

Factores de virulencia y patrones de susceptibilidad antifúngica en aislados de candidiasis vulvovaginal

Virulence Factors and Antifungal Susceptibility Patterns in Vulvovaginal Candidiasis Isolates

Mayda Rosa Perurena Lancha^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-5255-9012>

Beatriz Caballero Rivero¹ <https://orcid.org/0000-0001-8780-1430>

Rosario Esperanza Velar Martínez¹ <https://orcid.org/0000-0001-9507-0578>

Javier San Juan Galán¹ <https://orcid.org/0000-0001-5943-715X>

Gerardo Martínez Machín¹ <https://orcid.org/0000-0002-7388-0374>

Carlos Manuel Fernández Andreu¹ <https://orcid.org/0000-0002-2306-0001>

María Teresa Illnait Zaragoza¹ <https://orcid.org/0000-0002-8929-6172>

Eduardo Antonio Valdés Ramos¹ <https://orcid.org/0000-0003-3710-5044>

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), Laboratorio de Micología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: mrpl@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: La candidiasis vulvovaginal es causa frecuente de consulta médica y el número de pacientes con recurrencia de los síntomas es cada vez mayor. Aunque la *Candida albicans* es su principal agente etiológico, estudios más recientes revelan un incremento en la incidencia de otras especies. Los atributos de virulencia que contribuyen a la aparición del cuadro clínico son el dimorfismo, la adherencia, la producción de biopelículas y la secreción de enzimas líticas.

Objetivos: Determinar la producción de factores de virulencia (fosfolipasas, proteasas) y la susceptibilidad antifúngica *in vitro* a la nistatina y al fluconazol de aislados de *Candida* spp., provenientes de casos de candidiasis vulvovaginal.

Métodos: Se estudiaron 60 aislados pertenecientes al género *Candida*, tomados de pacientes con candidiasis vulvovaginal. Se evaluó la producción de enzimas fosfolipasas y proteasas, utilizando medios específicos para su detección y se cuantificaron los índices Pz referentes a la habilidad productora de cada aislados. Para el estudio de la susceptibilidad antifúngica se emplearon las normativas establecidas en el documento M27-A3 del CLSI.

Resultados: Del total de 60 aislados, 33 presentaron actividad fosfolipasa (55 %) y 34 productores de proteasas para un 56,67 %. Se encontraron diferencias significativas en la producción de fosfolipasa entre *C. albicans* y *C. no albicans* y no en la de proteasa. Solo un aislado de *C. albicans* resultó ser resistente a la nistatina. Para el fluconazol la resistencia se constató en diez aislados de *C. albicans*, uno de *C. glabrata* y otro de *C. famata*. Estos aislados alcanzaron una concentración mínima inhibitoria de $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ para este antifúngico.

Conclusiones: Los resultados en el presente trabajo permiten tener una comprensión más completa de la etiología de la candidiasis vulvovaginal, lo que es de gran valor epidemiológico y terapéutico.

Palabras clave: candidiasis vaginal; *Candida albicans*; actividad enzimática; susceptibilidad a los antifúngicos.

ABSTRACT

Introduction: Vulvovaginal candidiasis is a common reason for medical consultation, and the number of patients experiencing recurrent symptoms is increasing. Although *Candida albicans* is its main etiological agent, recent studies have shown a rise in the incidence of other species. Virulence traits contributing to the clinical presentation include dimorphism, adherence, biofilm formation, and secretion of lytic enzymes

Objectives: To determine the production of virulence factors (phospholipases, proteases) and the *in vitro* antifungal susceptibility to nystatin and fluconazole of *Candida* spp. isolates from cases of vulvovaginal candidiasis.

Methods: Sixty isolates belonging to the genus *Candida*, from patients with vulvovaginal candidiasis, were studied. The production of phospholipases and proteases was evaluated using specific media for their detection, and the Pz indices referring to the production ability of each isolate were quantified. The antifungal susceptibility study followed the guidelines established in document M27-A3 from the CLSI.

Results: Out of the 60 isolates, 33 showed phospholipase activity (55%) and 34 were protease producers, accounting for 56.67%. Significant differences were found in phospholipase production between *C. albicans* and non-*albicans Candida*, but not in protease production. Only one *C. albicans* isolate was resistant to nystatin. For fluconazole, resistance was observed in ten *C. albicans* isolates, one *C. glabrata*, and one *C. famata*. These isolates reached a minimum inhibitory concentration of $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ for this antifungal.

Conclusions: These results provide a more comprehensive understanding of the etiology of vulvovaginal candidiasis, which is of great epidemiological and therapeutic value.

Keywords: vaginal candidiasis; *Candida albicans*; enzymatic activity; antifungal susceptibility.

Recibido: 01/12/2022

Aceptado: 24/02/2023

Introducción

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una de las tres causas principales de consulta en el primer nivel de atención médica.⁽¹⁾ Sin embargo, pese a lo frecuente de esta micosis en las mujeres con vida sexual activa, las cifras de su incidencia se desconocen, ya que no es una enfermedad de declaración obligatoria.⁽²⁾ A nivel mundial las estadísticas señalan que el 75 % de las mujeres presentan al menos un episodio de CVV durante su vida y en la mitad de ellas se reportan dos o tres presentaciones en un año. Solo en un 5 % de los casos la enfermedad evoluciona a la cronicidad, dando paso a la CVV recurrente.⁽³⁾

Pese a que varias especies de *Candida* pueden ser comensales o colonizadores transitorios del ambiente vaginal en condiciones fisiológicas normales, los miembros del género poseen atributos patogénicos que, asociados a factores de riesgo del huésped, son responsables del cambio que se produce de microorganismo comensal a patógeno oportunista.⁽⁴⁾

Los factores de virulencia son estructuras o productos moleculares que permiten al microorganismo sobrevivir en el interior del hospedero y provocar infección. Usualmente, la virulencia no depende de una sola característica, sino de la expresión de un número crítico de factores que operan en conjunto.⁽⁵⁾ Los principales factores asociados a *Candida* son el dimorfismo, la secreción enzimática (proteasas, fosfolipasas, lipasas), el cambio de fenotipo, la expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, la síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biopelículas.⁽¹⁾

Al igual que los factores de virulencia, los mecanismos moleculares de resistencia antifúngica pueden influir en el desarrollo de la enfermedad y en la respuesta al

tratamiento. A partir de los años noventa, aparejado al uso indiscriminado en el orbe de antifúngicos vaginales sin prescripción médica, se reporta un incremento en la aparición de aislados clínicos de *Candida* con fenotipos resistentes y la emergencia de especies patógenas diferentes de *C. albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, entre otras.^(6,7)

Existe un amplio espectro de fármacos para el tratamiento de la CVV; dentro de los antifúngicos tópicos más usados se encuentran la nistatina (NYS).⁽⁸⁾ En los cuadros clínicos no complicados todos los grupos de antimicóticos disponibles son efectivos, tanto las formulaciones tópicas como las orales. En los complicados, se debe realizar un tratamiento más prolongado y sistémico por vía oral. Se usan distintos azoles; no obstante, está establecido que se indique una dosis oral única de fluconazol.⁽⁹⁾

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* permiten guiar la selección del fármaco más adecuado para el tratamiento de la CVV. Es indudable el valor terapéutico de los antifúngicos azólicos en la candidiasis; pese a ello, hay episodios que no responden adecuadamente a este grupo farmacológico. En la actualidad se reportan aislados clínicos de *Candida* con resistencia *in vitro* al fluconazol, itraconazol y el ketoconazol.⁽¹⁰⁾

Para evaluar la prevalencia de factores de virulencia y de mecanismos de resistencia antifúngica en diferentes especies de *Candida* se plantearon como objetivos de este trabajo determinar la producción de fosfolipasas y proteasas en aislados de *Candida* spp., provenientes de casos de candidiasis vulvovaginal y establecer sus perfiles de susceptibilidad antifúngica.

Métodos

Aislados clínicos

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo de la actividad enzimática hidrolítica y la susceptibilidad antifúngica en 60 aislados clínicos de *Candida* spp., procesados durante el año 2018 en el Laboratorio Nacional de Micología del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (LNM-IPK). La distribución de los aislados según su especie fue: *Candida albicans* (37), *Candida parapsilosis* (9), *Candida tropicalis* (6), *Candida glabrata* (3), *Candida guilliermondii* (2), *Candida lusitanae* (2) y una *Candida famata*.

Producción de enzimas hidrolíticas

Actividad fosfolipasa y proteasa

Se realizó la actividad fosfolipasa según la metodología de Marcos y otros⁽¹¹⁾ y la actividad proteasa por Ge y otros.⁽¹²⁾

Interpretación

Los resultados de la actividad de las proteasas y fosfolipasas se expresaron mediante el índice Pz que evalúa la relación entre el crecimiento de la colonia y el halo de precipitación alrededor del área de crecimiento.

$$Pz = \frac{\text{diámetro de la colonia}}{(\text{diámetro de la colonia} + \text{diámetro del halo})}$$

Se clasificaron los aislados como no productores (Pz = 1), moderados productores (Pz = 0,51 – 0,90) y fuertes productores (Pz = 0,35 - 0,50).^(11,12) Para reducir la estratificación se unificaron en la categoría denominada productores todos los aislados clasificados como fuertes y moderados productores.

Por cada evaluación se realizaron dos réplicas y el índice de actividad se reportó como la media aritmética de ambos valores. La cepa de referencia utilizada como control de las pruebas fue *C. albicans* ATCC 10231.

Perfiles de susceptibilidad antifúngica

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se realizó por el método de microdilución en medio líquido en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo en U, según las normas del CLSI, recogidas en el documento M27-A3.⁽¹³⁾ Se evaluaron dos antifúngicos, la nistatina (NYS) (Sigma-Aldrich, USA) y el fluconazol (FLZ) (Sigma-Aldrich, USA). Como solvente de los fármacos se empleó dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, USA) para NYS y agua ultrapura para FLZ. Como medio de cultivo para la microdilución se empleó el RPMI-1640 con glutamina, sin bicarbonato, con ácido morfolino-propano sulfónico (MOPS) como tampón. El rango de concentraciones evaluadas fue de 0,0312-16 µg/mL para la NYS y 0,25-128 µg/mL para el FLZ

El inóculo se preparó con colonias cultivadas en agar Sabouraud incubadas a 37 °C por 24 h. Se realizó una suspensión en 5 mL de SSE con referencia en la escala de turbidez de MacFarland para un tubo 0,5 ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL) y, posteriormente, la concentración se ajustó a un valor final en RPMI-1640 de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Las placas inoculadas se incubaron en cámara húmeda a 37 °C durante 24 horas.

Como cepas controles en las evaluaciones se utilizaron *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258.

Interpretación

La lectura se realizó de manera visual para ambos antifúngicos. Para el FLZ la CMI se determinó como el menor valor de concentración del fármaco capaz de inhibir el 50 % del crecimiento fúngico con respecto al pozo control.

Para la clasificación de los aislados según sus perfiles de susceptibilidad se emplearon los valores de corte epidemiológico (VCE), definidos en el documento M59 del CLSI.⁽¹⁴⁾ Los VCE establecidos para el fluconazol por especies fueron los siguientes: *C. albicans*, 0,5 µg/mL; *C. glabrata*, 8 µg/mL; *C. parapsilosis*, 1 µg/mL;

C. tropicalis, 1 µg/mL; *C. guilliermondii*, 8 µg/mL; *C. lusitaniae*, 1 µg/mL. En el caso de *C. famata*, este aislado se excluyó de los criterios de clasificación y solo se presentó su valor de CMI frente a fluconazol.

Bajo los criterios de los VCE, los aislados se separaron en dos grupos de acuerdo con su resistencia microbiológica frente al FLZ: i) grupo tipo salvaje (TS), constituido por levaduras con ausencia de mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos frente al antifúngico evaluado y ii) grupo tipo mutante (TM), formado por levaduras con presencia de mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos frente al antifúngico en evaluación.

La CMI para la NYS se definió como el menor valor de concentración del fármaco donde se observó un 100 % de inhibición del crecimiento con respecto al pozo control. Para definir la resistencia frente a NYS en los aislados se valoraron las concentraciones iguales o superiores a 16 µg/mL.⁽¹⁵⁾

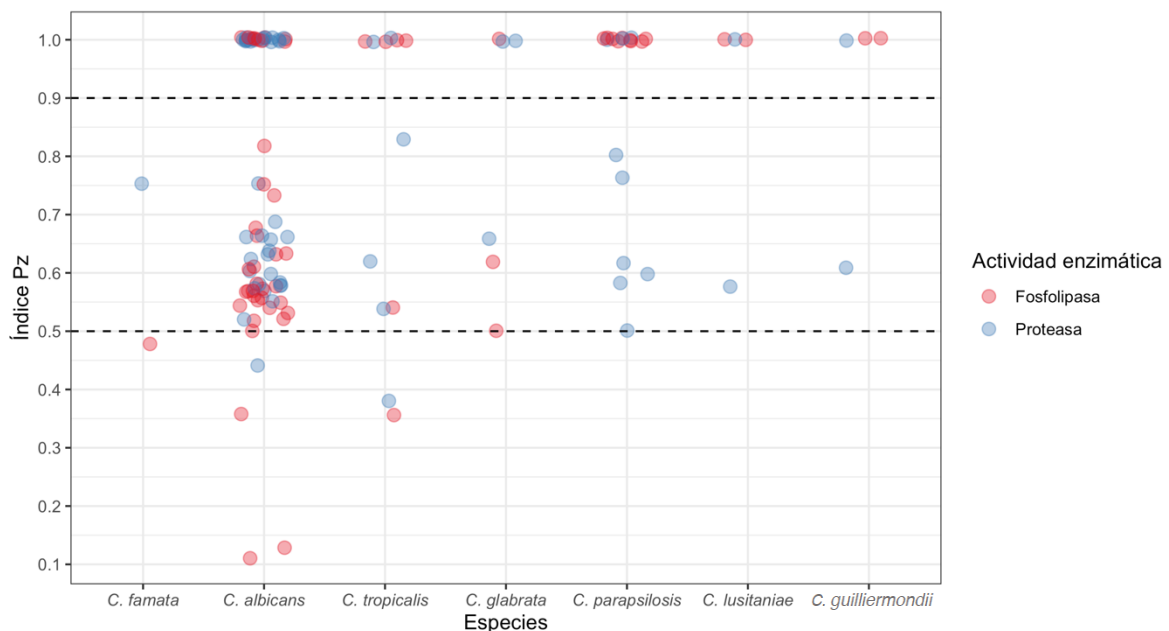
Análisis de los datos

Los datos recopilados se procesaron en RStudio. Se determinaron los estadísticos descriptivos y las frecuencias absolutas y relativas de la muestra. Además, se evaluaron las diferencias entre la producción de enzimas hidrolíticas de *C. albicans* y de las especies diferentes de *C. albicans* mediante una prueba de Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95 %.

Este trabajo correspondió a una tarea de un proyecto institucional (código 18012) que contó con la aprobación de la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de Ética del IPK de acuerdo con las normas éticas de la Declaración de Helsinki.⁽¹⁶⁾

Resultados

Del total de los aislados evaluados resultaron productoras de fosfolipasas 33 aislados (55 %), 34 productoras de proteasas (56,67 %) y de ambas enzimas 20 aislados (33,33 %). En este último grupo se ubicaron 17 *C. albicans* y tres diferentes de *C. albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. famata*). Además, se identificaron 13 aislados como no productores de ambas enzimas hidrolíticas. Para las especies *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* no se detectaron aislados productores de fosfolipasa (fig. 1).



Fuente: Elaboración propia.

Fig. 1 – Distribución de los índices Pz para cada factor de virulencia según la especie. Las líneas discontinuas que dividen el gráfico separan los grupos según su actividad productora: $Pz > 0,9$ no productores; $0,9 > Pz > 0,5$ moderados productores; $Pz < 0,5$ fuertes productores.

La mayor actividad fosfolipasa se evidenció en *C. albicans* (75,68 %), en tanto las especies diferentes de *C. albicans* se destacaron por su producción de proteasas

(73,91 %). Por otra parte, el 78,26 % de las especies diferente de *C. albicans* se clasificaron como no productoras de fosfolipasas.

Cuando se comparó la capacidad de producción de enzimas entre *C. albicans* y las especies diferentes de *C. albicans*, mediante el *test* de Mann-Whitney, se constataron diferencias significativas en la producción de fosfolipasas ($p = 0,0014$), pero no en la producción de proteasas ($p = 0,85$).

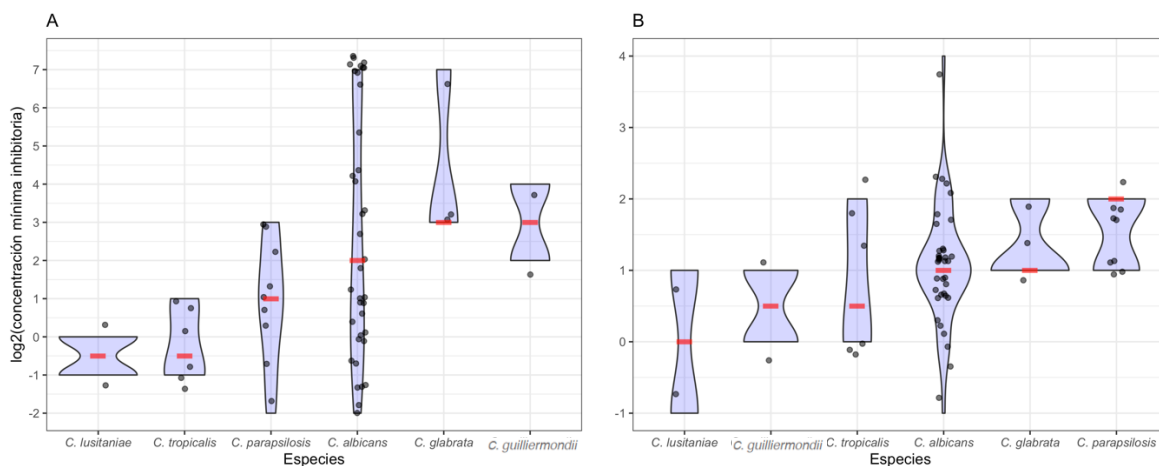
Susceptibilidad *in vitro*

En la tabla 1 se muestran los estadísticos descriptivos de los resultados. En el caso de *C. albicans* los valores de CMI frente a fluconazol estuvieron más uniformemente distribuidos dentro del rango de concentraciones evaluadas; sin embargo, en el caso de la nistatina los valores de CMI en su mayoría se agruparon cercanos a 1 $\mu\text{g/mL}$ (fig. 2). Para las especies diferentes de *C. albicans* los mayores valores de CMI se detectaron en *C. Glabrata* y *C. Guillermondi* (fig. 2). Para *C. famata* los valores de CMI fueron de 64 $\mu\text{g/mL}$ y 2 $\mu\text{g/mL}$ para el fluconazol y la nistatina, respectivamente. Estos valores no se incluyeron en los gráficos debido a que afectaban la visualización del resto de los datos y se consideró declararlos directamente en el texto.

Tabla 1 - Estadísticos de las pruebas de susceptibilidad para la nistatina (NYS) y el fluconazol (FLZ), frente a los aislados evaluados

Aislados (N.º)	Antifúngico	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Media geométrica
Total (60)	NYS	0,5-16	2	4	2,12
	FLZ	0,25-128	2	128	4,38
<i>C. albicans</i> (37)	NYS	0,5-16	2	4	2,11
	FLZ	0,25-128	4	128	6,15
No - <i>C. albicans</i> (23)	NYS	0,5-4	2	4	2,12
	FLZ	0,25-128	2	16	2,54

Fuente: Elaboración propia.



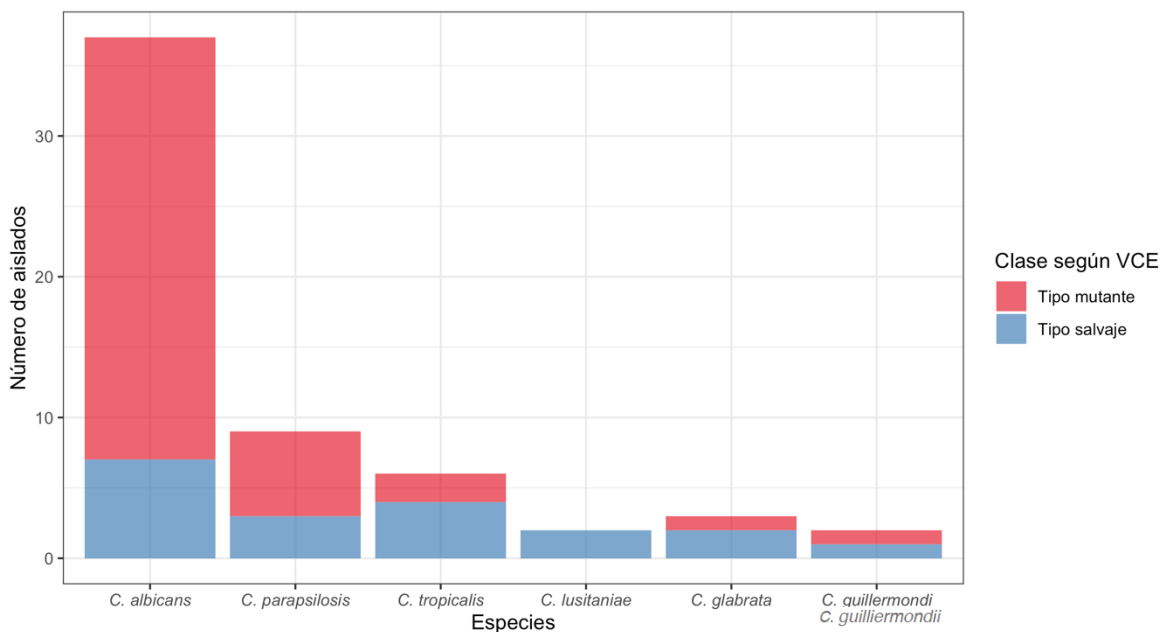
Leyenda: Las líneas rojas en los gráficos de violín representan las medianas de los valores de CMI. El caso de *C. famata* se discute en el texto de forma independiente.

Nota al pie: Los rangos de concentración evaluados fueron 0,03-16 µg/mL y 0,25-128 µg/mL para fluconazol y nistatina respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.

Fig. 2 – Distribución de los valores de CMI transformados a escala logarítmica (log₂) para cada antifúngico evaluado según la especie: A) Fluconazol, B) Nistatina.

Para la NYS todos los aislados mostraron valores de CMI inferiores al criterio para determinar resistencia antifúngica (16 µg/mL), por lo que se clasificaron como sensibles. En el caso del fluconazol se detectaron múltiples aislados con valores de CMI superiores a los VCE establecidos en la metodología. En una proporción del 66,7 % los aislados evaluados frente a fluconazol mostraron valores de CMI que los clasificaron como portadores de mecanismos de resistencia frente al triazol. En la figura 3 se presentan los resultados tras la clasificación de los aislados según los VCE establecidos en la metodología.



Nota al pie: La especie *C. famata* se excluyó de este gráfico por ser el único aislado para el cual no están definidos VCE por el CLSI.

Fuente: Elaboración propia.

Fig. 3 – Distribución de los aislados evaluados, según su clasificación, de acuerdo con el VCE para el fluconazol por especie. El tipo salvaje está representado por microorganismos con ausencia de mecanismos de resistencia asociados y el tipo mutante categoriza aquellos portadores de mecanismos de resistencia.

Discusión

En las vaginitis las levaduras del género *Candida* tienen una alta frecuencia como agente etiológico.⁽¹⁷⁾ Su predominio, en particular el de la especie *C. albicans*, está relacionado con la composición de la microbiota vaginal de la que forma parte. Las especies comensales de *Candida* pueden convertirse en patógenas cuando es alterado el balance de su ecosistema. La patogenicidad depende de factores tales como el estado inmunitario del hospedero, la carga microbiana y la expresión de sus atributos de virulencia. Lo expuesto facilita la invasión a los tejidos, la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero y genera, además, diferentes cuadros clínicos entre los que destaca la CVV.^(4,18)

En la literatura publicada sobre la expresión de atributos de patogenicidad y, específicamente de la actividad enzimática en el género *Candida*, son escasos los trabajos que se refieren de manera exclusiva a los aislados de CVV. La mayoría de los reportes describen los resultados en otras localizaciones y cuadros clínicos (cutáneos, orales, sistémicos).⁽⁵⁾

Estudios previos realizados en el LNM-IPK durante 2013 de 110 aislados de *Candida*, procedentes de exudados vaginales, demuestran la expresión de fosfolipasas y proteasas en un 89,1 % y 83,6 % de los aislados, respectivamente.⁽¹⁹⁾ En la India Hacioglu y otros confirman la producción de estas enzimas en 100 aislados vaginales de *Candida*; la actividad fosfolipasa se evidenció en un 75 % de los aislados y la actividad proteasa en un 70 %.⁽²⁰⁾ No obstante, otros trabajos informan valores inferiores. En 2018 Kalaiarasan y otros corroboran la actividad de proteasas y fosfolipasas en el 37,3 % y el 29,4 %, respectivamente, de una muestra de 51 aislados de *Candida* cultivadas de pacientes con CVV en Turquía.⁽¹⁸⁾

Durante el presente estudio se pudo detectar que la especie *C. albicans* tiene una amplia variabilidad en la actividad de proteasas y fosfolipasas, donde la producción de estas últimas predominó (fig. 1). Por otro lado, Bezerra y otros evaluaron la actividad enzimática y hemolítica en diferentes especies de *Candida*, de los 50 aislados clínicos analizados, 19 (38 %) presentaron actividad proteinasa y resultaron productoras las especies: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y 16 (32 %) para fosfolipasa se detectó en *C. albicans* y *C. tropicalis*; como se puede observar *C. albicans* resultó productora de ambas enzimas.⁽²¹⁾ Por el contrario, en las especies diferentes de *C. albicans* la ausencia de actividad fosfolipasa fue mucho más marcada (fig. 1). Esto es consistente con estudios realizados en el 2015 por Ramos y otros, donde se evaluó la actividad proteasa y fosfolipasa en aislamientos de *Candida* procedentes de candidiasis cutánea, donde, de igual forma, encuentran que el 53,06 % de los aislamientos de *Candida* no-*C. albicans* fueron capaces de producir proteasa y el 4,08 % fosfolipasa.⁽²²⁾

Para los atributos proteolíticos los resultados fueron mucho más homogéneos en toda la muestra con proporciones similares entre la especie *C. albicans* y el resto

de las especies (fig. 1). Kantarcioglu y Yücel informan que de 95 aislados de *Candida*, el 78,9 % resultó ser productores de dicha enzima.⁽²³⁾

Pese a que el tamaño de la muestra y su distribución no fueron idóneos, se encontraron evidencias estadísticas sobre la superioridad de *C. albicans* en la producción de fosfolipasas, en comparación con las especies diferentes de *C. albicans*. Existe la posibilidad de que esta sea una característica inherente a la especie que le permite adaptarse más fácilmente al ecosistema vulvovaginal en contraste con otras especies que se aíslan con menos frecuencia de este sitio anatómico.^(1,4) Las fosfolipasas secretadas tienen una estrecha relación con su virulencia, son necesarias en los procesos de invasión y colonización de los tejidos por el papel que juegan en la disrupción de las membranas de las células del hospedero.⁽²⁴⁾

Las proteasas, principalmente las proteasas aspárticas secretadas (Saps, del inglés *secreted aspartyl proteinases*), también constituyen un factor clave en la virulencia de estos patógenos. Junto con las fosfolipasas, se encargan de mediar el proceso de invasión tisular, además de jugar un papel importante en evadir al sistema inmunológico del huésped, a través de la degradación de proteínas del complemento e inmunoglobulinas. Recientemente, además, se asocia con las Saps y el proceso de adherencia de la *Candida*.⁽²⁵⁾

La contribución de las proteasas extracelulares en la patogenia de las infecciones por *C. albicans* es controversial; investigaciones indican que estas no son necesarias para la invasión *in vitro* al epitelio humano. Sin embargo, la gran cantidad de genes que codifican para estas en *C. albicans*, en comparación con otras especies menos invasivas, sugiere que existe un papel dentro de la patogenia para este grupo de enzimas.⁽²⁴⁾

Los resultados de los aislados frente a NYS exhibieron la respuesta esperada en cuanto a las CMI (tabla 1) y sus distribuciones fueron similares para todas las especies (fig. 2), lo cual indica una elevada sensibilidad y coincide con otros autores.^(15,26,27) Sin embargo, algunos investigadores plantean que los valores de CMI para definir resistencia a la NYS debieran definirse para $\geq 2 \mu\text{g/mL}$.⁽²⁸⁾ A pesar de que este criterio aumentaría el rango de aislados a incluir como resistentes no

se tomó en cuenta para la metodología y la discusión, por no considerar evidencias suficientes que respalden este nuevo punto de corte.

La NYS pertenece al grupo farmacológico de los polienos, al igual que la anfotericina B y la natamicina. Es un macrólido anfipático que tiene afinidad por el ergosterol de la membrana citoplasmática de los hongos y, al unirse, intervienen varios mecanismos que causan un desequilibrio osmótico y conducen a la muerte celular. La resistencia a los polienos es poco frecuente y algunos autores plantean que puede deberse a que su diana es un componente estructural de la célula que resulta difícil de modificar sin comprometer la viabilidad celular. No obstante, la resistencia está descrita, fundamentalmente asociada a una disminución en la concentración de ergosterol en la membrana y a la producción de enzimas reductoras que mantienen el estrés oxidativo en niveles viables.⁽²⁹⁾ En el presente estudio solo un aislado de *C. albicans* mostró un alto valor de CMI igual a 16 µg/mL (fig. 2), que pudiese explicarse sobre la base de lo expuesto anteriormente.

La NYS es uno de los principales agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal; sin embargo, en ocasiones se presentan casos de vaginitis crónica por *Candida*, que responden parcialmente a la terapia antifúngica local y pueden tener episodios recurrentes. Las recurrencias sugieren un fallo terapéutico no inherente al hongo ni a la aparición de aislados con sensibilidad disminuida o resistentes al medicamento, por lo que pudieran atribuirse a factores asociados al hospedero.⁽³⁾

Actualmente, no se cuenta con criterios estandarizados para la determinación del perfil de susceptibilidad frente a la NYS en aislados clínicos. Establecer un VCE para este antifúngico sería de mucha utilidad para la asistencia sanitaria, ya que brindaría elementos de apoyo para la toma de decisiones en las estrategias de tratamiento.

Para el fluconazol las distribuciones de los valores de CMI tuvieron una mayor dispersión en los grupos de las especies *C. albicans* y *C. glabrata*, mientras que en el resto de las especies los valores se mantuvieron más concentrados (fig. 2). En el caso particular de la *C. albicans* se puede apreciar un grupo bien definido de aislados con valores de CMI superiores a los 125 µg/mL que, sin duda alguna,

marcan un punto de interés sobre la presencia de uno o varios mecanismos moleculares de resistencia en acción conjunta. De acuerdo con los VCE específicos que se emplearon, el número de mutantes hallados en el estudio fue considerable, teniendo en cuenta que el tamaño de la muestra fue reducido (menos de 100 aislados). La especie *C. albicans* constituyó el punto de atención con más de tres cuartas partes de los aislados clasificados como portadores de mecanismos de resistencia a fluconazol.

La resistencia al fluconazol en *C. albicans* es un tema descrito con frecuencia en la literatura. En estudios posteriores, investigadores cubanos informan el 3,26 %⁽¹⁹⁾ y el 12,5 % de aislados de dicha especie con CMI $\geq 64 \mu\text{g/mL}$.⁽³⁰⁾ De acuerdo con un estudio realizado por Espinel y otros en el 2014, salvando las diferencias en el tamaño de muestra, puesto que en dicha investigación el total de aislados resultó ser mayor que el empleado en este estudio, se obtuvieron 136 aislados resistentes frente a dicho fármaco y la especie *C. albicans* fue una de las que obtuvo mayor cantidad de aislados resistentes.⁽³¹⁾

También *C. parapsilosis* mostró un número considerable de aislados mutantes. Si bien la resistencia a triazoles en *C. parapsilosis* está descrita, las investigaciones que informan aislados resistentes a fluconazol no son frecuentes. De acuerdo con lo planteado por Singh y otros en la India, de 199 aislados pertenecientes a la *Candida parapsilopsis*, resultaron ser no sensibles a dicho fármaco 64; de estos 55 aislados resultaron ser resistentes con una CMI $> 4 \text{ mg/L}$.⁽³²⁾

Otra especie que se conoce tiene cierta predisposición a portar mecanismos de resistencia antifúngica es la *C. glabrata*, aunque en la presente investigación el número de aislados de esta especie no permitió tener elementos que respaldaran esta tendencia. Un ejemplo de la presencia de mecanismos de resistencia se muestra en el estudio realizado por Espinel y otros en el 2014; con un tamaño de muestra considerable se determinó resistencia en dicha especie. De un total de 136 aislados con presencia de mecanismos de resistencia, resultaron pertenecer a la especie *C. glabrata* 57 aislados, lo que evidencia lo expuesto.⁽³¹⁾

El aislado de *C. famata* mostró un alto valor de CMI frente a fluconazol ($64 \mu\text{g/mL}$). El FLZ se considera de primera línea en la terapéutica de la CVV. Su naturaleza

fungistática puede explicar la resistencia de algunos aislados frente este; en cierto modo, esto depende de varios factores como la densidad celular y el pH de la vagina.⁽³³⁾

Cada vez es más importante conocer el perfil de susceptibilidad de los aislados clínicos y el espectro de acción de los antifúngicos. No obstante, en lo que se refiere a la correlación *in vitro* - *in vivo* con los azoles, los datos disponibles indican que existe relación entre la resistencia *in vitro* y el fallo terapéutico, pero no entre la sensibilidad y la curación clínica.⁽³⁴⁾

El desarrollo de nuevos antifúngicos y su amplia utilización en la profilaxis, así como en la terapia empírica, genera cambios epidemiológicos entre los que se destacan la aparición de resistencia secundaria y la sustitución de poblaciones sensibles por otras con resistencia intrínseca.^(35,36) Este fenómeno suele manifestarse con mayor frecuencia en las especies diferentes de *C. albicans*. La expresión de resistencia en pacientes con CVV recurrente se favorece con la presión selectiva que ejercen los tratamientos prolongados y reiterados que se aplican en estos casos.⁽³⁾

En la actualidad se reportan tres mecanismos de resistencia a los azoles entre las especies de *Candida*: la sobreexpresión de bombas de eflujo; mutaciones en el gen *erg11* que conducen a la sobreexpresión de la enzima citocromo P450 14 α esterol demetilasa o a una disminución progresiva de la afinidad de esta por la molécula del antifúngico y, por último, mutaciones en el gen *erg3* que provocan la síntesis de otros esteroides, como componentes de la membrana celular, de forma que su integridad no se ve afectada por la acción de los azoles.⁽³⁷⁾ Más de un mecanismo puede actuar de forma simultánea en un aislado en particular, por lo que su patrón de resistencia podría deberse a un efecto aditivo o conducir al desarrollo de resistencia cruzada con otro antifúngico.⁽³⁸⁾

La tendencia en nuestro país al incremento de la resistencia de *C. albicans* al FLZ justifica desarrollar e implementar un programa de vigilancia a este antifúngico en los diferentes niveles de atención en la salud pública. Por otra parte, se insta a la comunidad científica a evaluar nuevos bioactivos con posible actividad anticandidiásica que permitan contrarrestar esta problemática.

En la CVV los factores de virulencia, como la producción de enzimas hidrolíticas, puede facilitar los procesos de infección; sin embargo, no es una característica inherente a todas las levaduras que causan CVV. Es por ello que debe considerarse una enfermedad multifactorial donde intervienen factores del hospedero, del agente causal y del ambiente. Con respecto a la susceptibilidad antifúngica, estos resultados se suman a la alerta global sobre la resistencia a triazoles, específicamente al FLZ, en las levaduras del género *Candida*. Es de vital importancia mantener actualizadas las guías sobre tratamiento de las diferentes formas de candidiasis para disminuir los riesgos asociados al mal manejo de estas enfermedades en los sistemas sanitarios y a la evolución del fenómeno de la resistencia antifúngica.

Actualmente, existe el ibrexafungerp (IBX), un antifúngico triterpenoide de primera clase que inhibe la biosíntesis de β -(1,3)-D-glucano en la pared celular fúngica, con un mecanismo de acción similar a la de las equinocandinas; tiene un efecto fungicida sobre la *Candida* spp. Las características distintivas de este nuevo antifúngico incluyen la biodisponibilidad oral, un perfil de seguridad favorable, pocas interacciones farmacológicas, buena penetración tisular, mayor actividad a pH bajo y actividad contra aislados resistentes a múltiples fármacos, incluidos *C. auris* y *C. glabrata*. Tiene una potente actividad contra los aislados resistentes a los azoles, incluidos la *Candida* spp. Los ensayos clínicos han demostrado que el IBX es eficaz para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal y para la prevención de candidiasis vulvovaginal recurrente.⁽³⁹⁾

En Cuba, específicamente en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), recientemente se comienza a incursionar en esta temática y se pretende, siempre que sea posible, acompañar los estudios de vigilancia de la susceptibilidad antifúngica con los de la expresión de diferentes factores de virulencia. Esto permitirá evaluar el comportamiento de los aislados de *Candida* de diferentes sitios anatómicos y detectar a tiempo cambios en su resistencia o capacidad patogénica que faciliten realizar la necesaria alerta epidemiológica.

Referencias bibliográficas

1. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, *et al.* *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. J. Fungi. 2021;7:79. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7020079>
2. Ge G, Yang Z, Li D, Zhang N, Chen B, Shi D. Distinct host immune responses in recurrent vulvovaginal candidiasis and vulvovaginal candidiasis. Front Immunol. 2022;13:959740. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.959740>
3. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. Am J of Obst Gynecol. 2016;214:15-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.067>.
4. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. Virulence. 2022;13:89-121. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
5. Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. Int J Mol Sci. 2022;23(11):5895. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>
6. Arechavala A, Negroni R, Santiso G, Depardo R, Bonvehí P. Chronic recurrent vulvovaginitis is not only due to *Candida*. Rev Iberoam Micol. 2021;38(3):132-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.03.002>
7. Aslani N, Kokabi R, Moradi F, Abbasi K, Vaseghi N, Hosein M. Characterization of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis by MALDI-TOF with in vitro antifungal susceptibility profiles. Curr Med Mycol. 2021;7(4):6-11. DOI: <https://doi.org/10.18502/2Fcm.7.4.8405>
8. Miró MS, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely PA, Gonzaga de Freitas M, Riera FO, *et al.* Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. Rev Iberoam Micol. 2017;34(2):65-71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.006>
9. Fan S, Liu X, Wu C, Xu L, Li J. Vaginal nystatin versus oral fluconazole for the treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis. Mycopathologia. 2015;179:95-101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9827-4>
10. Kombade SP, Abhishek KS, Mittal P, Sharma C, Singh P, Nag VL. Antifungal profile of vulvovaginal candidiasis in sexually active females from a tertiary care

hospital of Western Rajasthan. J Family Med Prim Care. 2021;10:398-402. DOI: https://doi.org/10.4103%2Fjfmprc.jfmprc_1124_20

11. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindós G. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. Mycoses. 2009;54:6-10. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.14390507.2009.01812.x>

12. Ge YP, Lu GX, Shen YN, Liu WD. In vitro evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. Mycopathologia. 2011;172:429-38. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9440-8.Epub 2011 Jun 23>.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: third edition. Wayne, PA: CLSI;2008.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute. M59. Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing second edition. Wayne, PA:CLSI;2018.

15. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. Oral Microbiology and Immunology. 2005;20(6):349-53. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2005.00236.x>

16. Editorial, E. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Arbor. 2008 [01/10/2022];184(730):349-52. Disponible en: <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/183>

17. Balakrishnan SN, Yamang H, Lorenz MC, Chew SY, Lung LT. Role of vaginal mucosa, host immunity and microbiota in vulvovaginal candidiasis. Pathogens. 2022 Jun;11(6):618. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060618>

18. Kalaiarasan K, Singh R, Chaturvedula L. Changing virulence factors among vaginal non *albicans* *Candida* species. Indian Journal of Medical Microbiology. 2018;36:3. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_94

19. Gorgui DL. Caracterización fenotípica de aislamientos provenientes de pacientes con candidiasis vulvovaginal [Trabajo de Terminación de Residencia]. La Habana: Instituto Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK);2013.

20. Hacıoglu M, Bozkurt CG, Savage PB, Seher AB. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology*. 2019;57:291-99. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myy023>
21. Bezerra E, De Paula R, Amante P, Dos Santos R. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32:79-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.11.003>
22. Ramos L, Barbedo LS, Braga-Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32(2):122-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.01.003>
23. Kantarcioglu A, Yücel SA. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002;45:160-5. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00727.x>.
24. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28. DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
25. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2011;19(5):241-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.02.003>.
26. Llovera V, Fernández CM. Susceptibilidad in vitro de aislamientos vaginales de *Candida* frente a clotrimazol y nistatina. *Rev Cubana Med Trop*. 2003 [01/10/2022];55(3):138-45. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602003000300002
27. Prieto LM, Díaz LA, Illnait MT, Perurena MR, Cantelar N, Fernández CM. Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de *Candida* y su correlación con la respuesta al tratamiento. *Rev Cubana Med Trop*. 2010 [01/10/2022];62(3):237-44. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000300012

28. Diaz MC, Camponovo R, Araya I, Cerda A, Santander MP, Carrillo AJ. Identificación y sensibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. Rev Esp Quimioter. 2016 [01/10/2022];29(3):151-54. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/160183>
29. Carolus H, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. J Fungi. 2020;6(321):1-21. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof6040321>
30. Perurena MR, Pérez Y, Fernández CM, Mertínez G, Illnait MT. Susceptibilidad antifúngica de aislados vaginales de *Candida* spp. Rev Cubana Med Trop. 2016 [01/10/2022];68(3). Disponible en: https://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602016000300007
31. Espinel A, Pfaller M, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, *et al.* Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole and voriconazole. American Society for Microbiology. 2014;58:2006-12. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02615-13>.
32. Singh A, Singh P, Groot T, Kumar A, Mathur P, Tarai B, *et al.* Emergence of clonal fluconazole – resistant *Candida parapsilopsis* clinical isolates in a multicentre laboratory – based surveillance study in India. J Antimicrob Chemother. 2019;74:1260-68. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz029>
33. Donders GG, Grinceviciene S, Ruban K, Bellen G. Vaginal pH and microbiota during fluconazole maintenance treatment for recurrent vulvovaginal candidosis (RVVC). Diagn Microbiol Infect Dis. 2020;97(2):115024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115024>
34. Adjapong G, Hale M, Garrill A. An investigation of the distribution of *Candida* species in genitourinary candidiasis and pelvic inflammatory disease from three locations in Ghana. African Journal of Microbiology Research. 2014;8(6):470-75. DOI: <https://doi.org/10.5897AJMR2013.6407>

35. Arechavala A, Bianchi I, Robles MH, Santiso AM, Negroni R. Identificación y sensibilidad frente a fluconazol y albaconazol de 100 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal. Rev Iberoam Micol. 2007;24:305-08. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70061-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70061-X)
36. Hong N, Lei Y, Chen H, Chen X, Ming K, Hu D. Genotyping and drug resistance profile of clinical isolates of *Candida albicans* from vulvovaginal candidiasis in the Eastern China. Mycopathologia. 2022 [01/10/2022];187(2-3):217-24. Disponible en: <https://rdcu.be/dbiiu>
37. Sobel JD, Sobel R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. Expert Opin Pharmacother. 2018;19(9):971-7. DOI: <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1476490>
38. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses. 2015;58(S2):2-13. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.12330>
39. Jallow S, Govender NP. Ibrexafungerp: A first in class oral triterpenoid glucan synthase inhibitor. J. Fungi. 2021;7:163-82. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7030163>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Mayda Rosa Perurena Lancha, Rosario Velar Martínez.

Análisis formal: Javier San Juan Galán.

Investigación: Mayda Rosa Perurena Lancha, Rosario Velar Martínez, Gerardo Martínez Machín, Carlos Manuel Fernández Andreu.

Metodología: Mayda Rosa Perurena Lancha, Beatriz Caballero Rivero, Rosario Velar Martínez, Eduardo Antonio Valdés Ramos.

Administración del proyecto: Mayda Rosa Perurena Lancha.

Redacción – borrador original: Mayda Rosa Perurena Lancha, Beatriz Caballero Rivero, Javier San Juan Galán, María Teresa Illnait Zaragozaí.

Redacción – revisión y edición: Carlos Manuel Fernández Andreu.