



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC**

**ESCUELA DE QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA UNAM**

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD
“IN VITRO” DE FLUCONAZOL, ITRACONAZOL,
KETOCONAZOL, ANFOTERICINA B y
CASPOFUNGINA EN CEPAS DE
Candida albicans Y *Candida dubliniensis*
PROVENIENTES DE PACIENTES
*DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO-BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JESÚS JONATHAN CARDOSO TENORIO

DIR. DE TESIS: Q. F. B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ.
DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ RIVERA.



MÉXICO, D. F., 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Victor Manuel Sánchez Hidalgo

VOCAL: Q.F.B. Javier Araiza Santibañez

SECRETARIO: Q.F.B. Gerardo Garcia Camacho

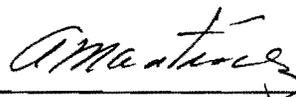
1er. SUPLENTE: M. en C. Eduardo del Rey Pineda

2º. SUPLENTE: M. en C. Guillermo del Rey Pineda

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, perteneciente al honorable Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera.



Q.F.B. Javier Araiza Santibañez.
Director de Tesis
Interno



Dra: María de los Ángeles Martínez Rivera
Director de Tesis
Externo



Jesús Jonathan Cardoso Tenorio.
Autoría del Trabajo

Agradecimientos.

Hoy te doy gracias señor por el don de la vida, por la salud y una familia: Por un amanecer, por que todos los días puedo volver a empezar y continuar mi camino, ni el tiempo ni la distancia podrá hacerme olvidar todo el amor recibido.

Querido papá

Me alegro que haya elegido a mamá, gracias por su fortaleza , su confianza , por todo el amor que me ha brindado en la vida, por cuidarme, protegerme, por estar ahí y motivarme continuamente a seguir adelante, se lo agradezco de todo corazón.

Querida mamá

Me alegro que haya elegido a papá , a través de usted he recibido todo el amor, ternura, sensibilidad, que una madre pueda darle a sus hijos ese amor que ha quedado firme en mi corazón , gracias por sus cuidados, desvelos, protección, dedicación, cariño, apoyo, confianza, por la fuerza recibida, que me alimentan a ser mejor cada día. Por estar siempre que la necesito, por hacer que mi vida sea más fácil con sus sabios consejos y comprensión, gracias por ser una persona maravillosa, la quiero muchoo...

A mis padres, no biológicos, pero si de corazón

Juanita Cardoso Ramírez

Clemente Morales Meneses

Que fueron y seguirán siendo pilar fundamental en la formación de mi persona así; como lo profesional por esa gran paciencia y apoyo incondicional que hasta ahora me han brindado. Gracias papás por los regaños que me han hecho hombre, los consejos que me harán un viejo sabio y las palabras tiernas que me siguen haciendo sentir un niño.

A mi carnal Felipin

M; compañerito desde la niñez, que tanto quiero, aprecio y respeto.

A mi carnal Ulises

Gracias por soportarme, y apoyarme en todo momento, así mismo este trabajo de lo dedico.

A mis hermas (Maribel, Yaquelínee, Oralia) y familia

Gracias, por que en momentos importantes de la carrera estuvieron conmigo, apoyándome, dándome ánimos, cocos, jalones de orejas y demás. Gracias queridas hermanas, gracias a toda mi familia.

A la Dra. María de los Ángeles Martínez Rivera:

Por su infinita ayuda, ya que sin usted no sería posible este trabajo, por su disponibilidad, por el tiempo dedicado a este trabajo, por haberme dado la oportunidad de trabajar con usted, que ha sido un gran privilegio, por la confianza que me brindó. Finalmente quisiera darle las gracias, pero no hay forma de cómo agradecer el apoyo incondicional que usted me ha brindado.

Al mtro. Javier Araiza Santibáñez

Por todas sus aportaciones, enseñanzas, tiempo y dedicación en el proceso de esta tesis.

A mis sinodales por haber tenido la atención y amabilidad de revisar este trabajo.

A mis amigos y todas las personas que han estado presentes en mi vida, les digo que cada encuentro con ustedes me nutre, me ayuda, me enseña, cada uno de ustedes han sido un libro, una lección de vida que me conduce a ser la persona que soy.

A la Universidad del Valle de México (Campus Chapultepec) por que en tus aulas conocí a mis profesores, personas que me heredaron sus conocimientos que contribuyeron a mi formación profesional y personal.

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD
“IN VITRO” DE FLUCONAZOL, ITRACONAZOL,
KETOCONAZOL, ANFOTERICINA B y
CASPOFUNGINA EN CEPAS DE
Candida albicans Y *Candida dubliniensis*
PROVENIENTES DE PACIENTES
DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

ÍNDICE

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.....	1
1.1.1 Introducción.....	1
1.1.2 Concepto.....	2
1.1.3 Utilidad.....	2
1.1.4 Pruebas en medio líquido y sólido.....	3
1.2 Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Proceso de estandarización.....	4
1.2.1 Introducción.....	4
1.3 Metodología de referencia para determinar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Estándar aprobado. Documento M27-A2.	6
1.3.1 Introducción.....	6
1.3.2 Origen de antifúngicos.....	6
1.3.3 Utilización de solventes diferentes del agua.....	7
1.3.4 Filtración.....	7
1.3.5 Almacenamiento.....	7
1.3.6 Nombres genéricos.....	7
1.4 Características generales de los azoles.....	8
1.4.1 Mecanismo de acción.....	9
1.4.2 Fluconazol.....	11
1.4.3 Itraconazol.....	13
1.4.4 Ketoconazol.....	15
1.5 Polienos.....	17
1.5.1 Mecanismo de acción.....	18
1.6 Nuevas dianas: Equinocandinas.....	20
1.6.1 Características generales de la Caspofungina.....	20
1.6.2 Mecanismo de acción.....	20
1.7 Resistencia a los antifúngicos.....	23
1.7.1 Introducción.....	23
1.7.2 Definición de sensibilidad y resistencia.....	23
1.7.3 Resistencia.....	24
1.7.4 Mecanismos celulares de resistencia a antifúngicos.....	25
1.7.5 Mecanismos moleculares de resistencia a los azoles.....	25

1.8 Candidosis.....	28
1.8.1 Definición.....	28
1.8.2 Patogenia.....	28
1.8.3 Identificación en el laboratorio.....	29
1.8.4 Tipificación de cepas especie <i>albicans</i>	32
1.8.5 Identificación de <i>Candida dubliniensis</i> en especímenes clínicos.....	36
2. JUSTIFICACIÓN.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIALES Y MÉTODO.....	40
4.1 Materiales.....	40
4.2 Métodos.....	42
4.2.1 Determinación de los valores de las CMI's al Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol, Anfotericina B y Caspofungina, de los aislados de <i>Candida</i> . Método de referencia para determinar la susceptibilidad de las levaduras a los antifúngicos CLSI M27-A2.....	43
4.2.1.1 Dilución del antifúngico.....	43
4.2.1.2 Preparación del inóculo.....	45
4.2.1.3 Llenado de microplacas.....	46
4.2.1.4 Inoculación de placas.....	47
4.2.1.5 Lectura de resultados.....	48
5. RESULTADOS.....	50
6. DISCUSION.....	73
7. CONCLUSION.....	78
8. REFERENCIAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura química del anillo imidazólico y anillo triazólico.....	8
Figura 2. Biosíntesis del ergosterol y sitio de acción de los azoles.....	10
Figura 3. Estructura química del Fluconazol.....	11
Figura 4. Estructura química del Itraconazol.....	13
Figura 5. Estructura química del Ketoconazol.....	15
Figura 6. Estructura química del la Anfotericina B.....	17
Figura 7. Estructura química de Caspofungina.....	20
Figura 8. Mecanismos de acción de la Caspofungina.....	21
Figura 9. Mecanismos moleculares de resistencia a los azoles.....	27
Figura 10. Esquema para el diagnóstico de Candidosis.....	31
Figura 11. Identificación de cepas de <i>Canndida</i> especie <i>albican</i>	34
Figura 12. Pruebas de asimilación.....	35
Figura 13. Dilución de antifúngicos.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
TABLA 1. Muestras de procedencia de <i>Candida albicans</i>	50
TABLA 2. Muestras de procedencia de <i>Candida dubliniensis</i>	51
TABLA 3. Puntos de corte para el género <i>Candida spp</i>	52
TABLA 4. Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) de los antifúngicos frente a las dos especies de <i>Candida</i>	53
TABLA 5. Resultados de las CMI's de las cepas de control frente a los cinco antifúngicos.	54
TABLA 6. Valores de las CMI's de las cepas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> al Fluconazol.....	55
TABLA 7. Valores de las CMI's de las cepas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> al Itraconazol y Ketoconazol.....	56
TABLA 8. Valores de las CMI's de las cepas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida dubliniensis</i> a Anfotericina B y Caspofungina.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO	Página
GRÁFICO 1. Susceptibilidad de <i>C. albicans</i> al Fluconazol.....	58
GRÁFICO 2. Susceptibilidad de <i>C. dubliniensis</i> al Fluconazol.....	58
GRÁFICO 3. CMI's de <i>C. albicans</i> al Fluconazol.....	59
GRÁFICO 4. CMI's de <i>C. dubliniensis</i> al Fluconazol.....	60
GRÁFICO 5. Susceptibilidad de <i>C. albicans</i> al Ketoconazol.....	61
GRÁFICO 6. Susceptibilidad de <i>C. dubliniensis</i> al Ketoconazol.....	61
GRÁFICO 7. CMI's de <i>C. albicans</i> al Ketoconazol.....	62
GRÁFICO 8. CMI's de <i>C. dubliniensis</i> al Ketoconazol.....	63
GRÁFICO 9. Susceptibilidad de <i>C. albicans</i> al Itraconazol.....	64
GRÁFICO 10. Susceptibilidad de <i>C. dubliniensis</i> al Itraconazol.....	64
GRÁFICO 11. CMI's de <i>C. albicans</i> al Itraconazol.....	65
GRÁFICO 12. CMI's de <i>C. dubliniensis</i> al Itraconazol.....	66
GRÁFICO 13. Susceptibilidad de <i>C. albicans</i> a la Anfotericina B.....	67
GRÁFICO 14. Susceptibilidad de <i>C. dubliniensis</i> a la Anfotericina B.....	67
GRÁFICO 15. CMI's de <i>C. albicans</i> a la Anfotericina B.....	68
GRÁFICO 16. CMI's de <i>C. dubliniensis</i> a la Anfotericina B.....	69
GRÁFICO 17. Susceptibilidad de <i>C. albicans</i> a la Caspofungina.....	70
GRÁFICO 18. Susceptibilidad de <i>C. dubliniensis</i> a la Caspofungina.....	70
GRÁFICO 19. CMI's de <i>C. albicans</i> a la Caspofungina.....	71
GRÁFICO 20. CMI's de <i>C. dubliniensis</i> a la Caspofungina.....	72

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

1. 1 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

1. 1. 1 Introducción

Es evidente que el nacimiento de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos está unido al descubrimiento de los mismos. El pionero de la moderna quimioterapia fue Ehrlich quien con sus colaboradores comenzaron a probar la actividad *in vitro* de diversas sustancias contra algunos patógenos, principalmente protozoos y espiroquetas. Sin embargo, la consolidación de la quimioterapia comienza cuando Fleming, en 1928, descubre que un hongo (*Penicillium notatum*), que había contaminado una placa de cultivo de un estafilococo, segregaba una sustancia que ejercía una acción inhibitoria contra dicha bacteria. Esta sustancia recibió, en honor al hongo contaminante, el nombre de Penicilina. En ese momento, de forma indirecta, nacieron las pruebas de sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos en medio sólido. Posteriormente, en la década de los 30 se descubrieron las sulfamidas. La mayoría de las pruebas de actividad de estas sustancias se realizaban *in vivo*. Curiosamente, como ha ocurrido en otras ocasiones, la actividad *in vitro* de estos compuestos era nula. En esta década, se retomaron los trabajos de Fleming y se logra aislar la sustancia pura. Su actividad antimicrobiana se evalúa tanto *in vitro* como *in vivo* con métodos de difusión en medio sólido. Todos estos descubrimientos dieron lugar al desarrollo de diversos procedimientos dirigidos a evaluar la actividad antimicrobiana de diversas sustancias que, con modificaciones, hoy siguen en uso. Se intentaba disponer de unas pruebas, fáciles de realizar, que pudieran, por un lado identificar sustancias con actividad antimicrobiana y por otro, ayudar a guiar el tratamiento de los pacientes. Como casi siempre, los condicionantes económicos hicieron que este tema se desarrollara. La producción de la penicilina antes de la II Guerra Mundial era limitada y muy cara. Por tanto, el disponer de una metodología que predijera si el uso de un antimicrobiano iba a ser útil era muy importante. En los años 40, se descubrieron otros antibióticos y así estas técnicas se fueron haciendo cada vez más necesarias

La dilución en caldo fue el primer procedimiento que se desarrolló para evaluar la actividad *in vitro* de los antimicrobianos y hoy en día sigue, siendo el método de

referencia. Este método consiste en obtener una serie de diluciones del fármaco en un caldo de cultivo; Posteriormente, se inocula el microorganismo problema y se incuba a una temperatura determinada. Tras un tiempo adecuado, se determina que concentración del antimicrobiano produce la inhibición completa del crecimiento. Sin embargo, existían otros métodos basados en la difusión de las sustancias en medio sólido. Los métodos más adecuados se adaptaron de una técnica que se utilizaba para determinar la concentración de penicilina en el suero ^[1].

Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

1. 1. 2 Concepto

En la introducción, ya se ha hablado del concepto de estas pruebas. Como resumen se puede decir que están encaminadas a conocer, si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos. Las condiciones de realización de estas pruebas son completamente diferentes a lo que ocurre en el organismo humano. Sin embargo, cuando los resultados se interpretan con sentido común son de enorme utilidad para el clínico. Así mismo, los resultados obtenidos tras analizar la sensibilidad de los microorganismos deben servir para elegir de forma óptima el tratamiento empírico en la comunidad y en el hospital ^[2].

1. 1. 3 Utilidad

Una de las funciones más importante de los laboratorios de Microbiología Médica son: Los resultados obtenidos con estas pruebas tienen muchas aplicaciones que influyen en el tratamiento empírico, en el directo y en la política de control de la infección. Así mismo son pruebas cruciales para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos.

1. 1. 4 Pruebas en medio líquido y medio sólido

Existen 3 procedimientos generales para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos y estos son:

- **Dilución en caldo.-** consiste en realizar diluciones del antimicrobiano en un medio líquido, adecuado para el crecimiento del microorganismo a trabajar; se inocula el microorganismo, se incuba a la temperatura adecuada y se determina la concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento del microorganismo.
- **Dilución en agar.-** el antimicrobiano se diluye en un caldo apropiado y se solidifica con agar (sólo se valora una concentración); se inocula el microorganismo en la superficie del medio, se incuba a una temperatura adecuada y se determina la concentración del antimicrobiano que produce inhibición del crecimiento. Este método permite evaluar la susceptibilidad de varias especies de microorganismos simultáneamente.
- **Dilución en agar con disco.-** se utiliza un medio sólido. El microorganismo se inocula en la superficie del medio. El antimicrobiano se deposita en un disco de papel (soporte), se pueden valorar diferentes concentraciones del fármaco, se incuba a una temperatura adecuada, después del tiempo de incubación se va a producir un halo de inhibición del crecimiento, de acuerdo al tamaño del halo se puede determinar si el microorganismo es sensible o resistente al antimicrobiano ^[2].

1.2 Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Proceso de estandarización.

1. 2. 1 Introducción

El proceso de estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos comenzó hace años. En 1981, la “Sociedad Francesa de Micología Médica” publica un artículo con recomendaciones para estandarizar la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos ^[3]. En 1982, el Comité de Microbiología del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) construye el “Subcomité de Sensibilidad a los antifúngicos”. En 1985, este Subcomité publica su primer informe que recoge los resultados de una encuesta y un pequeño estudio cooperativo ^[4], cuyos resultados son los siguientes:

Aproximadamente, el 20 % de los hospitales que son miembros del CLSI con más de 200 camas realizaban pruebas de sensibilidad a los antifúngicos.

1. La mayoría utilizaban diluciones en caldo.
2. La mayoría de las cepas ensayadas eran *C. albicans* u otras especies de levaduras.
3. La mayoría de los centros analizaban pocos aislamientos por año.
4. La concordancia de los resultados entre los laboratorios que participaron en el estudio cooperativo fue inaceptablemente baja.

Tras estos hallazgos, el Subcomité decidió que había que desarrollar un procedimiento de referencia más reproducible. Se comenzó con los siguientes aspectos básicos.

1. Metodología en macrodilución con caldo.
2. Medio sintético para evitar antagonismos con algún antifúngico.
3. Se adoptaron, con muy pocas variaciones, los procedimientos utilizados con los antibacterianos relativos a la preparación, almacenamiento y dilución de los antifúngicos.

A pesar de estos acuerdos, se necesitaban estandarizar otros factores que influyen en los resultados y que se han comentado anteriormente. Estas variables son las siguientes:

1. Preparación del inóculo.
2. Tamaño del inóculo.
3. Elección del medio sintético.
4. Temperatura de incubación.
5. Duración de la incubación.
6. Método de lectura y definición de la CMI.

Para ello, se realizaron una serie de estudios cooperativos que vieron la luz en diversas publicaciones ^[5, 6, 7, 8], y que fueron recogidas en 1992 en el primer estándar del CLSI, “Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts” documento M27-P (“proposed”) ^[9]. En los siguientes cuatro años se eligieron, entre varias, 2 cepas para realizar el control de calidad y se establecieron sus CMIs de referencia ^[10, 11]. Además, se comparó el método en macrodilución con una técnica en microdilución ^[3]. Toda esta información se publicó en un estándar denominado M27-T (“tentative”) ^[12]. Durante estos últimos años, la actividad del Subcomité se ha centrado en el desarrollo de puntos de corte para los antifúngicos ^[13]. Estos puntos de corte se han publicado en el documento M27-A (“approved”) publicado en 1997 ^[14].

De los métodos antes descritos, el método estándar de referencia, aceptado internacionalmente para determinar la sensibilidad a los antifúngicos, es el de dilución en caldo, descrito ampliamente por CLSI en el documento M27-A. Recientemente, se incluyeron las modificaciones realizadas en el documento por el comité europeo (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) quedando incluidas en el documento M27-A2 ^[14,15]. Con este método se desarrollo el siguiente estudio.

1. 3 Metodología de referencia para determinar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Estándar aprobado.

Documento M27-A2

1. 3. 1 Introducción

El método que describe este estándar, está pensado para evaluar levaduras que causan infecciones invasoras. Estas levaduras abarcan todas las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Esta metodología no se ha aplicado para evaluar la fase levaduriforme de los hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Asimismo, el análisis de los hongos filamentosos causa problemas que no han sido evaluados en este procedimiento.

El documento M27-A2 es un ESTÁNDAR DE REFERENCIA. Se ha desarrollado a través de un proceso de consenso para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Un objetivo primordial de un estándar de referencia es sentar las bases de forma que se puedan desarrollar otras metodologías más accesibles pero que obtengan resultados similares al estándar. Como ejemplo, cabe citar los métodos de microdilución que ofrecen ventajas particulares como facilidad de realización, economía y obtención más rápida de resultados ^[16,17].

1. 3. 2 Origen de antifúngicos.

Los estándares de los antifúngicos o el polvo de referencia se pueden obtener comercialmente o directamente del fabricante. Los productos almacenados en farmacias u otras preparaciones clínicas del producto no se deben de utilizar. El polvo base enviado por el fabricante suele llevar una etiqueta en la que consta el nombre genérico del fármaco, su potencia (normalmente en µg /mL o Unidades internacionales por mg de polvo) y su fecha de caducidad. El polvo base se debe de almacenar como recomienda el fabricante, a -20 °C o menos, en ambiente seco (desecador y preferentemente a vacío). Para evitar la condensación de agua, cuando el polvo base se saca del congelador, y antes de abrir el desecador, se debe permitir que transcurra el tiempo necesario para que alcance la temperatura ambiente.

1. 3. 3 Utilización de solventes diferentes del agua.

Los siguientes antifúngicos se deben disolver en dimetilsulfóxido y luego en el medio de cultivo apropiado.

Solventes recomendados para algunos antifúngicos

Antifúngicos	Disolvente	Diluyente
Anfotericina B	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Ketoconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Itraconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo

1. 3. 4 Filtración

Se puede asumir que las soluciones madre son estériles ya que es muy difícil que crezcan microorganismos en ellas. Si queremos asegurarnos se deben de filtrar a través de un filtro de membrana. No se debe utilizar filtros de papel, de asbesto o de fibra de vidrio ya que pueden absorber cantidades apreciables del antifúngico. Cuando se decida filtrar el antifúngico es importante cerciorarse de que la forma de filtración no va a disminuir la concentración de la solución madre.

1. 3. 5 Almacenamiento

La solución madre se divide en pequeños volúmenes en tubos de polipropileno o polietileno estériles. Se sellan cuidadosamente y se almacenan siempre a temperaturas por debajo de -20°C , preferiblemente a menos -60°C . Los viales que se retiren se deben de utilizar el mismo día. No se pueden volver a congelar. Deben de ser eliminados convenientemente. Las soluciones madre de los antifúngicos se pueden almacenar a -60°C durante 6 meses o más, sin ninguna pérdida aparente de actividad.

1. 3. 6 Nombres genéricos

Para evitar confusiones, se utilizarán los nombres genéricos de los antifúngicos. En ningún caso se deben de utilizar nombres comerciales.

1. 4 Características generales de los azoles.

Los azoles son moléculas químicas sintéticas, contienen anillos heteropentacíclicos, con dos átomos de nitrógeno (imidazoles) o tres átomos de nitrógeno (triazoles) unidos por átomos de carbono a otros anillos aromáticos (fig. 1) ^[18].

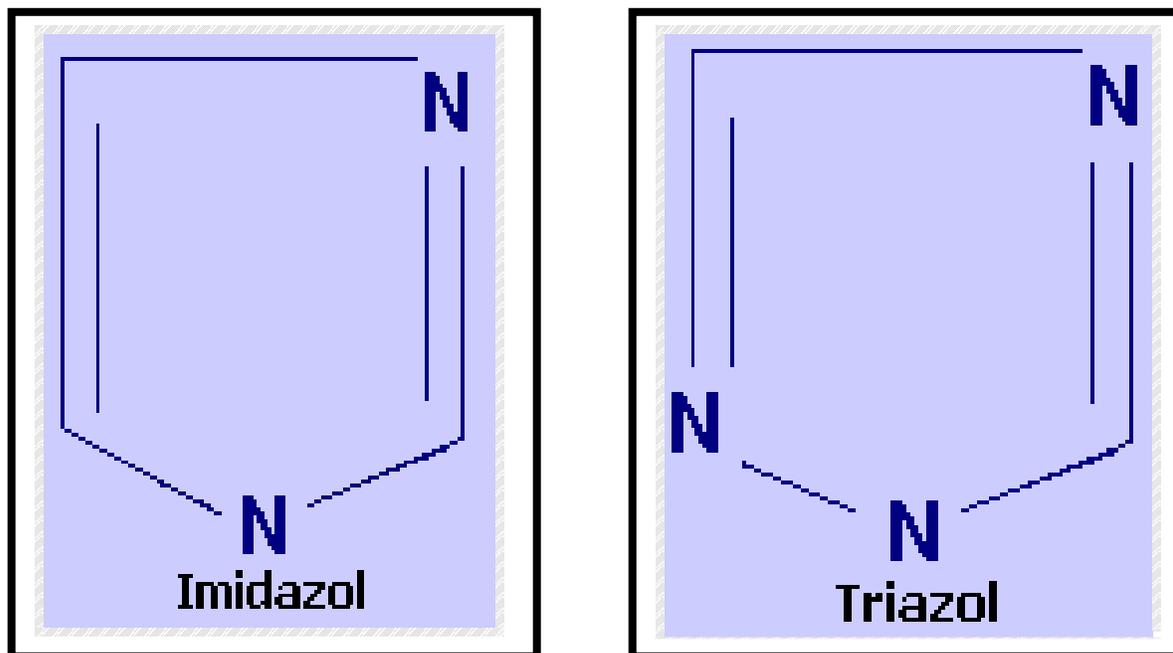


Figura 1. Estructura química del anillo imidazólico y anillo triazólico ^[19].

Los antifúngicos sintéticos derivados del imidazol y del triazol han supuesto el avance más importante de los últimos años en el tratamiento de las micosis sistémicas oportunistas ^[20]. Los imidazoles y triazoles comparten, a grandes rasgos, los mecanismos de acción y de resistencia, y por ello se suelen agrupar como derivados azólicos o azoles. No obstante, también existen numerosas diferencias entre los dos grupos de antifúngicos.

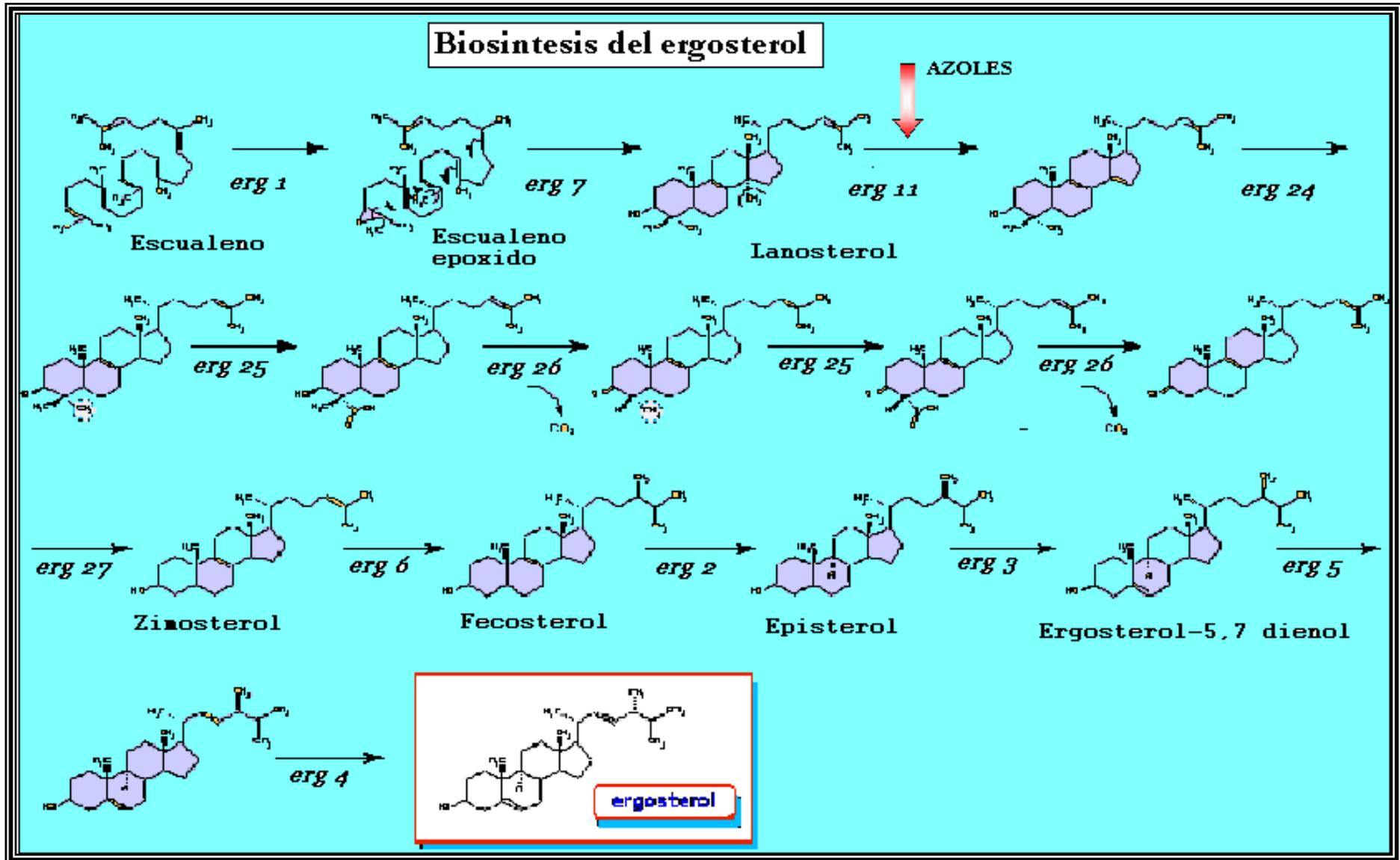
Entre todos los antifúngicos azólicos que se han sintetizado, tan solo dos imidazoles (miconazol y ketoconazol) y dos triazoles (fluconazol e itraconazol) se utilizan por vía oral o parenteral. El resto de los imidazoles, mucho más numerosos, y algún triazol, como el terconazol, se administran sólo tópicamente ^[21].

1. 4. 1 Mecanismo de acción.

Específicamente, el mecanismo primario de acción de los azoles, es a nivel de la inhibición de la síntesis del ergosterol, principal esteroide de la membrana celular fúngica, al modificar la composición de la membrana celular, causa múltiples alteraciones, por ejemplo: afecta la permeabilidad celular produciendo pérdida de elementos intracelulares esenciales, así como de electrolitos; altera la estructura y función de los organelos intracelulares; inhiben la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos, además de la actividad enzimática oxidativa y peroxidativa, dando como resultados un cúmulo intracelular de concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno, lo cual puede contribuir al deterioro de órganos subcelulares y necrosis celular [22].

Los azoles inhiben la síntesis del ergosterol a través de la interacción con desmetilasa 14 α del lanosterol, esta inhibición se produce al formarse un complejo del compuesto azólico con una parte del citocromo P-450 del hongo (necesario para la conversión del lanosterol a ergosterol) dando como resultado la acumulación de precursores intermediarios (14 metil lanosterol) (Fig. 2). A nivel molecular uno de los átomos de nitrógeno (N-3 en los imidazoles; N-4 en los triazoles) se une al átomo de hierro (Fe) del grupo hemo del citocromo P-450 inhibiendo la activación de la enzima [19,23].

Figura 2. Biosíntesis del ergosterol y sitio de acción de los azoles. [24].



1. 4. 2 Fluconazol

El fluconazol está indicado específicamente en el tratamiento de infecciones por: i) *C. neoformans*; ii) *Candida spp.*: candidosis sistémica, candidosis diseminada y otras formas de infección invasiva; iii) en modelos animales normales e inmunosuprimidos demostró ser efectivo contra: *Microsporium spp*, *Trichophyton spp*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* [25, 13,26].

Fórmula química (C₁₃H₁₂F₂N₆O).

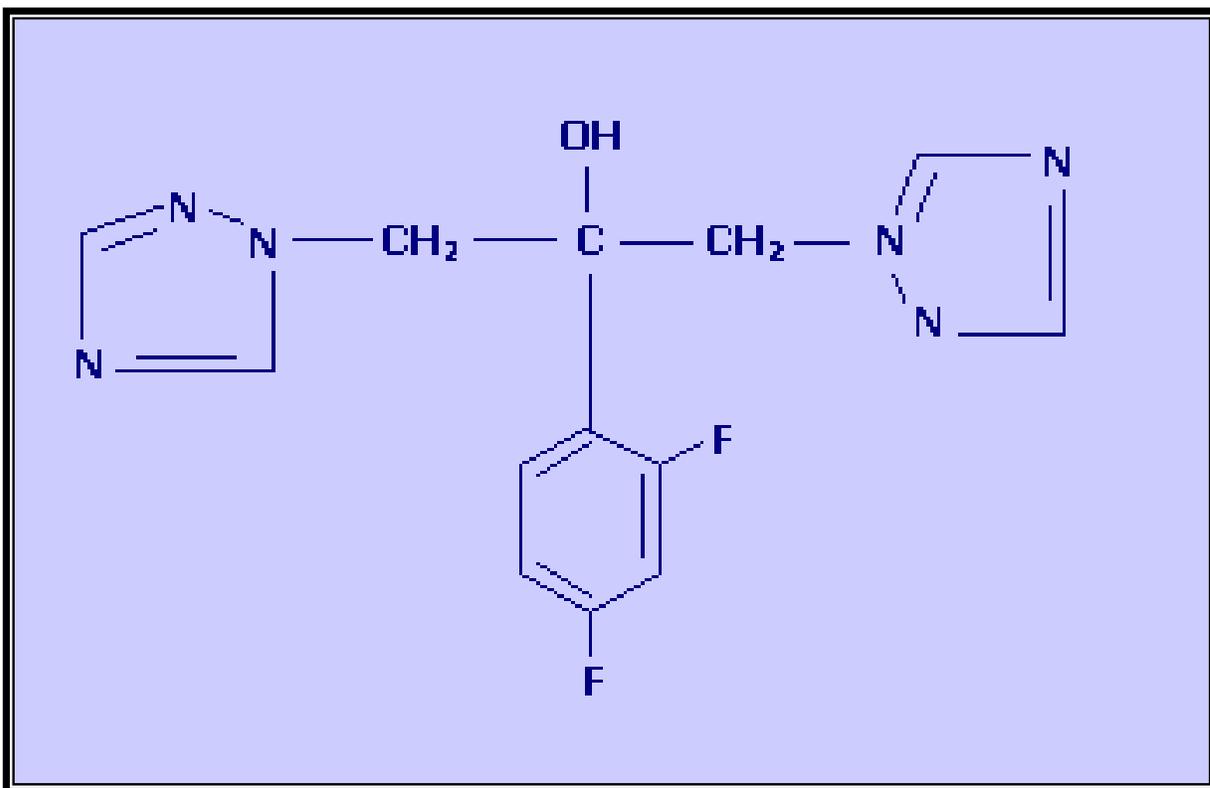


Figura 3. Estructura química del Fluconazol [20].

Farmacocinética.

Las propiedades farmacocinéticas del Fluconazol son similares en cuanto a su administración ya sea por la ruta intravenosa (IV) u oral. El Fluconazol es bien absorbido en la administración oral, y por los niveles plasmáticos (y la biodisponibilidad sistémica) está sobre el 90 % de los niveles logrados por administración IV. Las concentraciones máximas plasmáticas en estado de ayunas se presentan entre los 30 minutos. Las concentraciones plasmáticas son proporcionales a la dosis. Se logran niveles estables de 90 % en el día 4-5 con dosificaciones múltiples de 1 vez al día. La unión a proteínas plasmáticas es baja (11-12 %). El Fluconazol logra una buena penetración en todos los fluidos corporales estudiados. Los niveles de Fluconazol en saliva y esputo son similares a los niveles plasmáticos. En pacientes con meningitis fúngica, los niveles de Fluconazol en líquido cefalorraquídeo (LCR) son de aproximadamente 80% de los correspondientes niveles plasmáticos. La ruta principal de excreción es renal, con aproximadamente el 80% de la dosis administrada apareciendo en la orina. La vida media es de eliminación prolongada. El Fluconazol de 50 mg administrado en forma diaria, hasta por 28 días, ha demostrado no afectar las concentraciones plasmáticas de testosterona en hombres o las concentraciones de esteroides en mujeres en edad fértil. [13, 26, 27].

Efectos adversos

El Fluconazol es generalmente bien tolerado. Los efectos adversos más comúnmente asociados con Fluconazol son síntomas relacionados con el tracto gastrointestinal. Estos incluyen náuseas, dolor abdominal, diarrea y flatulencia; el segundo efecto adverso es el enrojecimiento. En algunos pacientes, especialmente aquellos con enfermedades subyacentes severas, tales como SIDA y cáncer, se han observado cambios en los resultados de las pruebas de función renal y hematológica además de anomalías hepáticas durante el tratamiento con Fluconazol. Los pacientes con SIDA son más propensos a desarrollar reacciones cutáneas severas a numerosos fármacos. Una pequeña cantidad de pacientes con SIDA han desarrollado tales reacciones, generalmente después de recibir Fluconazol en forma concomitante con otros fármacos, que se sabe que están asociados con reacciones cutáneas exfoliativas [26, 13, 27].

1. 4. 3 Itraconazol

Es un derivado triazólico indicado para el tratamiento de micosis: i) superficiales y mucocutáneas como: pitiriasis versicolor, queratitis micótica, candidosis oral; ii) onicomicosis causada por dermatofitos y/o levaduras y iii) micosis sistémicas como: aspergilosis y candidosis sistémica, criptococosis, histoplasmosis, esporotricosis, paracoccidioidomicosis, blastomicosis [25, 13, 28, 29].

Fórmula química ($C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$).

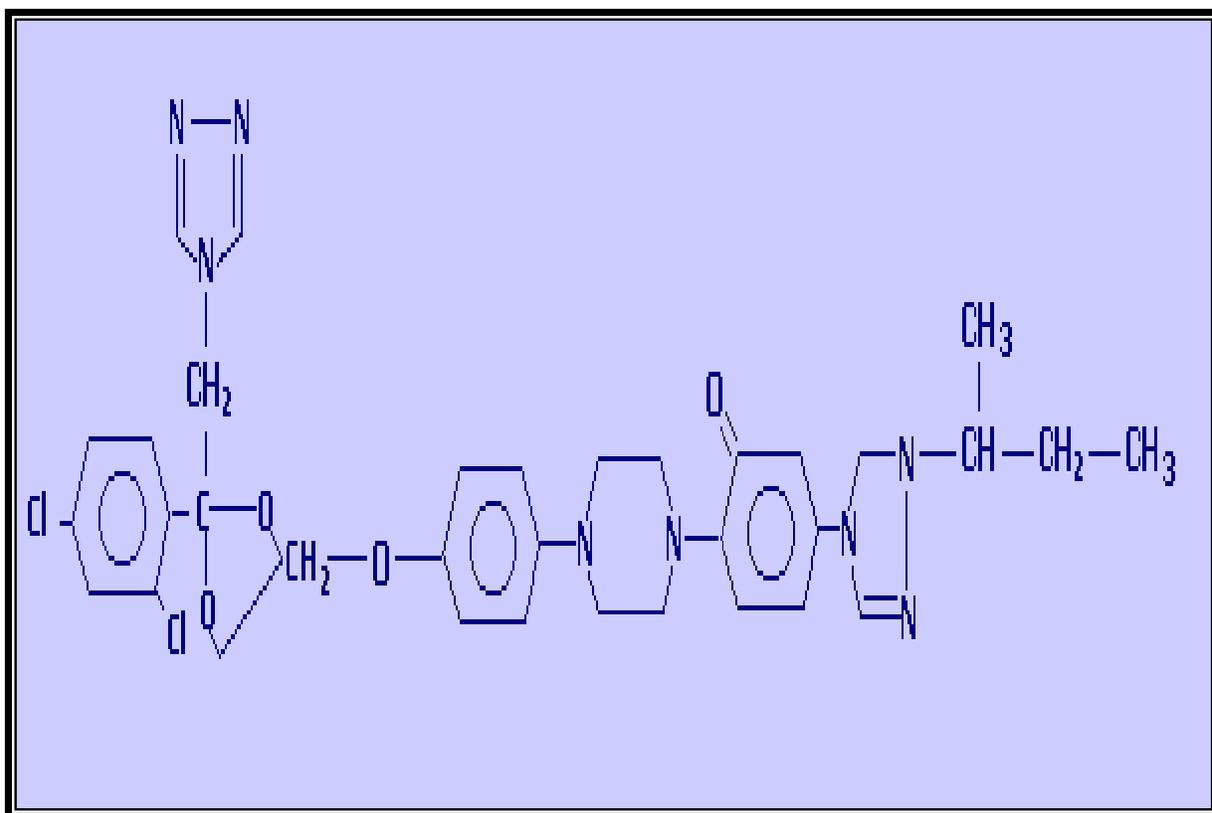


Figura 4. Estructura química del Itraconazol [20].

Farmacocinética

La biodisponibilidad oral del Itraconazol es máxima al administrarse una dosis de 200 mg inmediatamente después de una comida completa. Los niveles máximos en el plasma se alcanzan 3 a 4 horas después de una dosis oral. La eliminación del plasma es bifásica, con una vida media terminal de 1 a 15 días. Las concentraciones estables de Itraconazol en el plasma, 3 a 4 horas después de la ingesta del medicamento, son de 0.4 mg/ml, 1.1 mg/ml y 2.0 mg/ml.

El Itraconazol se une a las proteínas plasmáticas en un 99.8 %, sus concentraciones en sangre total son del 60 %; además, tiene gran afinidad a tejidos con alto contenido de queratina, en especial la piel, y ahí se registran concentraciones del fármaco hasta cuatro veces más altas que en el plasma, la eliminación del fármaco está relacionada con la generación de la epidermis.

Se detectan niveles de Itraconazol en la queratina ungueal a partir de la semana siguiente a la iniciación del tratamiento y persiste durante al menos 6 meses después de un régimen terapéutico de 3 meses. El Itraconazol está presente también en secreciones sebáceas; también se distribuye extensivamente en los tejidos que son susceptibles a invasión micótica. Así podemos encontrar concentraciones terapéuticas 2 ó 3 veces más altas en pulmones, riñones, hígado, huesos, bazo y músculos, comparativamente con las concentraciones plasmáticas ^[13, 27, 29].

Efectos adversos.

El Itraconazol puede provocar reacciones adversas de origen gastrointestinal tales como dispepsia, náuseas, dolores abdominales y estreñimiento. Menos frecuentes son: cefalea, aumentos reversibles de las enzimas hepáticas, trastornos menstruales, mareos y reacciones alérgicas (tales como prurito, exantema y urticaria) ^[13, 27, 29].

1. 4. 4 Ketoconazol

El Ketoconazol es un derivado imidazólico, usado para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas: candidosis, blastomicosis, coccidioidomicosis, hitoplasmosis, cromomicosis y paracoccidioidomicosis; a su espectro de acción se incluyen: *Trichophyton spp.*, *Epidermophyton spp.* y *Microsporum spp.* [27, 30, 31].

Fórmula química (C₂₅H₂₃Cl₂N₄O₄).

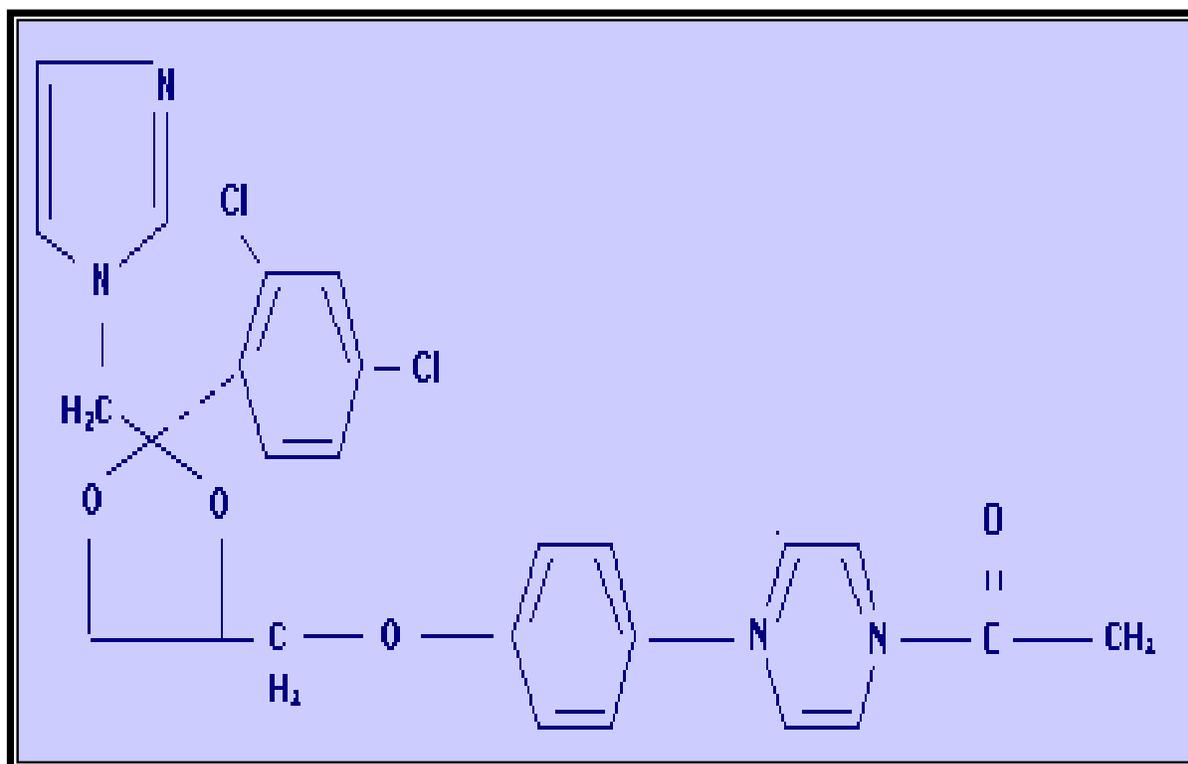


Figura 5. Estructura química del Ketoconazol [20].

Farmacocinética.

El Ketoconazol se absorbe rápidamente por vía digestiva. La biodisponibilidad del fármaco administrado por vía oral depende del pH gástrico, debido a que es un agente dibásico débil y que requiere un medio ácido para su disolución y absorción. Estudios realizados por Chin y colaboradores refieren que el Ketoconazol, se incrementa en un 65 % cuando es ingerido con una bebida ácida, tal como es la coca-cola ^[32].

El nivel plasmático máximo de 3.5 µg/ mL, se alcanza en un intervalo de 1 a 2 horas, luego de la administración oral de 200 mg del fármaco. El fármaco es extensamente distribuido a la mayoría de los líquidos corporales, la penetración al líquido cefalorraquídeo (LCR) es mínima. La unión a proteínas plasmáticas, principalmente en albúmina es del 99% *in vitro*. La concentración plasmática disminuye en forma bifásica, la fase inicial de eliminación es de aproximadamente 2 hrs y la fase terminal es de aproximadamente 8 hrs. La vía de eliminación más importante es la gástrica, las heces (en las cuales del 20-65% del fármaco no es modificado), y finalmente, el 13% de la dosis administrada se excreta por orina ^[27, 30, 31].

Efectos adversos.

El Ketoconazol puede inhibir la síntesis de esteroides en humanos, incluyendo la síntesis de aldosterona, cortisol y testosterona. El efecto de Ketoconazol sobre la síntesis de testosterona ocurre a dosis más bajas que las que afectan la síntesis de cortisol, dosis de 200-400 mg/día, puede inhibir la secreción de testosterona y 400- 600 mg/día ha mostrado inhibir la síntesis de cortisol.

El uso de Ketoconazol oral se ha asociado a toxicidad hepática, se han reportado casos de hepatitis en niños a veces fatales ^[25].

1. 5 Polienos

La Anfotericina B. Es un antifúngico natural, producido por el actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Su estructura química es de un macrólido heptaénico que contiene 7 ligaduras solubles conjugadas en la posición trans y es 3-amino-6,6-dideoximanosa (micosamina) unida al anillo principal por un enlace glucosídico. ^[33]

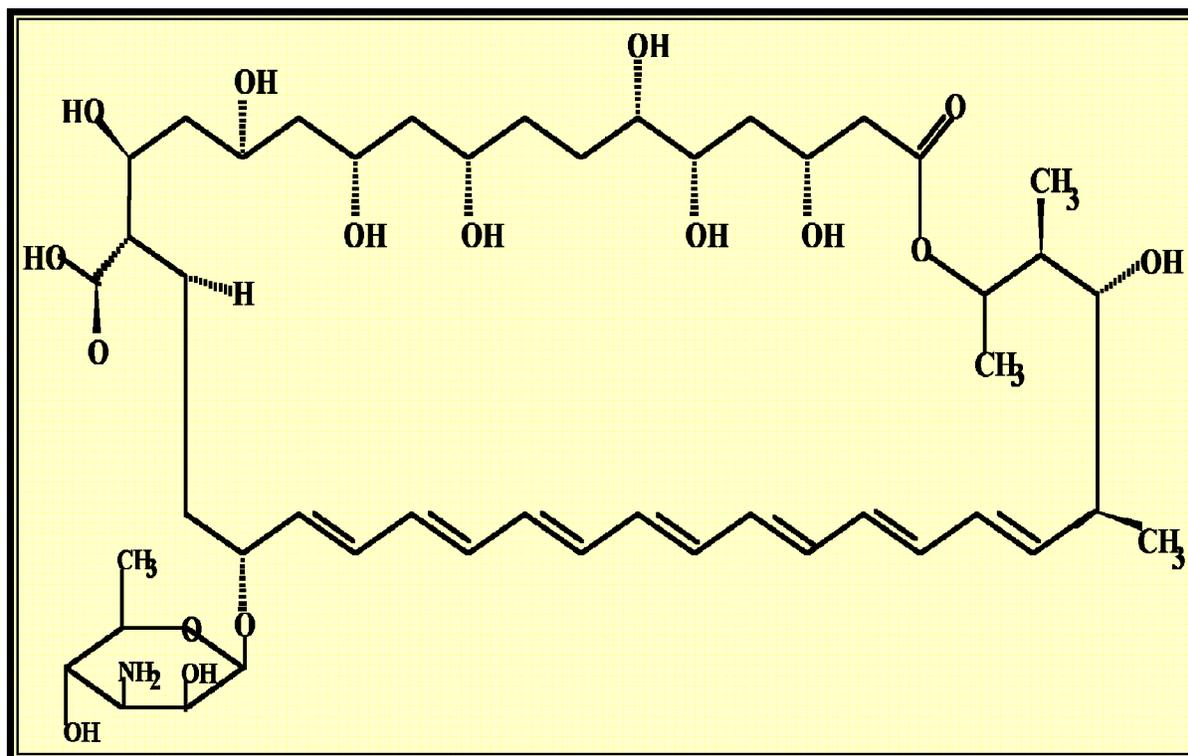


Figura 6. Estructura química del la Anfotericina B ^[33].

1. 5. 1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la Anfotericina B, de la Nistatina y de otros macrólidos poliénicos, consiste en la unión con diversos compuestos de la membrana plasmática, especialmente el ergosterol de los microorganismos sensibles. Tras la unión se produce la rotura de la membrana plasmática. Se piensa que el anillo macrólido es el responsable de la actividad antifúngica de estos compuestos. Los polienos se unen irreversiblemente, siendo su tasa de absorción dependiente de la temperatura y de la energía.

La especificidad de estos antibióticos por los hongos es debida a la existencia de esteroides en la membrana plasmática de los mismos. Las bacterias al carecer de esteroides son insensibles a estos compuestos. La unión de estos antibióticos a la membrana celular afecta a los sistemas de transporte de las pequeñas moléculas. De esta forma, los microorganismos son incapaces de concentrar metabolitos y se produce una pérdida de iones y azúcares. Probablemente debido a la pérdida de constituyentes vitales para la actividad enzimática se inhibe la respiración y la glicólisis. Los efectos letales de estos antifúngicos son el resultado final del daño producido en la membrana.

Las concentraciones bajas de Anfotericina B incrementan la permeabilidad de pequeñas moléculas o iones como el potasio. Este aumento de la permeabilidad es reversible (fungistasis). Por el contrario, a altas concentraciones la pérdida de moléculas grandes conduce a la pérdida irreversible de la viabilidad celular (efecto fungicida) ^[2].

Farmacocinética

- Vía de elección goteo intravenoso (IV) lento. Se absorbe mal por vía gastrointestinal y la vía intramuscular es irritante.
- Vía oral: Para baja colonización intestinal por *Candida*.
- 90-95% ligada a lipoproteínas. Se excreta por riñones. Se elimina sin cambios en pacientes anéfricos o con hemodiálisis.
- Concentración en líquido pleural, peritoneo, sinovial y humor acuoso son $\cong 2/3$
- Atraviesa la placenta. Escasa cantidad en humor vítreo, LCR o líquido amniótico normal.
- Por su extensa unión a los tejidos, la Anfotericina B tiene una fase terminal de eliminación de $\cong 15$ días ^[33].

Efectos Adversos

- Irritación del endotelio venoso, dolor y tromboflebitis en sitio de la inyección.
- Puede producir fiebre y escalofríos que son frecuentes al comienzo del tratamiento por liberación de interleucina I (pirógeno endógeno) y factor de necrosis tumoral de monocitos humanos. Con frecuencia la reacción comienza 1-2 hrs. después de la infusión y se prolonga por 3-4 hrs. puede ser precedida por disnea y taquicardia.
- Puede producir nefrotoxicidad, que es dosis dependiente y se potencia con otros nefrotóxicos como aminoglucósidos o ciclosporina [33].

Resistencia

- * La resistencia es poco frecuente y se presenta en pacientes con SIDA, y con tumores sólidos o hematológicos.
- * Se ha atribuido a alteraciones en los componentes de la membrana fúngica con posible modificación de la relación ergosterol/fosfolípidos.

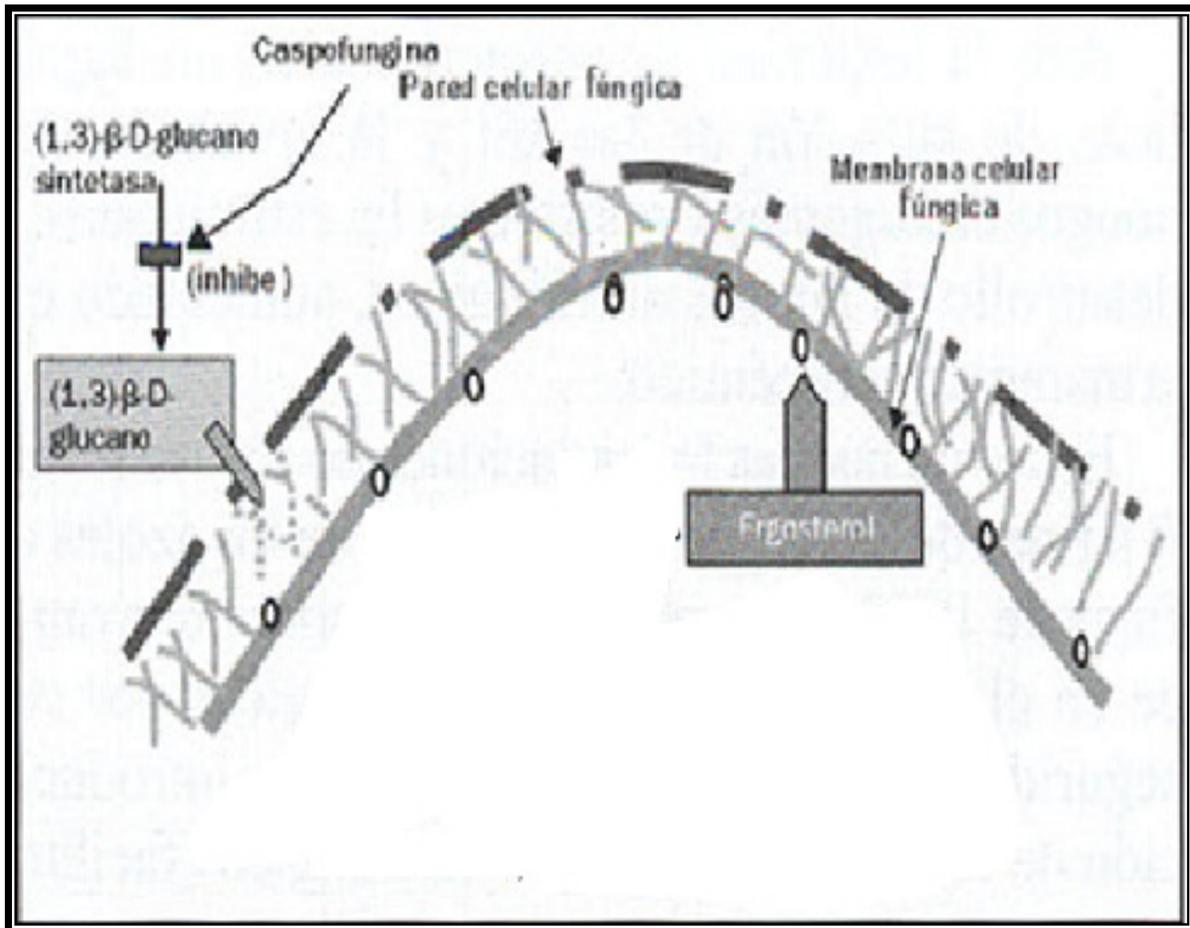


Figura 8. Mecanismos de acción de la Caspofungina ^[36].

Farmacocinética

Actualmente están sólo disponibles para uso intravenoso, muestran concentraciones en plasma proporcionales a la dosis suministrada. Su vida media es de aproximadamente 10-15 horas. El 95% se une a proteínas plasmáticas y se distribuyen en la mayoría de los tejidos incluyendo el cerebro; sin embargo, la concentración en LCR es baja ^[37].

Resistencia

Actualmente sólo se ha detectado resistencia a la Caspofungina por algunas cepas de *Candida albicans* debido a mutaciones de la FKS1P. No se conocen bombas que lleven el medicamento al exterior de la célula del hongo ^[35].

Efectos adversos

El principal efecto asociado a la administración de Caspofungina es la hepatotoxicidad (11% de los pacientes), que puede agravarse con la administración simultánea de ciclosporina.

Produce también eosinofilia, descensos de hemoglobina y/o hematocrito, hasta un 12%, descenso de neutrófilos y plaquetas. Se produce también dolor de cabeza, elevación de potasio sérico, diarrea, anorexia, náuseas y vómitos en menos del 5% de los pacientes ^[38].

1.7 Resistencia a los antifúngicos.

1.7.1 Introducción

La resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos es un fenómeno bien conocido, sobre todo en el campo de las infecciones bacterianas. Sin embargo, hasta hace poco, no se había prestado mucha atención a la resistencia de los hongos a los antifúngicos. El incremento de la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del número de pacientes trasplantados y de otro tipo de pacientes inmunosuprimidos, ha producido un aumento paralelo de las infecciones fúngicas, del uso de antifúngicos y de la aparición de hongos resistentes a los mismos.

Antes de comenzar a desarrollar la problemática de la resistencia a los antifúngicos, conviene recordar una serie de conceptos que se emplean con los antibacterianos y que son igualmente útiles con los antifúngicos.

1.7.2 Definición de sensibilidad o resistencia.

El concepto de sensibilidad y resistencia depende, en gran parte, del método utilizado en el laboratorio para determinar la sensibilidad. Al igual que ocurre con los antibacterianos, la forma más habitual de determinar si un hongo es sensible o resistente a los antifúngicos es mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Al hablar de los conceptos de sensibilidad o resistencia conviene establecer dos puntos de vista, el microbiológico y el clínico. Desde un punto de vista microbiológico un aislado es resistente a un antimicrobiano cuando su CMI es más elevada que la habitual para esa especie. Ahora, desde un punto de vista clínico, hay que tener en cuenta que aislados considerados resistentes microbiológicamente pueden responder perfectamente a un tratamiento, ya que la concentración del fármaco en el lugar de la infección puede ser mucho más elevada que la CMI del microorganismo. En consecuencia para clasificar a un microorganismo como resistente clínicamente podríamos utilizar la siguiente definición propuesta por Kerridge y cols^[39]: “Un hongo es resistente a un antifúngico cuando continúa creciendo y produciendo sintomatología a pesar de que la concentración del fármaco es máxima en el lugar de la infección”. Idealmente, para clasificar a un microorganismo como clínicamente resistente deberíamos conocer la CMI del mismo y

la concentración que está alcanzando el antifúngico en la zona de infección. Asimismo, deberíamos seguir recuperando dicho microorganismo del lugar de infección.

Los factores que contribuyen a la resistencia clínica son principalmente de tres tipos:

1.-Fúngico. Incluye: i) tipo de célula (levadura o hifa); ii) susceptibilidad, CMI inicial; iii) serotipo y tamaño de población (cepas y cantidad de inóculo)

2.-Fármaco. i) naturaleza, composición química; ii) actividad sobre el hongo, fungistático o fungicida; iii) dosis (frecuencia, cantidad y esquema de terapia, intermitente o continua); iv) farmacocinética, absorción, distribución, metabolismo e interacción con otros medicamentos.

3.- Huésped. i) estado inmune; ii) sitio de infección; iii) gravedad de la infección; iv) presencia de materiales extraños (catéteres, etc.), formación de abscesos [22].

1. 7. 3 Resistencia.

Con independencia de la situación clínica en particular, cuando se hable de resistencia, los siguientes conceptos deben de estar claros:

Resistencia clínica: se define como la persistencia o progresión de una infección a pesar de una terapia antimicrobiana adecuada contra el agente causal [39]. Se habla de **resistencia primaria o intrínseca:** cuando un microorganismo es resistente a un antimicrobiano sin una previa exposición a este (*C. krusei* y *C. glabrata*, resistentes al fluconazol) [40]; mientras que la **resistencia secundaria** se presenta después de que el antimicrobiano ha estado en contacto con el microorganismo (*C. albicans*, resistente al fluconazol) [41,22].

1. 7. 4 Mecanismos celulares de resistencia a antifúngicos.

1. Alteraciones genéticas: en una población grande de levaduras, donde una presión de selección es ejercida por el antifúngico, hay un desplazamiento de cepas susceptibles por cepas resistentes.
2. Resistencia epigenética: es una expresión genética transitoria, en la cual la célula fúngica puede expresar un fenotipo en presencia del antifúngico; sin embargo, puede revertir a una cepa susceptible una vez que el antifúngico es eliminado.
3. Alteración en la población fúngica: con un incremento en la población fúngica, la probabilidad de mutar a una cepa más resistente es mayor (microevolución) ^[41, 22].

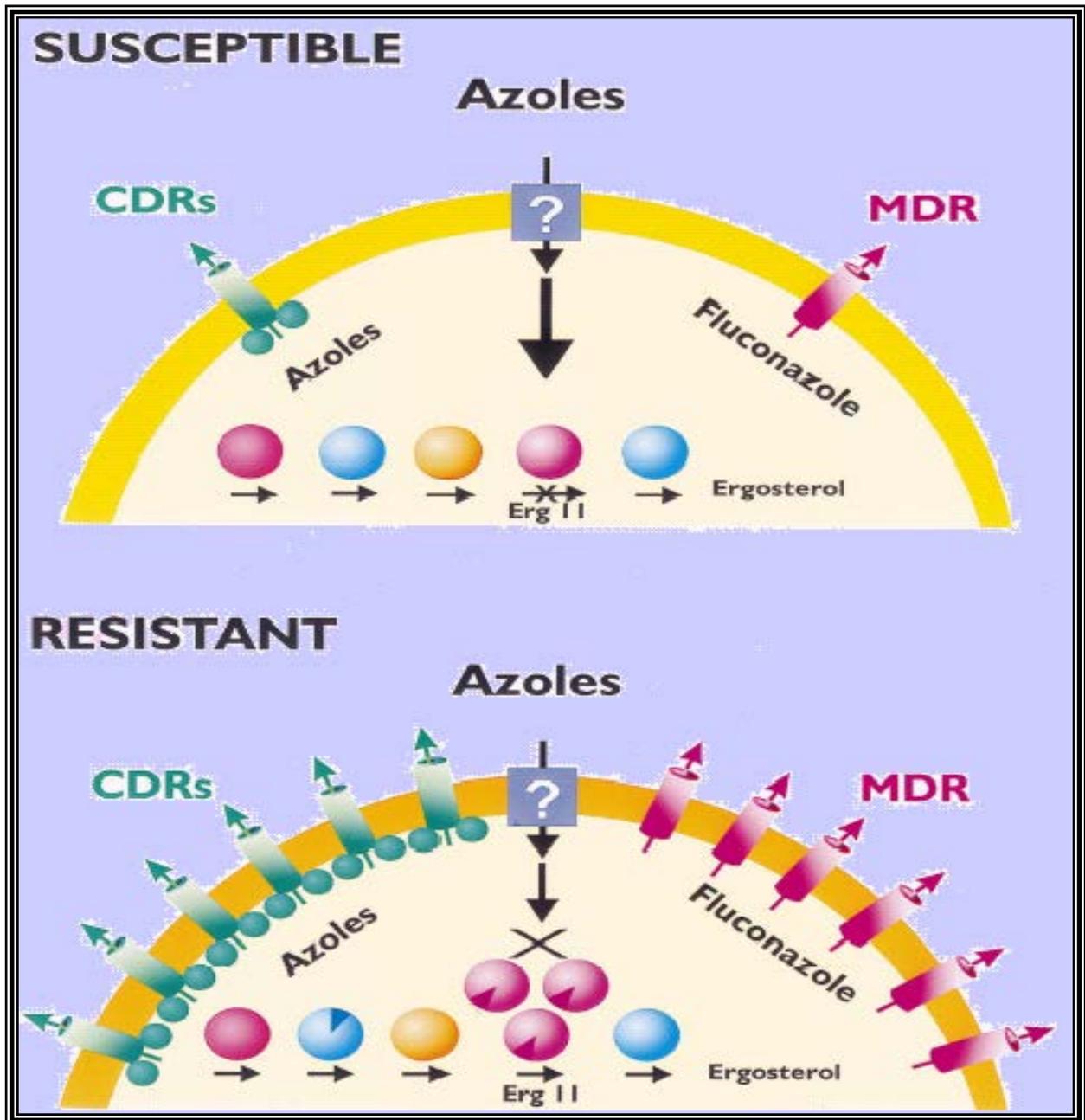
1. 7. 5 Mecanismos moleculares de resistencia a los azoles.

1. Modificación de la vía biosintética del ergosterol.- modificación de la enzima blanco u otras enzimas de la vía metabólica.
2. Alteraciones moleculares del gen *erg11*.- la enzima blanco de los compuestos azólicos es la desmetilasa 14 α del lanosterol. El gen que codifica para esta proteína es el *erg11* en todas las especies fúngicas y estas regulado por el *erg3*. Dentro de este gen pueden presentarse alteraciones como:
 - a) Mutaciones puntuales.- se reemplaza la treonina (T) por alanina (A) en la posición 315, llamada mutación puntual T315A ^[41, 22].
 - b) Sobreexpresión.- incremento en el numero de copias de la enzima blanco (14 α desmetilaza) ^[1].
 - c) Amplificación del gen.- por incremento en el número de copias del *erg11*, dando como resultado también un incremento en su expresión ^[22].

3. Sistemas de bombeo activo del antifúngico al exterior celular, se conocen dos tipos de bombas de salida (Figura 9).

En una célula susceptible, el compuesto azólico entra a la célula por mecanismos que aún no se conocen o tal vez por difusión pasiva. Los compuestos azólicos inhiben al gen *erg11* (circulo rosa), bloqueando la formación del ergosterol. Los dos tipos de bombas se expresan a niveles bajos. Los genes CDR (*Candida* drug resistance) son ABCT (binding cassette transporters), forman un poro en la membrana (tubos verdes) y se unen dos esferas (péptidos) (círculos verdes). Los genes MDR (Multidrug resistance) son el principal facilitador que forman un poro en la membrana (tubos rojos). En un modelo de resistencia celular. Los azoles entran en la célula por un mecanismo desconocido. Los azoles son menos eficaces contra el gen *erg11* por dos razones: la enzima ha sido modificada por mutaciones específicas (rebanadas oscuras en esferas rosadas) y/o la enzima es sobreexpresada. Las modificaciones en otras enzimas son en la biosíntesis del ergosterol, contribuyen a la resistencia a los azoles (rebanadas oscuras en las esferas azules). Los componentes de la membrana plasmática son modificados (membrana en amarillo oscuro). Finalmente, las moléculas de los azoles son eliminadas de la célula por la sobre expresión de los genes CDR (ABCT) y los genes MDR (Major Facilitators, MF). Los genes CDR son eficaces contra muchos fármacos del grupo de los azoles. Mientras que los genes MDR parecen ser específicos únicamente para el Fluconazol [22].

Figura 9. Mecanismos moleculares de resistencia a los azoles.



1. 8 Candidosis.

1. 8. 1 Definición

Es una infección micótica causada por levaduras oportunistas, por diferentes especies, pertenecientes al género *Candida*. Aunque estas infecciones pueden presentarse en hospederos normales, la mayoría de ellas se desarrollan en individuos inmunocomprometidos o inmunodeprimidos, así que estas se pueden presentar en una gran variedad de cuadros clínicos que dependen más del paciente y de la nueva tecnología terapéutica, que del agente etiológico.

Así mismo las lesiones pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas. Las manifestaciones clínicas pueden ser de curso agudo, subagudo o crónico [42, 25, 43, 44, 45].

1. 8. 2 Patogenia.

Al ser *Candida spp.* una levadura comensal, la mayor parte de las infecciones son de tipo endógeno y el evento crucial para que se lleve a cabo la infección puede ser un cambio en la relación entre la levadura y el paciente [42, 45].

El proceso de infección comienza con la adherencia de las levaduras a las células de la mucosa o queratinocitos, que interactúan en la relación de la pared fúngica de polisacáridos (mananas) con un receptor en la célula epitelial. Se han reconocido como adhesinas a: mananas, manoproteínas y quitina [42, 46, 47].

Aun cuando *in vivo* la situación es más compleja que en estudios *in vitro*, se han postulado los siguientes mecanismos de virulencia: capacidad de adhesión; producción de enzimas proteolíticas, especialmente proteasas y fosfolipasas, las cuáles facilitan la penetración y degeneración de queratina y colágena; transformación morfológica de levadura a pseudohifa, lo que también facilita la penetración y permite evadir al sistema inmunológico, ya que la pseudohifa libera mayor cantidad de fosfolipasas y es más resistente a la fagocitosis; efectos inmunomoduladores de determinantes antifúngicos que contribuyen a disminuir la actividad de las defensas del huésped; cambios fenotípicos, los cuales permiten al hongo adaptarse a condiciones diferentes o cambiantes [42, 28, 48].

1. 8. 3 Identificación en el laboratorio.

La toma de muestra es muy variable, ya que la candidosis se puede presentar en cualquier parte del cuerpo, así que los productos que se recolectan son: sangre, esputo, escamas, LCR, orina, etc...(Figura 10) ^[42,25].

1) EXAMEN DIRECTO. La muestra se coloca entre un portaobjetos y un cubreobjetos y se procesa con una solución aclarante, por lo regular se utiliza KOH al 10 %, así mismo también se puede utilizar solución fisiológica o solución de lugol, se pueden realizar también tinciones como Gram, Wright, Giemsa, PAS e incluso Papanicolau. A la observación al microscopio de los exámenes directos o tinciones es probable observar pseudohifas cortas o largas y / o cúmulos de blastoconidias, estas determinan el estado virulento y patógeno de la levadura, de esta manera nos ayuda a confirmar el diagnóstico. En el caso de onicomycosis candidótica regularmente no se encuentran pseudohifas, solamente blastoconidias, pero el solo aislamiento del hongo en los medios de cultivo nos indican la enfermedad, debido a que *Candida spp.* no es microbiota habitual en esta región ^[25].

2) CULTIVOS. Las diversas especies de *Candida* crecen en los medios de cultivo habituales (agar Sabouraud, gelosa sangre, infusión de cerebro- corazón y extracto de levadura). Es importante considerar que *Candida albicans* crece en los medios de micosel; sin embargo, otras especies son inhibidas por la cicloheximida (*Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida zeylanoides*), por lo cual es recomendable sembrar a la vez en medio de Sabouraud. *Candida sp* crece rápidamente a 37 ° C en un periodo de 24 a 48 horas después de las cuales es posible observar las características de las colonias, las cuales son similares en la gran mayoría de medios de cultivo: son colonias blancas hasta amarillentas, húmedas, limitadas, opacas, algunas veces se observan lisas y otras rugosas y en ocasiones es posible observar sumergido dentro del agar el pseudomicelio. Son útiles los medios selectivos para este género como el medio Biggy (Nickerson), que contiene gran cantidad de citratos y sulfitos, los citratos eliminan la flora bacteriana y los sulfitos, al ser reducidos a sulfuros provocan que las colonias adquieran

una coloración café claro u oscuro, lo que permite distinguirlas de otros hongos levaduriformes. En la actualidad se utilizan medios de cultivo que permiten hacer una identificación de primoaislamiento de algunas especies; ejemplos de esto son el Candiselect® y el CHROMagar® (los cuáles se detallarán un poco más adelante). El hecho de que tengamos un cultivo positivo no es un indicador forzoso de una candidosis, ya que hay que recordar que esta levadura es parte de la microbiota habitual de ciertas zonas del cuerpo, es por esto que la correlación de los aspectos clínicos y micológicos es muy importante ^[42, 25].

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE CANDIDOSIS

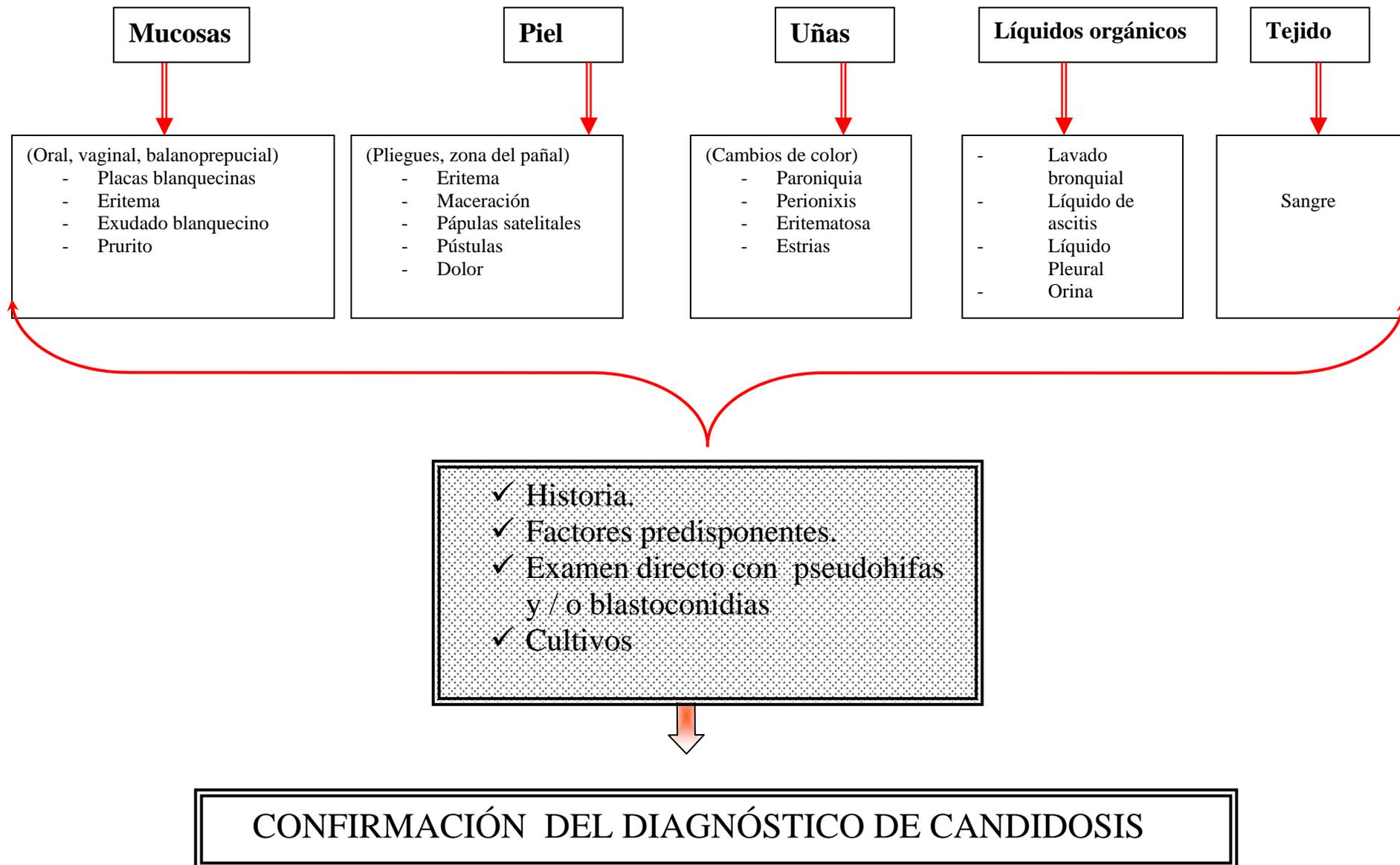


Figura 10. Esquema para el diagnóstico de Candidosis.

1. 8. 3 Tipificación de cepas de *Candida* especie *albicans*.

Para distinguir cepas de especie *albicans* de cepas *no – albicans* habitualmente se sugiere la siguiente secuencia de pruebas.

Cultivo: En agar Sabouraud se desarrollan las diversas especies de *Candida* en un periodo de 24 a 48 horas, dando colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, generalmente lisas aunque algunas veces se presentan rugosas, de color blanco y blanco amarillento. El medio Candiselect® permite el reconocimiento de *Candida albicans* (se observan de color azul turquesa), mientras que el resto de las especies crecen de manera similar (se observan de color blanco). El medio de CHROMagar® está hecho a base de sales cromógenas lo que permite que las diferentes especies del género *Candida* formen colonias coloridas al crecer: *Candida albicans* (verde); *Candida tropicalis* (azul -gris); *Candida krusei* (rosa pálido) y *Candida sp.* (blanco-crema). Este medio tiene una alta especificidad su utilidad radica en que desde el primoaislamiento se puede conocer la especie causante y nos ayuda a reconocer infecciones mixtas [25, 49, 50, 51].

Filamentación en suero: Se realiza en suero humano o suero glucosado. Se siembra la cepa a investigar en 0.5 mL. de suero a 37 °C durante 3 horas, en este momento se realiza una observación en fresco. Esta prueba es presuntiva de cepas de especie *albicans*. Si se forma un tubo germinativo de aproximadamente 5 –15 µm de largo, a partir de la célula levaduriforme. Después de este periodo de incubación, todas las especies pueden producir tubos germinativos [25, 52].

Producción de pseudomicelio y clamidoconidias: Se realiza en medios pobres en nutrientes y se les agrega un tensoactivo (1%), un ejemplo es el medio de Corn –meal (agar harina de maíz) + Tween 80. En este medio se siembra por estria y se incuba a una temperatura de 25 °C durante 72 horas, posteriormente la caja se coloca en la platina del microscopio para la observación. Todas las especies oportunistas del género *Candida* presentan pseudohifas largas, ramificadas, con cúmulos de blastoconidias; con excepción de *Candida glabrata*. En el caso específico de cepas especie *albicans* presentan clamidoconidias terminales o intercalares que miden entre 10 y 12 µm de diámetro con

una doble membrana bien formada. Esta prueba fisiológica es determinante ya que nos permite distinguir cepas especie *albicans* entre cepas *no – albicans*. [42, 25, 49].

Pruebas bioquímicas: Se basa en la fermentación (zimograma) y utilización de carbohidratos (auxonograma). Existe un perfil bioquímico que identifica a cada especie del género *Candida*.

- ❖ **Zimograma:** Se realiza en medio de cultivo líquido con una proporción de carbohidratos que varía entre 1 y 5 %, se le agrega un indicador de pH ácido (rojo de fenol), y una campana de fermentación para detectar la producción de gas, esto se incuba a 25 ° C durante 5 a 15 días, al final de los cuáles se hace la lectura de las pruebas mediante el viraje del indicador y la formación de gas.

- ❖ **Prueba de la xilosa:** Todos los aislamientos positivos a la prueba de formación de tubos germinales son sometidos a la prueba de asimilación de la xilosa. Una o dos colonias son inoculadas en un tubo conteniendo 2 mL de xilosa, luego son incubadas por 24 horas. Un cambio de color a rosa es positivo lo cual es característico de *C. albicans*, mientras que si no hay cambio en el color, significa no asimilación del azúcar que es el caso de *C. dubliniensis* [49].

- ❖ **Auxonograma:** Se realiza en medio sólido peptonado, ausente de carbohidratos, estos se agregan en forma de penicilindros o sensidiscos, la cepa problema es sembrada previamente y el carbohidrato a investigar se aplica en una solución de 1 a 2 %, se incuban a 25 ° C durante 5 a 15 días. El desarrollo de la colonia alrededor del carbohidrato indica una lectura positiva [25, 49].

(Figura 11 y en la tabla siguiente los resultados de la mayoría de las pruebas de tipificación figura I2)

Diagrama de flujo para la identificación de cepas de *Candida* especie *albicans*.

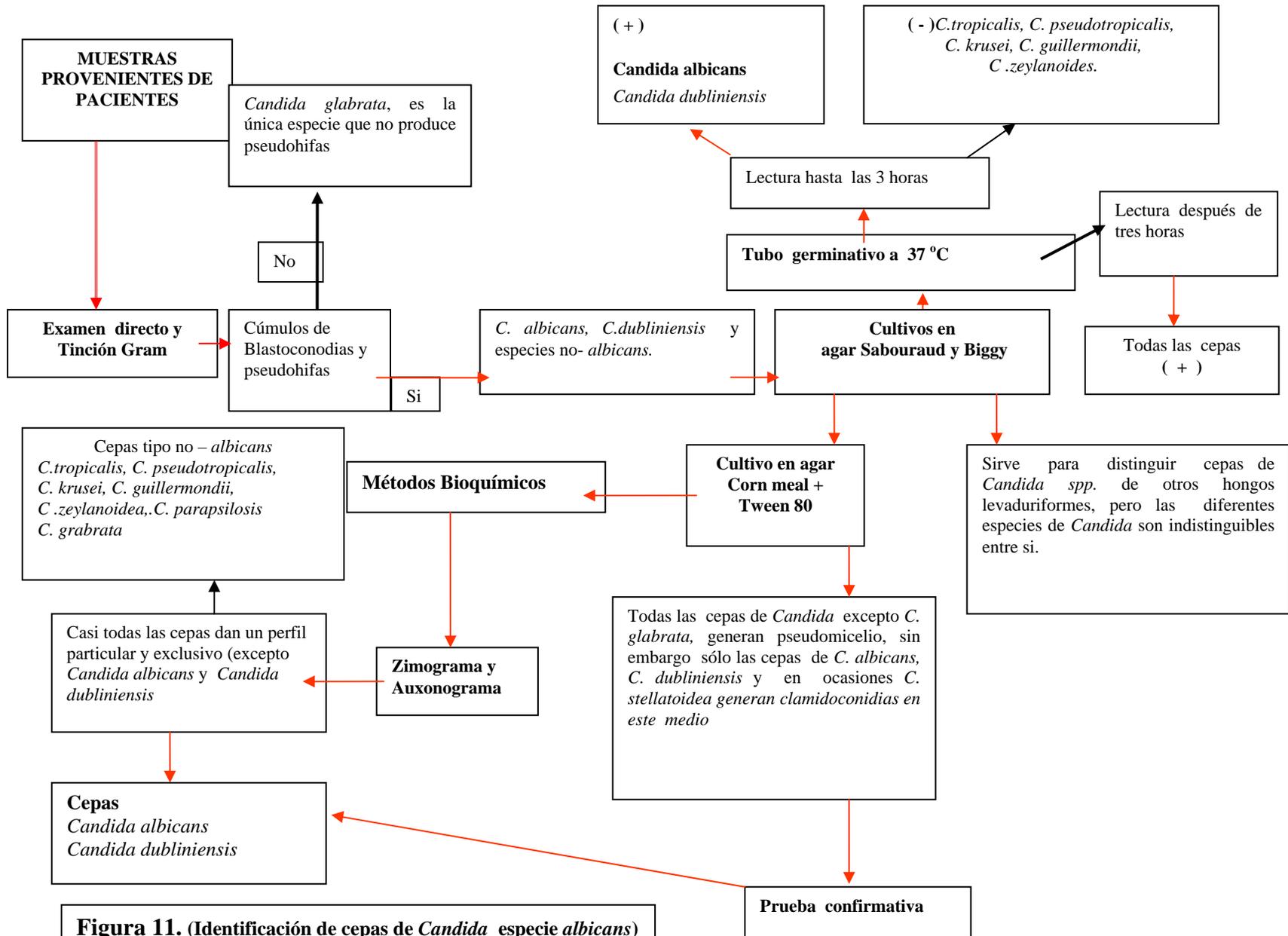


Figura 11. (Identificación de cepas de *Candida* especie *albicans*)

Figura 12. Pruebas de asimilación

	Morfología			Auxonograma										Zimograma						Otros caracteres			
				Indispensable					Electivo														
	Micelio o pseudomicelio	Clamidoconidias	Tubos germinativos	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xilosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Ureasa	Red. tetrazolio	Res. Actidione	Utilización KNO ₃
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+-	+	-	-	-	B	+	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	-	-	-	R	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	+	+-	+-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Vi	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	V	-	+	-	+	+	+	+	-	R	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	R	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-	-	R	-	-

+ = positivo; - = negativo; +/- = casi siempre positivo; V = variable; B = blanco; R = rosado; Red. = reducción; Vi = violeta; Res = resistencia

1. 8. 4 Identificación de *Candida dubliniensis* en especímenes clínicos.

PRUEBAS FENOTÍPICAS

A continuación se presentan los resultados de la mayoría de las pruebas fenotípicas descritas a nivel internacional para la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*.

- Formación de tubo germinativo en suero a 37 ° C durante 3 horas:

Candida albicans: Generación de tubo germinal.

Candida dubliniensis: Generación de tubo germinal.

- Producción de clamidoconidias en Corn meal + Tween 80:

Candida albicans: Se observan levaduras, pseudomicelio y clamidoconidias únicas y terminales.

Candida dubliniensis: Se observan levaduras, pseudomicelio y clamidoconidias múltiples y en grupos de 2 ó 3 generalmente, a veces es posible observar grupos más grandes.

- Agar Alpiste Negro:

Candida albicans: Crecimiento levaduriforme sin producción de pseudomicelio.

Candida dubliniensis: Crecimiento levaduriforme con producción de pseudomicelio.

- Agar caseína:

Candida albicans: No hay producción de clamidoconidias.

Candida dubliniensis: Hay producción de clamidoconidias

- CHROM agar Candida®:

Candida albicans: Colonias de color verde claro.

Candida dubliniensis: Colonias de color verde oscuro.

- Candiselect ID®:

Candida albicans: Colonias verde turquesa claro.

Candida dubliniensis: Colonias verde turquesa oscuro.

Características	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
Examen directo KOH al 10%	Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas	Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas
Tinción de Gram	(+) Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas	(+) Cúmulos de blastoconidias y/o pseudohifas
Crecimiento en Sabouraud	Colonias blancas, suaves, limitadas, opacas, ocasionalmente con pseudomicelio	Colonias blancas, suaves, limitadas, opacas, ocasionalmente con pseudomicelio
Tubo germinativo en suero a 37 °C	(+) después de 3 horas	(+) después de 3 horas
Clamidoconidias en Cornmeal + Tween 80	Únicas, terminales	Múltiples y en racimos
Biggy (Nickersson)	Colonias color café	Colonias color café

Sin embargo, a pesar de esta relación tan cercana, estos organismos exhiben algunas diferencias fenotípicas, que si bien son pequeñas y sutiles, nos sirven para intentar su identificación en los diversos especímenes biológicos que se trabajan de manera rutinaria en los laboratorios de microbiología.

2. JUSTIFICACIÓN

En México los estudios microbiológicos en levaduras, agentes de infección mucocutánea, cutánea, invasora y/o sistémica son limitados y la frecuencia reportada es inferior a los datos internacionales. La aplicación de algunos centros de métodos de mayor sensibilidad en el aislamiento y reconocimiento del agente a partir de material clínico, han contribuido al diagnóstico precoz de estas micosis. En estudios extranjeros, realizados principalmente en países desarrollados, se relata un aumento de aislamientos de levaduras resistentes o que presentan elevada CMI frente a los distintos antimicóticos. (En base a lo ya mencionado, pretendemos demostrar que *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentan variados perfiles de sensibilidad antifúngica, en muestras clínicas del Hospital General de México, predominando las cepas con rangos considerados sensibles.)

Sin embargo, esperamos determinar cepas que presenten CMI elevadas, frente a los azoles de uso frecuente, identificando levaduras resistentes.

3. OBJETIVOS.

Objetivo general:

- Determinar el perfil de sensibilidad “in vitro” frente a diversos antifúngicos como son Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Anfotericina B y Caspofungina en cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* de aislados clínicos provenientes del Hospital General de México.

Objetivos específicos:

- ✓ Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI), de Fluconazol, Ketoconazol, Itraconazol, Anfotericina B y Caspofungina para las dos cepas de levaduras por el método estandarizado del documento M 27- A2 del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
- ✓ Correlacionar los resultados de susceptibilidad “in vitro” para ambas especies de *Candida*, con el origen clínico de las cepas estudiadas.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4. 1 Materiales

a) Materiales biológicos

- *Candida krusei* ATCC 6258
- *Candida parapsilosis* ATCC 22019
- *Candida albicans* ATCC 90028
- *Candida dubliniensis*, donada por la Facultad de la UNAM.
- 12 aislados de *Candida albicans*
- 12 aislados de *Candida dubliniensis*

b) Antifúngicos

- Ketoconazol Sigma No. de catalogo K 1003
- Fluconazol Chemo Ibérica FL09006
- Itraconazol CRS/SCR Council of Europe, EUROPEAN PHARMACOPOEIA, BPX907-F67029 STRASBOURG CEDEX1; Batch/lot. 19 Ca. 200mg.
- Caspofungina 70 mg, sol. Inyectable caja con una ampula con polvo H3822 (MX), No. Reg. 555M2000SSAI, Lote:HV43280;Merck Sharp & Dohme 564990/131200X
- Anfotericina 50 mg, Lote 0015007, Farmacia GI.

c) Medio de cultivo y reactivos.

- Sabouraud Dextrosa (SDA) Agar Merk No. de cat. 1.05438
- RPMI 1640 0.2 % glucosa GIBCO BRL No. de cat. 31800-022
- Acido morfolino propanosulfónico (MOPS) Sigma No. de cat. M6270
- Dimetilsulfoxido (DMSO) Sigma No. de cat. D 5879
- Agua destilada
- Éter etílico (J. T. Baker)

d) Materiales.

- Placas NUNC de 96 pozos, fondo plano estériles. NUNC No. de cat. 167008.
- Balanza analítica digital peso máx.: 210 g d= 0.0001g (Scientech)
- Balanza de 2 platillos, capacidad 2 KG (Ohaus)
- Espátula de acero inoxidable (Fischer Stainless)
- Frascos de vidrio graduados de 100, 250, 500 y 1000 mL (Schott)
- Matraz Erlenmeyer de vidrio para 400 mL (Pyrex)
- Micropipetas de 20 – 200 µL. (Gilson)

-
- Micropipetas de 100 – 1000 μ L. (Gilson)
 - Pipetas multicanal de 8 canales de 2 – 200 μ L. (Gilson)
 - Pipetas multicanal de 12 canales de 2 – 200 μ L. (Gilson)
 - Pipetas graduadas de vidrio de 5 y 10 mL. (Pyrex)
 - Probeta graduada de vidrio de 100, 500 y 1000 mL. (Pyrex)
 - Puntillas de plástico de 100 μ L (Biological)
 - Puntillas de plástico de 200 μ L (Biological)
 - Puntillas de plástico de 1000 μ L (Biological)
 - Tubos eppendorf estériles de 1mL
 - Tubos de plástico estériles de 10 mL
 - Jeringa de 10 mL
 - Gradilla
 - Vortex -2 Modelo G-560 (Genie)
 - Asa micológica
 - Vaso de precipitado de 10 mL (Pyrex)
 - Membrana de filtración
 - Cinta

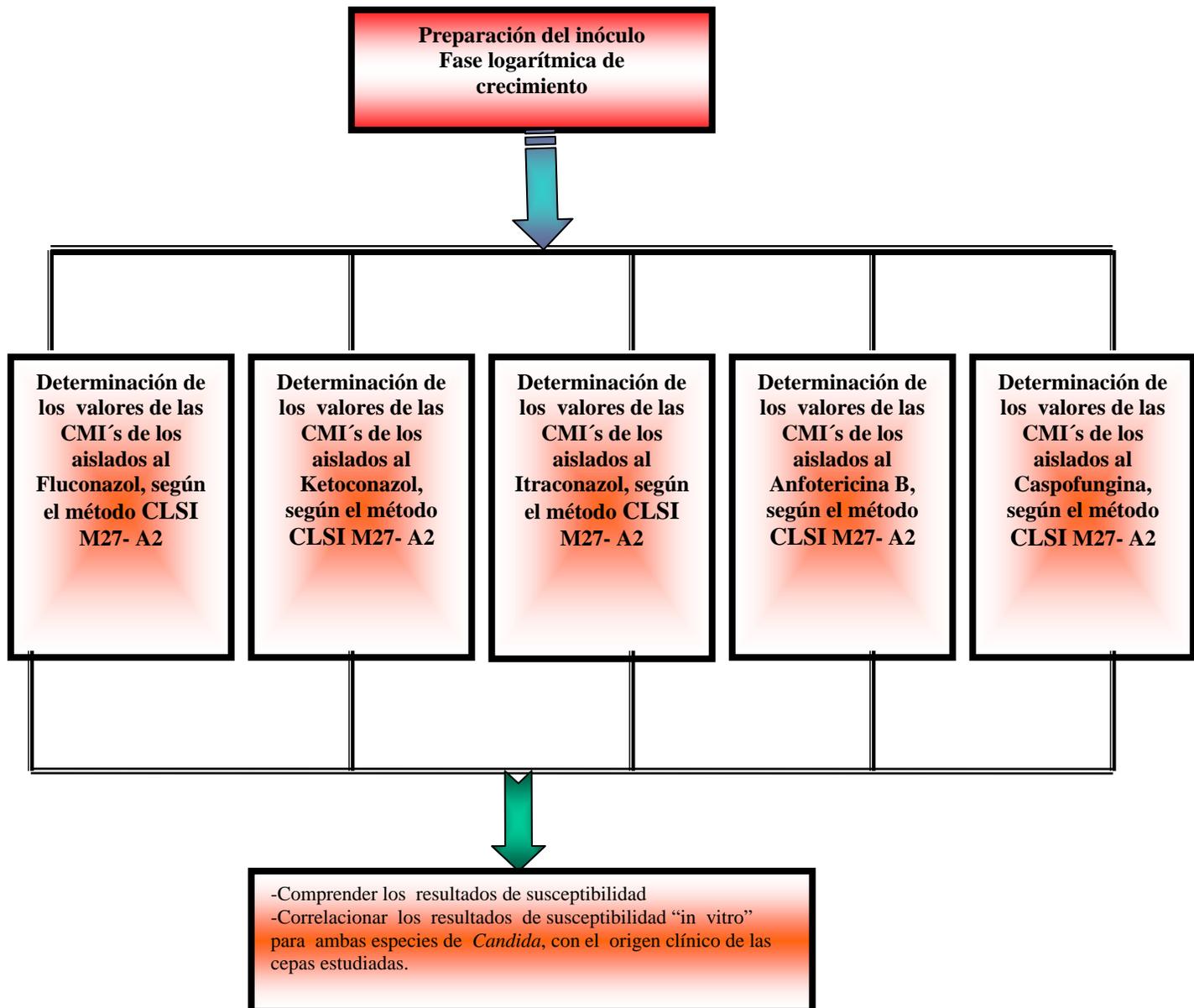
e) Material específico.

- Lector de microplacas de ELISA Labsystems. Multi Ska Ms.
- Incubador Shaker modelo G25. N. J., USA.
- Refrigerador a temperatura 4 - 8 °C

4. 2 Método.

Los 24 aislados clínicos de *Candida* (12 aislados de *Candida albicans* y 12 de *Candida dubliniensis*); fueron previamente identificados a nivel de género y especie en el Laboratorio de Micología del Hospital General de México y ratificados en el Laboratorio de Micología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

El diagrama general de trabajo para la determinación de los perfiles de susceptibilidad de los aislados a los azoles, un macrólido poliénico (Anfotericina B), y una equinocandina (Caspofungina) se muestran en el siguiente diagrama.



4. 2. 1 Determinación de los valores de las CMI's al Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Anfotericina B y Caspofungina, de los aislados de *Candida*. Método de referencia para determinar la susceptibilidad de las levaduras a los antifúngicos CLSI M27-A2 (Figura 13).

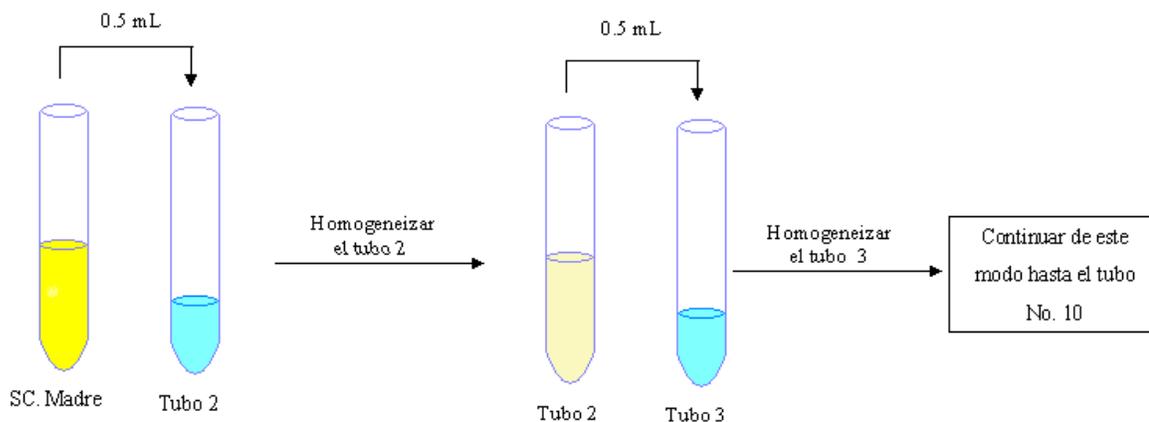
4. 2. 1. 1 Dilución del antifúngico

- I. La solución madre de antifúngico se preparó con el siguiente procedimiento: pesar los antifúngicos en tubos eppendorf 16 mg para Ketoconazol (KZ), Anfotericina B (AB), Caspofungina e Itraconazol (IZ) y 64 mg de Fluconazol (FZ)
- II. Diluir cada antifúngico en 1 mL de los solventes que les corresponde, en el caso de FZ y Caspofungina es agua destilada estéril y para KZ, AB e IZ en Dimetil Sulfoxido (DMSO).
- III. Se realizó una dilución 1:10 de cada antifúngico: en tubos estériles, para esto se colocó 9 mL de los solventes para cada antifúngico, adicionando el mL de los antifúngicos contenidos en cada uno de los tubos eppendorf (concentración final para el KZ, AB, Caspofungina e IZ 1,600 µg/mL y para el FZ de 6,400 µg/mL).

Solución madre de cada antifúngico

A partir de la solución madre (Se rotulo como tubo No.1) se realizaron 9 diluciones consecutivas 1:2. Para ello se procedió de la siguiente forma:

- 1.- Se numeraron 9 tubos de plástico para diluciones del 2 al 10.
- 2.- Se cargaron los tubos con 0.5 mL de DMSO (Para KZ, AB e IZ) y agua destilada estéril (Para FZ y Caspofungina).
- 3.- Se tomaron 0.5 mL de la solución madre (Tubo No.1) y traspaso al tubo No. 2, (se homogeneizo). Ahora se tomaron 0.5 mL de este (Tubo No.2) y se agregó al tubo No. 3, (se homogeneizo). Nuevamente se tomaron 0.5 mL del tubo No.3 y agregó al tubo No. 4, se homogeneizo, y así se continuo sucesivamente hasta el tubo No. 10.



4.- Al terminar el paso 3 se tuvieron 10 tubos de cada antifúngico con los siguientes intervalos de concentración.

Antifúngico	Intervalo de concentración µg/ mL	
	Mayor	Menor
Caspofungina	1,600	3
AB	1,600	3
IZ	1,600	3
KZ	1,600	3
FZ	12,800	25

5.- Diez tubos de plástico se tomaron para diluciones y se rotularon del 1 al 10.

6.- Estos tubos se llenaron con 6,860 µL de RPMI 1640 (al 0.2 % de glutamina)

7.- Posteriormente se realizó una dilución 1/50 en RPMI 1640 (al 0.2 % de glutamina) de la serie de antifúngico disueltos en DMSO (o agua destilada estéril). Para esto, se pasaron 140 µL del tubo No. 10 con antifúngico al tubo No. 10 con RPMI, luego 140 µL del tubo No.9 con antifúngico al tubo No. 9 con RPMI, y se continuó de este modo hasta el tubo No. 1.

Al finalizar este paso tenemos las soluciones de antifúngico lista para cargar las microplacas.

Antifúngico	Intervalo de concentración µg/ mL	
	Mayor	Menor
Caspofungina	16	0.03
AB	16	0.03
IZ	16	0.03
KZ	16	0.03
FZ	128	0.25

4. 2. 1. 2 Preparación del inóculo

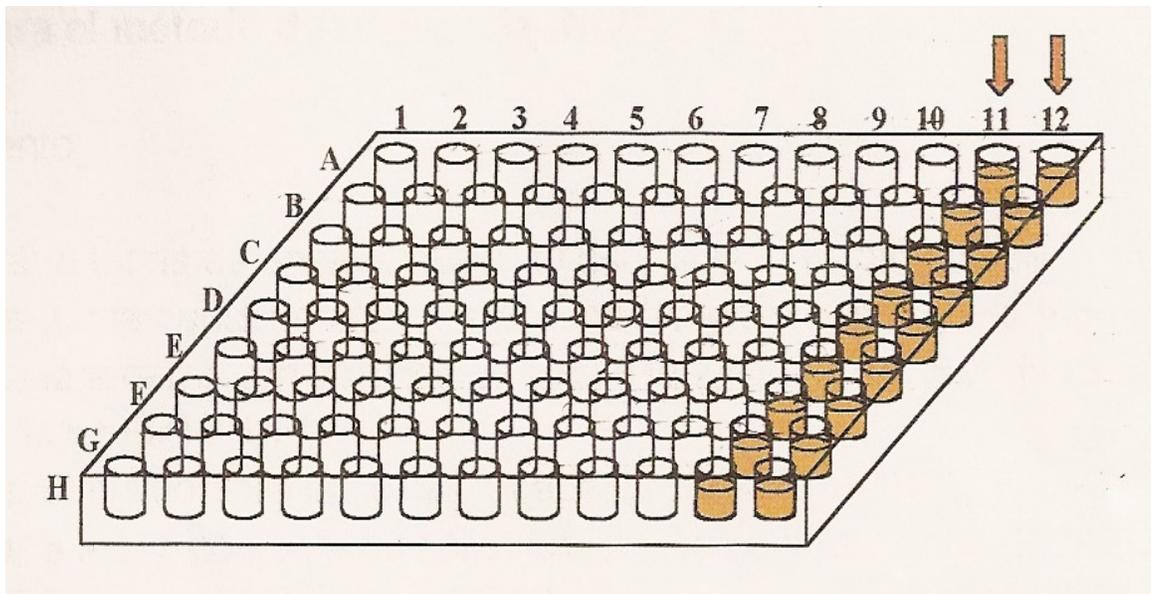
- 1.- Obtención del inóculo en fase logarítmica de crecimiento. Sembrar en Agar Dextrosa Papa (PDA) los aislados y cepas a probar a 37 ° C por 24 horas. Hay que asegurarse de que los aislados y las cepas no se encuentren contaminados.
- 2.- Para preparar el inóculo se tomó una asada del cultivo y se depositó en un tubo de vidrio con 7 mL de medio de cultivo (RPMI), la suspensión se agitó en vortex por 15 segundos.
- 3.- La densidad de la suspensión celular se ajustó a una turbidez de 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, dando como resultado una suspensión que contiene entre $1- 5 \times 10^6$ UFC/mL.
Este procedimiento se realizó con cada aislado y cepa a utilizar.
- 4.- El inóculo se conservó como máximo 15 minutos a temperatura ambiente y 2 horas a 4 ° C.

4. 2. 1. 3 Llenado de microplacas

Para el llenado se utilizaron microplacas NUNC de 96 pozos, fondo plano, con su tapa y estériles (la microplaca tiene 12 columnas y 8 filas). Las microplacas se llenaron por columna, utilizando pipetas multicanal, de manera que se llenaran las 8 filas de cada columna simultáneamente.

Se utilizaron cubas de plástico, de manera que las puntas de las pipetas multicanal se cargaran del antifúngico, así mismo se trabajó con la suspensión de levaduras.

1. Empezar a llenar la columna **12** que corresponde al control de crecimiento del microorganismos, colocar **100 μ L** de RPMI 1640 al 0.2 % de glutamina.
2. Llenar la columna **11** que corresponde al blanco de reactivos y control de esterilidad. Se llena con **200 μ L de RPMI 1640** al 0.2 % de glutamina, **sin antifúngico y sin levadura.**



4. 2. 1. 4 Inoculación de placas

Una vez llenada la microplaca con las diluciones de los antifúngicos a utilizar, se procedió a inocular cada cepa por duplicado, por ello se procedió de la siguiente forma:

- 1.-Tomar el tubo “A” (suspensión de levaduras preparada anteriormente), agitar en vórtex para homogeneizar y se vierte en una cubeta estéril.
- 2.-Tomar la pipeta multicanal (de 12 canales), y ajustar a 100 μ L, después ajustar los tips estériles en los 10 canales dejando el canal 11 y 12 (ya que la columna 11 de las placas está destinada a blanco de reactivos para la lectura espectofotométrica y control de esterilidad, por lo que no debe tener inóculo y la columna 12 esta destinada para la cepa de referencia ATCC)
- 3.-Posteriormente con la pipeta multicanal cargar 100 μ L del inóculo en los 10 pocillos de cada una de las filas (Fila “A” y “B”).
- 4.-Cargar del mismo modo los 11 inóculos restantes por duplicado.
- 5.-Finalmente, cargar los ocho pocillos de la columna 12 con 100 μ L del inóculo de la cepa de referencia. En cada microplaca pueden probarse 4 cepas; así mismo, cada pozo debe contener un volumen final de 200 μ L.

4. 2. 1. 5 Lectura de resultados

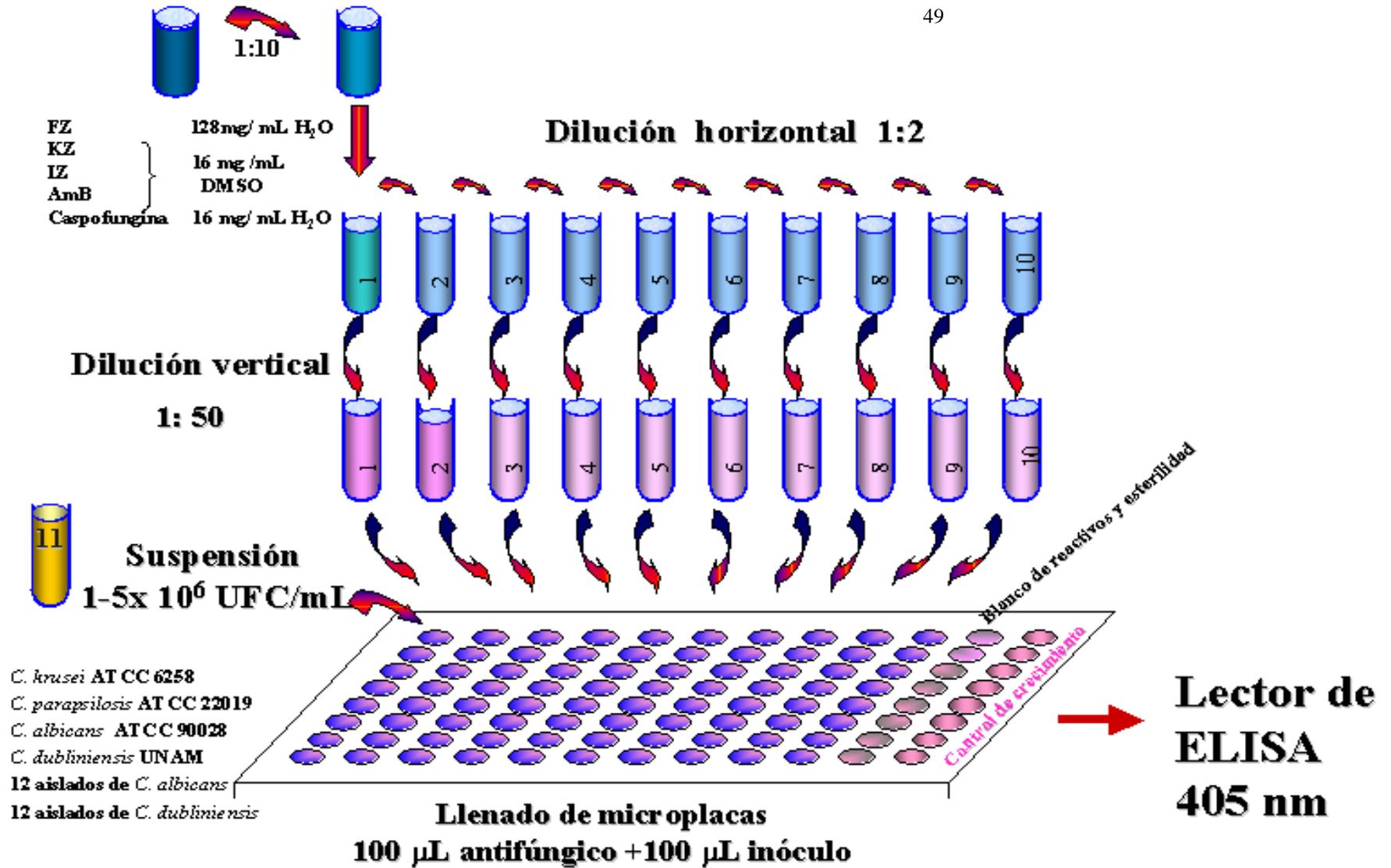
1.-Cada microplaca se leyó en un lector de placas ELISA, agitándose durante 30 segundos previamente a una longitud de onda de 405 nm.

2.-Para los azoles como el FZ, IZ y KZ, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, la CMI, es la concentración más baja del antifúngico que inhibe el 50 % de crecimiento levaduriforme. Comparando el crecimiento de cada concentración de antifúngico con el crecimiento de la columna 12, control de crecimiento levaduriforme.

3.-Para el caso de AB y Caspofungina se sigue la misma regla es decir; de acuerdo a las recomendaciones del CLSI, la CMI, es la concentración más baja del antifúngico, para el caso de estos antifúngicos debe ser del 90 % de inhibición con respecto al control positivo.

Método NCCLS-M27-A2

49



5 RESULTADOS

Las muestras de procedencia fueron recolectadas de los pacientes que se encuentran en los diversos pabellones del Hospital General de México; así mismo, de los pacientes que acudieron al Laboratorio de Micología Médica del mismo. En la siguiente tabla se exhiben los datos de cada aislado de *Candida albicans*.

Tabla 1. Muestras de procedencia de *Candida albicans*.

<i>Candida albicans</i>						
	Sexo	Edad	Origen o Muestra	Examen directo	Cultivo Sabouraud	Pruebas fenotípicas
1	M	64 a	Espectoración	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
2	M	80 a	Orina	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
3	F	60 a	Vulva	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
4	M	1 mes	Orina	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
5	F	82 a	Vulva	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
6	F	25 a	Expectoración	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
7	M	34 a	Orina	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
8	M	31 a	Orina	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
9	M	41 a	Oral	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
10	F	57 a	Oral	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
11	F	49 a	Oral	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>
12	F	50 a	Oral	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C. albicans</i>

Las muestras de procedencia fueron recolectadas de los pacientes que se encuentran en los diversos pabellones del Hospital General de México; así mismo, de los pacientes que acudieron al Laboratorio de Micología Médica del mismo. En la siguiente tabla se exhiben los datos de cada aislado de *Candida dubliniensis*.

Tabla 2. Muestras de procedencia de *Candida dubliniensis*.

<i>Candida dubliniensis</i>						
	Sexo	Edad	Origen o Muestra	Examen directo	Cultivo Sabouraud	Pruebas fenotípicas
1	M	RN	Orina	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
2	M	75 a	Oral	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
3	M	1 a	Orina	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
4	M	30 a	Expectoración	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
5	F	40 a	Oral	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
6	F	17 a	Vulva	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
7	M	69 a	Oral	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
8	F	50 a	Onicomycosis	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
9	F	32 a	Oral	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
10	F	22 a	Oral	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
11	M	34 a	Oral	Pseudohifas	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>
12	F	47 a	Vulva	Pseudohifas con blastoconidias	<i>Candida sp.</i>	<i>C.dubliniensis</i>

La identificación de los valores de las CMI's de los 24 aislados de *Candida* (12 aislados de *Candida albicans* y 12 aislados de *Candida dubliniensis*), cada uno de los cinco antifúngicos utilizados, se muestra en los gráficos 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19 y 20. La evaluación de la sensibilidad o resistencia de los aislados frente a azoles y de Anfotericina B se determinó en base al documento del CLSI M27-A2, el cual establece los intervalos de susceptibilidad de las cepas de control y del género *Candida*, aceptados internacionalmente, con los cuales se trabajaron. Para la equinocandina se tomaron los puntos de corte con respecto a Anfotericina B debido a que no está estandarizado actualmente. (Tabla 3). El porcentaje de la respuesta de susceptibilidad de los aislados a cada uno de los cinco antifúngicos se muestra en los gráficos 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17 y 18.

Tabla 3. Puntos de corte para el género *Candida spp.*

Criterio	Ketoconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Itraconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Fluconazol ($\mu\text{g/mL}$)	Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$)	Caspofungina ($\mu\text{g/mL}$)
Susceptible	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 8	≤ 2	≤ 2
SDD*	0.25 - 0.5	0.25 - 0.5	16 - 32	—	—
Resistente	≥ 1	≥ 1	≥ 64	≥ 4	≥ 4

*SDD Susceptible dependiente de la dosis

Tabla 4. Resultados de las CMI's de los antifúngicos frente a las dos especies de *Candida*.

ESPECIE	CARACTERISTICAS	CMI µg/mL				
		FLUCONAZOL	ITRACONAZOL	KETOCONAZOL	ANOTERICINA B	CASPOFUNGINA
<i>C. albicans</i> 1	Espectoración	64	0.03	8	0.5	0.25
<i>C. albicans</i> 2	Orina	16	0.03	0.03	1	0.25
<i>C. albicans</i> 3	Vulva	1	0.5	16	1	0.25
<i>C. albicans</i> 4	Orina	16	16	0.25	1	0.12
<i>C. albicans</i> 5	Vulva	128	4	2	0.5	0.06
<i>C. albicans</i> 6	Expectoración	4	16	0.25	0.5	0.12
<i>C. albicans</i> 7	Orina	16	16	0.25	1	0.12
<i>C. albicans</i> 8	Orina	128	0.25	4	1	2
<i>C. albicans</i> 9	Oral	1	0.03	0.25	1	0.25
<i>C. albicans</i> 10	Oral	2	0.06	0.25	1	0.25
<i>C. albicans</i> 11	Oral	16	0.03	0.5	1	0.25
<i>C. albicans</i> 12	Oral	16	16	0.25	2	0.12
<i>C. dubliniensis</i> 1	Orina	16	16	16	1	0.5
<i>C. dubliniensis</i> 2	Oral	16	1	2	1	0.5
<i>C. dubliniensis</i> 3	Orina	16	16	16	1	0.06
<i>C. dubliniensis</i> 4	Expectoración	128	2	0.5	2	0.25
<i>C. dubliniensis</i> 5	Oral	128	4	0.03	2	0.5
<i>C. dubliniensis</i> 6	Vulva	16	2	0.5	1	0.12
<i>C. dubliniensis</i> 7	Oral	16	2	0.03	0.5	0.12
<i>C. dubliniensis</i> 8	Onicomycosis	128	2	1	2	0.12
<i>C. dubliniensis</i> 9	Oral	8	0.5	0.12	0.5	0.25
<i>C. dubliniensis</i> 10	Oral	16	2	2	0.5	0.06
<i>C. dubliniensis</i> 11	Oral	16	2	1	0.5	0.06
<i>C. dubliniensis</i> 12	Vulva	32	0.5	16	0.5	0.5

Susceptible
 SDD
 Resistente

Tabla 5. Resultados de las CMI de las cepas de control frente a los cinco antifúngicos.

ESPECIE	CARACTERÍSTICAS	CMI µg/mL				
		FLUCONAZOL	ITRACONAZOL	KETOCONAZOL	AmB	CASPOFUNGINA
<i>Candida krusei</i>	ATCC	64	16	0.25	2	2
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC	2	0.125	0.06	0.25	0.12
<i>Candida albicans</i>	ATCC	0.25	0.125	0.06	0.25	0.12
<i>Candida dubliniensis</i>	UNAM	4	0.5	0.5	0.5	0.25

Tabla 6. Valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* al Fluconazol

Flucomazol (µg/mL)	<i>Candida albicans</i> (n =12)	<i>Candida dubliniensis</i> (n =12)
0.25µg/mL	0*	0*
0.5µg/mL	0*	0*
1µg/mL	2	0*
2µg/mL	1	0*
4µg/mL	1	0*
8µg/mL	0*	1
16µg/mL	5	7
32µg/mL	0*	1
64µg/mL	1	0*
128µg/mL	2	3

*No se registró al menos el 50 % de inhibición de crecimiento levaduriforme a las concentraciones del antifúngico indicado.

Tabla 7. Valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* al Itraconazol y Ketoconazol.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ITRACONAZOL		kETOCONAZOL	
	<i>C. albicans</i> (n=12)	<i>C. dubliniensis</i> (n=12)	<i>C. albicans</i> (n=12)	<i>C. dubliniensis</i> (n=12)
0.03 $\mu\text{g/mL}$	4	0*	1	2
0.06 $\mu\text{g/mL}$	1	0*	0*	0*
0.12 $\mu\text{g/mL}$	0*	0*	0*	1
0.25 $\mu\text{g/mL}$	1	0*	6	0*
0.5 $\mu\text{g/mL}$	1	2	1	2
1 $\mu\text{g/mL}$	0*	1	0*	2
2 $\mu\text{g/mL}$	0*	6	1	2
4 $\mu\text{g/mL}$	1	1	1	0*
8 $\mu\text{g/mL}$	0*	0*	1	0*
16 $\mu\text{g/mL}$	4	2	1	3

*No se registró al menos el 50 % de inhibición de crecimiento levaduriforme a las concentraciones del antifúngico indicado.

Tabla 8. Valores de las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* a Anfotericina B y Caspofungina.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	ANFOTERICINA B		CASPOFUNGINA	
	<i>C. albicans</i> (n =12)	<i>C. dubliniensis</i> (n =12)	<i>C. albicans</i> (n =12)	<i>C. dubliniensis</i> (n =12)
0.03 $\mu\text{g/mL}$	*	*	*	*
0.06 $\mu\text{g/mL}$	*	*	1	2
0.12 $\mu\text{g/mL}$	*	*	4	3
0.25 $\mu\text{g/mL}$	*	*	6	2
0.5 $\mu\text{g/mL}$	3	5	*	4
1 $\mu\text{g/mL}$	8	4	*	1
2 $\mu\text{g/mL}$	5	3	1	✚
4 $\mu\text{g/mL}$	✚	✚	✚	✚
8 $\mu\text{g/mL}$	✚	✚	✚	✚
16 $\mu\text{g/mL}$	✚	✚	✚	✚

* No se registró al menos el 70 % de inhibición de crecimiento levaduriforme a las concentraciones del antifúngico indicado.

✚ Total inhibición, en base al CLSI se debe tomar la lectura de la concentración mas baja, a la cual inhiba el 80 % de crecimiento levaduriforme.

Gráfico 1.

Susceptibilidad de *C. albicans* al Fluconazol

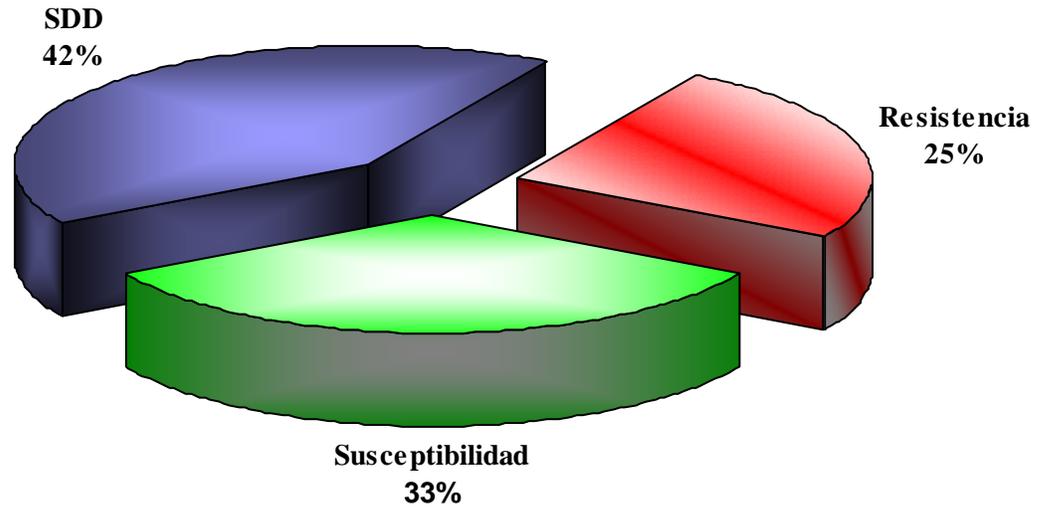
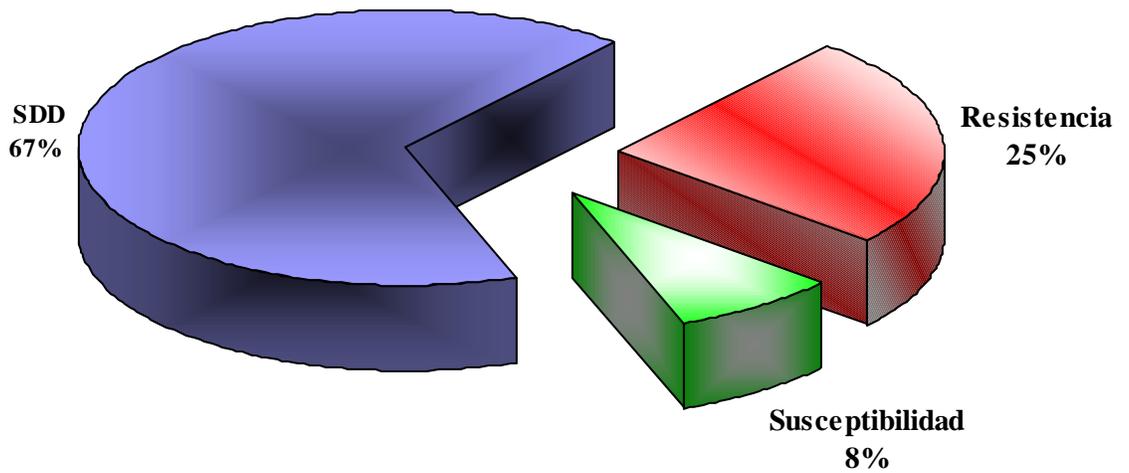


Gráfico 2.

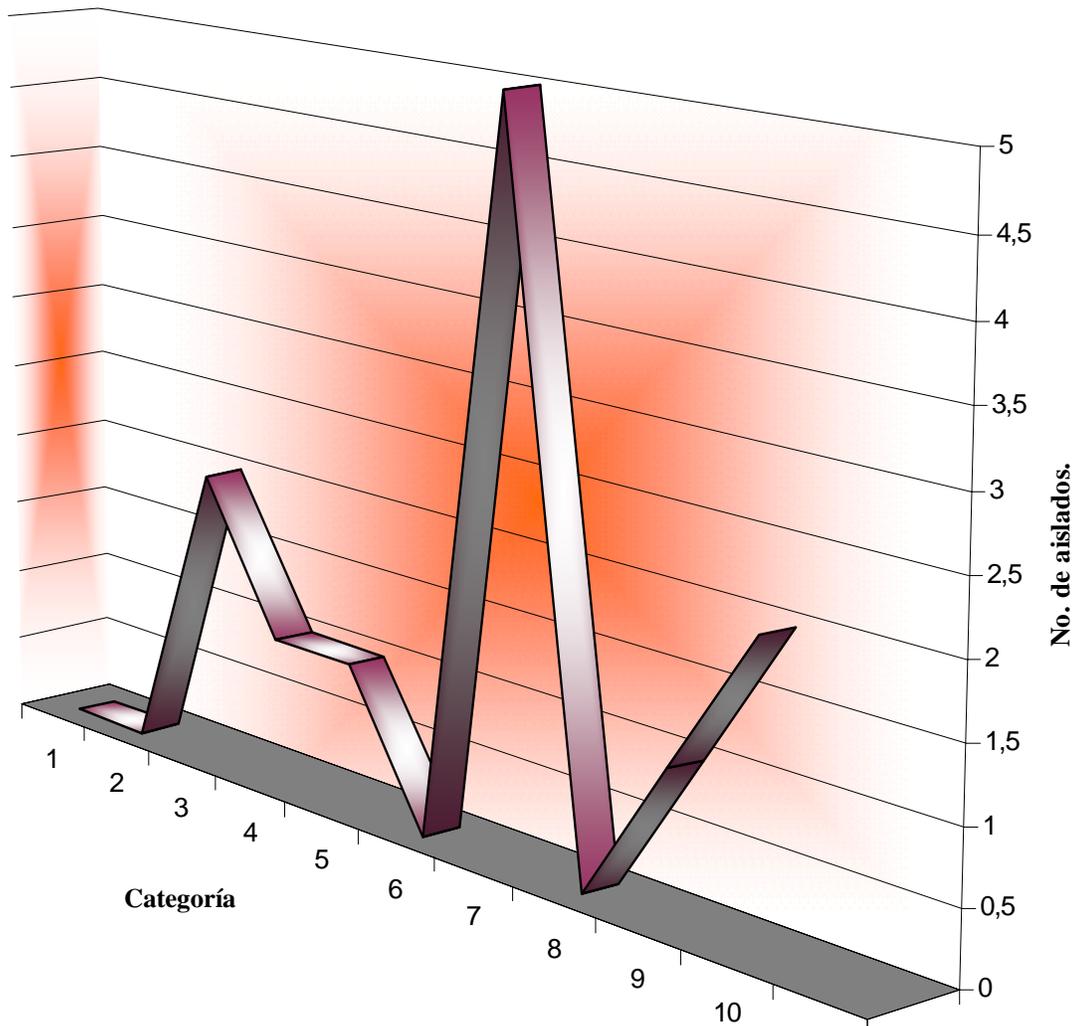
Susceptibilidad de *C. dubliniensis* al Fluconazol



Porcentaje de susceptibilidad de *C. albicans* y *C. dubliniensis* al Fluconazol.
*SDD sensible dependiente de la dosis.

Gráfico 3.

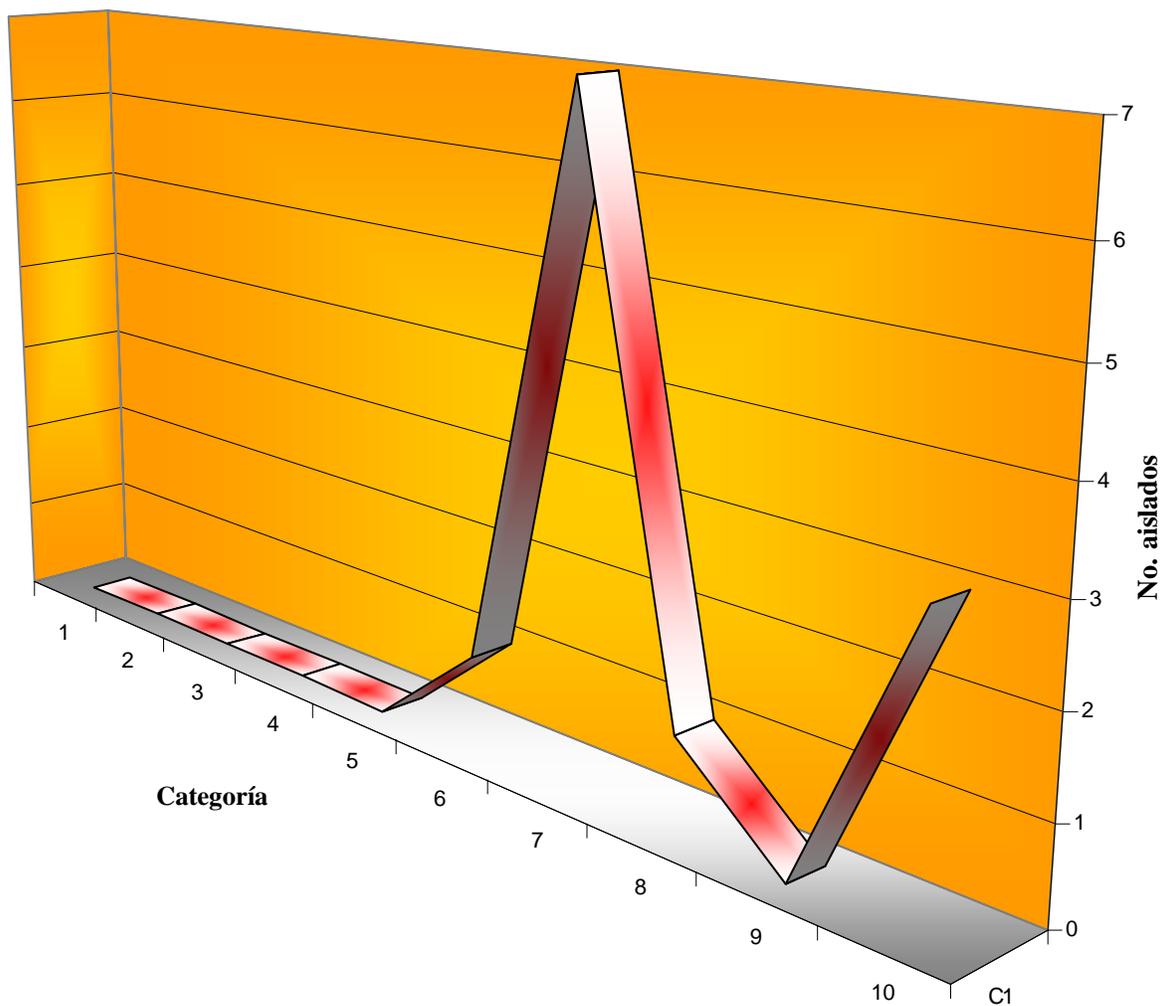
(No. de aislados) Concentraciones mínimas inhibitorias de *C. albicans* al Fluconazol



Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1 (0.25); 2 (0.5); 3 (1); 4 (2); 5 (4);
6 (8); 7 (16); 8 (32); 9 (64); 10 (128)

Distribución bimodal de la susceptibilidad de *C. albicans* (n = 12) al Fluconazol.

Gráfico 4. (No. de aislados) Concentraciones mínimas inhibitorias de *C. dubliniensis* al Fluconazol



**Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.25); 2(0.5); 3(1); 4 (2); 5(4);
6 (8); 7(16); 8(32); 9(64); 10(128)**

Distribución unimodal de la susceptibilidad de *C. dubliniensis* (n = 12) al Fluconazol.

Gráfico 5.

**Susceptibilidad de *C.albicans*
al Ketoconazol**

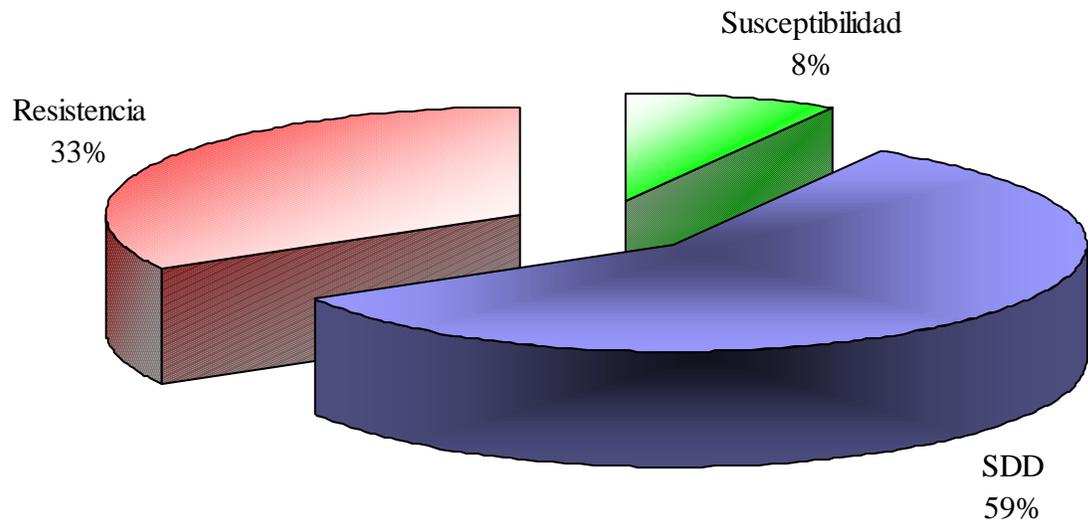
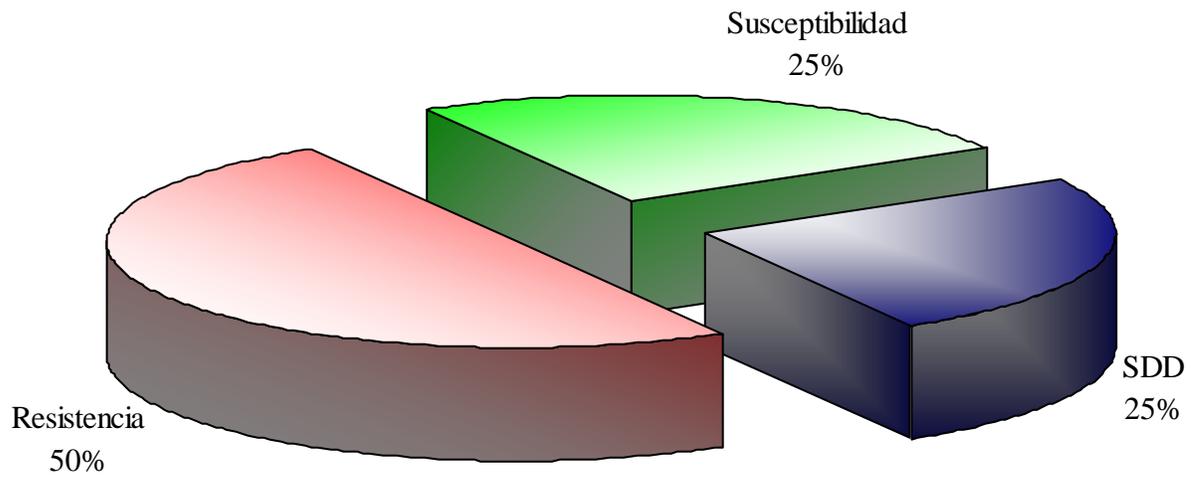


Gráfico 6.

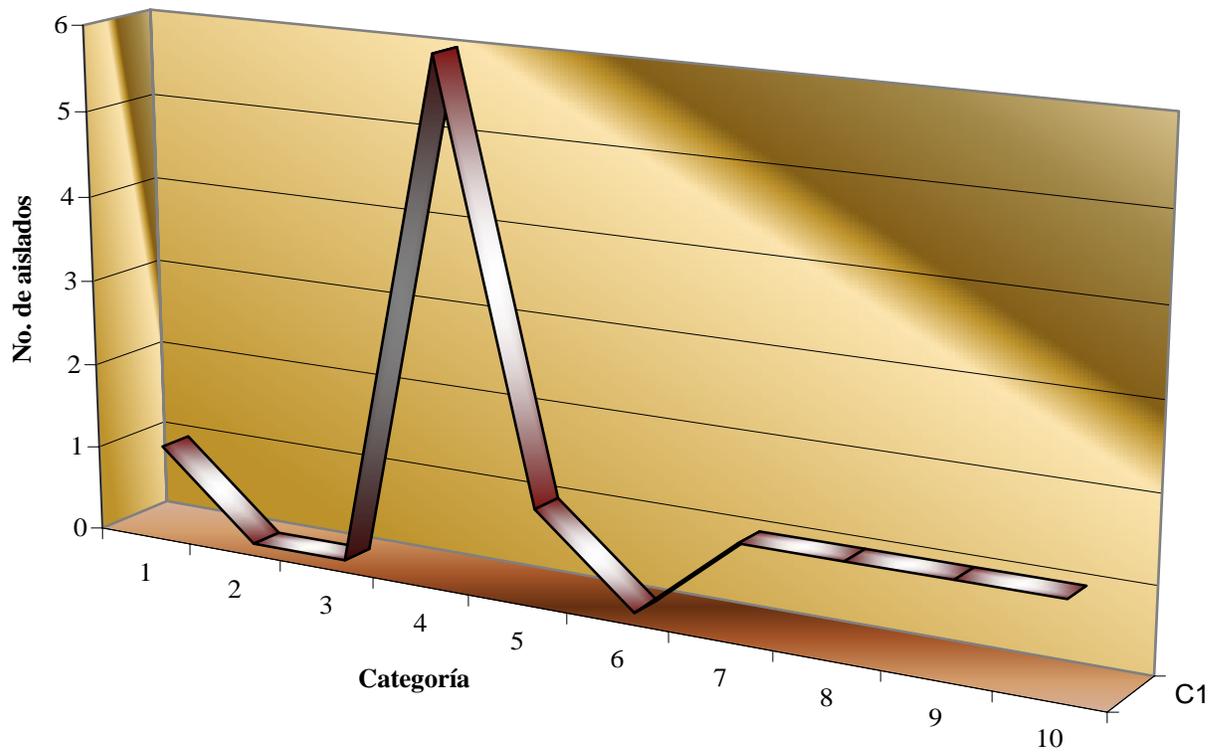
**Susceptibilidad de *C. dubliniensis*
al Ketoconazol**



**Porcentaje de susceptibilidad de *C. albicans* y *C. dubliniensis* al Ketoconazol.
*SDD sensible dependiente de la dosis.**

Gráfico 7.

(No. de aislados) Concentraciones mínimas
Inhibitorias de *C. albicans*
al Ketoconazol

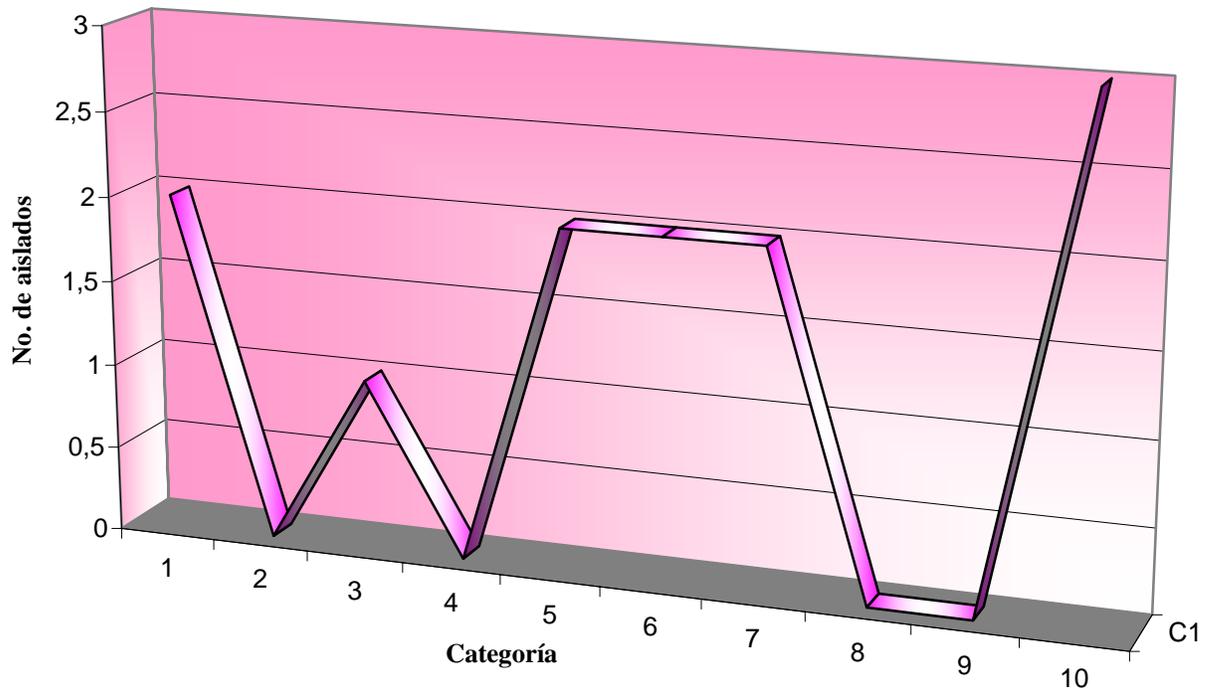


Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2(0.06); 3(0.12); 4(0.25); 5(0.5);
6 (1); 7(2); 8(4); 9(8); 10(16)

Distribución unimodal de la susceptibilidad de *C. albicans* (n= 12) al
Ketoconazol.

Gráfico 8.

**(No. de aislados) Concentraciones mínimas
inhibitorias de *C. dubliniensis*
al Ketoconazol**



**Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2(0.06); 3(0.12); 4(0.25); 5(0.5);
6(1); 7(2); 8(4); 9(8); 10(16)**

**Distribución multimodal de la susceptibilidad de *C. dubliniensis* (n= 12) al
Ketoconazol.**

Gráfico 9.

Susceptibilidad de *C. albicans* al Itraconazol

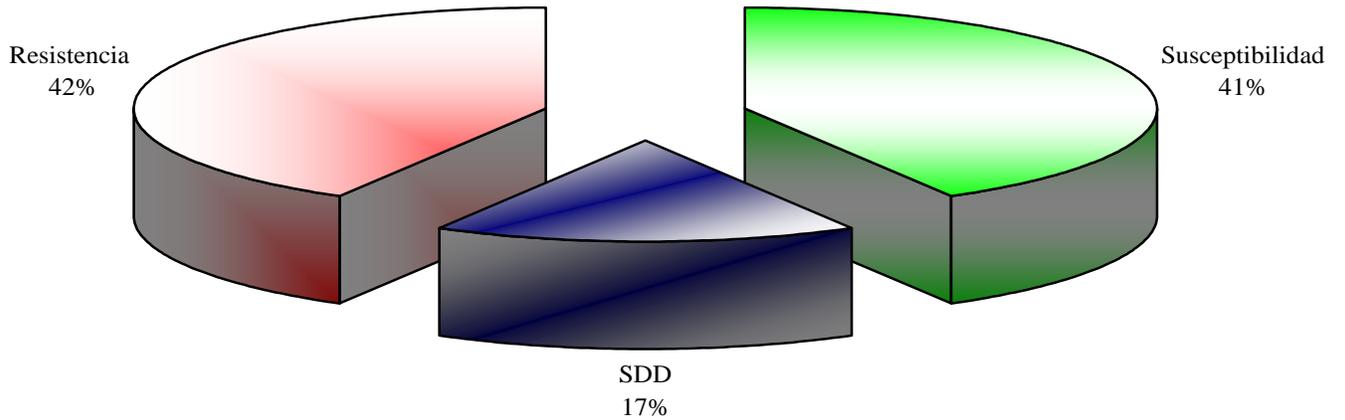
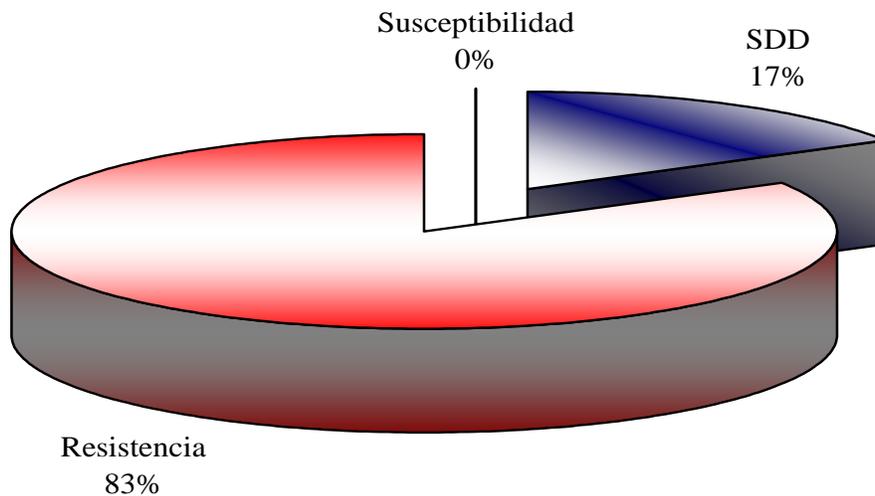


Gráfico 10.

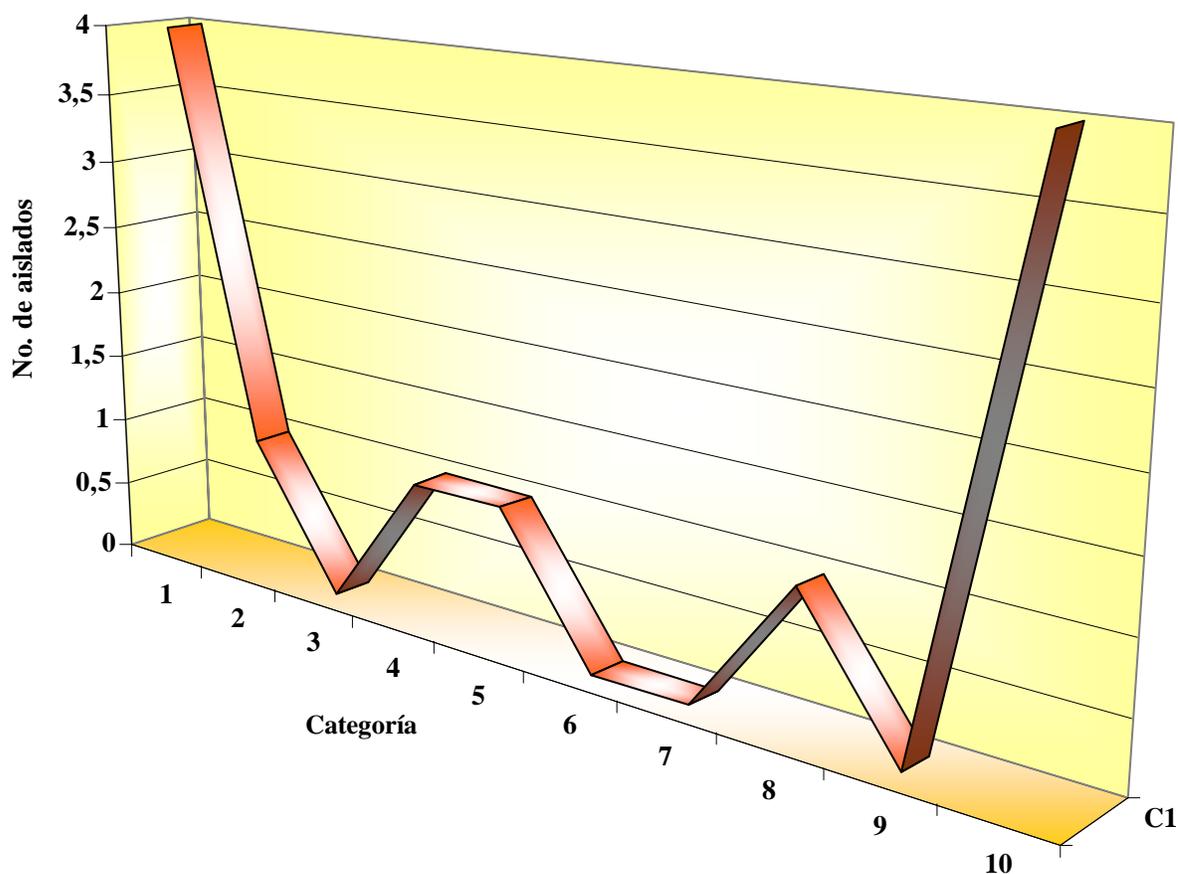
Susceptibilidad de *C. dubliniensis* al Itraconazol



Porcentaje de susceptibilidad de *C. albicans* y *C. dubliniensis* al Itraconazol.
*SDD sensible dependiente de la dosis.

Gráfico 11.

(No. de aislados) Concentraciones mínimas inhibitorias de *C. albicans* al Itraconazol

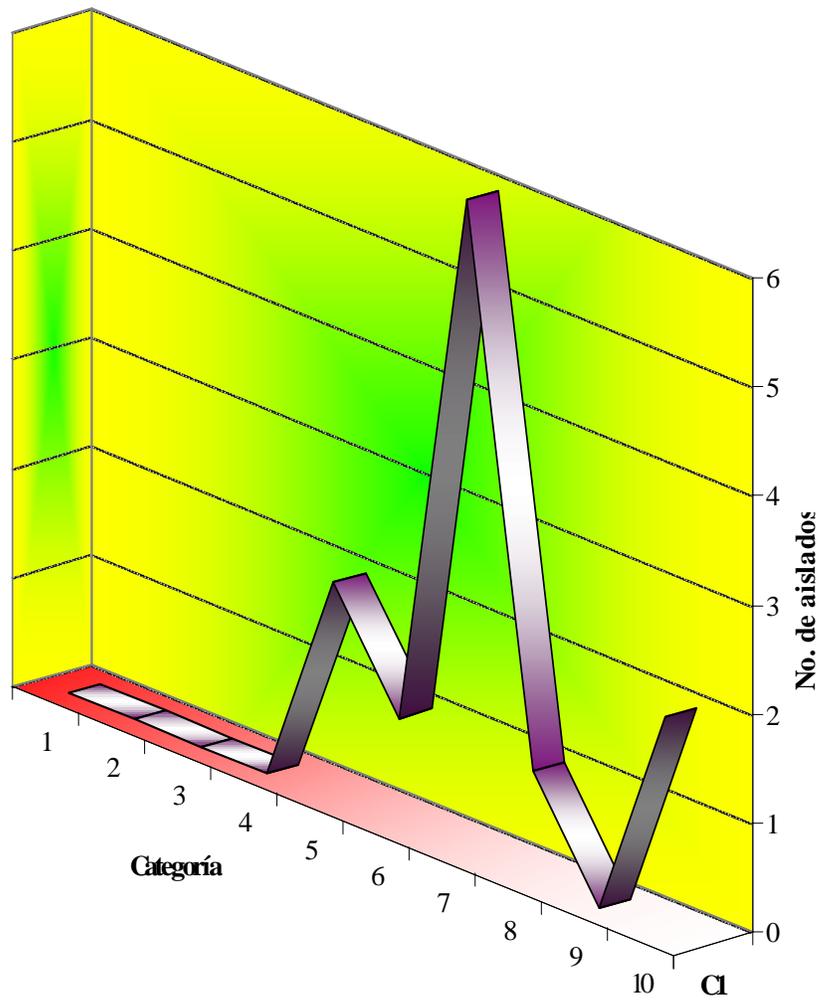


**Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2 (0.06); 3 (0.12); 4 (0.25); 5 (0.5);
6(1); 7(2); 8 (4); 9(8); 10(16)**

Distribución multimodal de la susceptibilidad de *C. albicans* (n= 12) al Itraconazol.

Gráfico 12.

(No. de aislados) Concentraciones mínimas inhibitorias de *C. dubliniensis* al Itraconazol



Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2 (0.06); 3 (0.12); 4 (0.25); 5 (0.5);
6(1); 7(2); 8 (4); 9(8); 10(16)

Distribución bimodal de la susceptibilidad de *C. dubliniensis* (n = 12) al Itraconazol.

Gráfico 13.

**Susceptibilidad de *C. albicans*
a la Anfotericina B**

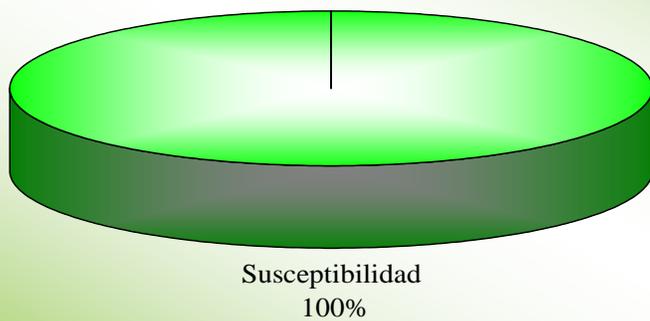


Gráfico 14.

**Susceptibilidad de *C. dubliniensis*
a la Anfotericina B**

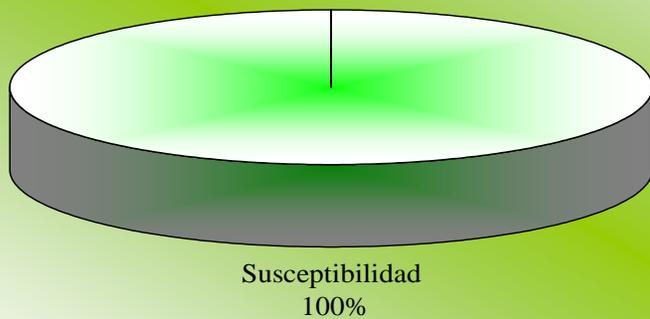
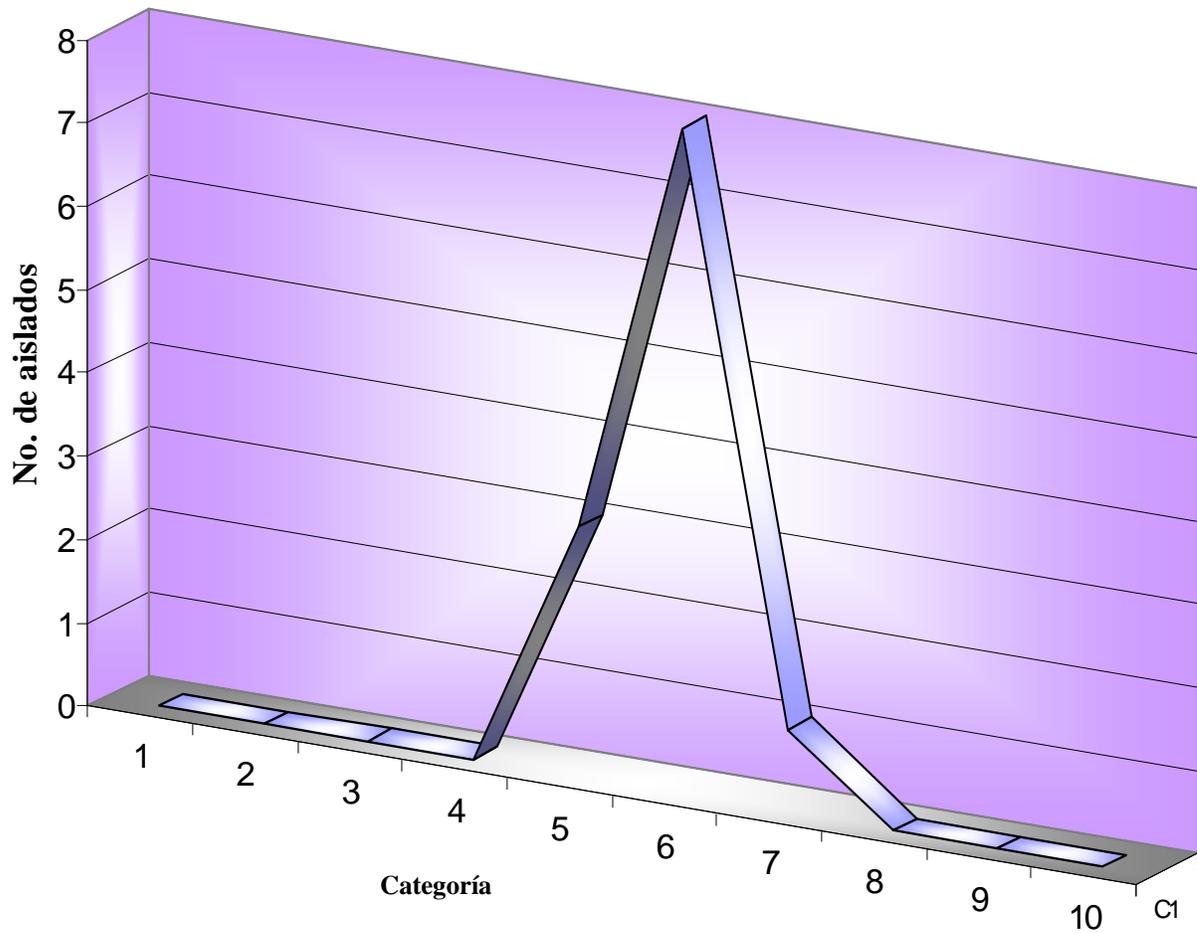


Gráfico 15.

(No. de aislados) Concentraciones mínimas
inhibitorias de *C. albicans*
a la Anfotericina B

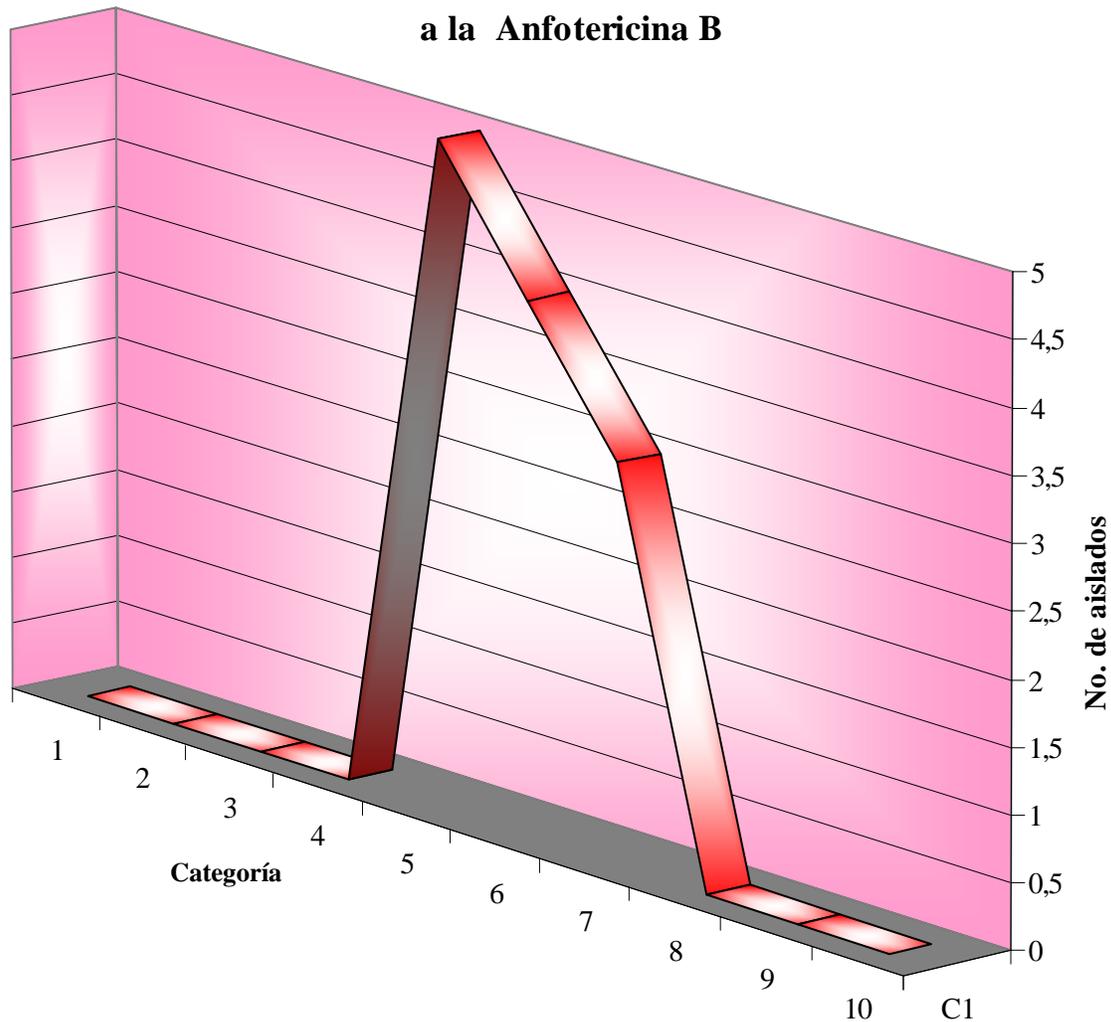


Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2 (0.06); 3 (0.12); 4 (0.25); 5 (0.5);
6(1); 7(2); 8 (4); 9(8); 10(16)

Distribución unimodal de la susceptibilidad de *C. albicans* (n = 12) a la
Anfotericina B

Gráfico 16.

(No. de aislados) Concentraciones mínimas
inhibitorias de *C. dubliniensis*
a la Anfotericina B



Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2 (0.06); 3 (0.12); 4 (0.25); 5 (0.5);
6(1); 7(2); 8 (4); 9(8); 10(16)

Distribución unimodal de la susceptibilidad de *C. dubliniensis* (n = 12) a la Anfotericina B

Gráfico 17.

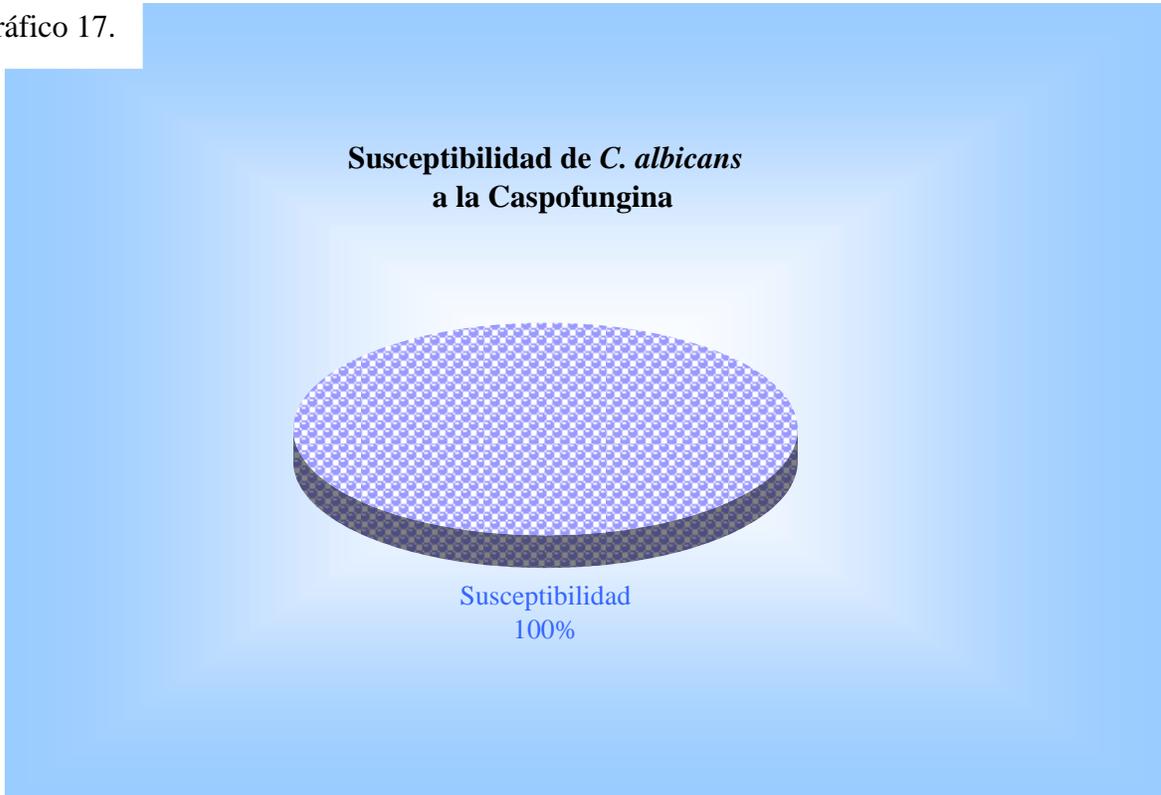


Gráfico 18.

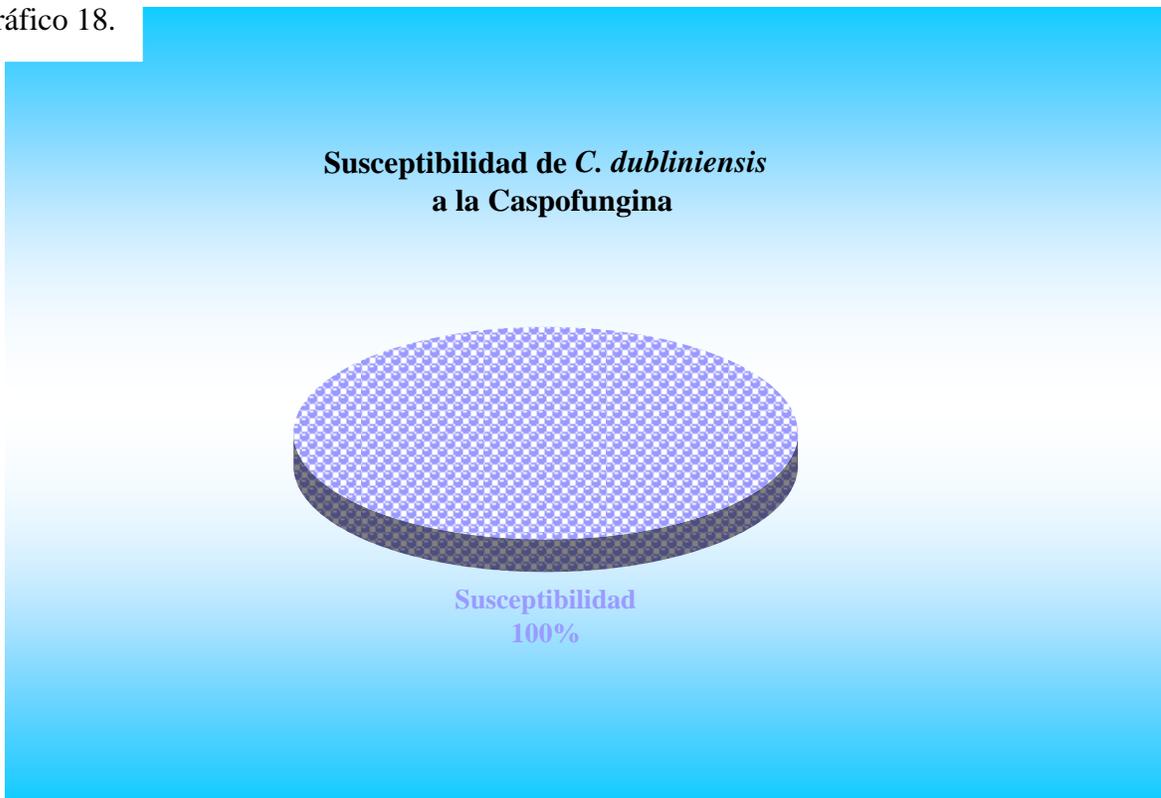
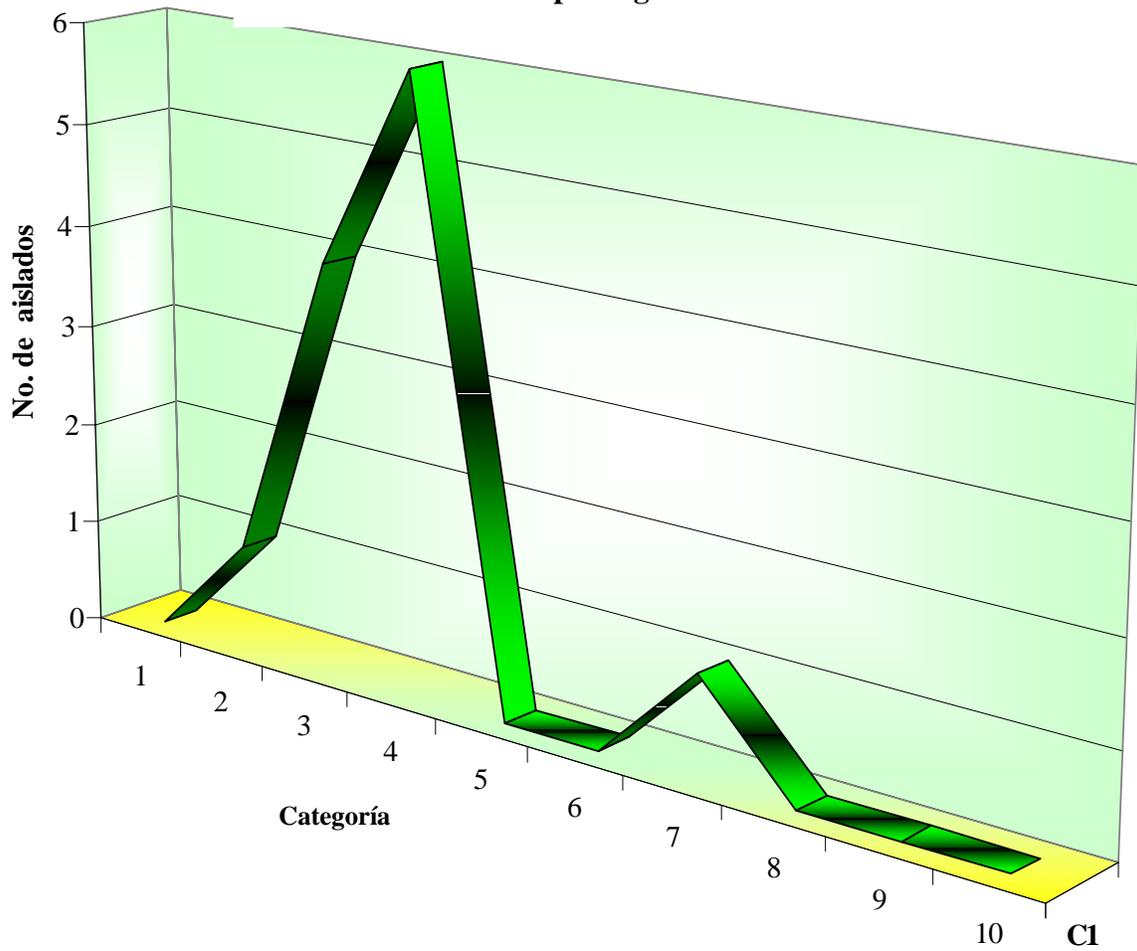


Gráfico 19

(No. de aislados) Concentraciones mínimas
inhibitorias de *C. albicans*
a la Caspofungina

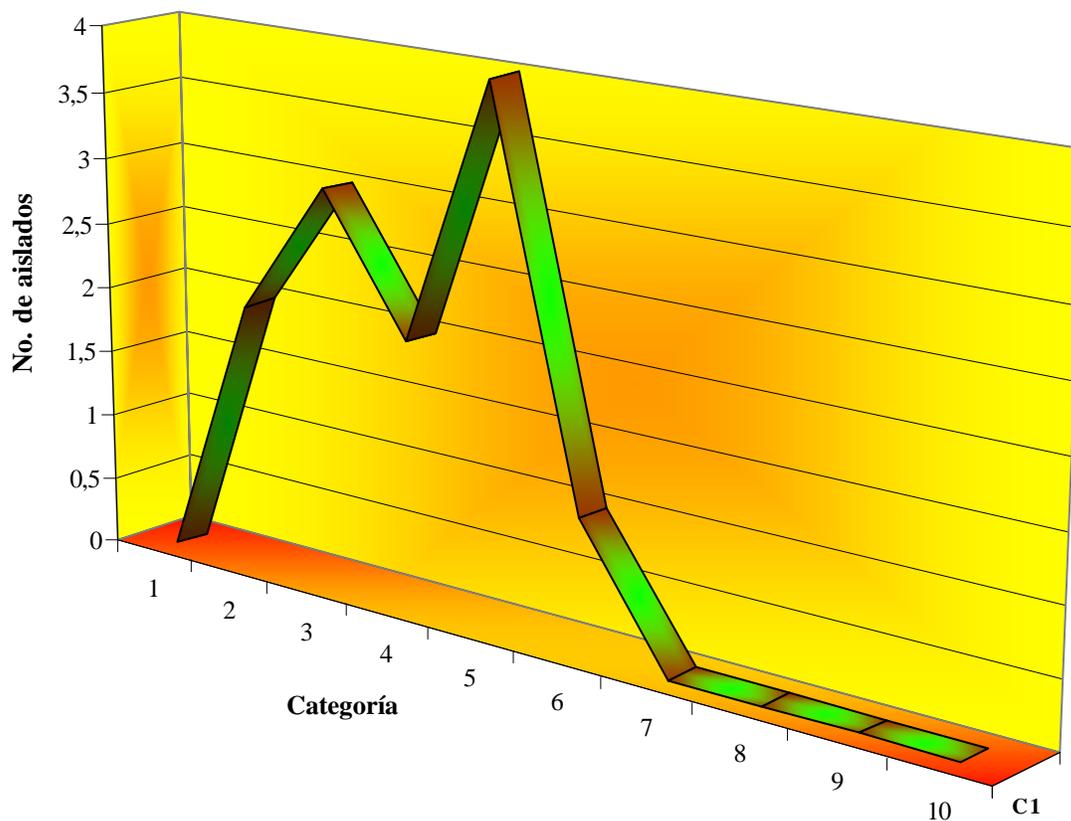


Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2 (0.06); 3 (0.12); 4 (0.25); 5 (0.5);
6(1); 7(2); 8 (4); 9(8); 10(16)

Distribución bimodal de la susceptibilidad de *C. albicans* (n = 12) a la Caspofungina

Gráfico 20.

(No. de aislados) Concentraciones mínimas inhibitorias de *C. dubliniensis* a la Caspofungina



Categorías ($\mu\text{g/mL}$): 1(0.03); 2 (0.06); 3 (0.12); 4 (0.25); 5 (0.5); 6(1); 7(2); 8 (4); 9(8); 10(16)

Distribución bimodal de la susceptibilidad de *C. dubliniensis* (n = 12) a la Caspofungina.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se determinaron los perfiles de susceptibilidad de aislados clínicos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* a cinco antifúngicos, tres de ellos son compuestos azólicos (Fluconazol, Ketoconazol e Itraconazol); un macrólido poliénico (Anfotericina B) y una equinocandina (Caspofungina). Los aislados clínicos provienen del Hospital General de México.

La respuesta observada (CMI) de los 12 aislados de *C. albicans* a los cinco antifúngicos utilizados se muestran en los gráficos 3, 7, 11, 15 y 19; Los intervalos de susceptibilidad fueron: para el Fluconazol de 1- 128 µg/mL: Itraconazol 0.03 – 16 µg/mL: Ketoconazol 0.03 – 16 µg/mL: Anfotericina B de 0.5 – 2 µg/mL y para Caspofungina de 0.06 – 2µg/mL. Estos resultados son similares a los presentados en trabajos previamente publicados [53, 54,55]. Con respecto a *C. dubliniensis*, la respuesta observada (CMI) de los 12 aislados a los cinco antifúngicos utilizados se muestra en los gráficos 4, 8, 12, 16 y 20. Los intervalos de susceptibilidad fueron: para Fluconazol de 8- 128 µg/mL: Itraconazol 0.5 – 16 µg/mL: Ketoconazol 0.03 – 16 µg/mL: Anfotericina B de 0.5 – 2 µg/mL y Caspofungina 0.06 – 1 µg/mL.

Al comparar la respuesta de *C. albicans* y *C. dubliniensis* con respecto a cada uno de los antifúngicos utilizados se puede observar que los intervalos de respuesta para *C. dubliniensis* en la mayoría de las cepas fue mayor; es decir, los valores de las CMI's fueron menores en *C. albicans*.

Los puntos de corte para considerar a un aislado susceptible o resistente para las especies de *Candida* se basaron en los criterios de susceptibilidad presentados por **Rex** [13].

Asimismo, se determinaron las CMI's de un número de aislados clínicos intrahospitalarios, los cuales se muestran en los diversos gráficos, de los cuales se pueden obtener diversas distribuciones que son muy útiles para definir los criterios microbiológicos de sensibilidad y resistencia.

Cuando la respuesta de la población fúngica es unimodal (prácticamente toda la población se comporta de la misma forma) se puede estar ante 2 situaciones diferentes, que la

población sea sensible o que sea resistente. Cuando se determina antes de que el antifúngico haya tenido contacto con dicha población, se obtiene la sensibilidad intrínseca de la misma. Por ejemplo la sensibilidad al Fluconazol de *C. albicans* generalmente se presenta una sensibilidad intrínseca; mientras que *C. krusei* intrínsecamente es resistente. Si la población es bimodal, es fácil asumir que ambos subgrupos son candidatos a una población sensible y resistente microbiológicamente, al hablar de una resistencia microbiológica, es porque ya no está dentro de los límites de la población habitual sensible para dicha cepa. Pero desde un punto de vista clínico, hay que tener en cuenta que cepas consideradas resistentes microbiológicamente, pueden responder al tratamiento, ya que la concentración del fármaco en el lugar de la infección puede ser mucho más elevada que la CMI del microorganismo. En consecuencia para clasificar a un microorganismo como resistente clínicamente podríamos utilizar la siguiente definición propuesta por **Kerridge y cols** ^[56]: “Un hongo es resistente a un antifúngico cuando continúa creciendo y produciendo sintomatología a pesar de que la concentración del fármaco es máxima en el lugar de la infección”.

La distribución de los valores de las CMI's de Fluconazol frente a *C. albicans* se presentan en el gráfico 3. Como se puede observar, la distribución es bimodal con 2 picos. La moda de esta distribución está en 16 µg/mL, estando el 41.6 % de los aislados entre 8 – 32 µg/mL. Por lo tanto, desde un punto de vista microbiológico y atendiendo a este gráfico, una cepa de *C. albicans* con una CMI de 64 µg/mL es microbiológicamente resistente, puesto que ya no está dentro de los límites (0.5 – 16 µg/mL) de la población habitualmente sensible de *C. albicans*, lo cual concuerda con las directrices emitidas por el CLSI ^[14,15]. Para *C. dubliniensis* (gráfico 4) la distribución es unimodal con un pico. La moda de esta distribución se encuentra en 16 µg/mL, estando el 75 % de los aislados. A pesar que, parte de esta población se encuentra dentro de los límites de sensibilidad, presento CMI elevada con respecto a *C. albicans*, de ahí la razón que *C. dubliniensis* mostró ser más sensible dependiente de la dosis.

La distribución de los valores de las CMI's de Itraconazol frente a *C. albicans* se presentan en el gráfico 11. Como se puede observar la distribución es multimodal; por lo

que la moda se repite, estando en aislados sensibles y aislados resistentes. Lo cual nos indica la presencia de aislados altamente sensibles; posiblemente, estos aislados no habían tenido contacto con dicho antifúngico (sensibilidad intrínseca), pero también tenemos aislados resistentes, lo cual nos hace pensar en pacientes multitratados a tal grado, que han generado una alta resistencia a este fármaco. Para *C. dubliniensis* (gráfico 12) la distribución es bimodalidad con 2 picos. La moda de esta distribución es de 2 µg/mL, estando el 66.6 % de los aislados entre 1 – 4 µg/mL. Por lo tanto *C. dubliniensis* presenta alta resistencia al Itraconazol.

La distribución de los valores de las CMI's de Ketoconazol frente a *C. albicans* se presenta en el gráfico 7. Como se puede observar la distribución es unimodal con un solo pico. La moda de esta distribución está en 0.25 µg/mL, estando el 58.3 % de los aislados entre 0.12 – 0.5 µg/mL. Por lo tanto, desde un punto de vista microbiológico y atendiendo a este gráfico; la población de *C. albicans* presentó sensibilidad al Ketoconazol, puesto que está dentro de los límites susceptibles de la población referido por el Subcomité del CLSI. Para *C. dubliniensis* la distribución es multimodal, la cual presenta aislados altamente sensibles (0.03 µg/mL), pero también altamente resistentes (16 µg/mL). Por lo tanto estamos ante dos situaciones; una, algunos aislados no habían tenido contacto con dicho fármaco; y la otra tenemos aislados de pacientes que han sido multitratados, lo cual conlleva a la resistencia.

La distribución de los valores de las CMI's de Anfotericina B frente a *C. albicans* se presenta en el gráfico 15. Como se puede observar la distribución es unimodal con un solo pico, La moda de esta distribución está en 1 µg/mL, estando el 100 % de los aislados entre 0.5 – 2 µg/mL. Para *C. dubliniensis* (gráfico 16) la distribución es unimodal con un solo pico. La moda de esta distribución está en 0.5 µg/mL, apareciendo el 100 % de los aislados entre 0.5 - 2 µg/mL. Por lo tanto, desde un punto de vista microbiológico y atendiendo a ambos gráficos (15 y 16), la población de *C. albicans* y *C. dubliniensis* presentaron sensibilidad a la Anfotericina B; sin embargo, *C. dubliniensis* presentó CMI más elevadas.

La distribución de los valores de las CMI's de Caspofungina frente a *C. albicans* se presentan en el grafico 19. Como se puede observar la distribución es bimodal por 2 picos. La moda de esta distribución está en 0.12 µg/mL estando el 90.6 % de los aislados entre 0.06 – 0.25 µg/mL. Para *C. dubliniensis* (grafico 20) la distribución tiende a la bimodalidad con 2 picos. La moda de esta distribución está en 0.5 µg/mL, estando el 58.3 % de los aislados entre 0.25 – 1 µg/mL. La respuesta de ambas especies presentaron sensibilidad a la Caspofungina; sin embargo *C. dubliniensis* presento una CMI mas elevada con respecto a *C. albicans*.

Con respecto al porcentaje de susceptibilidad al Fluconazol, se observo la misma resistencia en ambas especies (25%). Sin embargo, es importante señalar que *C. dubliniensis* presentó diferencia significativa en la distribución de cepas susceptibles dependiente de la dosis (SDD) ya que *C. albicans* presentó un menor porcentaje de susceptibilidad dependiente de la dosis (67 y 42 % respectivamente) (Grafico 1 y 2). La susceptibilidad dependiente de la dosis, estudiada en especies de *Candida*, considera una respuesta favorable al aumentar la dosis terapéutica del fármaco.

Para el Itraconazol, se observó resistencia en 5 aislados de *C. albicans* (1 de 4 µg/mL y 4 de 16 µg/mL) y 10 de *C. dubliniensis* (1 de 1 µg/mL: 6 de 2 µg/mL: 1 de 4 µg/mL y 2 de 16 µg/mL) (Gráfico 9 y 10), representando un 41 % más de resistencia con respecto a *C. albicans*, es importante mencionar que ningún aislado de *C. dubliniensis* fue susceptible al Itraconazol; es decir concentraciones ≤ 0.12 µg/mL, encontrándose además aislados susceptibles dependientes de la dosis (SDD); ello significa que la respuesta clínica, cuando se conserva la misma dosis del fármaco, hace que la enfermedad evolucione como si fuera causada por una especie resistente, por lo tanto, al incrementar la dosis la posibilidad de erradicar con éxito la infección es muy alta.

Los resultados obtenidos en este estudio para el Fluconazol y el Itraconazol en *C. dubliniensis* son acordes con los datos encontrados en la literatura especializada y posiblemente se explique por la presencia de genes de resistencia, fácilmente activados para los azoles en esta especie [57, 58,59]

Para el Ketoconazol, se presentó resistencia en 4 aislados de *C. albicans* (2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL y 16 µg/mL) y 7 de *C. dubliniensis* (2 de 1 µg/mL: 2 de 2 µg/mL y 3 de 16 µg/mL) (Grafico 5 y 6). Representando un 17 % más de resistencia de *C. dubliniensis* con respecto a *C. albicans*. Posiblemente, esta resistencia puede explicarse de acuerdo a lo expuesto por algunos investigadores quienes consideran que la resistencia se presenta con mayor probabilidad en pacientes multitratados, ocasionando resistencia cruzada a los compuestos azólicos por esta especie [22]; o a deficiencias en la absorción de Ketoconazol, por lo que la dosis sérica es mucho menor a la ingerida, específicamente por la elevación del pH gastrointestinal [32], estos autores recomiendan la ingesta del fármaco con una bebida ácida como la Coca-Cola.

Para los 24 aislados estudiados de ambas especies mostraron un 100% de sensibilidad a Anfotericina B y Caspofungina (Graficos 13, 14, 17 y 18) con una $CMI_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$. No se encontraron aislados en niveles de resistencia ($CMI_{90} \geq 4 \mu\text{g/mL}$). Estos resultados son similares a los presentados en trabajos previamente publicados [60].

La mayoría de nuestros aislados clínicos provienen de la cavidad oral, cabe mencionar que *C. albicans* es la especie más frecuente implicada en los casos de candidosis oral sobre todo en pacientes inmunocomprometidos y pacientes inmunocompetentes.

Sin embargo, la incidencia de infecciones causadas por otras especies de *Candida* incluyendo *C. dubliniensis*, *C. krusei* y *C. glabrata*; además, han aumentado de la aparición de aislados clínicos resistentes al Fluconazol e Itraconazol.

La literatura marca que *C. dubliniensis* ha sido aislado, tanto en pacientes sanos como pacientes infectados con VIH/SIDA, alrededor del mundo. Esto sugiere que la cavidad oral es el lugar ideal para *C. dubliniensis*, lo cual no quiere decir que no se encuentre en otros sitios anatómicos. La existencia de casos de individuos sanos con *C. dubliniensis*, aun cuando no es tan frecuente, sugiere que el sistema inmunológico y la microbiota habitual, evitan el excesivo crecimiento de *C. dubliniensis*. Las densidades de población de especies individuales de *Candida* deben ser dinámicas y cambiar con mucha frecuencia, dependiendo de las condiciones del microambiente, el cual está afectado por la dieta, los tratamientos con fármacos y el estado de inmunocompetencia de un individuo. Esto es fácil observarlo en pacientes con candidosis recurrentes; es aquí en particular donde *C. albicans* puede ser reemplazado por otra especie menos patógena

como *C. dubliniensis*. Esta situación puede explicarse de manera hipotética si suponemos que esta especie menos patógena puede subsistir y persistir en la cavidad oral después del tratamiento con fármacos antifúngicos, lo cual no puede hacer *C. albicans* y lo cual explicaría el posible cambio epidemiológico que está ocurriendo en los casos de candidosis orales. Esto es cierto en los casos de *C. glabrata* y *C. krusei*, las cuales en comparación con *C. albicans*, son generalmente menos susceptibles al Fluconazol, el antimicótico más usado comúnmente en el tratamiento de las candidosis orales. En el caso específico de *C. dubliniensis*, los aislados recuperados de individuos sanos son, en su gran mayoría, susceptibles a los antifúngicos más comunes a excepción de Itraconazol, sin embargo, los casos, de aislados de *C. dubliniensis* con muy poca susceptibilidad, provienen de casos de pacientes con VIH/SIDA y que han tenido tratamientos previos y prolongados con Fluconazol provocando una resistencia cruzada a los compuestos azólicos.

7. CONCLUSIÓN

La importancia del presente estudio radica en conocer el comportamiento de poblaciones microbiológicas del entorno hospitalario específico de este hospital. Este hecho permite elegir tratamientos específicos en función de la especie aislada y del fármaco a aplicar.

De acuerdo a los resultados obtenidos la respuesta esperada para las Candidosis cuyo agente etiológico es *C. dubliniensis* será en el 90 % de los casos exitosa cuando se aplique Anfotericina B o Caspofungina ya que la resistencia a los azoles fue marcada para estas cepas. Además en los azoles incrementar la dosis y tiempos.

Finalmente, en este trabajo se muestra la importancia de efectuar estas determinaciones para contar con más recursos que permitan elegir la terapia más adecuada en beneficio de los pacientes.

8. Referencias

1. Garrod H P., N. G. Heatley. Bacteriological methods in connection with penicillin treatment. *Br J Surg* 1944; 32: 117- 124.
2. IV Curso Hispano-Argentina de Micología Médica, Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el Laboratorio. Instituto Malbrán. Buenos Aires, Argentina 2001: 11-217
3. Drouhet, E., T. Barele, J. Bastide, and et al. Standardisation de l'antibiogramme antifongique du groupe d'études de la Societe Francaise de Mycologie Medicale. *Bull Soc Fr Med Mycol* 1981; 10: 131-134.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Antifungal susceptibility testing; Committee Report NCCLS document M20-CR. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania 1985.
5. Espinel Ingroff, A., C. W. Kish, Jr., T. M Kerkering, R. A. Fromtling, K. Bartizal, J. N. Galgiani, K. Villareal, M. A. Pfaller, T. Gearden, M. G. Rinaldi, .Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (12): 3138- 45.
6. Fromtling, R. A., J. N. Galgiani, M. A. Pfaller, Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 39-45
7. Pfaller, M. A., B. Buschelman, M. Bale, Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1437- 1441
8. Pfaller, M. A., M. G. Rinaldi, J. N. Galgiani, Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents Chemother* 1990; 34: 1648- 1654.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed Standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania 1992.
10. Pfaller, M. A., M. Bale, B. Buschelman, M. Lancaster, A. Espinel Ingroff, J. H. Rex, M. G. Rinaldi, C. R. Cooper, and M. R. McGinnis. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (5): 1104- 1107
11. Rex, J. H., M. A. Pfaller, M. Lancaster, F. C. Odds, A. Bolmstrom, and M. G. Rinaldi. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards—recommended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (4): 816- 7.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative Standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania 1995.

-
13. Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, and A. L. Barry. Development of interpretive Breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual Framework and analysis of *in vitro* - *in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards [see comments]. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (2): 235- 47.
 14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania 1997.
 15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard — Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1- 45238-469-4). National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002
 16. Espinel Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 314-319.
 17. Espinel Ingroff A, Bartlett M, Bowder R, et al. Multicenter evaluation of proposed standardization procedure for antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 139-143
 18. Carrillo-Muñoz A. J; Penmány J, Gobernado M. Nuevos antifúngicos presente y futuro. Barcelona, España. *Clin Microbiol Reviews* 2002. pp.1-22.
 19. Bodey G. P. 1992. Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis* 14 (Suppl. 1): s 161-69
 20. Como, J. A., and W. E. Dismukes. 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *New Engl J Med* 330(4) n: 263-272.
 21. Fromtling, R. A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Reviews* 1988; 1: 187- 217.
 22. White T. C; Marr K.A. & Bowden R.A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382 - 402.
 23. Lumberras C; Lizasoain M. & Aguado J. M. Antifúngicos de uso sistémicos. *Enfer Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(7): 336- 380
 24. http://www.tu-berlin.de/~biotec/mibi/AG_Lang/Lang_web/Projekte/2sterolpathwaylarge.htm
 25. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. México. Méndez Editores, 2000: 301-324
 26. <http://www.farmaciasahumada.cl/steroles/fase/html/Mft/producto/p3931.htm>, febrero 2007.
 27. Saag M.S. & Dismukes W.E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1- 8.
 28. Castrillón Rivera Laura, Palma Ramos Alejandro, Padilla Desgarenes Carmen. 2005. Factores de virulencia en *Candida sp*. *Rev Mex Dermatol* 49:12-25.
 29. <http://www.ecuapymes.com>, marzo 2007.

-
30. Sonino N. The use of Ketotoconazole as an inhibitor of steroid production. *New Engl J. Med* 1987; 317: 812 - 817.
 31. <http://www.hsmq.cl/farmacia/farm022.htm> marzo 2007.
 32. Chin T.W; Loeb M. & Fong I. W. Effects of an acid beverage (coca-cola) on absorption of ketoconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2001.;39: 1671-1675.
 33. Gallis H., Drew R. & Pickard: 30 years of clinical experience. *Rev Infec Dis* 1990;12: 308
 34. Hector FR. Compounds active against cell wall of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*: 1993; 6: 1- 21.
 35. Frank CO. Alistair JP, Brown, Neíl AR. Antifungal agents: mechanism of action. *TRENDS in microbiology* 2003; 11: 272-9
 36. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004021100002&script=sci_arttext marzo 2007.
 37. Keating G.M, Jarvis B. Caspofungina. *Drugs* 2001; 61: 1121- 9.
 38. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182004021100002&script=sci_arttext marzo 2007.
 39. Kerridge, D., M. Fasoli, and F. J. Wayman. Drug resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Ann New York Acad Sci* 1988; 544: 245- 259.
 40. Stiller, R. L., J. E. Bennet, H. J. Scholer, M. Wall, A. Polak, and D. A. Stevens. Susceptibility to 5- fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 482 - 487.
 41. Odds. F. C. Resistance of yeasts to azoles – derivate antifungals. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31(4): 463- 71
 42. Arenas, Roberto. “Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento”. Ed. McGraw – Hill. Mexico. 1987: 189-211
 43. Dermatocosis Superficiales. Atlas Médico en Color, México. Editorial científico- médica. 1982: 34-45
 44. Revisión del 1^{er}. Consenso Nacional de prevención, diagnóstico y Tratamiento de Micosis Superficiales. México: Talleres de Litográfica e impresos TOCA, S. A. de C. V., 2001: 26-33
 45. Rippon J W. Micología Médica. México: Interamericana McGraw Hill, 1990: 574-628.
 46. Chaffin WL. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*. Identification, Function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 130-180.
 47. Sturtevant J, Calderone R. *Candida albicans* adhesions: biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 90 – 97.
 48. Saporito Irwin, Fonzi W. A. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans* is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 601- 613.
 49. DerekJ Sullivan y cols. *Candida dubliniensis*: An update. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 72-76.

-
50. Giammanco GM y cols. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus- infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17: 89- 94.
 51. Priscila de Laet. *Candida dubliniensis* in HIV negative and positive patient in Brazil Vol. 98 (4) June 2003: 533-538
 52. Kyoung-HoLee. The presuntive Identification of *Candida albicans* with Germ Tube Induce By Higt Temperature. *Yonsei Medical Journal* 1999; 40 (5): 420- 424
 53. Giusiano, Mangiaterra. Hongos levaduriformes emergentes y sensibilidad antifúngica en pacientes pediátricos hospitalizados. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2000: 1-4
 54. J. Jil Tomás, C. Rubio Calvo y R. Benito Ruesca. Criterios de sensibilidad a los azoles. *Rev Esp Quimioterap*, 2004; 17 (1): 83-90.
 55. J. Martínez y C. Albrecht. Sensibilidad al Fluconazol y a la Anfotericina B en cepas de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 298-299.
 56. Kerridge, D. Mode of action of clinically important antifungal drugs. *Adv Microbial Physiol* 1986; 27: 1- 72
 57. Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, *et al*. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients whit oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1695-703.
 58. Rex, J.H., Pfaller, M.A., Galgiani, J.N., Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: Conceptual framework and analysis on *in vitro*, *in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235- 247.
 59. Ghannoum M. A. & Rice L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 501- 517
 60. Ceballos A, Gaitán L, Orihuela F, Olea D, y cols. *In vitro* antifungal resistanse in *Candida albicans* from HIV-infected patients with and without oral candidosis. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 194-197.