

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**APLICACION DE METODOS DE REFERENCIA PARA EL
ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA: DOCUMENTOS
M27-A2 Y M38-A DEL NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR
CLINICAL LABORATORY STANDARDS).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:**

ITZEL ESTHER FRANCO NOGUEZ

**ASESORES: MICROBIOLOGA AMPARO LONDOÑO OROZCO
DR. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.
2006.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico brindado por el proyecto PAPIIT; IN 202105-3; documento: Evaluación Antimicótica de Nuevos Compuestos Químicos.

DEDICO ESTE TRABAJO A:

Mis padres:

Esther Noguez Cruz y Juvenal Franco Granillo; por su apoyo, consejos y cariño que me han brindado.

Mis hermanos:

Sac, Zanya, Juve y Juan; que son parte importante de mi vida.

Mi amigo y compañero:

José Luis; por todo el apoyo que siempre me has brindado.

Gracias a:

Mi Universidad:

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM

Mis maestros:

Amparo Londoño y Tonatiuh Cruz; por brindarme la oportunidad y la confianza para la realización de este trabajo.

Mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Campo 4.

Mis sinodales:

MVZ. Gerardo Cruz, QFB. Patricia Zúñiga, MC. Virginia Benítez y MC. Lidia Rangel.

Todos mis amigos:

Olga, Lucia, Araceli, Ana, Hellen, Lluvia, Selene, Jaz, Moni, Lupe, Víctor, Miguel, Pedro, Omar, Bladimir, Gerardo, Aquino, Eric, et. al.

ÍNDICE GENERAL

1.0. Índice de tablas.....	4
1.1. Índice de imágenes	9
2.0. Resumen	11
3.0. Abreviaturas.....	12
4.0. Generalidades	
4.1. Los hongos y su taxonomía	13
4.2. Enfermedades ocasionadas por hongos	18
4.3. Clasificación de las micosis	19
4.4. Antifúngicos	23
4.4.1. Nistatina	26
4.4.2. Anfotericina B	28
4.4.3. Azoles	31
4.4.3.1. Miconazol	32
4.4.3.2. Clotrimazol	33
4.4.3.3. Ketoconazol.....	34

4.4.4. Triazoles	
4.4.4.1. Fluconazol	36
4.4.4.2. Itraconazol	38
4.4.4.3. Variconazol ..	40
4.4.4.4. Posaconazol	42
4.4.5. Alilaminas	43
4.4.6. Griseofulvina y 5-fluorocitosina (5-fluocitosina)	45
4.4.7. Lipopéptidos .	48
4.4.8. Nikomicinas	50
4.4.9. Sordarinas ..	50
4.5.0. Pruebas de sensibilidad	53
5.0. Objetivo general	59
5.1. Objetivos particulares	59
6.0. Material y Metodología	60
7.0. Resultados.....	70
8.0. Discusión	90
9.0. Conclusiones.....	97

10.0. Anexo nº 1	98
10.1. Anexo nº 2	99
10.2. Anexo nº 3	102
10.3. Anexo nº 4	104
10.4. Anexo nº 5	107
10.4. Anexo nº 6.....	110
11.0. Referencias bibliográficas	112

1.0. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla nº 1

Clasificación taxonómica de los principales agentes
productores de micosis.....16

Tabla nº 2

Clasificación de las hifas según su forma.....17

Tabla nº 3

Clasificación clínica de las infecciones micóticas.....22

Tabla nº 4

Clasificación antifúngicos según el tipo de micosis.....24

Tabla nº 5

Clasificación química de los antifúngicos.....25

Tabla nº 6

Principales grupos de antifúngicos utilizados para
la terapia de las infecciones micóticas sistémicas.....51

Tabla nº 7

Actividad de los principales fármacos antifúngicos
frente a los hongos más frecuentemente implicados
en la infección fúngica invasiva.....52

Tabla nº 8

Cepas utilizadas en la prueba de microdilución M27-A2
para levaduras.....63

Tabla nº 9

Hongos filamentosos utilizados en la aplicación de la
prueba M38-A69

Tabla nº 10

Lectura visual a las 24hrs de la prueba de microdilución
método M27-A2 utilizando como antifúngico fluconazol.....71

Tabla nº 11

Lectura visual a las 48hrs de la prueba de microdilución
método M27-A2, utilizando como antifúngico fluconazol.....72

Tabla nº 12

Lectura de la prueba de microdilución a 490nm, método
M27- A2 con el antifúngico fluconazol.73

Tabla nº 13

Lectura visual a las 24 hrs de la prueba de microdilución
método M27-A2 utilizando como antifúngico ketoconazol.....74

Tabla nº 14

Lectura visual a las 48 hrs de la prueba de microdilución
método M27-A2 utilizando como antifúngico ketoconazol.....75

Tabla nº 15

Lectura de la prueba de microdilución a 490nm
método M27-A2 utilizando como antifúngico ketoconazol.76

Tabla nº 16

Lectura visual a las 24 hrs de la prueba de microdilución
método M27-A2 utilizando como antifúngico itraconazol.77

Tabla nº 17

Lectura visual a las 48 hrs. De la prueba de microdilución
método M27-A2 utilizando como antifúngico itraconazol.....78

Tabla nº 18

Lectura de la prueba de microdilución a 490nm
método M27-A2 utilizando como antifúngico itraconazol.....79

Tabla n° 19	
CMI (48hrs a 490nm y 48hrs lectura visual)	
y CFM obtenidas para cada Antifúngico en	
cepas de <i>Candida</i>	80

Tabla n° 20	
Determinación de la susceptibilidad antifúngica	
en levaduras por medio de CMI obtenidas por	
lectura espectrofotométrica y la lectura visual a 48hrs.....	81

Tabla n° 21	
Lectura visual a las 48hrs de la prueba de microdilución	
Método M38-A utilizando como antifúngico fluconazol.....	83

Tabla n° 22	
Lectura de la prueba de microdilución a 490nm	
método M38-A utilizando como antifúngico fluconazol.	84

Tabla n° 23	
Lectura visual a las 48 hrs de la prueba de microdilución	
método M38-A utilizando como antifúngico ketoconazol.....	85

Tabla n° 24	
Lectura de la prueba de microdilución a 490nm	
método M38-A utilizando como antifúngico ketoconazol.	86

Tabla n° 25	
Lectura visual a las 48 hrs de la prueba de microdilución	
método M38-A utilizando como antifúngico itraconazol.....	87

Tabla nº 26	
Lectura de la prueba de microdilución a 490nm método M38-A utilizando como antifúngico itraconazol.	88
Tabla nº 27	
Determinación de la CMI, CFM y CME para especies del genero <i>Aspergillus</i>	89
Tabla nº 28	
Solubilidad de los antifúngicos.....	98
Tabla nº 29	
Diluciones realizadas para los antifúngicos insolubles en agua.....	100
Tabla nº 30	
Diluciones realizadas para los antifúngicos solubles en agua	101
Tabla nº 31	
Intervalos para la determinación de susceptibilidad para <i>Candida spp</i>	105
Tabla nº 32	
CMI de antifúngico para hongos filamentosos.....	108

1.1. ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen nº 1	
Micelio con hifas cenocíticas.....	14
Imagen nº 2	
Micelio con hifas septadas.....	14
Imagen nº 3	
Panel Sensititre Yeast One.....	55
Imagen nº 4	
Panel Fungitest.....	56
Imagen nº 5	
Método E-test (levadura).....	58
Imagen nº 6	
Método E-test (hongo filamentoso).....	58
Imagen nº 7	
Ejemplo del tipo de crecimiento que se presenta en la microplaca, prueba M27-A2.....	103
Imagen nº 8	
Determinación de la CFM de itraconazol con <i>Candida glabrata</i>	106
Imagen nº 9	
Prueba sensibilidad antifúngica M38-A para <i>Aspergillus fumigatus</i> con itraconazol.....	108

Imagen nº 10
Determinación de la CFM de ketoconazol
en *Aspergillus fumigatus*.....109

Imagen nº 11
Hifas de *Aspergillus niger* alteradas con itraconazol.....111

2.0. RESUMEN

En este trabajo de tesis se aplicaron dos métodos de referencia para la realización de estudios de sensibilidad antifúngica: el documento M27-A2 para hongos levaduriformes y el M38-A para hongos filamentosos recomendados por el instituto norteamericano: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), utilizando para el documento M27-A2 levaduras del genero *Candida* del cepario de hongos del Laboratorio de Micología de la Sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM y cepas de *Candida* y una cepa de *Rhodotorula rubra* aisladas de casos clínicos donadas por el Laboratorio Clínico del Centro Médico ABC de la Ciudad de México. Con el método M38-A2 se utilizaron cepas de *Aspergillus* obtenidas del cepario de hongos del Laboratorio de Micología de la Sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, realizando los estudios de sensibilidad antifúngica con tres fármacos, el fluconazol antifúngico soluble en agua y el ketoconazol e itraconazol antifúngicos insolubles en agua; obteniendo cepas resistentes o sensibles a cierto antifúngico, y comprobando la sensibilidad intrínseca que pueden tener algunas especies de un genero específico; por ejemplo: *Candida krusei*, que es resistente intrínsecamente al fluconazol. Es recomendada la aplicación de los métodos M27-A2 y M38-A, para establecer la sensibilidad a antifúngicos, el seguimiento del tratamiento y la evaluación de la actividad antifúngica de nuevos compuestos.

3.0. ABREVIATURAS

ABCL: anfotericina B complejo lipídico

ABCD: anfotericina B de dispersión coloidal

ABL: anfotericina B liposomal

ABD: anfotericina B desoxicolato

ADP: agar dextrosa papa

CMI: Concentración mínima Inhibitoria

CME: Concentración mínima efectiva

CFM: Concentración fungicida mínima

DNA: Ácido desoxirribunucleico

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EUCAST: European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing

FESC: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

5-FC: 5 flucitosina

IFI: Infección Fúngica Invasiva

LCR: líquido cefalorraquídeo

MOPS: [3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico]

NCCLS: Comité norteamericano de estándares en laboratorios clínicos
(*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)

R: Resistente

RNA t: Ácido ribonucleico de transferencia

S: Sensible

SDA: agar dextrosa Sabouraud

SDD: Sensibilidad Dosis Dependiente

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

UFC: Unidades formadoras de colonias

VO: vía oral

VI: vía intravenosa

4.0. GENERALIDADES

4.1. LOS HONGOS Y SU TAXONOMIA

Debido a su gran número y diversidad, no es posible de manera precisa definirlos, por lo tanto se prefiere hablar de sus principales características, como son ^{9, 15}:

- Organismos eucariontes
- Su hábitat natural es el agua, suelos y restos orgánicos
- Pueden subsistir en rangos de pH muy amplios
- Aerobios o facultativos
- Quimiotrópicos
- Heterótrofos
- Su principal componente lipídico de la membrana celular es el ergosterol
- Su reproducción puede ser sexual (telemorfismo) o asexual (anamorfismo)
- Pueden ser unicelulares (levaduras), multicelulares (hongos filamentosos)
- Por medio de los estudios de biología molecular podemos ubicar a la mayoría de estos organismos, en el reino fungi. ^{9, 15}

La clasificación taxonómica se muestra en la tabla nº 1, divididos en diferente *Phylum* según su forma de reproducción sexual.

Se mencionaba el *Phylum* Deuteromycota, donde se colocaban a los hongos que no se les había descubierto su forma de reproducción sexual, pero actualmente no se emplea ^{9,15}.

Las estructuras de reproducción sexual se denominan esporas y las estructuras de reproducción asexual conidios^{9, 15} y se llaman mitospóricos a los hongos sin reproducción sexual conocida, y meiospóricos a los hongos con reproducción sexual conocida.

La unidad anatómica fundamental de los hongos es la hifa, que en los hongos unicelulares está representada por la levadura, de forma redonda u oval, cuando son hongos multicelulares adoptan en general la forma filamentosa; los filamentos o hifas pueden ser cenocíticos (aseptados), o septados^{9,15} (Imagen nº 1 y 2).

Imagen nº 1
Micelio con hifas Cenocíticas

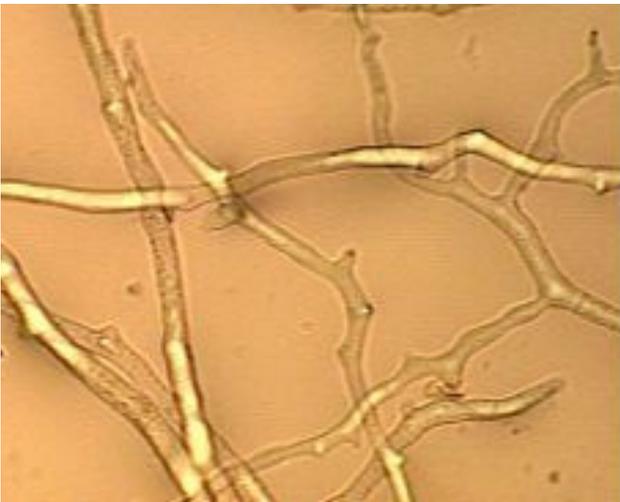
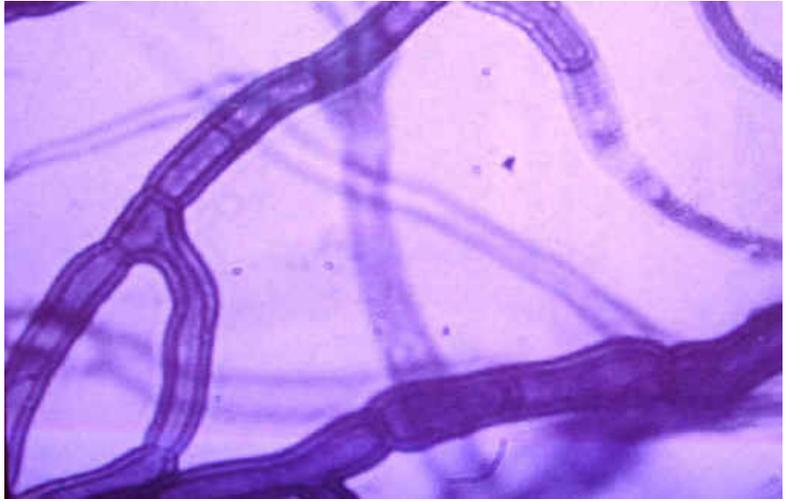


Imagen nº 2
Micelio con hifas septadas



Según la forma de la hifa (Tabla nº 2 Clasificación de las hifas según su forma) se denominan⁹:

- Vesiculosas
- Nodosas
- Pectinadas
- Raqueta
- Candelabro fávico
- Espiral
- Hifas unicelulares
- Seudohifas

Las hifas generalmente miden de 3 a 20 μm de diámetro; el crecimiento es apical y se ramifican para formar el micelio y según su función se divide en dos⁹:

1. Micelio vegetativo: esta inmerso en el sustrato y se encarga de la absorción de los nutrientes.

2. Micelio aéreo o reproductor: se encuentra libre y en él se desarrollan las estructuras de reproducción, esporas o conidios los cuales tienen la función de dispersión de los hongos en la naturaleza.

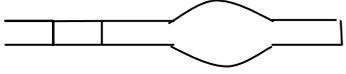
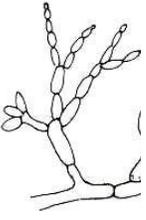
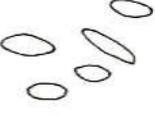
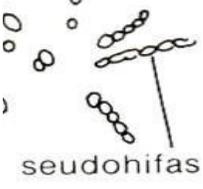
Tabla n° 1* Clasificación taxonómica de los principales agentes productores de micosis.

Phylum	Orden	Familia	Género
<i>Ascomycota</i>	<i>Dithideales</i>	<i>Lophostomataceae</i> <i>Piedraiaceae</i> <i>Testudinaceae</i>	<i>Pyrenpchaeta</i> <i>Piedraia</i> <i>Neotestudina</i>
	<i>Eurotiales</i>	<i>Trichomaceae</i>	<i>Aspergillus (M)</i> <i>Penicillium (M)</i>
	<i>Microascales</i>	<i>Microascaceae</i>	<i>Pseudallescheria</i>
	<i>Onygenales</i>	<i>Arthorodermataceae</i>	<i>Arthroderma</i> <i>Microsporum spp.</i> <i>Epydermophyton sp.</i> <i>Trichophyton spp.</i> <i>Malbranchea (M)</i>
		<i>Onygenaceae</i>	<i>Ajellomyces</i> <i>Histoplasma</i> <i>Coccidioides (M)</i>
	<i>Ophiostomatales</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Sporothrix</i>
	<i>Pneumocystidales</i>	<i>Pneumocystidaceae</i>	<i>Pneumocystis*</i>
	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Endomycetaceae</i>	<i>Endomyces</i> <i>Geotrichum</i>
		<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Blastoschizomyces (M)</i> <i>Candida</i>
	<i>Incierto</i>		<i>Cladophialophora (M)</i> <i>Exophiala (M)</i> <i>Fonsecaea (M)</i> <i>Madurilla (M)</i> <i>Paracoccidioides(M)</i> <i>Phialophora (M)</i> <i>Wangiella (M)</i>
<i>Basidiomycota</i>	<i>Sporidiales</i>	<i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Filobasidiella</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Malassezia</i>
	<i>Incierto</i>		<i>Trichosporon</i>
<i>Hyphochytriomycota</i>	<i>Incierto</i>		<i>Rinosporidium*</i>
<i>Oomycota</i>	<i>Peronoporaes</i>	<i>Pythiaceae</i>	<i>Phytium</i>
<i>Zygomycota</i>	<i>Entomophtorales</i>	<i>Basidiobolaceae</i>	
<i>Basidiobolus</i>		<i>incierto</i>	<i>Loboa</i>
	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Rhizomucor</i> <i>Rhizopus</i> <i>Saksenaceae</i>

M: mitospórico; * Hongos que, según otras clasificaciones, pertenecen a otros reinos.

* Rubén López; Luis Méndez; Francisca Hernández; Rocío Castañón; Micología Médica procedimientos para el diagnóstico de laboratorio; Trillas; 2da edición; México D.F. mayo de 2004.

Tabla n° 2* Clasificación de las hifas según su forma

Imagen	Hifas
	Hifa vesiculosa
	Hifa nodosa
	Hifas en candelabro fávico
	Hifa pectinada
	Hifa en raqueta
	Hifa en espiral
	Hifas unicelulares
	Seudohifas

*Rubén López; Luis Méndez; Francisca Hernández; Rocío Castañón;

Micología Médica procedimientos para el diagnóstico de laboratorio

Trillas; 2da edición; México D.F. mayo de 2004.

4.2. ENFERMEDADES OCASIONADAS POR HONGOS

La Micología es la ciencia que estudia a los hongos, deriva de la palabra griega *mykos*, que quiere decir hongo.²⁴

Los hongos se pueden encontrar en cualquier parte, en los suelos, aire, agua; como recicladores biológicos, fuente de alimento, contaminantes, proveedores de compuestos con actividad biológica o fuente de infección para animales y seres humanos, desde alergias, micotoxicosis, micetismo o una infección en la cual el hongo prolifera en el huésped.^{7,24}

1. Alergias: Cuadro producido por acción de hipersensibilidad frente a hongos.

Ejemplo: el genero *Aspergillus*, causa asma y rinitis alérgicas.

En algunos casos la infección y la alergia se puede dar en forma simultánea.

Según el sitio de depósito de estos alérgenos, los pacientes pueden desarrollar rinitis, asma bronquial, alveolitis o neumonitis generalizada.

2. Micotoxicosis: patología que deriva de la ingestión de alimentos contaminados con metabolitos tóxicos. Ejemplo: las aflatoxinas que contaminan los granos de maíz y son producidas por especies de *Aspergillus*.

3. Micetismo: Afección causada por la ingestión de hongos, ejemplo *Amanita phalloides*, *Claviceps purpurea* (llamado cornezuelo del centeno).

4. Infecciones micóticas: se refiere al crecimiento del hongo en un huésped humano o animal.

4.3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS

El termino micosis alude a la infección causada por un hongo. En general el establecimiento de una micosis depende del estado de las defensas del huésped o de su carencia, de la vía de exposición, del tamaño del inóculo y de la virulencia del hongo.²⁴

Existen varios criterios para clasificar a las micosis y uno de ellos es por medio de su localización anátomo-clínica⁷ :

- Micosis superficiales
- Micosis cutáneas
- Micosis subcutáneas
- Micosis profundas o sistémicas

Las micosis superficiales afectan la capa cornea de la piel y la porción suprafolicular del pelo.⁷

Las micosis cutáneas son infecciones en el ser humano que incluyen una gran variedad de procesos en los que pueden estar afectados la piel, pelo, uñas.^{9, 24}

Las micosis subcutáneas son infecciones del tejido subcutáneo asociado a dermis y epidermis, la puerta de entrada es la inoculación traumática de material contaminado, por lo que también se llaman micosis de implantación.^{9, 24}

La clasificación propuesta por la OMS divide a las micosis en ⁹:

- Micosis Superficiales: llega a afectar algunas capas de la epidermis, pelo y anexos.
- Micosis Subcutáneas: afectan a la piel como puerta de entrada, extendiéndose al tejido celular subcutáneo y con capacidad para invadir otros tejidos como el muscular y óseo y se adquieren por penetración a través de una herida en la piel.
- Micosis sistémicas: están generalmente a nivel pulmonar y se diseminan por vía hematológica a otros sistemas, órganos y tejidos del cuerpo y se adquieren por inhalación.
- Micosis oportunistas: infecciones micóticas que se producen en los pacientes cuyas defensas están comprometidas de alguna forma.
- Seudomicosis o falsas micosis: son las micosis que generan organismos que no son hongos a pesar que su ubicación taxonómica está bien definida en las Eubacteriales; se pueden mencionar como seudomicosis la Nocardiosis, Actinomicosis, Tricomosis, Actinomicetoma, Eritrasma etc.

Desde el punto de vista clínico (tabla nº 3) es más práctico clasificar a las micosis Según los tejidos comprometidos en ²⁴:

- Micosis superficiales: invasión fúngica de la piel cornificada y la respuesta inmunológica del huésped es mínima.

- Micosis cutáneas: producidas por hongos que invaden solo tejido queratinizado superficial: piel, pelo y uñas.
- Micosis subcutáneas: son producidas por inoculación traumática de material contaminado penetrando a la piel o al tejido subcutáneo y pueden transformarse en infecciones sistémicas, las más peligrosas son el micetoma, la esporotricosis y la cromomicosis, que atacan sobre todo a los campesinos.
- Micosis sistémicas: son las infecciones fúngicas más complicadas de tratar, al afectar tejidos más profundos u órganos, pueden llegar a comprometer la vida del paciente, son ocasionadas por hongos patógenos como: *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix Shenckii*, *Blastomyces dermatitidis* y por hongos oportunistas: *Candida albicans*, otras especies del genero *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y otras especies del genero *Aspergillus*.

Se refiere a micosis sistémicas primarias, (tabla nº 3) a la infección originada por una vía de entrada diferente a la piel y son diseminadas a todo el organismo por medio de la sangre; por ejemplo la mayor parte de las micosis sistémicas primarias son pulmonares al principio; las micosis oportunistas son infecciones en pacientes inmunodeprimidos, causadas por hongos de bajo potencial patógeno como *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Geotrichum*; las infecciones por hongos altamente virulentos como *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* y *Paracoccidioides brasiliensis*, también son causa de un número creciente de infecciones en este tipo de pacientes.²⁴

Tabla nº 3* Clasificación clínica de las infecciones micóticas.

Área de compromiso predominante	Micosis	Etiología
Superficial	<i>Pitiriasis versicolor</i>	<i>Malassezia furfur</i>
	<i>Tiña negra</i>	<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>
	<i>Piedra blanca</i>	<i>Trichosporon beigelii</i>
	<i>Piedra negra</i>	<i>Piedraza hortae</i>
Cutánea	<i>Dermatofitosis</i>	Especies del genero <i>Microsporium</i> , <i>Trichophyton</i> y <i>Epidermophyton floccosum</i>
	<i>Candidiasis de la piel, Mucosas o uñas.</i>	<i>Candida albicans</i> , otras especies del genero <i>Candida</i>
Subcutánea	<i>Esporotricosis</i>	<i>Sporothrix Shenckii</i>
	<i>Cromomicosis</i>	<i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Fonsecae pedrosoi</i> y otras especies.
	<i>Micetoma</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Madurilla mycetomatis</i> y otras especies.
	<i>Rinosporidiosis</i>	<i>Rhinosporidium seeberi</i>
	<i>Lobomicosis</i>	<i>Loboa lobo</i>
	<i>Ficomicosis subcutanea</i>	<i>Basidiobolus haptosporus</i>
	<i>Rinoentomoftoromicosis</i>	<i>Conidiobolus coronatus</i>
Sistémicas	<u><i>Micosis primarias</i></u>	
	<i>Coccidioidomicosis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
	<i>Histoplasmosis</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	<i>Blastomicosis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	<i>Paracoccidioidomicosis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	<u><i>Micosis oportunistas</i></u>	
	<i>Candidiasis sistémica</i>	<i>Candida albicans</i> , otras especies del genero <i>Candida</i>
	<i>Criptococosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Aspergilosis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> y otras especies del genero <i>Aspergillus</i>
	<i>Mucormicosis</i>	Especies del genero <i>Rizopus</i> , <i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> y otros

* Zinsser; Microbiología; Médica Panamericana; 20^a edición; páginas: 144, Argentina 1992.

4.4. ANTIFÚNGICOS

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración en las estructuras de la célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su capacidad de supervivencia, sin afectar la célula huésped;¹ antes de 1956 las micosis se trataban en general con yoduro de potasio oral, hasta que aparece la anfotericina B, después apareció la 5 - Flucitosina (5-FC) con un espectro clínico dirigido contra algunas levaduras; en la década del 70 surgieron los derivados azólicos, el miconazol y el ketoconazol fueron los primeros en estar disponibles; fluconazol e itraconazol son introducidos en la década del 80.^{8, 10, 12, 20, 21,23}

Clasificación de los antifúngicos

Los antifúngicos se pueden clasificar según el tipo de micosis (tabla nº 4), dividiéndose en antifúngicos para infecciones sistémicas y en antifúngicos para infecciones superficiales; otra clasificación es según sus características químicas²⁵ (tabla nº 5).

Tabla nº 4* Clasificación antifúngicos según el tipo de micosis

*** ANTIFÚNGICOS PARA INFECCIONES SISTÉMICAS**

- Anfotericina B
- Azoles:

a) Imidazoles

ketoconazol (Orifungal) oral
Econazol (Micolis) tópico
Butoconazol
Oxiconazol
Sulconazol
Bifonazol (Mycospor) tópico.

b) Triazoles

Terconazol
Fluconazol (Triflucan) oral, IV
Itraconazol (Sporanox) tópico

- Flucitosina (Ancotil)
- Griseofulvina (Griseovin)

*** ANTIFUNGICOS PARA INFECCIONES SUPERFICIALES**

- Terbinafina
- Nistatina
- Griseofulvina
- Azoles: clotrimazol, miconazol, tioconazol

*Clasificación obtenida del Departamento de Farmacología y terapéutica Facultad de Medicina; Universidad Autónoma de Madrid; Fármacos Antifúngicos.

Tabla nº 5* Clasificación química de los antifúngicos.

Poliénicos

- Nistatina: nistatina liposomal
- Anfotericina B

Azoles

- Imidazoles: miconazol, clotrimazol, ketoconazol.
- Triazoles: fluconazol, itraconazol.
- Triazoles de segunda generación: variconazol, ravuconazol, posaconazol.

Alilaminas

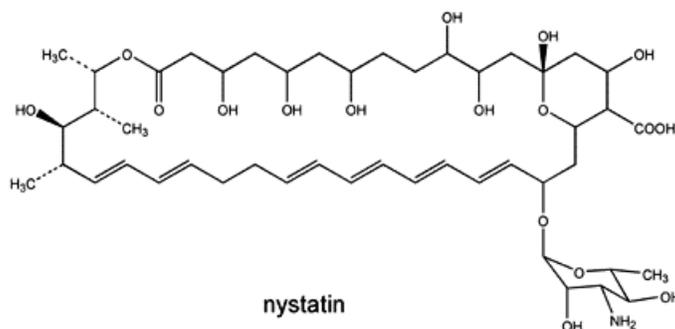
- Terbinafina
- Naftifina

Lipopéptidos

- Papulacandinas
- Equinicandinas
- Triterpenos glicosilados

*Bernardo Vargas, Carmen Parcha, Eugenio Reyes Arenas; Antifungal therapy for clinical use. Analysis of a mycology laboratory; Laboratorio de Micología, Fundación Científica y Tecnológica de la Asociación Chilena de Seguridad. Santiago, Chile.

4.4.1. NISTATINA



La nistatina (Mycostatin, Nilstat, Nistaquim) es un Antibiótico antifúngico que se aisló del *Streptomyces noursei* en 1950, posee múltiples dobles enlaces conjugados (antibiótico polieno) y desde el punto de vista químico es un glucósido, cuyo azúcar es la micosamina; pertenece a los antifúngicos para infecciones superficiales.^{4,8,22}

Vías de administración

Se administra por vía oral y tópica.

Presentaciones farmacéuticas

Entre sus presentaciones hay tabletas orales, suspensión oral, óvulos, crema vaginal y dérmica.

Farmacocinética

Su absorción es muy poca o nada y casi toda la dosis se elimina por las heces.

Mecanismo de acción

El fármaco actúa por unión al ergosterol en la membrana celular fúngica, lo que lleva a la formación de canales a través de los cuales se pierden iones y metabolitos esenciales.

Reacciones adversas

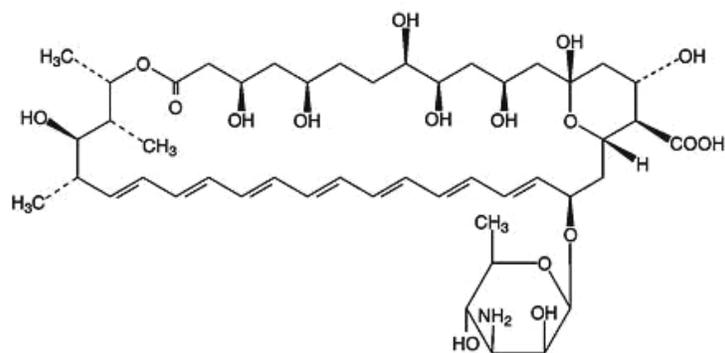
Puede causar irritación o reacciones alérgicas cuando se aplica en la piel o en membranas mucosas; al administrarse en dosis elevadas por vía oral Puede originar náuseas y diarrea.

Uso terapéutico

Solo se emplea en tratamientos de micosis superficiales (tópicas) o en micosis de las vías gastrointestinales.

La nistatina se emplea casi de manera exclusiva para el tratamiento de infecciones por *Candida* en mucosas o piel, incluso candidiasis oral y vaginal.^{4,8,22}

4.4.2. ANFOTERICINA B



La anfotericina B (Abelcet) compuesto aislado del *Streptomyces nodosus* en 1956. Existe en dos formas, A y B, esta última es más activa y se emplea en clínica; es otro antibiótico polieno, utilizado para infecciones sistémicas.^{4, 8,22}

Se han desarrollado diferentes formulaciones con el objetivo de mejorar la farmacocinética y disminuir sus efectos tóxicos; la anfotericina B convencional para vía intravenosa (anfotericina B desoxicolato, ABD) se emplea desoxicolato sódico y fosfato sódico monobásico como excipiente, otras formulaciones son⁴:

- La anfotericina B complejo lipídico (ABCL) es una formulación de Anfotericina B asociada a lípidos, compuesta por L-alfa-dimiristofosfatidilcolina (DMPC), L-alfa-dimiristofosfatidilglicerol (DMPG).
- La anfotericina B liposomal (ABL) se compone de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol y diestearoilfosfatidilglicerol, obteniéndose liposomas unilaminares de 55 a 75 nm de diámetro.
- La anfotericina B de dispersión coloidal (ABCD).

Vías de administración

La anfotericina B se administra por vía intravenosa.

Presentación farmacéutica

Suspensión inyectable.

Farmacocinética

Se absorbe poco en el tubo digestivo, la vía intramuscular es irritante, por lo tanto, la vía de elección es la i.v., la desoxicolina se separa de la anfotericina B y se une a proteínas plasmáticas en un 95% (lipoproteína β), la anfotericina B se almacena en hígado y otros órganos, pequeñas cantidades entran al líquido cefalorraquídeo, una pequeña cantidad se excreta en orina y bilis. La eliminación de este agente es bifásica con una vida media inicial de 24 horas, seguida de una vida media Terminal de 15 días.

Mecanismo de acción

El fármaco actúa por unión al ergosterol en la membrana celular fúngica, lo que lleva a la formación de canales a través de los cuales se pierden iones y metabolitos esenciales (potasio, aminoácidos).

El antimicótico tiene una mayor afinidad por el ergosterol (el principal esteroide de la membrana fúngica) frente al colesterol (el principal esteroide de las células eucariotas de mamíferos). La resistencia a la anfotericina B se produce cuando el hongo es capaz de alterar el ergosterol de su membrana. La anfotericina B posee mecanismos antimicóticos adicionales, como daño oxidativo de las células micóticas, y cierto aumento de la inmunidad celular del huésped.^{4, 8, 12,22}

Reacciones adversas

La anfotericina B es tóxica, pero la más eficaz para las micosis sistémicas graves que antes eran mortales.

Las reacciones adversas ocasionadas por la anfotericina B son:

- Fiebre
- Escalofríos
- Cefalea
- Anorexia
- Náusea
- Vómito
- Tromboflebitis
- Nefrotoxicidad

La fiebre y los escalofríos son los más frecuentes al inicio del tratamiento¹².

Uso terapéutico

La anfotericina B i.v. es el fármaco de elección para todas las micosis sistémicas patógenas u oportunistas; las principales infecciones tratadas con este fármaco son: Candidiasis, aspergilosis, coccidioidomicosis, histoplasmosis, mucormicosis, blastomicosis y criptococosis diseminadas; en las meningitis por *Candida* o *Cryptococcus* se asocia Anfotericina B + Fluocitosina, para retardar el desarrollo de resistencia y permite el uso de menores dosis de anfotericina con menores riesgos de nefrotoxicidad^{4,8,11,12,22}

4.4.3. AZOLES

Los antifúngicos azólicos o azoles, son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que contiene 2 o 3 nitrógenos, en función de esta última característica los azoles se dividen en imidazoles y triazoles.^{4, 6, 8, 10, 21,22}

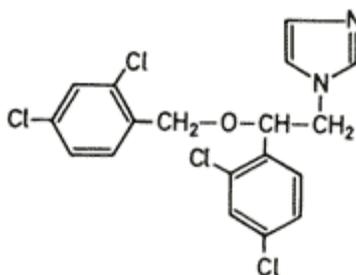
Mecanismo de acción

Los azoles actúan inhibiendo la enzima 14-alfa-desmetilasa una monooxidasa dependiente del C-P450. Esta inhibición se produce al formarse un complejo del azol con una parte del citocromo p450 del hongo. El bloqueo de la enzima impide la conversión de lanosterol en ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana citoplasmática del hongo, y produce una alteración en la permeabilidad de la membrana y la acumulación de peróxidos que la dañan.¹⁰

Antifúngicos tópicos azólicos

Los fármacos como miconazol (Fungicrem, Dermifun, Lotrimin, Nacomic) y clotrimazol (Canesten), son agentes imidazólicos tópicos, compuestos sintéticos que inhiben la síntesis del ergosterol, otros fármacos con propiedades similares al miconazol y al clotrimazol son el oxiconazol (Oxistat), Econazol (Ecostatin) y biconazol (Micospor); son compuestos lipofílicos con escasa hidrosolubilidad a pH neutro, pero el anillo imidazol se ioniza en condición ácida y esto incrementa mucho su solubilidad en agua; Poseen un amplio espectro de actividad que incluyen especies de *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, *Pityosporon orbiculare* y *Candida albicans*; según su concentración pueden ser fungistáticos o fungicidas. Pueden producir eritema, punzadas, flictenas, prurito, urticaria. Los imidazoles tópicos se emplean para infecciones fúngicas en pies, perineo, uñas, vagina y boca.^{4, 8}

4.4.3.1. MICONAZOL



Es uno de los primeros derivados azólicos desarrollados para terapia antifúngica^{4,}
12, 15,25

Vías de administración

Administración tópica.

Presentaciones farmacéuticas

Crema, polvo, polvo en aerosol, solución tópica.

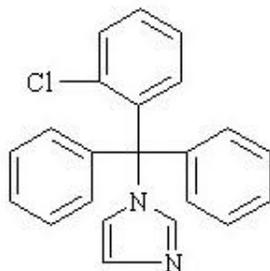
Reacciones adversas

Irritación, ardor, dermatitis.

Uso terapéutico

Su espectro abarca dermatofitos; *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, especies de *Aspergillus*, *Candida sp.* Y *Malassezia sp.*^{4, 8, 20, 22}

4.4.3.2. CLOTRIMAZOL



Primer agente sintetizado entre los pertenecientes al grupo de los imidazoles.^{4, 10}

Vías de administración

Administración tópica.

Presentaciones farmacéuticas

Crema, comprimidos vaginales, solución tópica.

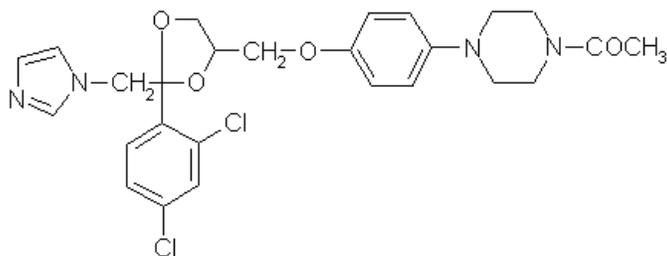
Farmacocinética

Poca absorción y cualquiera que sea la pequeña cantidad que se absorbe, se metaboliza en el hígado y se excreta por la bilis.

Usos terapéuticos

Tiene acción inhibitoria “*in Vitro*” contra gran variedad de hongos filamentosos, incluyendo *Aspergillus* y dermatofitos, levaduras como *Candida* y hongos dimorficos. Se considera un antimicótico de amplio espectro, pues es activo contra cepas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton* y *Corynebacterium cutáneo*.

4.4.3.3. KETOCONAZOL



El ketoconazol (Akorazol, Conazol, Femisan, Mycodib, Konaderm, Nizoral) es un imidazol, tiene un amplio espectro de acción.^{4, 8, 12, 10, 21,22}

Vías de administración

Activo por vía oral, a diferencia del clotrimazol y miconazol que son activos solo por vía tópica, este último también puede utilizarse por vía i.v. pero es sumamente tóxico.

Presentación farmacéutica

Se encuentra disponible en tabletas para administración oral, crema, polvo, óvulos.

Farmacocinética

Después de su administración oral su absorción es satisfactoria, es necesario un ambiente ácido para que el fármaco se disuelva, un 90% del fármaco se une a proteína, su distribución es escasa y la concentración alcanzada en el SNC es muy baja., se biotransforma para ser eliminado y ocurre principalmente en hígado. Los efectos colaterales más comunes son náuseas y vómito.

Usos terapéuticos

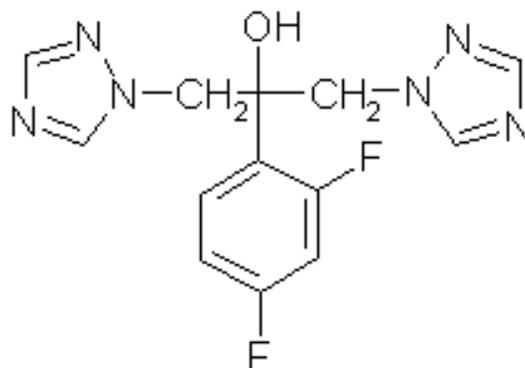
Fármaco de elección para el tratamiento de la blastomicosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis, pseudoallescheriasis y paracoccidioides no meníngeas (debido a su pobre penetración al LCR), candidiasis muco cutáneas crónicas. Es útil en la tiña resistente a griseofulvina y también en la tiña versicolor diseminada. No está indicado en la mucormicosis ni en las micosis meníngeas; tiene poca penetración en el SNC (puede lograrse con dosis altas), ha sido usado además como profiláctico en pacientes inmunocomprometidos; se emplea para tratar candidiasis bucal o esofágica resistente a Nistatina, también se usa en el tratamiento y profilaxis en candidiasis vaginal, en histoplasmosis no meníngea que afecta a pulmones, huesos, piel o tejido blando y enfermedad diseminada, tiene eficacia en la enfermedad criptocócica no meníngea, es útil en la terapéutica para paracoccidioidomicosis, blastomicosis y ciertas dermatomicosis; su principal limitación es su inicio lento de acción; por lo tanto la anfotericina B casi siempre es el fármaco de elección en infecciones fúngicas graves agudas, sobre todo en inmunocomprometidos.

Reacciones adversas

Puede producir: náuseas, vómitos, diarreas, constipación, dolor abdominal, aumento de las enzimas hepáticas, ginecomastia, impotencia y oligospermia, cerca del 10% de las mujeres presentan irregularidades menstruales, en los hombres se ha observado ginecomastia, disminución de la libido.

4.4.4. TRIAZOLES

4.4.4.1. FLUCONAZOL



Fluconazol (Diflucan, Anfugil, Difusel, Flucoxan)

Vías de administración

Administración oral e intravenosa.

Presentaciones farmacéuticas

El fluconazol se encuentra disponible en tabletas y en formulación intravenosa.^{4,}
12,22

Farmacocinética

Su absorción es buena, superior a 90%, en suero solo el 11-12% del fármaco está unido a proteína, las concentraciones en el LCR se aproximan a un 70% de las concentraciones simultáneas en sangre, penetra adecuadamente a todos los líquidos del organismo, tiene una vida media plasmática de eliminación promedio de 30 horas, la vía más importante de eliminación es renal, el 80% del fármaco aparece en orina como fármaco no modificado.

Reacciones adversas

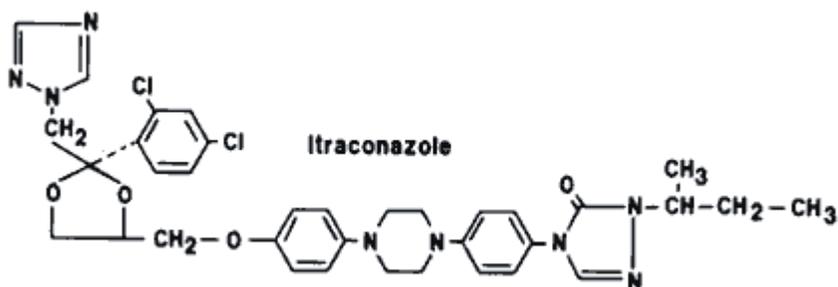
Los efectos adversos comunes es el aumento de la concentración de transaminasas en suero y en exantema, menos del 2% de los pacientes presentan náuseas, diarrea o dolor abdominal.

Usos terapéuticos

Se usa en criptococosis, incluyendo meningitis por *Cryptococcus* e infecciones en otros sitios (pulmonar, cutánea), y puede utilizarse como terapia de mantenimiento para prevenir la recaída de enfermedades por *Cryptococcus* en pacientes con SIDA; en la candidiasis sistémica, incluyendo candidemia, candidiasis diseminada, y otras formas de infección invasiva por candida; o que tengan factores predisponentes para infecciones por candida (cáncer, pacientes con tratamientos inmunosupresivo). El fármaco se emplea en el tratamiento de candidiasis bucal, esofágica en pacientes que no responden a nistatina o cetoconazol y en Candidiasis genital; se utiliza en profilaxis de infecciones por hongos en pacientes con tumores malignos; dermatomicosis, incluyendo *Tinea pedis*, *Tinea corporis*, *Tinea versicolor*, *Tinea unguium* e infecciones dérmicas por candida; micosis profundas endémicas en pacientes inmunocomprometidos, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, esporotricosis e histoplasmosis.

Ha habido reportes de casos de sobre infección con algunas especies de *Candida* distintas a *Candida albicans*, las cuales no son susceptibles a fluconazol (como *Candida krusei*).

1.4.4.2. ITRACONAZOL



El itraconazol (Sopranox, Sinozol) es Introducido en los tratamientos de micosis sistémicas en 1992; es un análogo del ketoconazol. ^{4, 12,22}

Vías de administración

Administración oral y tópica.

Presentaciones farmacéuticas

El itraconazol se encuentra en capsulas y suspensión oral (investigación), formulación intravenosa (investigación), polvo, tabletas, crema, óvulos.

Farmacocinética

Su absorción oral aumenta con la acidez gástrica, los niveles tisulares de itraconazol son mayores al ketoconazol, la principal vía de eliminación es la biotransformación hepática y sus metabolitos hidroxilados tienen acción antifúngica (hidroxi-itraconazol). La absorción por vía gastrointestinal es mejor con alimento (un 30% menos en ayunas), se consiguen las concentraciones plasmáticas máximas luego de 3-4 horas después de administrar 100mg de Itraconazol vía oral, con una vida media de 24 a 36 horas. Se une a proteínas en un 99.8% siendo sus concentraciones en sangre 60% mayores que en plasma.

Alcanza altas concentraciones en los tejidos; no se detecta droga activa en orina ni en LCR. La inducción enzimática por rifampicina, disminuye la concentración plasmática de itraconazol.

Reacciones adversas

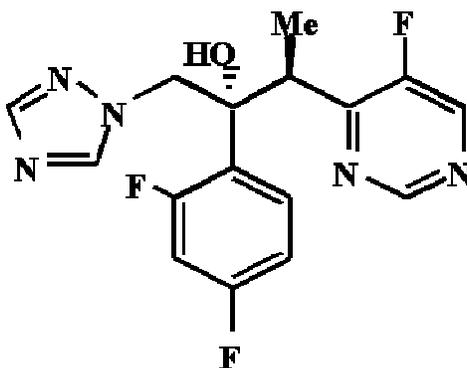
Pueden aparecer náuseas vómitos en un 10-15% de los pacientes, puede producir erupciones cutáneas, prurito, debilidad, mareos, vértigo, parestesias, impotencia.

Usos terapéuticos

Es útil para el tratamiento de candidiasis, dermatofitos causantes de onicomicosis, histoplasmosis, esporotricosis y blastomicosis, criptococosis.

Indicado en candidiasis vaginal, en el tratamiento de las tiñas como las palmoplantares y en las tiñas del cuerpo, ha demostrado ser útil en el tratamiento de la pitiriasis versicolor y candidiasis oral; existen reportes de buena respuesta al tratamiento con itraconazol en casos de micetomas.

4.4.4.3. VARICONAZOL



Variconazol (VFEND) es, entre los azoles disponibles en el mercado, el que tiene una mayor actividad antifúngica.⁴

Farmacocinética

Al ser administrado por lo menos una hora antes de la comida se absorbe bien, después de su administración alcanza en 1-2 horas la concentración plasmática máxima, Se calcula que la unión a proteínas plasmáticas es de un 58% se metaboliza en el hígado, su principal metabolito es el N-óxido y presenta una mínima actividad antimicótica y su vía de excreción del medicamento sin metabolizar es muy baja.

Usos terapéuticos

Es de amplio espectro para las siguientes indicaciones:

- Tratamiento contra aspergilosis invasora
- Infecciones invasivas por *Candida* resistente al fluconazol (incluyendo *Candida krusei*).

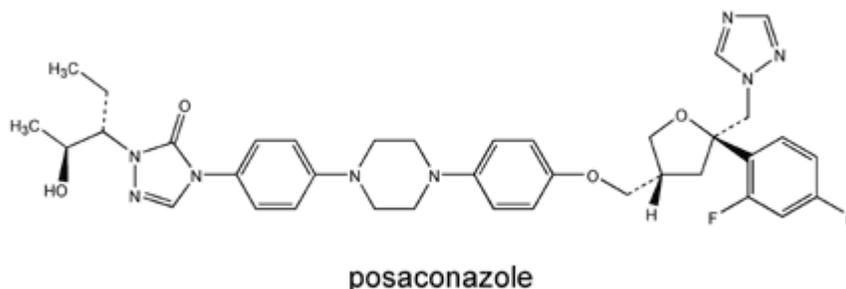
- c) Tratamiento de candidiasis esofágica causada por *C. albicans* en pacientes inmunocomprometidos.
- d) Tratamiento por infecciones causadas por *Scedosporium spp* y *Fusarium spp*.
- e) *Prevención de brotes de infecciones micóticas en pacientes febriles de alto riesgo (trasplante alogénico de médula ósea, pacientes con recaída de leucemia).*

Es activo frente *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Histoplasma*, *Blastomyces* o *Coccidioides*.

Reacciones adversas

Ocasiona vomito, diarrea, dolor abdominal y las alucinaciones visuales.

4.4.4.4. POSACONAZOL



Es un triazólico con mayor actividad antifúngica que el itraconazol y fluconazol, incluso frente a hongos con resistencia primaria o secundaria a fluconazol como *C. krusei* y algunas especies de *Aspergillus*.^{4, 21}

Vía de administración

Vía oral

Presentación farmacéutica

Cápsulas

Farmacocinética

La biodisponibilidad de posaconazol es excelente en los modelos utilizados y más aun si se utiliza la ciclodextrina como vehículo para su administración oral; se pueden obtener a las 24 horas de administrarse concentraciones superiores a la CMI, siendo el pulmón el órgano que alcanza la mayor concentración, por esto la actividad antifúngica contra los microorganismos fúngicos resistentes a otros azólicos que invaden este órgano, como es el caso de *Aspergillus*.

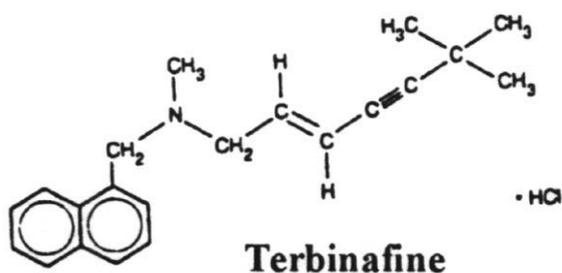
Otro triazol que se encuentra en estudio es el ravuconazol y albaconazol.

Usos terapéuticos

Estudios con animales de experimentación mostraron a este antifúngico como eficaz en: candidiasis sistémica, aspergilosis, vulvovaginitis candidiásica, dermatofitosis y micosis por hongos dimórficos

4.4.5. ALILAMINAS

TERBINAFINA (Lamisil, Xilatril)



La terbinafina es un antimicótico de reciente introducción (1991), cuyo empleo es tanto tópico como sistémico. Pertenece a la clase de las Alilaminas.^{4, 12,20}

Vía de administración

Vía tópica y oral.

Presentaciones farmacéuticas

Esta disponible como crema, solución dérmica, tabletas.

Farmacocinética

Se liga firmemente a las proteínas plasmáticas, difundiendo rápidamente a través de la dermis. Es lipofílica y alcanza altas concentraciones en el estrato córneo, sebo y pelo; además, continúa teniendo un efecto clínico después de la cesación del tratamiento, debido a los niveles residuales de la droga en los tejidos.¹⁸

Después de la absorción, la mayoría del fármaco es metabolizada por el hígado. Aproximadamente el 80% de una dosis oral se excreta como metabolitos. La

ventaja principal de terbinafina se debe a un alto margen de seguridad en el hombre, porque no tiene ningún efecto inhibitorio en el sistema citocromo P-450, siendo más selectiva que los derivados azólicos tales como el ketoconazol.

Mecanismo de acción

Las alilaminas son fármacos sintéticos que actúan de manera diferente al resto de los antifúngicos. Su mecanismo de acción se centra en la inhibición de la síntesis de ergosterol en etapas tempranas de su biosíntesis inhibiendo la enzima escualeno-epoxidasa; como consecuencia, se produce además de la reducción de la síntesis de ergosterol, acumulación de escualeno, resultando su acción fungicida. El alto nivel de escualeno puede aumentar la permeabilidad de la membrana llevando a la interrupción de la organización celular.

Reacciones adversas

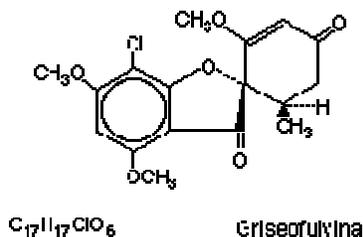
Los efectos adversos en seres humanos son infrecuentes, pero incluyen irritación gastrointestinal, dolor de estómago, gastritis, náuseas, vómitos, calambres, reacciones de piel y raramente hepatotoxicidad.

Uso terapéutico

Son fungistáticos y su empleo se limita a tratamientos contra dermatofitos especialmente contra infecciones en uñas.

4.4.6. GRISEOFULVINA Y 5-FLUOROCITOSINA (5-FLUOCITOSINA)

GRISEOFULVINA



Griseofulvina (Grisovin, Fulcin Forte) se aisló del *Penicillium griseofulvium* en 1939.^{4, 11, 12,22}

Farmacocinética

En promedio menos del 50% de la dosis oral se absorbe y una parte se transporta en la circulación hacia la piel, cabello y uñas, donde se encuentra por unión selectiva a queratina; la mayor parte es inactivada en el hígado y es excretado en orina. La vida media en el plasma es de 10 a 20 horas.

Mecanismo de acción

Se ha propuesto que la griseofulvina ejerce su actividad antifúngica al inhibir la producción del ADN micótico, también se une a proteína microtubular inhibiendo la mitosis.

Reacciones adversas

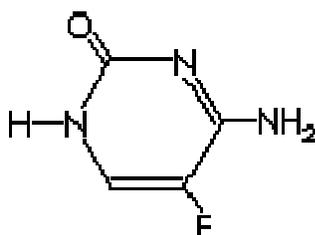
Puede causar: náusea, vómito, diarrea, cefalea, fatiga y confusión mental.

Usos terapéuticos

La griseofulvina es eficaz en el tratamiento generalizado de infecciones dermatofíticas causadas por *Microsporum*, *Epidermophyton* y *trichophyton*. Es útil

contra las infecciones del cuero cabelludo, manos, pies, en donde la terapia tópica se considera inadecuada o el tratamiento ha fallado; no es efectivo en infecciones causadas por *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Malassezia furfur* y especies de *Nocardia*.

5-Fluocitosina (5-FC); (Ancobon)



Flucitosina

La 5-Fluocitosina es una pirimidina fluorada relacionada con el fluoruracilo (Tecflu: antineoplásico). Se sintetizó en 1957, y en 1964 se descubrió que poseía actividad selectiva contra hongos.^{4, 22}

Vías de administración

Vía oral

Farmacocinética

La 5-FC se absorbe bien después de la administración oral un 10% se une a proteínas, se distribuye bien en los líquidos y tejidos del cuerpo una pequeña cantidad de 5-FC se convierte en 5-fluorouracilo y cerca de un 90% de 5-FC se excreta sin cambios a través del riñón, su vida media en plasma es de 3 a 4 horas.

Mecanismo de acción

Se cree que la 5-fluorocitosina también inhibe directamente la replicación de ácidos nucleicos, al actuar como un análogo fluorado de citosina, un componente normal del cuerpo. Al parecer este fármaco penetra a células fúngicas susceptibles y sufre desaminación por la desaminasa de citosina para convertirse en el antimetabolito 5-fluorouracilo. A través de varios pasos este último se convierte en el monofosfato ácido 5-fluorodesoxiuridílico, un inhibidor no competitivo de la sintetasa timidilato, la cual interfiere con la síntesis de ADN.

Reacciones adversas

Las náuseas y vómito son frecuentes, la toxicidad hematológica dependiente de la dosis con trombocitopenia, granulocitopenia, anemia aplásica.

Usos terapéuticos

El fármaco inhibe *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*, otros hongos sensibles son especies de *candida* y *Torulopsis glabrata* y las especies de *Aspergillus* muestran sensibilidad variable. Es útil para el tratamiento de candidiasis cutánea y muco cutánea, infecciones por candida en vías urinarias, y combinada con anfotericina B en el tratamiento de meningitis criptocócica.

Farmacocinética

Es de administración exclusiva por vía intravenosa, su semivida es de 9 a 11 horas y se une a proteínas en un 97% (albúmina) y se distribuye fundamentalmente en hígado, bazo y pared intestinal; se metaboliza en hígado mediante hidrólisis y N-acetilación, y sin metabolizarse se elimina en pequeñas cantidades en orina.^{4, 12}

Mecanismo de acción

La caspofungina actúa inhibiendo de manera específica y no competitiva la síntesis del complejo enzimático β (1,3) -D-glucan sintetasa, lo que impide la formación de polímeros de glucano, mayor componente de la pared de la célula fúngica, lo que provoca inestabilidad osmótica e impide sus funciones de crecimiento y replicación el 1,3- β -D-glucano no está presente en las células de los mamíferos, lo que explicaría la escasa toxicidad del fármaco sobre la célula humana.

Reacciones adversas

Puede provocar: fiebre, cefalea, dolor abdominal, escalofríos, náuseas, diarrea, vómito, anemia, aumento de la creatinina sérica, erupción, prurito, aumento de enzimas hepáticas ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina y de bilirrubina directa.

Usos terapéuticos

Es activa frente *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Exophiala jeanselmei*, *Curvularia lunata*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Paceiloyces variotii* y *Scedosporium apiospermum* *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* o *Blastomyces dermatitidis* y tiene una potente actividad fungicida frente a *Candida spp.*, por lo contrario no presenta actividad “*in Vitro*” frente a *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigelii*, ni frente a hongos dematiáceos, *Rhizopus spp* o *Fusarium spp.*

4.4.8. NIKOMICINAS

Son antibióticos antifúngicos producidos por *Streptomyces tender*, descubierto en los 70s, para uso en la agricultura.²¹

Mecanismo de acción

Las Nikomicinas son inhibidores competitivos de la síntesis de la quitina, que dañan la formación de septos, cadenas, y producen edema osmótico de la célula fúngica.

Usos terapéuticos

Nikomicina Z es la única que ha sido investigada, tiene buena actividad contra *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*, *B. dermatitides*, *C. immitis* y es de acción moderada contra *Candida albicans*. Son resistentes *Candidas non-albicans* y hongos filamentosos. Tiene sinergismo “*in Vitro*” con los triazoles.

4.4.9. SORDARINAS

Son un nuevo grupo de antifúngicos, en investigación, actúan inhibiendo la síntesis de proteínas.²

A pesar de tener una gran variedad de fármacos antifúngicos el manejo de las infecciones micóticas sistémicas se sostiene en cuatro grupos de antifúngicos (tabla nº 6); en donde el sitio de acción en la célula fúngica, su mecanismo de acción y espectro de actividad es diferente; el espectro de acción que llegan a tener algunos de estos fármacos en hongos frecuentemente implicados en infecciones fúngicas invasivas es muy variado, como ejemplo ver la tabla nº 7; donde se muestra el grado de actividad frente a la especie y la cepa.

Tabla nº 6*. Principales grupos de antifúngicos utilizados para la terapia de las infecciones micóticas sistémicas.

Agente antifúngico	Sitio de acción en la célula fúngica	Actividad	Implicaciones clínicas
Polienos	Membrana	Se une a ergosterol causando la muerte celular	Potente actividad antifúngica de amplio espectro.
Azoles	Membrana	Inhibe la enzima 14- odemetilasa. impide la conversión de lanosterol en ergosterol, Daña la membrana citoplasmática.	Actividad fungistática de potencia y espectro variable.
Fluorocitosina	Núcleo	Interfiere con la síntesis del ADN	Espectro restringido, Actividad antifúngica sumatoria en combinación con anfotericina B.
Equinocandinas	Pared Celular	Inhibe la síntesis de glucano, destruye la estructura de la pared celular causando lisis fúngica.	Potente actividad antifúngica de amplio espectro. Potencial efecto aditivo en terapias combinadas.

*Alexis Diomedi P; Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas; Rev Chil Infect; 21 (2): 89-10; 2004.

Tabla nº 7*. Actividad de los principales fármacos antifúngicos frente a los hongos más frecuentemente implicados en la infección fúngica invasiva.

Hongo	Anfotericina B	Itraconazol	Fluconazol	Variconazol	Caspofungina
<i>Candida</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Candida glabrata</i>	+++	+	0	++	+++
<i>Candida krusei</i>	+++	+	0	++	+++
<i>Aspergillus</i>	+++	+++	0	+++	+++
<i>Mucor</i>	+++	0	0	0	0
<i>Cryptococcus</i>	+++	++	+++	+++	0
Hongos filamentosos emergentes	+ / ++	0 / +	0	++	0
<p>Hongos emergentes: hongos filamentosos distintos a <i>Aspergillus</i>. 0: Sin actividad; +: actividad frente algunas cepas; ++: Actividad frente a gran parte de las cepas; +++: Actividad frente a todas las cepas.</p>					

*Carlos Lumbreras, Manuel Lizasoain y José María Agudo; Antifúngicos de uso sistémico; *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21(7):366-80; 2003.

4.5.0. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Antes de la década de 1980 las infecciones sistémicas ocasionadas por hongos no eran muy frecuentes y el único fármaco disponible para el tratamiento era la anfotericina B; al aumentar las infecciones por levaduras u hongos filamentosos debido a enfermedades que ocasionan deficiencia en el sistema inmunológico y a las nuevas tecnologías de diagnóstico, tratamientos (quimioterapia, radioterapia, trasplante de órganos) y el descubrimiento de nuevos fármacos a si como la aparición de cepas resistentes, ocasiono la necesidad de empezar a realizar estudios de sensibilidad a los antifúngicos.^{7,2,13,18,21,29,}

En 1982 el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), creo un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras y hongos filamentososⁱ; dicho subcomité, enfocó el problema de la estandarización de un método en caldo para levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*, en 1992 publico el documento M27-P y con el tiempo se ha ido modificando (M27-T en 1995, M27-A en 1997); actualmente se utiliza el documento M27-A2 que fue anunciado en el 2002. En el año 2002, el subcomité para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos creado dentro del Comité Europeo en pruebas de susceptibilidad a antibióticos, publicó el estándar EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing); este documento basado en el NCCLS, propone una alternativa para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos en levaduras; para la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos surgió por el NCCLS el documento M38-P, en 1998 y en el 2002 se publico el M38-A.²¹

Estos métodos de referencia son utilizados para pruebas de susceptibilidad en levaduras y hongos filamentosos que llegan a causar una infección sistémica; entre las levaduras podemos citar: las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, no se ha validado para levaduras u hongos dimorficos como *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*; entre los hongos filamentosos se encuentran las especies de *Aspergillus*, *Fusarium*,

Rhizopus, *Pseudallescheria boydii* y las formas miceliales de *Sporothrix shenckii*.^{16,17}

Técnicas comerciales para la determinación de susceptibilidad antifúngica

Estas técnicas intentan dar una alternativa al laboratorista clínico para la realización de pruebas de sensibilidad fúngica menos laboriosas que las técnicas de referencia, basándose en los procedimientos recomendados por el NCCLS, pero se ha observado que algunas de ellas tienen poca correlación con los métodos de referencia, y su ayuda se limita a la posible detección de resistencia. Algunas de las técnicas comerciales son¹:

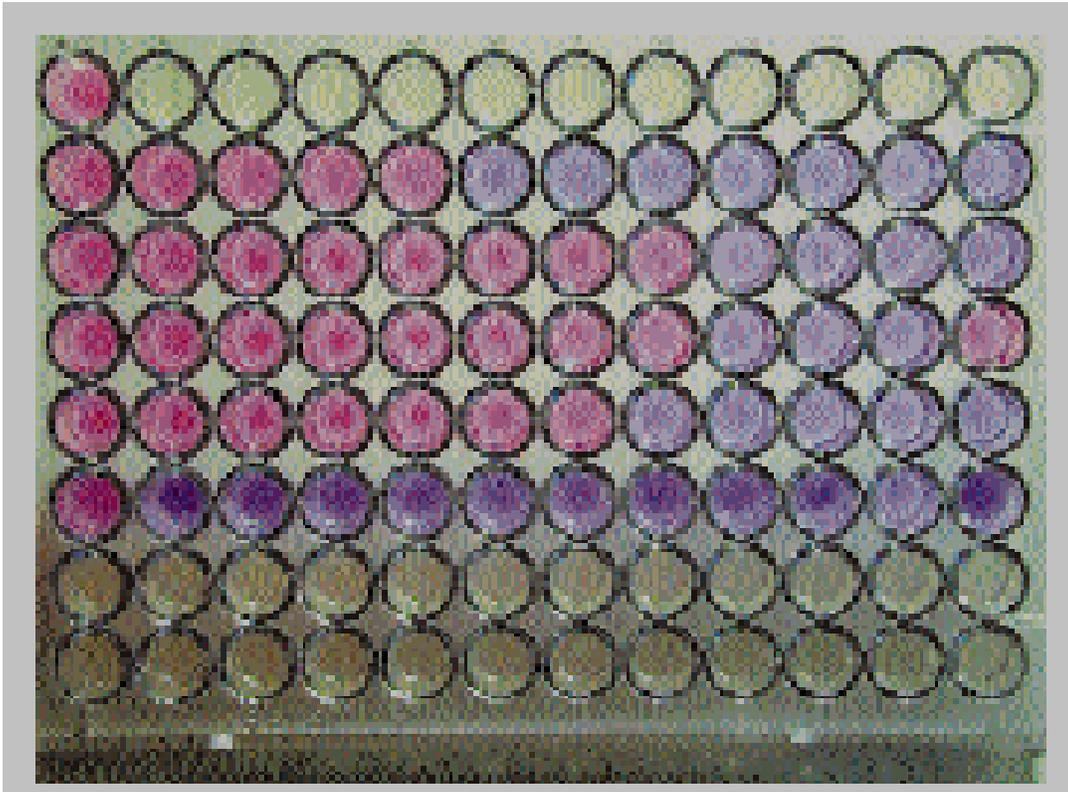
Sensititre YeastOne

Es un método cuantitativo (colorimétrico) de microdilución basado en el NCCLS, se le ha adicionado un indicador de crecimiento de óxido-reducción (azul Alamar). Tiene la ventaja de ser la lectura más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que, cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules (imagen nº 3). Sin embargo, con los azoles sigue habiendo problemas de lectura ya que, debido al efecto *training* o *de arrastre*, el cambio de color no es tan evidente y en ocasiones, pasa de rosa (crecimiento) a púrpura (inhibición parcial del crecimiento).¹³

Este método no es útil para la detección de cepas resistentes a anfotericina B, sin embargo, se considera un método que podría introducirse de rutina en el laboratorio de Microbiología clínica, y se puede utilizar en levaduras como en hongos filamentosos.¹³

Imagen nº 3* Panel Sensititre Yeast One

El color rosa indica crecimiento del hongo; azul inhibición del crecimiento;
Columna izquierda primer pozo se encuentra el control positivo.



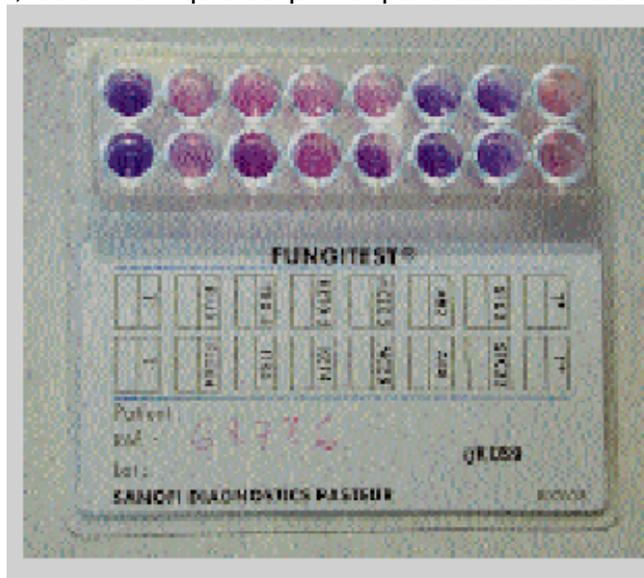
*Estrella Martín – Mazuelos, Emilia Cantón Lacasa y Ana Espinel – Ingroff; Otros métodos para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos; Revista Iberoamericana de Micología; 2001.

Fungitest

Está basado en el método de microdilución del NCCLS, incluye 6 antifúngicos cada uno de ellos a dos concentraciones críticas: anfotericina B (2 y 8 µg/mL), 5-fluorocitosina (2 y 32 µg/mL), miconazol (0,5 y 8 µg/mL), ketoconazol (0,5 y 4 µg/mL), itraconazol (0,5 y 4 µg/mL) y fluconazol (8 y 64 µg/mL); el crecimiento se aprecia por un cambio del color azul (ausencia de crecimiento) a rosa (crecimiento), para levaduras (imagen nº 4).¹³

Imagen nº 4* Panel Fungitest

El color rosa indica crecimiento del hongo y el azul inhibición del crecimiento; Columna izquierda primer pozo se encuentra el control positivo.



* Estrella Martín – Mazuelos, Emilia Cantón Lacasa y Ana Espinel – Ingroff; Otros métodos para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos; Revista Iberoamericana de Micología; 2001.

ATB Fungus

Es un sistema no colorimétrico. Se basa en el método del NCCLS, utiliza diluciones seriadas para anfotericina B y 5-fluorocitosina y dos concentraciones críticas para el resto de los antifúngicos, para levaduras.¹³

Difusión de discos

Al igual que con las bacterias y los antibacterianos, con este método se estudia la sensibilidad de (con sus respectivas modificaciones) levaduras y hongos filamentosos; para las levaduras el NCCLS publicó en el año 2003 el documento M44-P, para el estudio de sensibilidad de *Candida spp.* Mediante el método de difusión en disco frente a fluconazol.¹³

E-test

Es un método cuantitativo de difusión en agar. Las tiras de E-test son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación a 35°C durante 24-48 horas para *Candida spp.* y 48-72 horas para *Cryptococcus neoformans* (imagen nº 5); se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de E-test, también se puede utilizar el método para hongos filamentosos (imagen nº 6).

Imagen n° 5*

Método E-test (levadura)

Halo de inhibición producido con
Diferentes concentraciones de
Antifúngico.

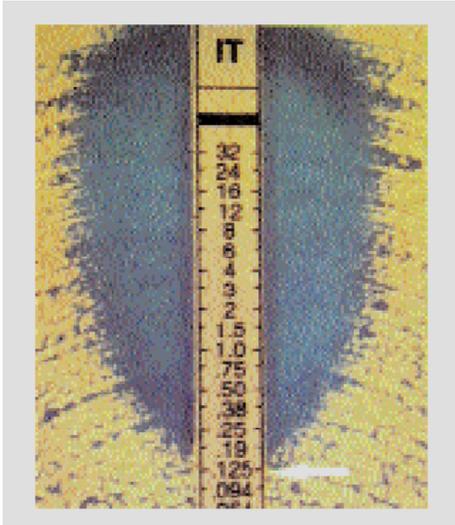
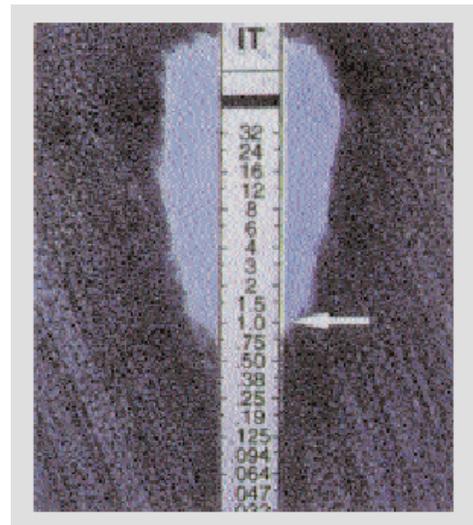


Imagen n° 6*

Método E-test (hongo filamentoso)

Halo de inhibición producido con
Diferentes concentraciones de
Antifúngico.



* Estrella Martín – Mazuelos, Emilia Cantón Lacasa y Ana Espinel – Ingroff;
Otros métodos para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos; Revista
Iberoamericana de Micología; 2001.

Dilución en agar

Este método tiene la ventaja de ser fácil, económico y rápido, y sirve tanto para *Candida* spp, como para *Cryptococcus* spp; sin embargo, tiene el inconveniente de la subjetividad de su lectura y que, por ahora, sólo es aplicable al Fluconazol.¹³

5.0. OBJETIVO GENERAL

- Aplicar las pruebas de sensibilidad antifúngica utilizando métodos de referencia documentados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para su uso en el laboratorio clínico y en la investigación de nuevos compuestos con posible actividad antifúngica.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Se aplicará la prueba del NCCLS documento M27-A2 para conocer la sensibilidad antifúngica de varias cepas de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*.

2.- Se aplicará la prueba del NCCLS documento M27-A2 para conocer la sensibilidad antifúngica de cepas de casos clínicos del género *Candida* y *Rhodotorula*.

3.- Se aplicará la prueba del NCCLS documento M38-A para conocer la sensibilidad antifúngica de varias cepas del género *Aspergillus*.

6.0. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Material para el método M27-A2

Cepas

Para la aplicación del método M27-A2 para levaduras, se utilizaron levaduras del cepario de hongos del Laboratorio de Micología de la Sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y tres levaduras aisladas de casos clínicos donadas por el Laboratorio Clínico del Centro Médico ABC (Tabla nº 8).

Medios de Cultivo

Agar Dextrosa Sabouraud; el medio de cultivo RPMI 1640 (con glutamina, sin bicarbonato y con rojo de fenol como indicador de pH).¹⁷ con el buffer MOPS [3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico] a una concentración de 0.165 mol/L con un pH 7.0 +/- 0.1 a 25°C.¹⁷

Agentes antifúngicos

Se Utilizaron antifúngicos de uso sistémico; un imidazol: ketoconazol y dos triazoles: fluconazol e itraconazol.

Reactivos

Buffer MOPS [3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico].

Solución salina fisiológica.

Dimetil Solfoxido grado analítico

Equipo

Espejo invertido

Lector de microplacas (Elisómetro).

Aparato de filtración con membranas de acetato de celulosa de 0.2µ

Bomba de vacío

Balanza analítica

Vortex Genie 2

Microplacas de 96 pozos fondo redondo

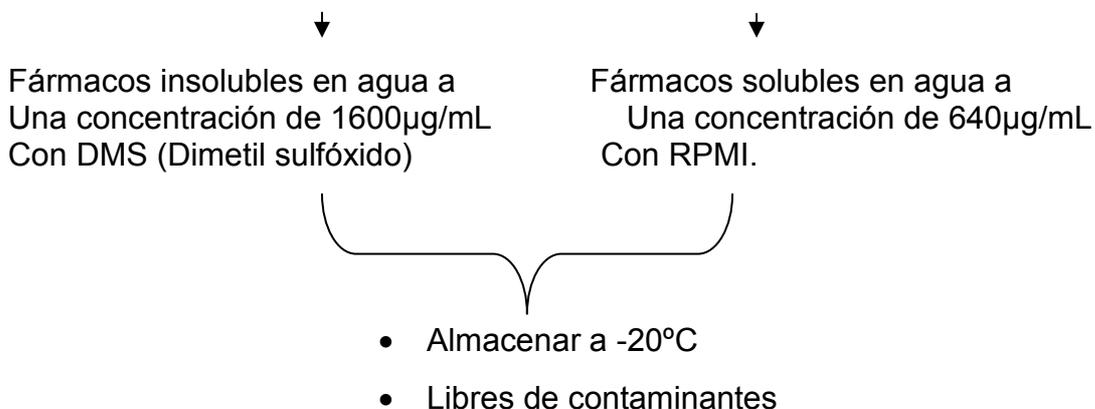
Micropipetas de 10,200 y 1000µL, y Micropipeta multicanal, 8 canales de 100 µL.

Tubo de MacFarland de 1-5 x 10⁶ UFC/mL

Microscopio compuesto.

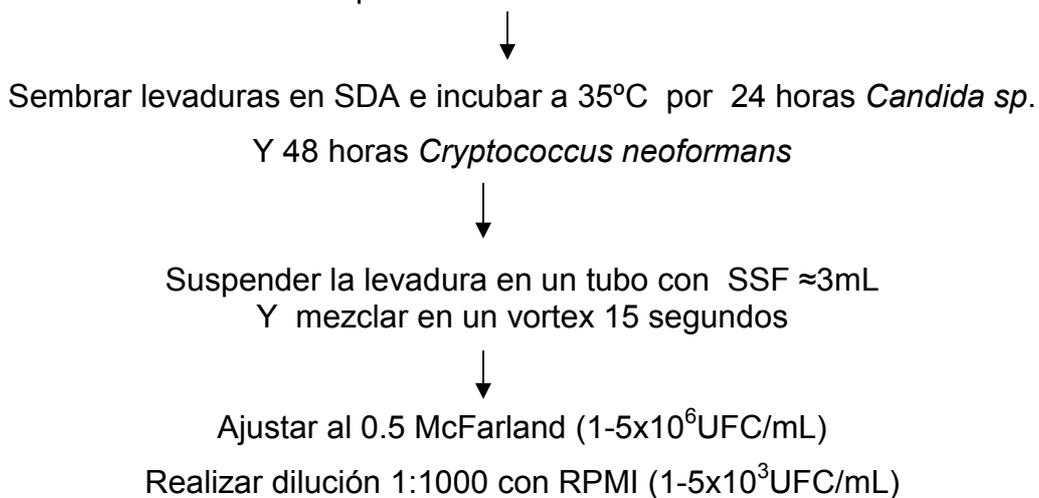
DIAGRAMA DE FLUJO Método M27-A2

1. Preparación de la solución Stock del antifúngico (anexo nº 1)



2. Preparar las diluciones de cada antifúngico (anexo nº 2)

3. Preparación del inóculo de levaduras



4. Realización del montaje de la prueba de microdilución



En microplacas de 96 pozos fondo redondo se adiciona 100µL de cada dilución de antifúngico más 100 µL del inóculo previamente ajustado al 0.5 McFarland



En la última columna de la placa
Se debe tener un pozo Control+ y otro Control-

C+= 100µL de inóculo y 100 µL de medio RPMI
C-=200 µL de medio RPMI



Incubar a 35°C 24 horas (leer placa) y 48horas
Candida spp. y *Cryptococcus neoformans* (segunda lectura de la placa)



Lectura de la prueba, utilizando el control de crecimiento (anexo nº 3)



5. Interpretación de resultados
Concentración mínima inhibitoria CMI,
Concentración fungicida mínima CFM (Anexo nº 4)

Tabla nº 8 Cepas utilizadas en la prueba de microdilución M27-A2 para levaduras

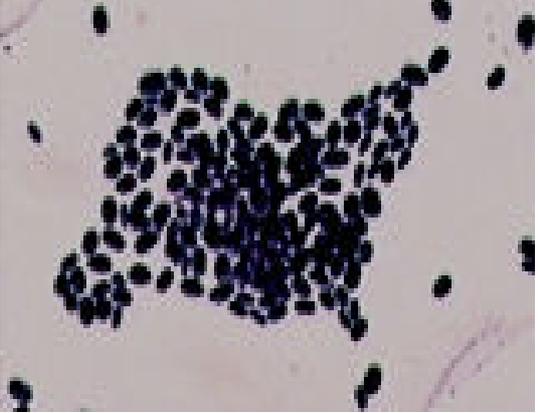
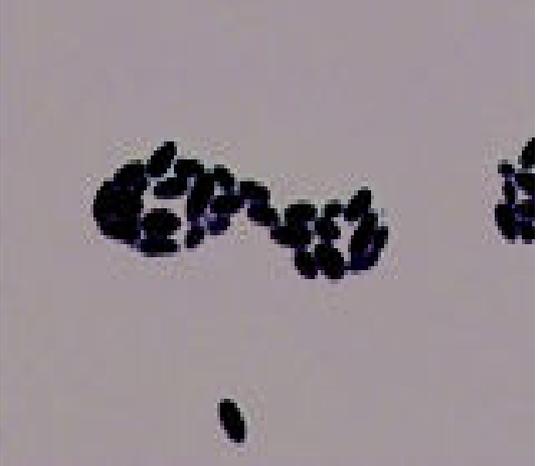
<i>Cepa</i>	<i>Imagen</i>
<i>Candida glabrata</i>	 <p data-bbox="695 757 1233 790">100x Abundantes levaduras Gram +</p>
<i>Candida parapsilosis</i>	 <p data-bbox="695 1263 1233 1301">100x Abundantes levaduras Gram +</p>
<i>Candida krusei</i>	 <p data-bbox="695 1774 1233 1807">100x Abundantes levaduras Gram +</p>

Tabla nº 8* Cepas utilizadas en la prueba de microdilución M27-A2 para levaduras Continuación

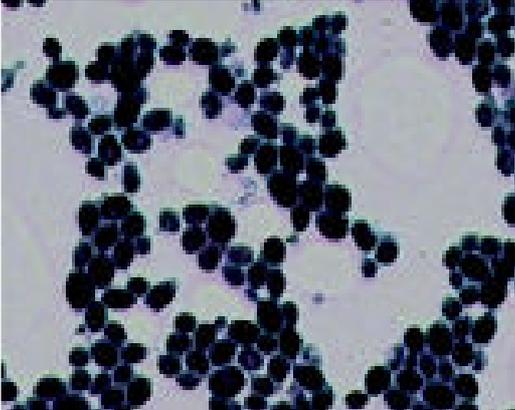
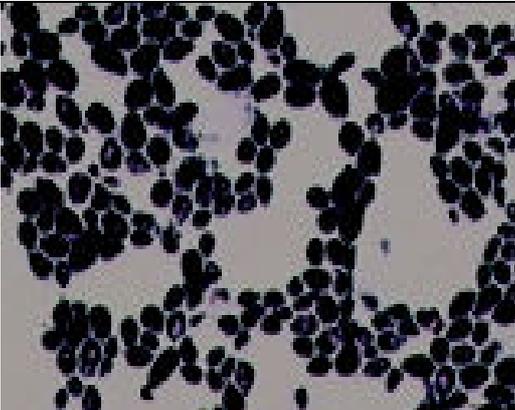
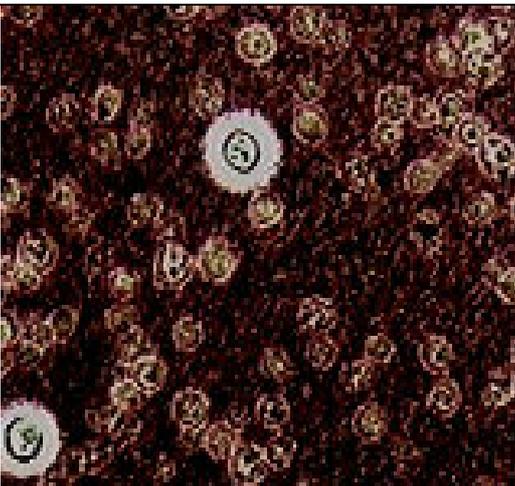
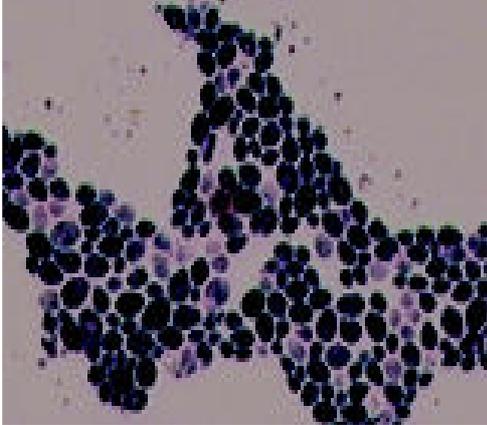
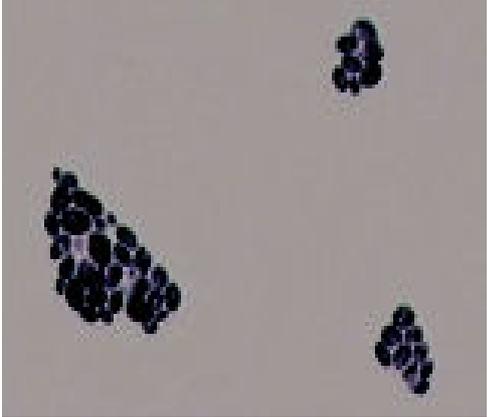
<i>Cepa</i>	<i>Imagen</i>
<i>Candida tropicalis</i>	 <p data-bbox="804 748 1319 786">100x Abundantes levaduras Gram +</p>
<i>Candida albicans</i>	 <p data-bbox="804 1196 1319 1234">100x Abundantes levaduras Gram +</p>
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	 <p data-bbox="804 1720 1319 1816">100X Tinción negativa, donde se observan las levaduras redondas con capsula.</p>

Tabla nº 8* Cepas utilizadas en la prueba de microdilución M27-A2 para levaduras Continuación

<i>Cepa</i>	<i>Imagen</i>
<i>Candida albicans</i>	 <p data-bbox="703 801 1235 837">100x Abundantes levaduras Gram +</p>
<i>Candida guilliermondii</i>	 <p data-bbox="703 1263 1235 1299">100x Abundantes levaduras Gram +</p>
<i>Rhodotorula rubra</i>	 <p data-bbox="703 1711 1235 1744">100x Abundantes levaduras Gram +</p>

Material para el Método M38-A

Cepas

Para la aplicación del método M38-A para hongos filamentosos, se utilizaron cepas de *Aspergillus sp*; del cepario de hongos del laboratorio de Micología de la sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Tabla nº 9).

Medios de Cultivo

Agar Dextrosa Papa; el medio de cultivo RPMI 1640 (con glutamina, sin bicarbonato y con rojo de fenol como indicador de pH).¹⁷ con el buffer MOPS [3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico] a una concentración de 0.165 mol/L con un pH 7.0 +/- 0.1 a 25°C.¹⁷

Agentes antifúngicos

Se Utilizaron antifúngicos de uso sistémico; un imidazol: ketoconazol y dos triazoles: fluconazol e itraconazol.

Reactivos

Buffer MOPS [3-(N-morfolino) ácido propanesulfónico].

Solución salina fisiológica.

Dimetil Solfoxido grado analítico

Equipo

Espejo invertido

Lector de microplacas (Elisómetro).

Cámara de Neubauer

Aparato de filtración con membranas de acetato de celulosa de 0.2µ

Bomba de vacío

Balanza analítica

Vortex Genie 2

Microscopio compuesto

Material otros

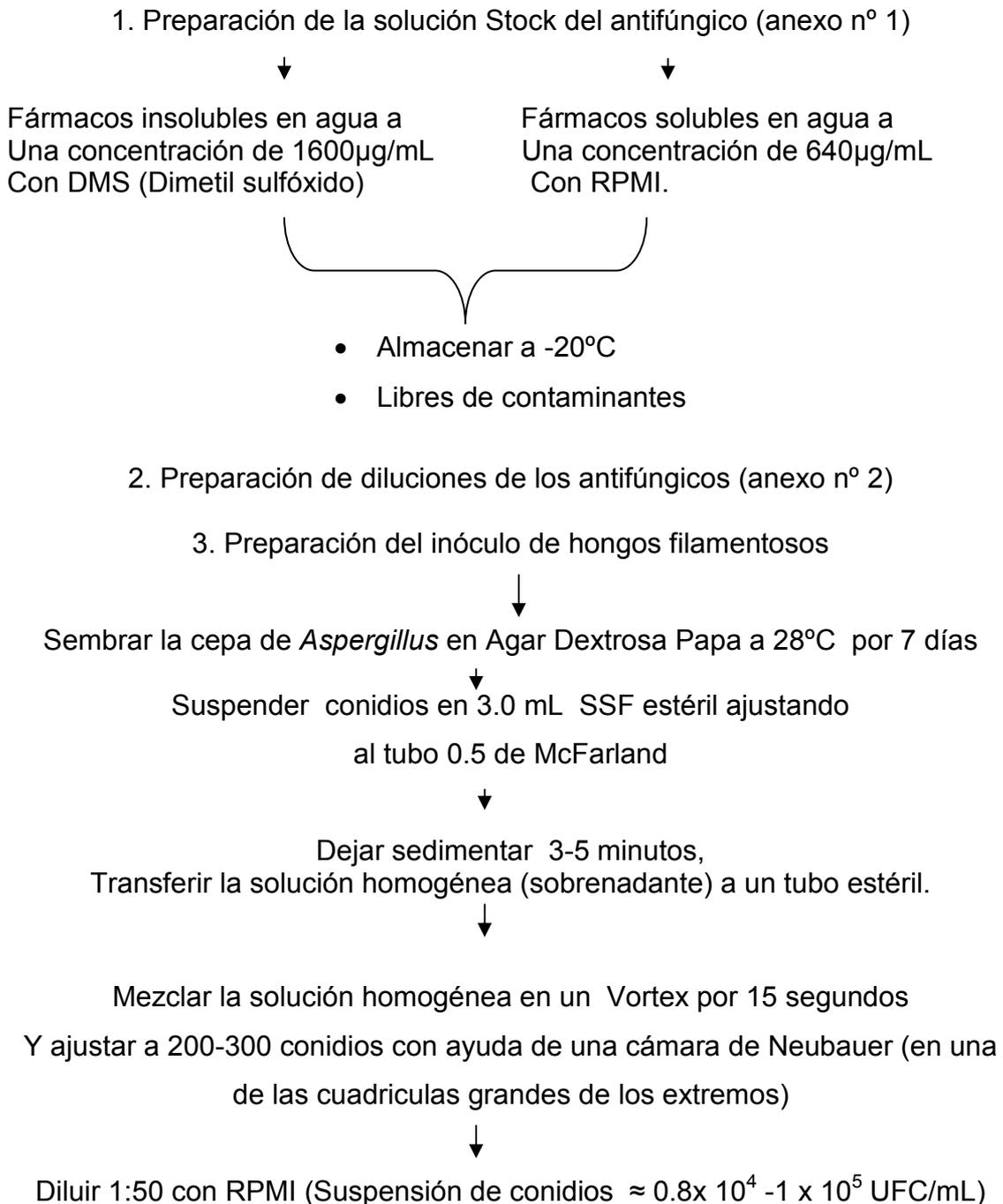
Microplacas de 96 pozos fondo redondo

Micropipetas de 10,200 y 1000µL, y Micropipeta multicanal, 8 canales de 100 µL.

Tubo de MacFarland de 1-5 x 10⁶ UFC/mL

DIAGRAMA DE FLUJO

M38-A



4. Realización del montaje de la prueba de microdilución



En microplacas de 96 pozos fondo redondo se adiciona 100µL de cada dilución de antifúngico más 100 µL del inóculo previamente ajustado a 0.8×10^4 - 1×10^5 UFC/mL



En la última columna de la placa
Se debe tener un pozo Control+ y otro Control-

C+= 100µL de inóculo y 100 µL de medio RPMI
C-=200 µL de medio RPMI



Incubación a 35°C sin agitación por 46-50 horas para *Aspergillus sp.*



Lectura de la prueba, utilizando el control de crecimiento (anexo nº 5)



5. Interpretación de resultados
Concentración mínima inhibitoria CMI,
Concentración fungicida mínima CFM,
Concentración mínima efectiva CME (Anexo nº 6)

Tabla nº 9 Hongos filamentosos utilizados en la aplicación de la prueba M38-A

<i>Cepa</i>	<i>Imagen (Azul de algodón)</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	 <p>40X</p>
<i>Aspergillus flavus</i>	 <p>40X</p>
<i>Aspergillus niger</i>	 <p>40X</p>

7.0. RESULTADOS

Prueba de microdilución, documento M27-A2 para levaduras

Resultados de la prueba de microdilución M27-A2 para levaduras, se muestran las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) obtenidas por medio de lectura visual y espectrofotométricamente, así como las Concentraciones Mínimas Fungicidas (CMF) para cada antifúngico con cada cepa y la determinación de la sensibilidad antifúngica.

Tabla n° 10 Lectura visual a las 24hrs de la prueba de microdilución; método M27-A2 utilizando como antifúngico fluconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL												Control -	Control +	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	0			
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<0.125
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<0.125
<i>Candida krusei</i>	0	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	0	0	16
<i>Candida tropicalis</i>	0	1	1	1	1	2	4	4	4	4	4	4	0	0	2
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	0	0	2
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4	0	0	0.5
<i>Candida albicans</i> (CC)	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	4	4	0	0	2
<i>Candida guilliermondii</i> (CC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	<0.125
<i>Rhodotorula rubra</i> (CC)	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	0	0	16

Tabla 10: Lectura visual; el n° 4 corresponde a: Crecimiento igual al control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL; CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; <: CMI menor que; CC: Caso Clínico.

Tabla nº 11 Lectura visual a las 48hrs de la prueba de microdilución; método M27-A2 utilizando como antifúngico fluconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL												Control +	Control -	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	4	4			
<i>Candida glabrata</i>	0	1	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	4	0	16
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	0	8
<i>Candida krusei</i>	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	0	64
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	0	8
<i>Candida albicans</i>	0	0	1	1	2	2	3	4	4	4	4	4	4	0	4
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	4	4	0	0.5
<i>Candida albicans (CC)</i>	0	1	1	1	2	2	3	4	4	4	4	4	4	0	4
<i>Candida guilliermondii (CC)</i>	0	0	1	1	1	2	3	4	4	4	4	4	4	0	2
<i>Rhodotorula rubra (CC)</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	0	64

Tabla 11: Lectura visual; el nº 4 corresponde a: Crecimiento igual al control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL; CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; <: CMI menor que; CC: Caso Clínico.

Tabla n° 12 Lectura de la prueba de microdilución a 490nm; método M27-A2 con el antifúngico fluconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125			
<i>Candida glabrata</i>	0.194	0.199	0.210	0.225	0.225	0.238	0.275	0.257	0.261	0.264	0.256	0.189	8
<i>Candida parapsilosis</i>	0.190	0.189	0.222	0.235	0.356	0.382	0.508	0.481	0.380	0.461	0.397	0.186	4
<i>Candida krusei</i>	0.318	0.335	0.322	0.322	0.323	0.329	0.325	0.371	0.503	0.439	0.436	0.186	64
<i>Candida tropicalis</i>	0.188	0.209	0.222	0.232	0.245	0.267	0.287	0.287	0.332	0.331	0.332	0.194	2
<i>Candida albicans</i>	0.232	0.220	0.235	0.219	0.216	0.255	0.279	0.357	0.393	0.409	0.354	0.193	1
<i>Cryptococcus Neoformans</i> <i>var. gattii</i>	0.196	0.198	0.194	0.193	0.194	0.195	0.205	0.224	0.223	0.240	0.251	0.150	1
<i>Candida albicans</i> (CC)	0.227	0.225	0.189	0.226	0.232	0.276	0.319	0.320	0.346	0.344	0.329	0.196	2
<i>Candida guilliermondii</i> (CC)	0.210	0.192	0.209	0.215	0.227	0.246	0.371	0.291	0.382	0.447	0.288	0.277	1
<i>Rhodotorula rubra</i> (CC)	0.301	0.316	0.310	0.376	0.374	0.235	0.325	0.307	0.328	0.323	0.345	0.199	64

Tabla n° 12 []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; CC= Caso Clínico.

Tabla n° 13 Lectura visual a las 24 hrs de la prueba de microdilución; método M27-A2 utilizando como antifúngico ketoconazol

Organismo	[]antifúngico µg/mL											Control -	CMI
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	Control +		
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<0.03
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<0.03
<i>Candida krusei</i>	0	0	0	0	1	1	2	3	3	3	4	0	0.125
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	0	1
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<0.03
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	0.03
<i>Candida albicans (CC)</i>	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	0	2
<i>Candida guilliermondii (CC)</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0.5
<i>Rhodotorula rubra (CC)</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	4	0	0.125

Tabla 13: Lectura visual; el n° 4 corresponde a: Crecimiento igual al control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1.: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL; CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; <: CMI menor que; CC: Caso Clínico.

Tabla nº 14 Lectura visual a las 48 hrs de la prueba de microdilución método M27-A2 utilizando como antifúngico ketoconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI	
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03				
<i>Candida glabrata</i>	1	1	1	1	2	3	4	4	4	4	4	0	1	
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	0	0.125	
<i>Candida krusei</i>	0	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4	0	0.25	
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	0	2	
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	1	2	2	3	3	4	4	0	0.5	
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4	0	0.03	
<i>Candida albicans (CC)</i>	1	1	1	2	2	2	3	3	4	4	4	0	2	
<i>Candida guilliermondii (CC)</i>	0	1	1	1	1	1	1	2	3	3	4	0	0.125	
<i>Rhodotorula rubra (CC)</i>	0	0	0	0	1	2	2	3	4	4	4	0	0.5	

Tabla 14: Lectura visual; el nº 4 corresponde a: Crecimiento igual al control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1.-poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL; CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; <: CMI menor que; CC: Caso Clínico.

Tabla n° 15 Lectura de la prueba de microdilución a 490nm; método M27-A2 con el antifúngico ketoconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			
<i>Candida glabrata</i>	0.214	0.214	0.228	0.227	0.214	0.222	0.236	0.210	0.232	0.274	0.248	0.196	0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	0.271	0.257	0.254	0.242	0.238	0.236	0.232	0.209	0.209	0.292	0.382	0.213	0.03
<i>Candida krusei</i>	0.251	0.235	0.231	0.222	0.212	0.253	0.376	0.394	0.396	0.548	0.401	0.208	0.25
<i>Candida tropicalis</i>	0.411	0.394	0.408	0.425	0.426	0.429	0.465	0.420	0.427	0.422	0.585	0.278	0.25
<i>Candida albicans</i>	0.201	0.196	0.439	0.196	0.206	0.207	0.202	0.192	0.198	0.208	0.208	0.207	0.03
<i>Cryptococcus Neoformans</i>	0.196	0.198	0.193	0.195	0.200	0.196	0.195	0.211	0.217	0.223	0.256	0.198	0.03
<i>var. gattii</i>													
<i>Candida albicans</i> (CC)	0.313	0.345	0.397	0.396	0.435	0.416	0.413	0.400	0.433	0.457	0.592	0.278	1
<i>Candida guilliermondii</i> (CC)	0.362	0.408	0.357	0.349	0.327	0.314	0.347	0.323	0.389	0.517	0.372	0.256	0.03
<i>Rhodotorula rubra</i> (CC)	0.210	0.198	0.212	0.159	0.234	0.223	0.222	0.258	0.294	0.363	0.294	0.171	4

Tabla n° 15 []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL. Ab: absorbancia a una longitud de onda de 490nm; CC=Caso Clínico.

Tabla nº 16 Lectura visual a las 24 hrs. de la prueba de microdilución método M27-A2 utilizando como antifúngico itraconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL										Control -	Control +	CMI
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<0.03
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	0	1
<i>Candida krusei</i>	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4	0	2
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	16
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<0.03
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3	4	0	0.5
<i>Candida albicans (CC)</i>	1	1	1	1	1	6	2	2	2	2	4	0	0.25
<i>Candida guilliermondii (CC)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	<0.03
<i>Rhodotorula rubra (CC)</i>	0	0	0	2	2	2	3	3	3	3	4	0	2

Tabla 16: Lectura visual; el nº 4 corresponde a: Crecimiento igual al control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL; CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; <: CMI menor que; CC: Caso Clínico.

Tabla n° 17 Lectura visual a las 48 hrs. de la prueba de microdilución método M27-A2 utilizando como antifúngico itraconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL										Control -	CMI	
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			Control +
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0	1	1	2	3	4	4	4	4	0	0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	1	2	3	4	4	4	4	4	4	0	2
<i>Candida krusei</i>	1	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	0	2
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	3	4	4	0	0.25
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	2	4	4	0	0.125
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0	0	0	0	1	2	3	3	3	3	4	0	0.5
<i>Candida albicans</i> (CC)	1	1	1	1	1	2	2	3	4	4	4	0	0.5
<i>Candida guilliermondii</i> (CC)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4	0	0.03
<i>Rhodotorula rubra</i> (CC)	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	0	8

Tabla 17: Lectura visual; el n° 4 corresponde a: Crecimiento igual al control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1.: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL; CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; <: CMI menor que; CC: Caso Clínico.

Tabla n° 18 Lectura de la prueba de microdilución a 490nm; método M27-A2 con el antifúngico itraconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI.
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			
<i>Candida glabrata</i>	0.150	0.150	0.145	0.149	0.176	0.205	0.211	0.225	0.238	0.229	0.238	0.153	0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	0.319	0.324	0.326	0.464	0.513	0.948	0.774	0.605	0.592	0.977	0.599	0.228	2
<i>Candida krusei</i>	0.192	0.183	0.163	0.255	0.328	0.330	0.342	0.426	0.335	0.372	0.313	0.161	0.125
<i>Candida tropicalis</i>	0.182	0.176	0.184	0.188	0.185	0.184	0.231	0.287	0.357	0.374	0.391	0.191	0.06
<i>Candida albicans</i>	0.198	0.183	0.184	0.193	0.189	0.192	0.192	0.207	0.246	0.310	0.368	0.189	0.03
<i>Cryptococcus Neoformans</i> <i>var. gattii</i>	0.196	0.198	0.193	0.195	0.200	0.196	0.234	0.304	0.206	0.213	0.231	0.204	0.25
<i>Candida albicans</i> (CC)	0.192	0.186	0.187	0.193	0.182	0.200	0.270	0.335	0.394	0.397	0.363	0.207	0.125
<i>Candida guilliermondii</i> (CC)	0.180	0.175	0.176	0.185	0.181	0.180	0.181	0.177	0.189	0.192	0.268	0.182	0.03
<i>Rhodotorula rubra</i> (CC)	0.217	0.238	0.260	0.319	0.345	0.291	0.271	0.320	0.258	0.251	0.272	0.203	4

Tabla n° 18 []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL. Ab: absorbancia a una longitud de

onda de 490nm CC= Caso Clínico.

Tabla n° 19 CMI (48hrs a 490nm y 48hrs lectura visual) y CFM obtenidas para cada Antifúngico en cepas de *Candida sp.*

Organismo	Fluconazol			Ketoconazol			Itraconazol		
	CMI/Visual	CMI/490nm	CFM	CMI/Visual	CMI/490	CFM	CMI/Visual	CMI/490nm	CFM
<i>Candida glabrata</i>	16	8	64	1	0.5	16	0.5	0.5	16
<i>Candida parapsilosis</i>	8	8	>64	0.125	0.03	2	2	2	>16
<i>Candida krusei</i>	64	64	>64	0.25	0.25	16	2	2	>16
<i>Candida tropicalis</i>	8	2	>64	2	0.5	>16	0.25	0.06	>16
<i>Candida albicans</i>	4	1	>64	0.5	0.5	0.06	0.125	0.03	0.5
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	0.5	1	2	0.03	0.03	0.5	0.5	0.25	2
<i>Candida albicans (CC)</i>	4	4	64	2	1	>16	0.5	0.125	>16
<i>Candida guilliermondii (CC)</i>	2	2	32	0.125	0.5	>16	0.03	0.03	0.25
<i>Rhodotorula rubra (CC)</i>	64	64	>64	0.5	0.5	2	8	8	>16

Tabla n° 19: CFM y CMI=µg/mL ; >: CFM mayor que.

Tabla n° 20 Determinación de la susceptibilidad antifúngica en levaduras por medio de CMI obtenidas por lectura espectrofotométrica y la lectura visual a 48hrs.

Organismo	Fluconazol		Ketoconazol		Itraconazol	
	Lectura a 490nm	Lectura Visual	Lectura a 490nm	Lectura Visual	Lectura a 490nm	Lectura Visual
<i>Candida glabrata</i>	S	S-DD	S	I-S	S-DD	S-DD
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	R	R
<i>Candida krusei</i>	R	R	S	S	R	R
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	I-S	S	S-DD
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Cryptococcus neoformans var. gattii</i>	S	S	S	S	S-DD	S-DD
<i>Candida albicans</i> (CC)	S	S	I-S	I-S	S	S-DD
<i>Candida guilliermondii</i> (CC)	S	S	S	S	S	S
<i>Rhodotorula rubra</i> (CC)	R	R	S	S	R	R

Tabla n° 20: S= susceptible; S-DD = susceptible-dosis dependiente; R = resistente; CC=Caso Clínico.

Método M38-A para hongos filamentosos

Resultados de la prueba de microdilución M38-A2 para hongos filamentosos, se muestran las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) obtenidas por medio de lectura visual y espectrofotométricamente, así como las Concentraciones Mínimas Efectivas (CME) y Concentraciones Fungicidas Mínimas (CFM) para cada antifúngico con cada cepa y la determinación de la sensibilidad antifúngica.

Tabla n° 21 Lectura visual a las 48hrs de la prueba de microdilución método M38-A con el antifúngico fluconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL											Control -	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	Control +		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	>64
<i>Aspergillus flavus</i>	1	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	32
<i>Aspergillus niger</i>	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	4	0	64

Tabla n° 21: Lectura visual; 4: Crecimiento = control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; >: CMI mayor a

Tabla n° 22 Lectura de la prueba de microdilución a 490nm; método M38-A con el antifúngico fluconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.402	0.501	0.399	0.396	0.404	0.418	0.398	0.400	0.410	0.385	0.356	0.245	>64
<i>Aspergillus flavus</i>	0.254	0.305	0.325	0.338	0.353	0.345	0.389	0.438	0.415	0.388	0.418	0.207	16
<i>Aspergillus niger</i>	0.367	0.383	0.365	0.346	0.352	0.363	0.342	0.345	0.347	0.352	0.392	0.240	>64

Tabla n° 22: []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL. Ab: absorbancia a una longitud de onda de 490nm.

Tabla n° 23 Lectura visual a las 48 hrs de la prueba de microdilución; método M38-A con el antifúngico ketoconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL										Control -	CMI	
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			Control +
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	2	2	3	3	4	4	4	4	4	0	4
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4	4	0	0.5
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4	4	0	0.5

Tabla n° 23: Lectura visual; 4: Crecimiento = control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + Y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL.

Tabla n° 24 Lectura de la prueba de microdilución a 490nm; método M38-A con el antifúngico ketoconazol.

Organismo	[]antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.301	0.302	0.307	0.347	0.363	0.370	0.408	0.435	0.416	0.471	0.355	0.260	4
<i>Aspergillus flavus</i>	0.271	0.267	0.253	0.249	0.248	0.335	0.311	0.325	0.382	0.400	0.474	0.219	0.5
<i>Aspergillus niger</i>	0.366	0.349	0.334	0.322	0.320	0.373	0.364	0.356	0.336	0.368	0.435	0.253	0.125

Tabla n° 24: []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL. Ab: absorbancia a una longitud de onda de 490nm.

Tabla n° 25 Lectura visual a las 48 hrs de la prueba de microdilución; método M38-A con el antifúngico itraconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL										Control -	CMI	
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03			Control +
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	2	3	4	4	4	4	4	4	0	4
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	2	2	4	4	4	4	4	4	0	4
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	1	2	3	3	4	4	4	4	0	4

Tabla n° 25: Lectura visual; 4: Crecimiento = control +; 3: menor crecimiento 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control +; 1: poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL.

Tabla n° 26 Lectura de la prueba de microdilución a 490nm; método M38-A utilizando con el antifúngico itraconazol.

Organismo	[] antifúngico µg/mL										Control +	Control -	CMI	
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.256	0.261	0.248	0.269	0.276	0.448	0.328	0.338	0.332	0.402	0.281	0.220	0.220	8
<i>Aspergillus flavus</i>	0.219	0.213	0.213	0.260	0.271	0.363	0.375	0.431	0.431	0.443	0.449	0.202	0.202	2
<i>Aspergillus niger</i>	0.298	0.275	0.274	0.272	0.310	0.330	0.306	0.594	0.352	0.343	0.325	0.208	0.208	>16

Tabla n° 26: []: Concentración µg/mL. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL. Ab: absorbancia a una longitud de onda de 490nm; >: CMI mayor a

Tabla nº 27 Determinación de la CMI, CMF y CME para especies de *Aspergillus*.

Organismo	Fluconazol			Ketoconazol			Itraconazol					
	CMI/ 490nm	CMI/ Visual	CFM	CME	CMI/490nm	CMI/ Visual	CFM	CME	CMI/ 490nm	CMI/ Visual	CFM	CME
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>64	>64	>64	>64	4	4	8	4	8	4	2	2
<i>Aspergillus flavus</i>	16	32	>64	>64	0.5	0.5	2	0.5	2	4	2	2
<i>Aspergillus niger</i>	>64	64	>64	64	0.125	0.5	1	1	>16	4	2	2

Tabla nº 27: >: mayor que. CMI: concentración mínima inhibitoria µg/mL; CME: Concentración mínima efectiva µg/mL; Con Itraconazol las hifas se observan de un mayor tamaño y con deformaciones (figura nº 5); con ketoconazol y fluconazol se encuentran hifas cortas y abundantes; CFM: Concentración fungicida mínima.

8.0. DISCUSIÓN

El método M27-A2, es un procedimiento estandarizado para el estudio de la sensibilidad antifúngica en levaduras y es una buena alternativa para brindar una guía para instaurar la terapia, al comparar los resultados de las pruebas realizadas con las diferentes levaduras empleadas ver tabla n° 8, El antifúngico con mayor espectro de acción y efectividad contra cualquiera de estas levaduras, del genero *Candida*, salvo *Candida krusei* pero si contra *Cryptococcus neoformans var. gatti*, es el fluconazol, ya que resultaron sensibles a este fármaco cepas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 1-8µg/mL (tabla n° 12), y aunque con ketoconazol resultaron sensibles algunas de estas levaduras (tabla n° 20), se descartaría su utilización ya que es sumamente toxico y su distribución en el SNC es baja⁴, dato importante, si el tratamiento es para combatir meningitis, por ejemplo, contra *Cryptococcus neoformans*, donde la utilización de fluconazol es más exitoso, ya que la concentración del fármaco en LCR se aproxima a un 70% de la concentración simultanea en sangre⁴, además el ketoconazol es un fármaco de elección para hongos que ocasionan infecciones endémicas como Histoplasmosis⁴, también se descarta el posible tratamiento con Itraconazol, ya que resulto ineficaz contra algunas levaduras (tabla n° 20) y su distribución en LCR es limitada⁴; en el caso de *C. krusei* y *Rhodotorula rubra*, el ketoconazol es el único que muestra eficacia en la prueba "In Vitro" (tabla n° 20).

El método M27-A2 recomienda la lectura a las 48 horas, ya que no existen grandes diferencias al determinar la sensibilidad o resistencia entre una lectura a las 24 horas y otra a las 48 horas en la mayoría de las cepas; y esto se observa si

se comparan las tablas de la lectura visual a las 24 horas con la lectura visual a las 48 horas de cada antifúngico (tablas n° 10,11; 13,14; 16,17); la razón de determinar las dos lecturas es que algunos aislamientos (aproximadamente el 5%), tienen diferencias entre sus CMI a las 24 horas y a las 48 horas¹⁷, esto ocurre ya que presentan una inhibición parcial del crecimiento, que ocasiona

aumento en el rango del antifúngico y por lo tanto, se observa a las 24 horas una sensibilidad bien definida (tabla nº 10, 13, 16) a este fenómeno se le denomina de “arrastre” ; por esta diferencia entre las lecturas (Visual 24 horas o visual 48 horas), no se conocía cual de las dos se debería tomar en cuenta, en las tablas nº 10 con 11; 13 con 14 y 16 con 17, se observa este fenómeno de arrastre donde efectivamente nos marca una inhibición parcial del crecimiento, se ha demostrado por medio de experimentos en animales con candidiasis¹⁷ que levaduras con fenómeno de arrastre resultan ser sensibles; como lo indicaría la lectura visual a las 24 horas; por lo tanto uno de los objetivos de realizar la lectura a las 24 horas además de observar la ausencia de contaminación es la posible presencia de cepas con el fenómeno de arrastre.¹⁷

Uno de los mayores problemas al realizar una lectura visual, es el error técnico; la automatización del método es una buena opción para aumentar su efectividad, algunos autores recomiendan seguir realizando la lectura visual (identificar cepas con fenómeno de arrastre) y comparar los resultados de la lectura visual a las 48 horas con la espectrofotométrica (no debe de existir una variación mayor de dos pozos) y así tener mejor control de la prueba y mayor facilidad de detección de error²¹, al comparar las tablas nº 11 con 12; 14 con 15 y 17 con 18, nos damos cuenta de la variación que existe entre la lectura visual a las 48 horas y la lectura espectrofotométrica, está no es más de dos pozos, pero si existe variación, tomando la lectura espectrofotométrica como obtención de datos más exactos.

En la prueba de sensibilidad antifúngica con fluconazol (tabla nº 10), las cepas *C.parapsilosis* y *C. guillermondii*, presentaron el fenómeno de arrastre determinando sin problema su sensibilidad hacia este fármaco ya que en la lectura visual a las 48 horas y espectrofotométrica son también sensibles (tabla nº 11, 12, 19 y 20), *C. glabrata* presentó fenómeno de arrastre, y en la lectura espectrofotométrica se indica que es una levadura sensible a fluconazol (tabla nº 12); *C. krusei* es resistente al fluconazol (tabla nº 20); en la literatura se

reporta la insensibilidad de *C. krusei* hacia el Fluconazol¹⁷; las demás cepas de *Candida* son sensibles al fármaco.

La *Rhodotorula rubra* (determinando su resistencia por medio de los puntos de corte para las especies de *Candida*), resultó resistente al fármaco (tabla nº 19 y 29), en pruebas de sensibilidad “*In Vitro*” indican que la *Rhodotorula* alcanza CMI mayores de 100µg/mL para fluconazol .^{5, 28}

La cepa de *Cryptococcus neoformans* es sensible al fluconazol (tablas nº 19 y 20).

Con Ketoconazol se presentaron tres cepas con fenómeno de arrastre (*C. glabrata*, *C. parapsilosis* y la *C. albicans*) ver tabla nº 13, estas cepas son sensibles al fármaco (tabla nº 19 y 20) obteniendo CMI bajas en la lectura espectrofotométrica confirmando la sensibilidad, en la detección de sensibilidad con ketoconazol hay un rango que indica sensibilidad intermedia (i), donde no se sabe si el tratamiento llegue a tener grandes posibilidades de éxito como el rango de concentración que indica sensibilidad, las cepas que presentaron esta sensibilidad intermedia es *Candida albicans* de caso clínico (tabla nº 20) en la lectura espectrofotométrica. Todas las demás cepas son sensibles, (tabla nº 19 y 20); aunque en la lectura visual a 48 horas (tabla nº 14) se determina a *C. glabrata* como sensibilidad intermedia, la lectura espectrofotométrica la detecta como una cepa sensible, teniendo una diferencia de un pozo (tabla nº 14 y15), y además es una cepa que presentó fenómeno de arrastre (tabla nº 13), por lo tanto se toma en cuenta el método espectrofotométrico; el *Cryptococcus neoformans* y la *Rhodotorula* resultaron sensibles al fármaco, en el caso de la *Rhodotorula*, existen datos de sensibilidad “*In Vitro*” en donde es sensible a los imidazólicos.⁵

Con Itraconazol resultaron dos cepas resistentes *C. parapsilosis*, *C. krusei* y la *Rhodotorula rubra*, coincidiendo perfectamente con la lectura visual a las 48 horas y espectrofotométrica (tablas nº 19 y 20); en sensible dosis dependiente se encuentran *C. glabrata* y *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (ver tablas 19 y 20), determinando como cepa sensible a *C. tropicalis*, *C. guillermondii*, y las dos cepas de *C. albicans*.

Con Itraconazol en las pruebas de sensibilidad “*In Vitro*”, este antifúngico tiene poca actividad contra *Rhodotorula*, encontrándose CMI mayores de 4µg/mL (tabla 15r y 16r).^{5,2/8}

Los fármacos antifúngicos pueden ser fungicidas o fungistáticos en determinada concentración, por lo tanto para un apoyo más al tratamiento, se determina la concentración fungicida mínima (CFM) a cada cepa (tabla nº 19).²¹

la CFM de Fluconazol con *Cryptococcus neoformans*, se encuentra en 2 µg/mL, siendo su CMI (490nm) de 1µg/mL, teniendo una buena relación entre la concentración del fármaco donde no se presenta crecimiento, CFM y la concentración que ocasiona un 50% de inhibición del crecimiento, CMI, ver tabla nº 19; así se observa, para cada antifúngico y cada cepa, una relación congruente entre su CMI y la CFM, los dos datos importantes para la guía en la instauración del tratamiento antifúngico.¹⁷

Hay que recordar que la CMI es un valor predictivo de la respuesta clínica al tratamiento y se deben de considerar varios puntos.²¹

- 1.- La CMI no es una medida química o física.
- 2.- Los factores del huésped pueden variar la correlación in Vitro e in vivo.
- 3.- no es necesariamente indicativo de éxito una determinación CMI que indique sensibilidad in Vitro.
- 4.-La resistencia in Vitro pronostica con frecuencia un fracaso terapéutico.

El tratamiento de la candidiasis está basado en el empleo racional de antimicóticos azólicos; principalmente fluconazol (*excepto C. krusei*), pero se ha observado para estos antifúngicos azólicos un aumento de la resistencia y se han descrito aislamientos clínicos de candida resistentes “*In Vitro*” a ketoconazol, fluconazol y al itraconazol.¹⁹

En la prueba de sensibilidad “*In Vitro*” para los hongos filamentosos, método M38-A, no se presento ningún problema para la determinación de la lectura

visual y se correlaciona bien con la lectura espectrofotométrica (tabla nº 27), Lo que puede complicar la determinación de la CMI es el fenómeno de “arrastre” y la acción fungistática de algún fármaco; este método M38-A no incluye todavía a los Dermatofitos.¹⁶

Para los hongos filamentosos no existen puntos de corte como los puntos de corte existentes para las levaduras (anexo nº 4)¹⁶, por lo tanto los únicos datos que pueden ayudar a identificar un posible tratamiento es la CMI, CFM y la concentración mínima efectiva (CME).

Analizando la tabla nº 27, se descarta como posible terapia para una Aspergilosis el fluconazol, al tener CMI mayores de 64, en 64 y 32µg/mL, los hongos filamentosos usualmente no son susceptibles a este fármaco y sus CMI se encuentran en rangos mayores a 64 µg/mL¹⁶; el Ketoconazol que muestra CMI menores al fluconazol, es sumamente tóxico y no se han determinado puntos de corte o una relación confiable entre CMI con el resultado clínico¹⁶, el itraconazol es el azol que podría constituir el tratamiento salvo con *A. niger*, el cual se detectó una CMI mayor a 16 (tabla nº 27) basándose que existe una relación de resistencia con CMI mayores a 8 µg/mL¹⁶.

En la Aspergilosis la Anfotericina B es el agente de elección para iniciar el tratamientoⁱ, pero la respuesta terapéutica con la anfotericina B en pacientes inmunocomprometidos es muy pobre y el Itraconazol es el único azol que aparenta ser una alternativa al tratamiento contra la aspergilosis.¹⁴

Se ha observado que el Itraconazol es un buen tratamiento para infecciones pulmonares ocasionadas por *Aspergillus sp* y en transplantes de órganos, pero tiene una menor respuesta en pacientes con SIDA.¹⁹

El Itraconazol es el único azol que puede considerarse en un tratamiento de profilaxis contra aspergilosis.¹⁴

Entre las infecciones sistémicas graves causadas por hongos patógenos, aparecen en segundo lugar, después de las infecciones por *Candida*, la aspergilosis; donde *Aspergillus fumigatus* es el responsable de más del 90% en infecciones invasivas en humanos; y la Anfotericina B e Itraconazol son los fármacos adecuados para este tratamiento.¹⁴

En cuanto a la especie, el *Aspergillus fumigatus* es el principal patógeno y en seguida se ubica *A. flavus*, *A. niger*, y el *A. terreus*, estas cuatro especies son las que generalmente ocasionan enfermedad al ser humano.¹⁴

Para obtener mayor información acerca de la resistencia o sensibilidad de alguna cepa se puede determinar la CFM y la CME.

La CFM es la concentración del antifúngico que inhibe un 99-99.5% esto es para hongos levaduriformes, pero en el caso de los hongos filamentosos es el 100% de inhibición del crecimiento, así que se puede distinguir la concentración fungicida a una concentración fungistática como podría ser la CMI, la CME²¹ indica la concentración del antifúngico que ocasiona una mal formación de las hifas (tabla nº 27).

La CMF, CME y CMI son datos de apoyo para tener éxito en la terapia antifúngica, ayudando a elegir el cambiar el tratamiento, aumentar la dosis o hasta disminuirla.

Todo este estudio de la sensibilidad a los antifúngicos otorga una guía para iniciar la terapia antifúngica²; se van recopilando información epidemiológica de infecciones micóticas en las cuales algunas especies se caracterizan por ser sensibles o resistentes a un cierto antifúngico; por ningún motivo se iniciaría o cambiaría a Fluconazol el tratamiento en un paciente con micosis ocasionada por *Candida krusei*.

Las pruebas de sensibilidad antifúngica tienen una mayor utilidad en determinados casos; la importancia de determinar la sensibilidad antifúngica a especies que ocasionan micosis en pacientes que tuvieron un tratamiento

profiláctico, o especies poco frecuentes, o cuando ya haya ocurrido un fracaso terapéutico.

La recopilación de información acerca de la sensibilidad o resistencia de cada hongo aislado de un caso clínico es elemental, para mantener y verificar que se lleva un buen control en el manejo de los fármacos antifúngicos.

La ventaja en la utilización del método M27-A2 y M38-A, es que son los métodos de referencia en el estudio de sensibilidad a los antifúngicos y aunque existan muchas clases de técnicas comerciales para realizar estudios de sensibilidad *"In Vitro"* a los hongos, estos métodos comerciales tienen que tener una buena correlación con el M27-A2 y M38-A; las técnicas comerciales que han demostrado una mayor concordancia con el NCCLS es el Sensititre Yeast One, el ASTY y el Fungitest, estos métodos están basados en la microdilución con un contraste colorimétrico, otro método es el E-test, un método basado en difusión del antifúngico en el agar.⁷

9.0. CONCLUSIONES

1.- Se aplicaron las pruebas de sensibilidad a antifúngicos utilizando el procedimiento descrito en los documentos de referencia internacional NCCLS M27-A2 para levaduras y M38-A para hongos filamentosos.

2.- Se aplicó la prueba del NCCLS documento M27-A2 para el estudio de sensibilidad antifúngica en levaduras, identificando varias cepas de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*, como sensibles o resistentes “*In Vitro*” a tres diferentes antifúngicos azólicos, eligiendo el posible tratamiento a seguir contra una infección micótica sistémica ocasionada por alguna de estas cepas.

3.- Se aplicó la prueba del NCCLS documento M38-A para el estudio de sensibilidad antifúngica identificando varias cepas del género *Aspergillus*, como hongos sensibles o resistentes “*In Vitro*” a tres diferentes antifúngicos azólicos, eligiendo el posible tratamiento a seguir contra una infección micótica sistémica ocasionada por alguna de estas cepas.

4.- Se aplicó la prueba de sensibilidad antifúngica M27-A2 para levaduras en tres casos clínicos donde fue aislada *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* y *Rhodotorula rubra*, identificando su sensibilidad en las dos especies de *Candida* con fluconazol e itraconazol, mostrando al ketoconazol como sensible o resistente dependiendo de la dosificación y el tipo de infección micótica y la sensibilidad de la cepa de *Rhodotorula rubra* hacia ketoconazol siendo resistente a fluconazol e itraconazol.

5.- Es recomendada la aplicación de los métodos M27-A2 para levaduras y M38-A para hongos filamentosos, para establecer la sensibilidad a antifúngicos, el seguimiento del tratamiento y para evaluar la actividad antifúngica de nuevos compuestos.

10.0. ANEXO N° 1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK

- Antifúngicos solubles en agua el diluyente utilizado es el medio RPMI 1640 (tabla n° 28)
- Antifúngicos insolubles en agua el diluyente utilizado es el Dimetil sulfóxido (DMSO) (tabla n° 28)

Tabla n° 28* Solubilidad de los antifúngicos

Antifúngico	Diluyente
Anfotericina B	DMSO
Ketoconazol	DMSO
Itraconazol	DMSO
Posaconazol	DMSO
Ravuconazol	DMSO
Variconazol	DMSO
Fluconazol	RPMI-1640
Flucitosina (5-FC)	RPMI-1640
DMSO: Dimetil sulfóxido	

* Documento NCCLS M27A2 y M38-A

Para los antifúngicos insolubles en agua se pesaron 16mg de reactivo puro (Ketoconazol e Itraconazol) en 10mL de DMSO obteniendo una concentración de 1600µg/mL.

Para los antifúngicos solubles en agua se pesaron 6.4 mg de reactivo puro (Ketoconazol e Itraconazol) en 10mL de RPMI obteniendo una concentración de 640µg/mL.

10.1. ANEXO nº 2 PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LOS ANTIFÚNGICOS.

Antifúngicos insolubles en agua

Para antifúngicos insolubles en agua, de la solución stock se realiza una serie de diluciones con DMSO (tabla nº 29), de esta serie de diluciones a cada solución se diluye con RPMI (Tabla nº 29), obteniendo una concentración 100% mayor a la utilizada en la prueba.

Tabla nº 29* Diluciones realizadas para los antifúngicos insolubles en agua

TUBO nº	[] Antifúngico	Solución	Vol. de la solución (mL)	DMSO (mL)	[] _i	mL de la [] _i	Vol. RPMI mL	[] final
1	1600	Stock**	0	0	1600	0,04	1,96	32
2	1600	Stock	0,5	0,5	800	0,04	1,96	16
3	1600	Stock	0.25	0.75	400	0,04	1,96	8
4	1600	Stock	0.25	1.75	200	0,04	1,96	4
5	200	Tubo 4 [] _i	0,5	0,5	100	0,04	1,96	2
6	200	Tubo 4 [] _i	0,25	0.75	50	0,04	1,96	1
7	200	Tubo 4 [] _i	0,25	1.75	25	0,04	1,96	0,5
8	25	Tubo 7 [] _i	0,5	0,5	12,5	0,04	1,96	0,25
9	25	Tubo 7 [] _i	0.25	0.5	6,25	0,04	1,96	0,125
10	25	Tubo 7 [] _i	0.25	0.75	3,12	0,04	1,96	0,06
11	12,5	Tubo 8 [] _i	0.25	1.75	1,6	0,04	1,96	0,032

*Documento NCCLS M27-A2 y M38-A

**Pesar 16mg en 10 mL de DMSO.

DMSO: Dimetil sulfóxido grado analítico; [] : Concentración expresada en µg/mL; Vol.: Volumen; []_i : Concentración intermedia expresada en µg/mL.

Antifúngicos solubles en agua

Para antifúngicos solubles en agua, de la solución stock se realiza una serie de diluciones con RPMI (Tabla nº 30), obteniendo una concentración 100% mayor a la utilizada en la prueba.

Tabla 30* Diluciones realizadas para los antifúngicos solubles en agua para el método del NCCLS documento M27-A2 para levaduras y M38-A para hongos filamentosos

TUBO nº	[] Antifúngico	Solución	Vol. de la solución (mL)	RPMI (mL)	[]i	[] Final
1	640	Stock**	0.2	0.8	128	128
Tubo nº	[]i	Vol. []i mL	Vol. RPMI mL	[] Final		
2	Stock	0.2	1.8	64		
3	64	0,5	0,5	32		
4	64	0,5	1,5	16		
5	16	0,5	0,5	8		
6	16	0,25	0,75	4		
7	16	0,25	1,75	2		
8	2	0,5	0,5	1		
9	2	0,25	0,75	0,5		
10	2	0,25	1,75	0,25		
11	0,25	1	1	0,125		
12	0,125	1	1	0,0625		

* Documento NCCLS M27-A2 y M38-A

**Pesar 6.4mg en 10mL de medio RPMI-1640

DMSO: Dimetil sulfóxido grado analítico; []: Concentración expresada en µg/mL;

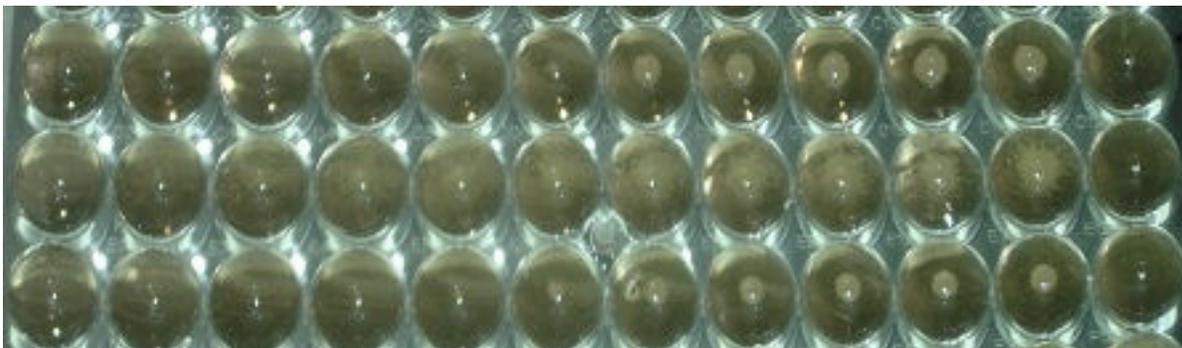
Vol : Volumen; []i : Concentración intermedia expresada en µg/mL.

10.2. ANEXO N° 3 LECTURA DE LOS RESULTADOS MÉTODO M27-A2

Se lee la placa a las 24 y 48 horas en la lectura visual, con apoyo de un espejo invertido y a 48 horas la lectura espectrofotométrica; generalmente se observa un acumulo de levadura en forma de botón al fondo del pozo pero hay levaduras que crecen en puntos aislados, para evitar errores se agito el pozo con un palillo estéril para asegurar que hay crecimiento (imagen n° 7).

1. Se observo el pozo control + (Sin antifúngico) y el pozo control – (Sin inocular) y se procedió a la lectura (si en el pozo control + hay crecimiento y en el negativo está libre de cualquier contaminante, se procede a la lectura).
2. El crecimiento en los pozos es comparado con el control + y se asigna un número de la siguiente manera:
 - 4.- ninguna reducción del crecimiento. ++++
 - 3.- ligera reducción del crecimiento o que contiene un 75% de crecimiento comparada con el control. +++
 - 2.- una prominente reducción del crecimiento un 50% comparada con el control de crecimiento. ++
 - 1.-poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. +
 - 0.- completamente claro, sin ningún crecimiento. 0

Imagen nº 7 Ejemplo del tipo de crecimiento que se presenta en la microplaca. El control negativo se encuentra en el lado derecho y el positivo es segundo pozo del lado derecho.



- Se realizó la lectura espectrofotométrica, longitud de onda de 490nm a las 48 horas de incubación, homogenizando con palillos estériles cada pozo con crecimiento.

CMI (Concentración mínima inhibitoria)

- La CMI para los azoles corresponde el primer pozo, que presenta una inhibición del crecimiento mayor o igual al 50% comparándola con el pozo control de crecimiento.

Para Determinar la CMI cuando se obtienen las absorbancia; se resta la lectura de absorbancia del pozo control positivo menos la lectura del pozo control negativo; y después se multiplica por 0.5, si es el 50% de inhibición del crecimiento o 0.1 si es el 100% de inhibición del crecimiento y para finalizar se suma el C- y se compara el resultado con las absorbancias obtenidas, determinándose la CMI.

10.3. ANEXO N° 4 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS MÉTODO M27-A2

CMI (Concentración mínima inhibitoria)

- La CMI para los azoles corresponde el primer pozo, que presenta una inhibición del crecimiento mayor o igual al 50% comparándola con el pozo control de crecimiento.

Al obtener la Concentración mínima inhibitoria se determina si la levadura es resistente o no al fármaco (tabla n° 31), por medio de los puntos de corte.

Puntos de corte

Los puntos de corte son rangos de concentraciones de un cierto antifúngico, indicándonos por medio de la CMI, cuales cepas son sensibles o resistentes; están establecidos por medio de estudios con cepas obtenidas de pacientes con sida o candidiasis orofaríngea o en neutropénicos con candidemia o candidiasis sistémica; se han determinado para fluconazol, Itraconazol y flucitosina.^{17,21}

Los puntos de corte son un apoyo para elegir un tratamiento de otro y así poder ahorrar tiempo y posibles complicaciones para el paciente como estar dosificando un antifúngico el cual no tiene actividad contra la especie involucrada en la infección.²¹

Tabla n° 31 Intervalos para la determinación de susceptibilidad para candida spp

Antifúngico	Susceptible (S)	Susceptible-Dosis dependiente (S-DD)	intermedio (I)	Resistente ®
Anfotericina B	≤ 1			>1
Fluconazol	≤ 8	16-32		≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-5		≥ 1
Ketoconazol	≤ 0,5		1	≥ 2
Flucitosina	≤ 4		8,0-16	≥ 32
Documento NCCLS M27-A2				
Los puntos de corte están expresados en µg/mL				
C. <i>krusei</i> es resistente a Fluconazol.				
Se obtuvieron los puntos de corte para fluconazol con pacientes que sufrían infecciones en las mucosas, pero hay poca información con respecto a infecciones invasivas.				
Los puntos de corte para itraconazol se obtuvieron de enfermos con infecciones en las mucosas no infecciones invasivas				
por lo tanto los puntos de corte para itraconazol no son aceptables para infecciones invasivas.				

CFM (Concentración fungicida mínima)

Después de la incubación de 48 horas, se tomaron del ultimo pozo que dio positivo (crecimiento mínimo) en la microplaca 10 μ L de inóculo y de los tres pozos siguientes, que muestran visualmente una inhibición del crecimiento completa, se cultivan en SDA e incuban a 35 ó 28 °C (según el hongo) de 3 a 4 días (imagen nº 8).

La Concentración fungicida mínima es la menor concentración del antifúngico que no muestra crecimiento o este es inferior a las tres colonias. La cual corresponde a 99-99.5% de la actividad fungicida; por lo tanto en la placa de SDA que no exista crecimiento o este inferior a tres colonias corresponderá al pozo con la concentración de antifúngico que es fungicida (imagen nº 8).

Imagen nº 8



Determinación de la CFM de Itraconazol con *Candida glabrata*;
donde la CFM corresponde al nº 3 con inhibición completa del crecimiento.

10.4. ANEXO N° 5 LECTURA DE RESULTADOS PARA EL MÉTODO M38-A

Se lee la placa a las 24 y 48 horas en la lectura visual, con apoyo de un espejo invertido y a 48 horas la lectura espectrofotométrica, para evitar errores en ambas lecturas, se agito el pozo con un palillo estéril para asegurar que hay crecimiento (imagen n° 9).

Se observo el pozo control + (Sin antifúngico) y el pozo control – (Sin inoculo) y se procedió a la lectura (si en el pozo control + hay crecimiento y en el negativo está libre de cualquier contaminante, se procede a la lectura).

El crecimiento en los pozos es comparado con el control + y se asigna un número de la siguiente manera:

- 4.- ninguna reducción del crecimiento. ++++
- 3.- ligera reducción del crecimiento o que contiene un 75% de crecimiento comparada con el control. +++
- 2.- una prominente reducción del crecimiento un 50% comparada con el control de crecimiento. ++
- 1.-poco crecimiento tan solo el 25% del crecimiento del control. +
- 0.- completamente claro, sin ningún crecimiento. 0

Imagen n° 9

Prueba sensibilidad antifúngica M38-A para *Aspergillus fumigatus* con Itraconazol.



Se realizó la lectura espectrofotométrica, longitud de onda de 490nm a las 48 horas de incubación, homogenizando con palillos estériles cada pozo con crecimiento

CMI (Concentración mínima inhibitoria)

- La CMI para los azoles (Tabla n° 32) corresponde el primer pozo, que presenta una inhibición del crecimiento mayor o igual al 50% comparándola con el pozo control de crecimiento.

Tabla n° 32 CMI de antifúngico para hongos filamentosos

Antifúngico	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Observaciones
Anfotericina B	0,5-2,0 / 2-16	bien definidos es la concentración con inhibición completa del crecimiento
Flucitosina	>64 no susceptible	concentración que inhiba un 50% o menos de crecimiento
Fluconazol	>64 no susceptible	concentración que inhiba un 50% o menos de crecimiento
Ketoconazol	0,0313-16	concentración que inhiba un 50% o menos de crecimiento
Itraconazol	0,0313-16	Concentración que inhiba un 100%
Pozaconazol	0,0313-16	Concentración que inhiba un 100%
Ruvaconazol	0,0313-16	Concentración que inhiba un 100%
Variconazol	0,0313-16	Concentración que inhiba un 100%
Documento NCCLS M38-A		

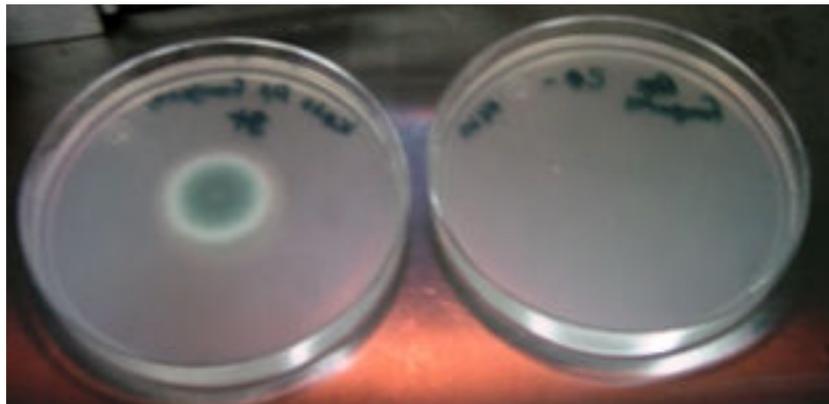
Para Determinar la CMI cuando se obtienen las absorbancia; se resta la lectura de absorbancia del pozo control positivo menos la lectura del pozo control negativo; y después se multiplica por 0.5, si es el 50% de inhibición del crecimiento o 0.1 si es el 100% de inhibición del crecimiento y para finalizar se suma el C- y se compara el resultado con las absorbancias obtenidas, determinándose la CMI.

CFM (Concentración fungicida mínima)

Después de la incubación de 48 a 72 hrs (dependiendo del hongo), se tomaron 10 μ L de medio del ultimo pozo que dio positivo (crecimiento mínimo) en la microplaca y de los tres pozos siguientes, que muestran visualmente una inhibición del crecimiento completa, se cultivan en SDA e Incuban a 35 ó 28°C (según el hongo) de 3 a 4 días (imagen n°10).

La Concentración fungicida mínima es la menor concentración del antifúngico que no muestra crecimiento; por lo tanto en la placa de SDA que no exista crecimiento corresponderá al pozo con la concentración de antifúngico que es fungicida (imagen n° 10).

Imagen n° 10. Determinación de la CFM de Ketoconazol en *Aspergillus fumigatus*



Placa izquierda: crecimiento de *A. fumigatus* en el ultimo pozo con crecimiento positivo; placa derecha: sin crecimiento del hongo, inculo tomado del primer pozo sin crecimiento positivo, donde se observa la acción fungicida del antifúngico.

CME Concentración mínima efectiva

Es la menor concentración del antifúngico que ocasiona un crecimiento anormal de las hifas con ramificaciones cortas y abundantes.

1. Tomar 10 μL en un portaobjeto de cada pozo que muestra inhibición del crecimiento comparando con el control positivo.
2. Añadir una gota de azul de algodón, cubrir y observar a 10X y 40X. Comparar el crecimiento con el pozo control positivo.

10.5. ANEXO Nº 6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS MÉTODO M38-A

CMI (Concentración mínima inhibitoria)

Flucitosina y Fluconazol tienen CMI mayores a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$; por lo tanto los hongos filamentosos no son muy susceptibles a este antifúngico.

Para Ketoconazol las CMI se encuentran en 0.0313 - 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para los nuevos triazoles e Itraconazol CMI mayores a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se asocian con resistencia clínica.

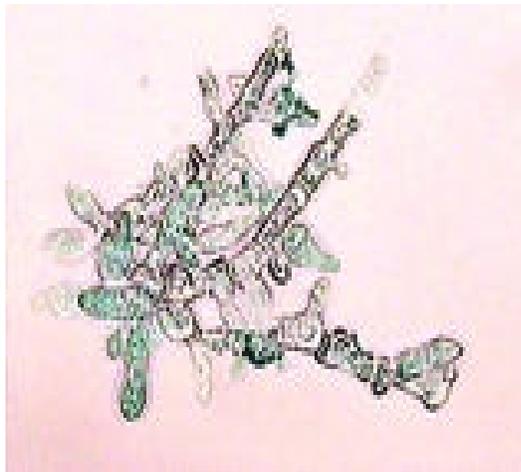
(CFM) Concentración Fungicida Mínima

No se han determinado los puntos de corte para estos fármacos con infecciones por hongos filamentosos, pero si se han realizado estudios por parte de varios investigadores para obtener información con respecto a las CMI obtenidas y su relación en la terapia antifúngica; por lo tanto la CFM es útil como apoyo terapéutico, para la dosificación o elección del tratamiento.

(CME) Concentración Mínima Efectiva

Es la menor concentración del antifúngico que ocasiona un crecimiento anormal de las hifas con ramificaciones cortas y abundantes, se toma una muestra de todos los pozos que muestran inhibición de crecimiento, se prepara la tinción de azul de algodón y se observa en el microscopio 40X, comparando las hifas con una muestra del control positivo; la CME será la primera concentración que muestre una alteración en la morfología de las hifas. (Imagen n° 11).

Imagen n° 11



Hifas de *Aspergillus niger* alteradas con Itraconazol
Azúl de algodón a 40X

11.0. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

¹ Baró María Teresa Tomás; Tesis Doctoral; Epidemiología de la Cryptococosis en España, caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans.*, Universidad Autónoma de Barcelona, departamento de Genética y Microbiología, Barcelona 2002.

² Cuenca Estrella; Rodríguez Tudela Juan Luis; ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? Rev. Iberoam. Micol; Vol. 19:133-138; 2002.

³ Cure Ruiz MD Nancy y Cardona Zorilla MD Andrés F., Aislamiento de *Rhodotorula sp.* En un paciente críticamente enfermo. Descripción de un caso y revisión de la literatura; Revista de Infectología Vol. 5 nº 3; Pág: 179-182; 2001.

⁴ Diccionario de especialidades farmacéuticas (PLM); 50ª edición; Thomson. México 2004.

⁵ Diekema, B. Petroelje, S.A. Messer, R.J. Hollis y M. A. Pfaller ; Activities of available and investigational antifungal agent against *Rhodotorula* species; Journal of Clinical Microbiology; p. 476-478; Jun. 2005.

⁶ Diomedí P Alexis; Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas; Rev Chil Infect; 21 (2): 89-10; 2004.

⁷ Gadea Ignacio y Cuenca Estrella; Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos; Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; vol. 22; p. 32-39; 2004.

⁸Harold Kalant; Principios de farmacología médica; sexta edición; editorial Oxford; Pág.: 674-681 y 696-699; México D.F. febrero del 2003.

⁹ López M. Rubén, Méndez T. Luis J; Hernández Francisca y Castañón Olivares Rocío; Micología Médica; Trillas; segunda edición; Pág: 12-14; México D.F. mayo del 2004.

¹⁰ Lumbreras Carlos, Lizasoain Manuel y Agudo José María; Antifúngicos de uso sistémico; Enferm Infecc Microbiol Clin;21(7):366-80; 2003.

¹¹ Malgor L.A; Valsecia M.E; Farmacología Médica; Vol. 3; Pág: 61-70; Argentina 2003.

¹² Martínez Fernández Carlos Alberto; Carnoturía José, Castro Arenas Raúl; et. al. Tratamiento de las micosis profundas, estado actual; ACTA MEDICA; 8(1):80-5; 1998

¹³ Mazuelos Martín Estrella, Cantón Lacasa Emilia y Espinel – Ingroff Ana; Otros métodos para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos; Revista Iberoamericana de Micología; capítulo 2, Págs.: 1-8; 2001

¹⁴ Meletiadis Joseph, Mouton Johan W., Jacques F.G.M. Meis, et. Al. Comparison of spectrofotometric and visual reading of NCCLS method and evaluation of a colorimetric method based on reduction of a soluble tetrazolium salt, for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species; Journal of Clinical Microbiology; Vol.39, Num 12; Pág:4256-4263; 2001

¹⁵Melnick y Aldelberg; Microbiología médica de Jawetz; Manual moderno, 17^a edición en español; páginas: 661-695; México D.F., 2002.

¹⁶ National Committee for Clinical Laboratory Standard; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility testing of Filamentous fungi; approved Standard-second edition: M38-A; vol.22; n° 16; 2002.

¹⁷ National Committee for Clinical Laboratory Standard; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility testing of Yeasts; approved Standard-second edition: M27-A2; vol.22; nº 15; 2002.

¹⁸Reyes F., Godoy P., Silva IR; Brevis P; Actividad In Vitro de 5 antifúngicos contra aislados clínicos y ambientales; Rev. Ciencia y Trabajo, año 7, número 15, enero/marzo 2005.

¹⁹ Sheeham Daniel; Hitchcock Christopher A. y Sibley Carol M; Current and Emerging Azole Antifungal Agents; Clinical Microbiology Reviews; Jun. 1999, p. 4-79; American Society of Microbiology.

²⁰ Silva Lizama Eduardo; Antifúngicos del futuro; Med Cutan Iber Lat Am; 32(6):231-242; 2004