusei* y la sensibilidad disminuida a este fármaco de *C. glabrata*. Esta variación importante en el perfil de sensibilidad,

especialmente de *C. glabrata*, apoya la necesidad de identificar especies, mantener una vigilancia constante de la resistencia a los antifúngicos y correlacionar los resultados de sensibilidad con las respuestas clínicas al tratamiento [18, 26]. Para los azoles, la determinación de la CIM₅₀ es la más adecuada, por ser drogas fungistáticas. Hay que tener en cuenta que estas observaciones están determinadas *in vitro*, por tanto, la extrapolación al humano deber ser cautelosa [11, 25].

En el presente estudio, se evaluó la sensibilidad *in vitro* al fluconazol por el método de difusión en agar y se obtuvieron halos de inhibición de crecimiento que oscilaron entre 22 y 30 mm; las levaduras fueron categorizadas como sensibles dosis-dependientes, según los puntos de corte establecidos por el CLSI. Mediante la técnica de microdilución en caldo, las cepas estudiadas fueron categorizadas como sensibilidad intermedia frente al fluconazol, según los puntos de corte publicados por el EUCAST, en un rango de la CIM₅₀ de 1 – 16 µg/ml, con una media de 8 µg/ml. Nuestros resultados fueron similares a los consignados por Díaz [18], quien obtuvo para *C. glabrata* valores de CIM₅₀ de 2 - 16 µg/ml, con una media de 8 µg/ml.

En este estudio, el método de difusión en agar presentó 100% de concordancia con el método de referencia, sin discrepancias *muy mayores*, *mayores* ni *menores*. Estudios realizados sobre 1190 cepas por Rodero [22], en 2006, obtuvieron un 94,7% de concordancia entre ambos métodos, con 0,2 % de discrepancias *muy mayores* y 0,3 % de discrepancias *mayores*. Demostraron reproducibilidad inter e intralaboratorio muy buena, por lo que, para detectar aislados sensibles al fluconazol, el método de difusión en agar resulta confiable y de bajo costo.

Los resultados obtenidos constituyen un aporte para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos en la región, ya que son escasos los registros en el estado del arte al respecto. Además, sienta bases para un estudio posterior con mayor número de cepas, de manera tal de obtener una visión más clara sobre el perfil de sensibilidad frente al fluconazol del complejo *C. glabrata*

y otras especies del género *Candida* involucradas en procesos infecciosos vulvovaginales.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones por permitir el desarrollo del presente estudio en sus instalaciones.

A la Dra. Susana Córdoba por su acompañamiento y profesional asesoramiento.

Referencias bibliográficas

- [1]. Puig L, Gallardo C. Vulvovaginitis. *Farm Prof* 2003; 17(2):7-79.
- [2]. Alsina M, Arencibia O, Centeno C, de la Cueva P, Fuertes I, Fusté P et al. AEPCC-Guía: Infecciones del tracto genital inferior [en línea] 2016 [Consulta: 10 de octubre 2018], 1-66. Disponible en: http://www.aepcc.org/wp-content/uploads/2016/12/AEPCC_revista08_INFECCIONES-TI.pdf
- [3]. Lancha M, Muñoz Y, Fernández C, Martínez G, Zaragoza M. Susceptibilidad antifúngica de aislados vaginales de *Candida* spp. *Rev Cubana Med Trop* 2016; 68(3):248-54
- [4]. Periodistas en español.com [Internet Blog]. Candidiasis vulvovaginal: Un problema de salud pública. Otero A, editora. Madrid. c2018 [Consulta: 10 octubre 2018]. Disponible en: <https://periodistas-es.com/candidiasis-vulvovaginal-un-problema-de-salud-publica-102117>
- [5]. Muñoz del Valle G. *Candida glabrata*: un patógeno emergente. *Biociencias* 2015; 10(1):89-102
- [6]. Nava K, Saldaña C, Hernandez C, Aguilera G. Principales Infecciones Cervicovaginales. *MedLab*. [en línea]. c2016 [Consulta: 20 de octubre 2019]; 8(4):3-16. Disponible en: <https://www.pacal.org/n/Datos/documentos/MED-LAB%202016%208-4.pdf>
- [7]. Espinosa J. Evaluación de factores de virulencia y susceptibilidad antifúngica de aislamientos clínicos del complejo *Candida glabrata*. [Tesis en internet]. México: Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica; 2017 [Consulta: 20 de octubre 2019]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/14482/>
- [8]. Miró M, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely P, Gonzaga M, Riera O, et al. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Rev Iberoam Micol* 2017; 34(2):65-71
- [9]. Díaz M. Utilidad clínica de la determinación de sensibilidad antifúngica *in vitro*. *Medwave* 2005; 5(8):e3554
- [10]. Pfaller M. Antifúngicos y resistencia. *Rev Chilena Infectolog* 2012; 29(3): 357.
- [11]. Córdoba S, Davel G, Elsla M. Manual Curso a Distancia y Taller "Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio". Departamento de Micología. INEI. Dr. Carlos Malbrán; 2016.
- [12]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Europa: EUCAST; 2018 [actualizada año 2018; acceso 30 de octubre de 2019]. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- [13]. Landis R, Koch G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 1977; 33(1):159-74
- [14]. Cohen, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; 1(20):37-42
- [15]. Sobel J, Wiesenfeld H, Martens M, Danna P, Hooton TM, Rompalo A, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. *N Engl J Med* 2004; 351(9): 876-83
- [16]. Pradenas M. Infecciones cérvico vaginales y embarazo. *Rev Med Clin Las Condes* 2014; 25(6):925-35
- [17]. Maldonado MA, Berger A, Costa ME, Szabo D, Catri M, Lafage, L et al. Prevalencia de especies de *Candida* en vulvovaginitis. Evaluación de la actividad *in vitro* de fluconazol y nistatina. *Rev Argen Microbiol* 2013; 1(45):33-42
- [18]. Díaz M, Camponovo R, Araya I, Cerda A, Santander M, Alfonso J. Identificación y sensibilidad antifúngica *in vitro* de *Candida* spp, de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Revi Esp Quimioter* 2016; 29(3):151-54
- [19]. García Martos P, Aznar P, GarcíaAgudo L. Servicio de Microbiología Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz Casos de Microbiología Clínica - Caso nº 603 [en línea]. 2014 [Consulta: 10 octubre 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/autor?codigo=920048>
- [20]. Galán F, García L, Guerrero I, Marina P, García A, García Martos P. Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015; 33(6),372-78
- [21]. Morales S, Taverna C, Bosco-Borgueat M, Maldonado I, Garcia G, Cordoba S. Identificación de especies crípticas del complejo *Candida glabrata*: utilidad del Chromagar *Candida*, pruebas bioquímicas, espectrometría de masas (MALDI-TOF) y PCR. Suplemento: XIII Congreso Argentino de Micología [en línea]. 2014 [Consulta: 10 octubre 2018]; 51, pp.129. Disponible en: https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=33316&congresos=yes
- [22]. Rodero S, Córdoba W, Vivot M, Campo P, Corfield C, Olguín A et al. Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Rev Argen Microbiol* 2006; 38:155-63.
- [23]. Cantón Lacasa E, Mazuelos E, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev Iberoamer Micol* 2007; (15a.1). [Consulta: 10 octubre 2019]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
- [24]. Cuenca-Estrella M, Tudela J L. Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los Antifúngicos (documento 7.1). *Rev Iberoamer Micol* 2007; (15b). [Consulta: 10 octubre 2019]. Disponible en: <http://coesant-seimc.org/documents/Dil%20Caldo%20Levaduras.pdf>
- [25]. Guelfand L, Cataldi S, Arechavala A, Perrone M. Manual Práctico de Micología Médica. Pruebas de sensibilidad Antifúngica. *Acta Bioq Clin Latinoam*. Ed. 2015.
- [26]. Sanglard D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(9):462-70