



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE LEVADURAS Y HONGOS
FILAMENTOSOS MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR: COMPARACIÓN
DE TRES MEDIOS DE CULTIVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

RIOS ARROYO ARACELI

ASESORES:

DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

MICROB. ESP. AMPARO LONDOÑO OROZCO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2008



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.

DEDICO ESTE TRABAJO A:

Mi mamá Juana Arroyo Soto por alumbrar mi vida, por su amor y paciencia

Mi papá Aldegundo Rios Sánchez por todo su cariño.

Y mis hermanos Juan Elliott y Marco Antonio por tanta fe en mí.

No los defraudare

AGRADECIMIENTOS

Todo trabajo o acto es el cumulo de esfuerzos conjuntos, no estamos solos en esta vida y nos necesitamos los unos a los otros. Por eso quiero brindar en estas líneas mi agradecimiento y reconocimiento a todos esos seres que me apoyaron en alguna u otra forma hasta poder llegar al final de esta tesis.

En primer lugar a Dios por su gran amor y la fortaleza que me ha dado para no desistir ante las adversidades.

A mi patria, mí querido México por ser tan maravilloso porque en este país he tenido la oportunidad de lograr muchos de mis sueños.

A las escuelas donde me he formado, principalmente a la UNAM y a la FES Cuautitlán porque en sus aulas y laboratorios aprendí a conocer valorar mas a la ciencia que nos rodea

A todos los profesores que han participado en mi formación, porque me han dado muchas herramientas para tener un pensamiento analítico y reflexivo y de este modo lograr un aprendizaje significativo.

A mis asesores el profesor Tonatiuh y la profesora Amparo por todo su apoyo y confianza.

A las personas que me permitieron utilizar su equipo y/o material de laboratorio el Sr. Martín, la Dra. Clara Inés Alvarez, Nachito y Epy; gracias a ellos pude avanzar rápidamente en la obtención de resultados.

A mis sinodales las profesoras Susana, Carolina y Guadalupe así como al profesor Enrique por revisar con atención mi trabajo de tesis y brindarme todas sus observaciones para obtener un trabajo de mejor calidad.

A aquellas personas que siempre me brindaron su aceptación y una sonrisa constante haciéndome más placentero el trabajo en el laboratorio como Marco, Chelo y la profesora Susy en campo 4 y Alex, Yola, Nely, Mitzeli y el profesor Gerardo en campo 1.

A los compañeros con los que compartí las aulas y laboratorios porque todos en su momento me brindaron parte de si para enriquecerme como persona.

A mis amigas Abigail, Arlette, Caty, Claus, Angy por ser eso mis amigas, y darme la fortuna de saber que cuento con ellas.

A Israel por ser tan buen amigo y compañero, por darme muchos tips para mejorar en el aspecto profesional, gracias por todo su apoyo.

A una persona muy especial que siempre estuvo a mi lado para darme animo y consejos, David.

Se agradece el apoyo económico a la DGAPA-UNAM Proyecto PAPIIT
IN 202105-3

“Evaluación antifúngica de nuevos compuestos”

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Generalidades	2
1.2 Clasificación de los hongos	4
1.3 Capacidad patógena de los hongos	8
1.3.1 Micetismo	8
1.3.2 Micotoxicosis	8
1.3.3 Alergias	8
1.3.4 Infecciones	8
1.4 Los hongos como agentes infecciosos	9
1.5 Fármacos antifúngicos	11
1.5.1 Evolución histórica de los antifúngicos	11
1.5.2 Clasificación de antifúngicos	11
1.5.3 Descripción de algunos antifúngicos según su sitio de acción	13
1.5.4 Mecanismos de resistencia a los antifúngicos	20
1.6 Pruebas “ <i>in vitro</i> ” de sensibilidad	22
1.6.1 Métodos de referencia para levaduras	22
1.6.2 Métodos de referencia para hongos filamentosos	23
1.6.3 Sensititre YeastOne®	23
1.6.4 Neo-sensitabs™	24
1.6.5 Etest®	24
1.6.6 ASTY colorimetric panel® y Fungitest®	25
1.6.7 Difusión en agar	25
1.7 Justificación	26
1.8 Hipótesis	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo General	29
2.1.1 Objetivos particulares	29
3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	30
3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR PARA LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS EN BASE AL DOCUMENTO M44-A (CLSI antes NCCLS, 2004)	33

3.1.1 Preparación de inóculo	34
3.1.2 Preparación de discos	34
3.1.3 Montaje de prueba	36
3.1.4 Lectura de la prueba de difusión en agar	37
3.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA PARA LEVADURAS EN BASE AL DOCUMENTO M27-A2 DEL CLSI (NCCLS, 2002)	37
3.2.1 Preparación del inóculo	38
3.2.2 Preparación de diluciones del antifúngico	38
3.2.3 Montaje de prueba de microdilución	41
3.2.4 Lectura de las microplacas	41
3.3 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA PARA HONGOS FILAMENTOSOS EN BASE AL DOCUMENTO M38-A DEL CLSI (NCCLS, 2002)	42
3.3.1 Preparación de inóculo	42
3.3.2 Preparación de diluciones de antifúngicos	43
3.3.3 Montaje de prueba	43
3.3.4 Lectura de microplaca	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Resultados de prueba de difusión en agar en base al documento M44-A (CLSI/NCCLS, 2004)	46
4.2 Resultados de prueba de microdilución	52
5 DISCUSIÓN	55
6 CONCLUSIONES	59
7 ANEXOS	61
7.1 Preparación de medios de cultivo	62
7.2 Preparación de soluciones	64
7.3 Datos totales obtenidos al efectuar la prueba de difusión en agar siguiendo las recomendaciones del documento M44-A del CLSI (NCCLS, 2002)	65
7.4 Datos totales obtenidos al efectuar la prueba de microdilución siguiendo las recomendaciones del documento M27-A2 del CLSI (NCCLS, 2002)	69
7.5 Datos totales obtenidos al efectuar la prueba de microdilución siguiendo las recomendaciones del documento M38-A del CLSI (NCCLS, 2002)	71
8 REFERENCIAS	72

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

Cuadro 1.2.1 Clasificación de los seres vivos según Whittaker	4
Cuadro 1.2.2 Esquema de los siete reinos que comprenden los seres vivos	5
Cuadro 1.2.3 Clasificación actual de los hongos	7
Tabla 1.4.1 Clasificación clínica de micosis y actinomicetosis	10
Tabla 1.5.1 Clasificación de los antifúngicos por estructura química	12
Tabla 1.5.2 Antifúngicos, clasificación según sitio de acción	13
Tabla 1.5.3. Relación de diferentes antifúngicos azólicos	15
Tabla 3.1.1 Preparación de discos impregnados con antifúngico soluble en agua (fluconazol)	35
Tabla 3.1.2 Preparación de discos con antifúngico insoluble en agua (ketoconazol)	36
Tabla 3.2.1 Diluciones para antifúngicos insolubles en agua (ketoconazol)	39
Tabla 3.2.2 Diluciones para antifúngicos solubles en agua	40
Tabla 4.1.1 Promedio de halos de inhibición de levaduras (<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. neoformans</i>) frente a fluconazol en diferentes medios de cultivo: agar Müller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM) y RPMI 1640 con agar	47
Tabla 4.1.2 Promedio de halos de inhibición de levaduras (<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. albicans</i> y <i>C. neoformans</i>) frente a ketoconazol en diferentes medios de cultivo: agar Müller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM) y RPMI 1640 con agar	48
Tabla 4.1.3 Promedio de halos de inhibición de hongos filamentosos (<i>A. fumigatus</i> y <i>A. flavus</i>) frente a ketoconazol en diferentes medios de cultivo: agar Müller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar Y Czapek	51
Tabla 4.2.1 promedio de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenido a partir de la prueba de microdilución para levaduras en base al documento M27-A2 (NCCLS/CLSI 2002)	52
Tabla 4.2.2 Criterios de susceptibilidad de las levaduras frente a antifúngicos de administración sistémica (Silva, 2002)	53
Tabla 4.2.3 Promedio de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenido a partir de la prueba de microdilución para hongos filamentosos en base al documento M38-A (NCCLS/CLSI 2002)	54

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1.1.1 Representación de Teo-nanacatl y un individuo consumiendo hongos alucinógenos	3
Figura 1.2.1 Características de <i>phyla</i> fúngico de relevancia médica	7
Figura 1.3.1 Enfermedades producidas por hongos en el ser humano	8
Figura 1.5.1 Evolución histórica de los antifúngicos	11
Figura 1.5.2 Sitio de acción de algunos los antifúngicos	13
Figura 1.5.3 Estructura química de la anfotericina B	15
Figura 1.5.4 Estructura química de ketoconazol	16
Figura 1.5.5 Estructura química del fluconazol	17
Figura 1.5.6 Estructura química de la terbinafina	17
Figura 1.5.7 Estructura química de la caspofungina	18
Figura 1.5.8 Estructura química de la 5-fluorocitosina	19
Figura 1.5.9 Estructura química de la griseofulvina	19
Figura 1.6.1 Imagen de la prueba comercial Sensititre YeastOne®	24
Figura 1.6.2 Imagen de dos pruebas de difusión en agar, utilizando tabletas Neo-sensitabs™(B) mediante tiras Etest con varias concentraciones de antifúngico (A)	24
Figura 1.6.3 Imagen de la prueba comercial Fungitest®	25
Figura 3.1 Diagrama de flujo de la técnica de microdilución para hongos levaduriformes y filamentosos.	31
Figura 3.2 Diagrama de microdilución para hongos levaduriformes y filamentosos en base a los documentos M27-A2 y M38-A respectivamente	32
Gráfica 4.1.1 Halo de inhibición de levaduras frente a fluconazol en dos diferentes medios de cultivo: MHM y RPMI	47
Gráfica 4.1.2 y Gráfica 4.1.3 Halo de inhibición de levaduras frente a ketoconazol en dos diferentes medios de cultivo: MHM y RPMI	49
Figura 4.1.1 Imagen de la prueba de microdilución en placa para levaduras después de seguir las recomendaciones propuestas por el CLSI (NCCLS, 2002)	50
Gráfica 4.1.4 Halo de inhibición de hongos filamentosos frente a ketoconazol en diferentes medios de cultivo: MHM, RPMI y Czapek	51
Figura 4.2.1 Imagen de la prueba de microdilución en placa para levaduras después de seguir las recomendaciones propuestas por el CLSI (NCCLS, 2002)	53

ABREVIATURAS

ADP: agar dextrosa papa

ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)

[] i: Concentración inicial

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) antes **NCCLS** Comité norteamericano de estándares en laboratorios clínicos (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*)

CMI: Concentración mínima Inhibitoria

DNA: Ácido desoxirribunucleico

DMSO: Dimetil Sulfóxido

FESC: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

5-FC: 5 fluorocitosina

IFI: Infección Fúngica Invasiva

Ig: Inmunoglobulina

InDRE: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico

LCR: líquido cefalorraquídeo

μl: Microlitros

ml: Mililitro

mm: Milímetros

M-H: Muller-Hinton

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

PAPIIT: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica

RNA: Ácido Ribonucleico

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S: Desviación estándar muestral

SDA: agar dextrosa Sabouraud

SDD: Sensibilidad Dosis Dependiente

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SSF: Solución Salina Fisiológica

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Durante mucho tiempo la sensibilidad a los antifúngicos apenas se estudio con detalle, de tal manera que en la década de 1980 no se disponía de métodos estándar y reproducibles para valorar la sensibilidad a los antifúngicos, esto se debió principalmente a que hubo un cambio epidemiológico al aumentar los casos de pacientes con inmunidad deprimida, al propio uso de antibióticos, al aumento de trasplantes y de tratamiento intravenoso, así como al uso de corticosteroides y aparición de resistencia a antifúngicos en terapias prolongadas. Por esta razón las pruebas de sensibilidad “*in vitro*” a los agentes antifúngicos se han convertido en una necesidad actual de los laboratorios de micología médica.

En este experimento de tesis se determino la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *C. albicans* ATCC 90027, *C.parapsilosis* ATCC 22019 y *C. neoformans*(todas proporcionadas por el laboratorio de micología médica de la FESC-UNAM) en base al protocolo M27-A2 del *Clinical and Laboratory Standard Institute*, CLSI antes *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, siglas en inglés), siendo clasificadas como sensibles. Para obtener la CMI de *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* (proporcionadas por el laboratorio de micología médica de la FESC-UNAM) se siguieron las recomendaciones del documento M38-A del CLSI (ante NCCLS), también resultando sensibles.

La prueba de difusión en agar, fue independiente a la de microdilución pero se utilizaron las mismas cepas que para ésta última, se ensayaron tres medios de cultivo: agar Müller-Hinton con 2% de glucosa y 0.5µg/ml de azul de metileno (MHM, Bioxon), RPMI 1640 con agar nobel (RPMI, Sigma) y el Czapek (Dibico). Se realizo por triplicado para determinar que tan reproducible es. El medio Müller-Hinton modificado fue el óptimo para las levaduras en estudio y el Czapek para los hongos filamentosos.

La prueba de difusión en agar puede ser usada como prueba de tamizaje para la investigación de nuevos compuestos antifúngicos tanto naturales como sintéticos y permite determinar si una cepa es sensible o no a determinado agente antifúngico del cual se conozcan sus puntos de corte pudiendo ser guía para implementar el mejor tratamiento en caso de una infección causada por levaduras u hongos filamentosos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES

Los hongos constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, tan grande que se calculan al menos la existencia de 300,000 especies fúngicas que viven en los medios más variados, sin embargo no exceden de 150 a 200 las especies patógenas para el hombre y animales. Además también hay patógenos vegetales, de insectos o de otros hongos, unos pocos cientos son hongos oportunistas. Los hongos mejor conocidos por todos son los macroscópicos, denominados también setas o champiñones, con tamaño, forma y color muy variado (Arenas, 2003).

Los hongos poseen gran importancia para el desarrollo de la vida en la tierra, ya que además de degradar la materia muerta, asociados a bacterias, poseen gran trascendencia ecológica, fitosanitaria, industrial, médica, biológica y alimentaria.

- a) Ecológica: son degradadores primarios en los ecosistemas terrestres ayudando por lo tanto a la fijación del nitrógeno al suelo a partir de elementos muertos, además de su utilidad en el control biológico de plagas.
- b) Frecuentemente producen enfermedades a los vegetales (fitopatología) con gran trascendencia económica: Roya del café, grandes plagas del platanero, y muchos otros vegetales.
- c) Producen frecuentemente enfermedades a los animales y al hombre con elevada morbilidad e impacto económico.
- d) Muy importantes en la industria alimentaria: producción de pan, vino, cerveza, además de se alimentos por si mismos en el caso de los champiñones por ejemplo.
- e) Trascendentales para la producción de antibióticos y otros medicamentos.

Aquí podemos destacar que los antiguos mexicanos sabían que el moho verde que crecía sobre las tortillas húmedas, tenía propiedades curativas sobre las heridas: no les permitía infectarse. Este saber empírico aunque finalmente terapéutico, es una muestra más del gran conocimiento que tenían de la naturaleza nuestros antepasados. Este moho verde de las tortillas es el hongo conocido científicamente como *Penicillium sp.*, y de él obtuvo la penicilina el microbiólogo Fleming, mérito que le valió el premio Nobel de medicina (Ruíz, 2001).

Así los hongos y sus derivados han sido utilizados desde la antigüedad, en la adivinación, en la curación de enfermedades psíquicas, no sólo por grupos autóctonos sino también por científicos (figura 1.1.1).

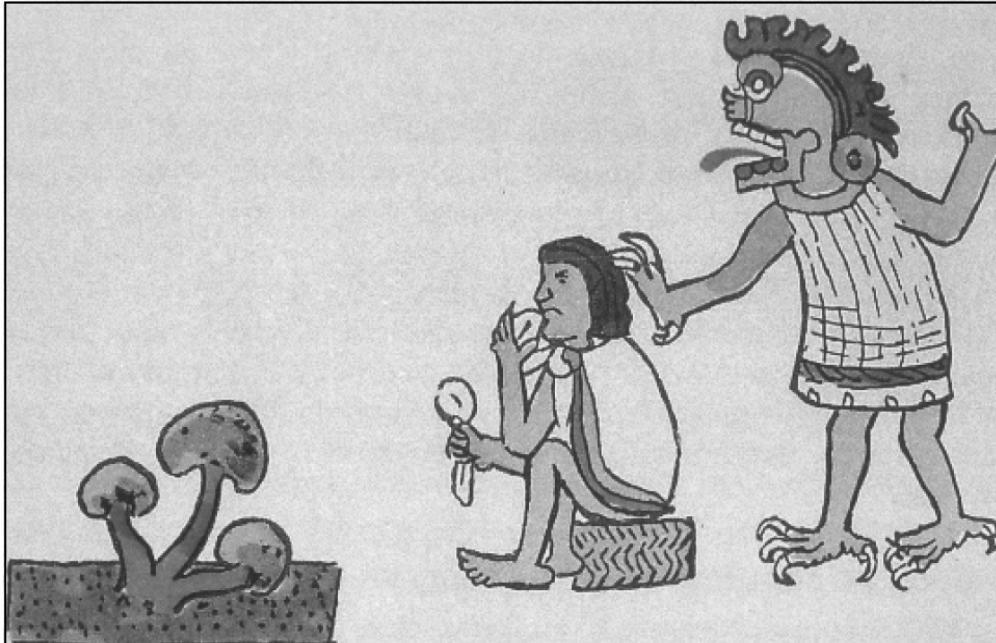


Figura 1.1.1 Representación de Teo-nanacatl (de Teos, dios en náhuatl, y nanácatl, hongo) y un individuo consumiendo hongos alucinógenos. Códice Magliabecchian (Ruíz, 2001)

Un grupo de hongos muy importante son los venenosos de los cuales el hombre ha obtenido ciertos malestares, trastornos e incluso la muerte. Existen setas y mohos que contienen potentes toxinas, las más importantes se encuentran en el género *Amanita*, como *A. phalloides*, común en Europa. Otra seta toxica de especial interés es *Claviceps purpurea* comúnmente llamada Ergot, es un hongo ascosporado que parasita las gramíneas (centeno y trigo) de ahí su nombre cornezuelo de centeno. En la actualidad la industria farmacéutica extrae estos derivados para usos abortivos y antihemorrágicos, aunque todavía no se ha logrado el cultivo artificial (Bonifaz, 2000).

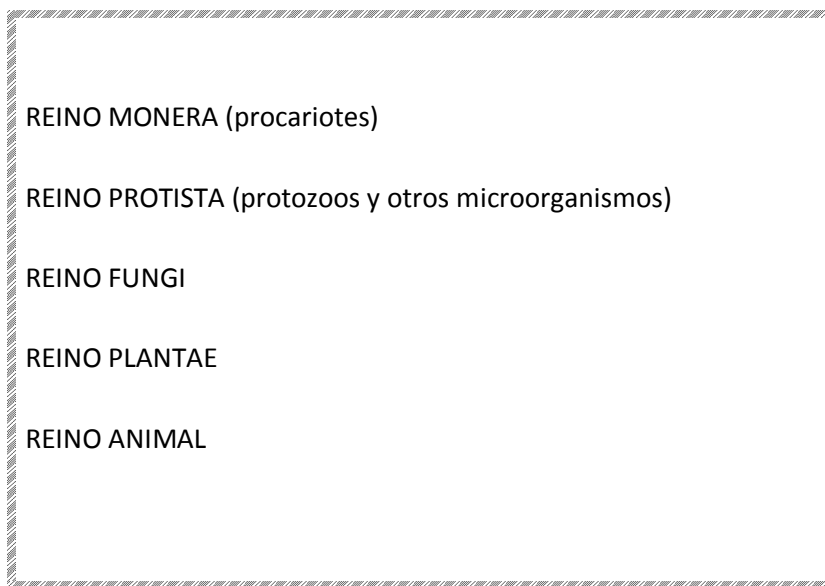
Pese a la gran importancia de los hongos, la información sobre morbilidad y mortalidad de las infecciones micóticas es prácticamente inexistente. Sin embargo, lo poco que conocemos, sugiere la gran relevancia socioeconómica y su gran impacto en la salud pública mundial que será conocida, hasta que los sistemas de salud del mundo permitan su contabilidad,

particularmente ahora, con el gran incremento de las enfermedades oportunistas (Velazco et al., 2004).

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

En un principio los hongos estaban clasificados dentro del reino vegetal, pero al transcurrir el tiempo esto se hizo obsoleto. En 1969 Whittaker, creó el reino Fungi, como uno de los cinco reinos que agruparon a los seres vivos (cuadro 1).

Cuadro 1.2.1 Clasificación de los seres vivos según Whittaker (Velasco et al., 2004)



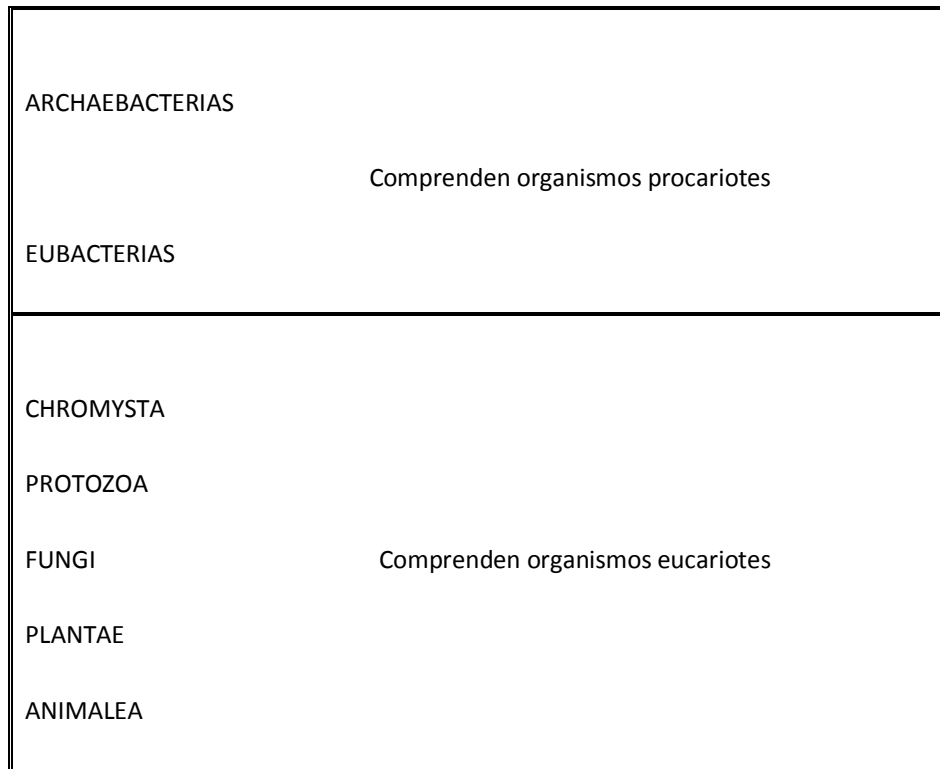
REINO MONERA (procariotes)
REINO PROTISTA (protozoos y otros microorganismos)
REINO FUNGI
REINO PLANTAE
REINO ANIMAL

El reino Fungi agrupó a organismos (micro y macroscópicos) eucariontes, heterótrofos, sin clorofila, que se nutren por absorción a través de su membrana celular, poseen paredes rígidas formada de quitina y celulosa, asociados a otros polisacáridos de acuerdo a los grupos taxonómicos, y aunque capaces de realizar reproducción sexual, de muchos solo se conoce la reproducción asexual.

A partir de la década de los noventa, el avance de los conocimientos científicos de morfología, inmunología, fisiología y principalmente biología molecular, permitió a algunos investigadores como Kendrick, clasificar a los organismos vivos en siete reinos: archeabacteria, eubacteria, chromysta, protozoa, fungi, plantae y animalia (Cuadro 1.2.2).

La clasificación de Whittaker fue el último intento premolecular de realizar un “árbol de la vida” y ha sido rápidamente suplido por clasificaciones apoyadas por la filogenética molecular de los ácidos nucleicos (López et al., 1995).

Cuadro 1.2.2 Esquema de los siete reinos que comprenden los seres vivos (Kendrick, 2000)



Hasta hace unos años, los hongos se dividían en cuatro clases: Phicomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes (que por poder reproducirse sexualmente se denominaban perfectos –fungi perfecti-) y los Adelomycetes o Deuteromycetes, que carecen de dicha propiedad, por lo que se reconocían como hongos imperfectos (-fungi imperfecti-).

Los Adelomycetes o Deuteromycetes, constituyen en la actualidad una clase en proceso de inclusión dentro de los Ascomycetos, con los cuales la gran mayoría se identifica filogenéticamente hablando. Los Adelomycetes comprenden hongos cuya fase sexual se desconoce y se reproducen por conidios.

Los organismos que conocemos como hongos no constituyen un grupo monofilético (descienden todos de un antepasado común), sino polifilético (descienden de antepasados diferentes; las semejanzas se deben a convergencia evolutiva, no a un origen común); es decir,

que comparten características filogenéticas comunes, pero están comprendidos en tres de los siete reinos que agrupan a los seres vivos: Fungi, Chromista y Protozoa (Cuadro 1.2.3) (Velasco et al., 2004).

Reino *Protozoa*: Protozoos. Es un reino que incluye a seres tan conocidos como los paramecios o las amebas. Casi todos los integrantes de la antigua división *Myxomycota* se agrupan aquí. Son organismos que no presentan pared celular y se alimentan por fagocitosis. Se distinguían 4 filos:

- Filo *Acrasiomycota*.
- F. *Dictiosteliomycota*.
- F. *Myxomycota*.
- F. *Plasmodiophoromycota*.

Reino *Chromista*: Incluye a protistas con mitocondrias de crestas tubulares y con células cuyos flagelos presentan una especie de pelillos adosados llamados mastigonemas. Aquí se pueden encontrar las algas pardas, las diatomeas... y algunos hongos, que en realidad descienden de algas que han perdido la clorofila. En general, las paredes celulares de estos seres no presentan quitina ni glucanos. Se distinguían 3 filos:

- F. *Hyphochytriomycota*.
- F. *Labyrinthulomycota*.
- F. *Oomycota*

Reino *Fungi*: Son los hongos verdaderos, con paredes celulares de quitina y glucanos. Están más emparentados con los animales que con las plantas. Se incluyen 4 filos. Los hongos imperfectos o mitospóricos (asexuales) ya no constituyen un grupo aparte, sino que se conectan con grupos ya existentes:

- F. *Chytridiomycota*. Incluye a los quítridos, que antes se situaban en Mastigomycotina por la presencia de esporas flageladas.
- F. *Zygomycota*.
- F. *Ascomycota*.
- F. *Basidiomycota*. Sólo se distinguen 3 clases, que corresponden a las 3 grandes líneas evolutivas en estos hongos: *Basidiomycetes* (setas, yesqueros, hongos gelatinosos, gasteromicetos...), *Teliomycetes* (royas) y *Ustomycetes* (carbones).

Cuadro 1.2.3 Clasificación actual de los hongos (Guarro et al., 1999)

REINO	PHYLA	IMPORTANCIA MEDICA
Fungi (Eumycota)	Ascomycota	+++
	Basidiomycota	++
	Zygomycota	+++
	Chytridiomycota	-
Chromista (Oomycota)	Hyphochytriomycota	+
	Labyrinthulomycota	-
Protozoa (Acrasiomycota)	Plasmodiophoromycota	-
	Myxomycota	-
	Dictyosteliomycota	-

Las técnicas moleculares han permitido ubicar a la mayoría de los organismos, con características de hongos, en el reino fungi; sin embargo dos hongos patógenos, *Phyium insidiosum* y *rhinosporidium seeberi*, se ubican en el reino chromista, mientras que en el reino protozoa se encuentra *Pneumocystis carinii* (Figura 1.2.1).

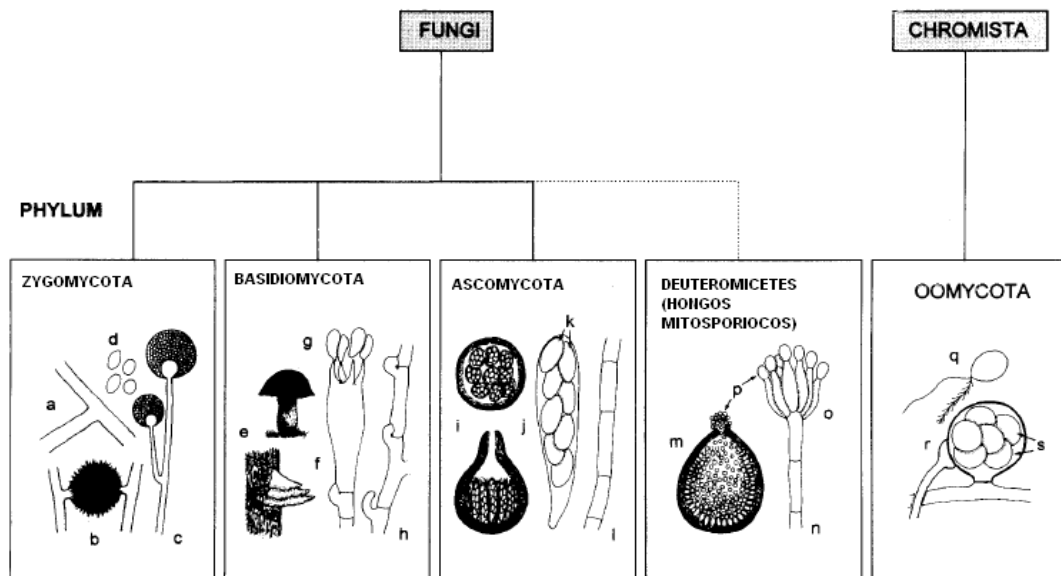


Figura 1.2.1 Características de *phyla* fúngico de relevancia médica. *Zygomycota*: a) hifa cenocítica, b) zigospora, c) esporangioforo, d) esporangiosporas. *Basidiomycota*: e) basidiomata, f) basidium, g) basidiosporas, h) hifa con conexiones en la abazadera. *Acomycota*: i) ascomata, j) ascas, k) ascosporas, l) hifa ceptada. *Hongos mitosporicos* antes *Deuteromycetes*: m) picnidio, n) conidióforo, o) células conidiogenas, p) conidias. *Oomycota*: zoospora, r) gametangio, s) oosporas (Guarro et al., 1999)

1.3 CAPACIDAD PATÓGENA DE LOS HONGOS (Arenas, 2003) (Figura 1.3.1)

1.3.1 Micetismo: Afección causada por la ingestión de hongos, por ejemplo *Amanita phalloides*, *Claviceps pupúrea* (llamado cornezuelo del centeno, uno de sus derivados es el LSD), esto se estudia en toxicología.

1.3.2 Micotoxicosis: Patología que deriva de la ingestión de alimentos como granos de maíz o de cacahuete contaminados con metabolitos secundarios denominados aflatoxinas, producida por algunos generos de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, etc.

1.3.3 Alergias: Cuadro producido por acción de hipersensibilidad frente a hongos, por ej.: como ocurre con el género *Aspergillus*, causando asma y rinitis alérgicas.

1.3.4 Infecciones: Se da en hospederos que le permitan al hongo colonizar y/o diseminarse por el organismo.

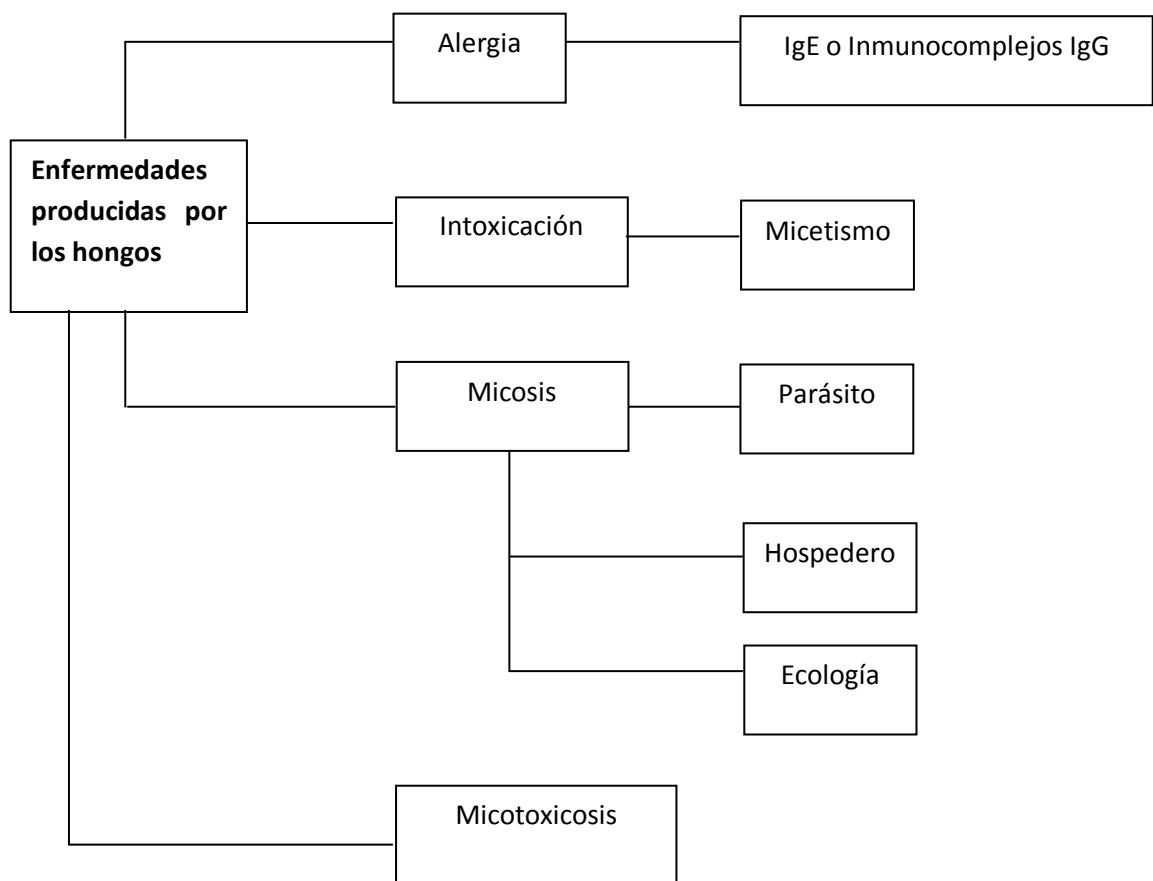


Figura 1.3.1 Enfermedades producidas por hongos en el ser humano (Bonifas, 2000)

1.4 LOS HONGOS COMO AGENTES INFECCIOSOS.

El establecimiento de una micosis implica la capacidad del microorganismo de crecer en las condiciones de pH, temperatura y potencial redox presentes en los tejidos del huésped, siendo dichas condiciones generalmente poco favorables para el crecimiento y desarrollo de los hongos. Los agentes infectantes deben poseer, por lo tanto, ciertas características que les permitan sobrevivir en tal ambiente así como mecanismos para evadir las defensas del huésped (Casadevall, 1998). La mayoría de hongos poseen escaso poder patógeno, sin embargo algunas especies han logrado adaptarse a las condiciones desfavorables impuestas por el hospedero y desarrollarse en sus tejidos. De todas formas la virulencia de un microorganismo depende tanto de las características del microorganismo como de factores propios del hospedero (Casadevall y Pirofski, 2001), por lo que el establecimiento de una enfermedad infecciosa depende del estrecho equilibrio entre el hospedero y el microorganismo. La puerta de entrada incluye el contacto con la piel, la inhalación de esporas y el paso a través de roturas en barreras físicas tales como lesiones en piel o mucosa. Los hongos pueden originar patologías muy variadas que pueden ser clasificadas de acuerdo a la OMS (Organización Mundial de la Salud) por su localización inicial en: Superficiales, Subcutáneas, Sistémicas y Oportunistas (Tabla 1.4.1).

Las micosis oportunistas pueden localizarse en cualquiera de las regiones corporales. Los hongos que producen las micosis superficiales tienen capacidad para afectar únicamente algunas capas de la epidermis, pelos y anexos. Las micosis subcutáneas afectan a la piel como puerta de entrada, extendiéndose al tejido celular subcutáneo y con capacidad para invadir otros tejidos profundos, como el músculo y el óseo. Las micosis sistémicas se localizan principalmente a nivel pulmonar y posteriormente tienden a diseminarse por sangre a diferentes sistemas, órganos y tejidos del cuerpo; éstas suelen ser las micosis más graves. Tanto los hongos que producen micosis subcutáneas como sistémicas viven libres en la naturaleza. Las primeras se adquieren a través de la penetración por heridas en la piel y las segundas por inhalación. Ninguna de las dos es contagiosa. Existen otros padecimientos causados por algunas bacterias del orden de los Actinomycetales, así como también ciertas algas aclorofílicas, que se estudian en micología médica y se denominan falsas micosis o seudomicosis (López et al., 1995).

Tabla 1.4.1 Clasificación clínica de micosis y actinomicetosis (Velasco et al., 2004)

TIPO	ENFERMEDAD	CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES
SUPERFICIALES (Exclusivamente tegumentarias)	Dermatofitosis Pitiriasis versicolor Tinea negra palmaris Piedras	Sólo afectan la piel y faneras. No atacan estructuras profundas. Son contagiosas, frecuentes fácilmente curables, excepto cuando atacan uñas (onicomicosis).
SUBCUTÁNEAS (inicialmente tegumentarias)	Micetoma actinomicótico Micetoma eumicótico Esporotricosis Cromomicosis Rinosporidiosis Enfermedad de lobo Feohifomicosis	No contagiosas, relativamente frecuentes, de muy difícil terapia con excepción de la esporotricosis.
SISTÉMICAS (secundariamente tegumentarias)	Histoplasmosis Coccidioidomicosis Paracoccidioidomicosis Blastomicosis norteamericana	No contagiosas, poco frecuentes, de difícil tratamiento.
OPORTUNISTAS	Candidosis Criptococcosis Aspergilosis Zigomicosis Geotricosis Hialohifomicosis	No contagiosas, poco frecuentes (excepto candidosis). En muchas de ellas la iatrogenia facilita su desarrollo. En otras el hongo es comensal del hospedero y se convierte en parásito.
PSEUDOMICOSIS	Actinomicetosis, Algisia	

1.5 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

1.5.1 EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LOS ANTIFÚNGICOS

Las opciones terapéuticas para las infecciones fúngicas no han dejado de evolucionar desde mediados del siglo pasado, mejorando no sólo su eficacia y espectro de acción sino también su tolerabilidad, manejo y tiempo de tratamiento. Los primeros antifúngicos datan de 1900 cuando se empleaba el ioduro potásico, metaloides y derivados azufrados; entre 1940 y 1950 surgieron los antifúngicos denominados de primera generación por ser derivados de productos naturales o productos de la actividad metabólica de determinados microorganismos (Amfotericina B, griseofulvina). Más tarde se desarrollaron los de segunda generación obtenidos predominantemente por síntesis química como los imidazoles y triazoles. En la década de los 90 se incorporaron los triazoles, siendo el itraconazol el primer antifúngico oral con actividad sobre un espectro amplio de hongos. En pleno siglo XXI las investigaciones continúan y periódicamente aparecen nuevos agentes como el voriconazol, la caspofungina entre otros (Figura 1.5.1). No obstante existen importantes inconvenientes para el desarrollo de fármacos antimicóticos eficaces entre los que cabe destacar el hecho de que tanto el hongo como el tejido del hospedero están constituidos por células eucariotas con características bioquímicas similares. Ello implica que los efectos sobre el hospedero constituyen un importante obstáculo para la obtención de fármacos eficaces (Escobar et al., 2004).

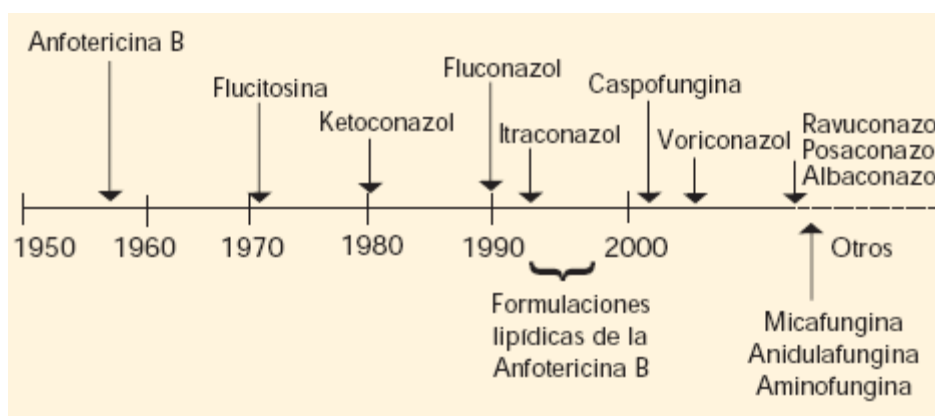


Figura 1.5.1 Evolución histórica de los antifúngicos (Catalán et al., 2006)

1.5.2 CLASIFICACIÓN DE ANTIFÚNGICOS

Los antifúngicos pueden clasificarse según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Tabla 1.5.1); de acuerdo con su origen

en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Tabla 1.5.2) (Gregori, 2005).

TABLA 1.5.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS POR ESTRUCTURA QUÍMICA (Vargas et al. 2005)

POLIENOS:	<ul style="list-style-type: none"> • Nistatina; Nistatina liposomal • Anfotericina B
AZOLES:	<ul style="list-style-type: none"> • Imidazoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol) • Triazoles (fluconazol, itraconazol) • Triazoles de segunda generación (voriconazol, ravuconazol, posaconazol)
ALILAMINAS:	<ul style="list-style-type: none"> • Terbinafina • Naftifina
LIPOPÉPTIDOS:	<ul style="list-style-type: none"> • Papulacandinas • Equinocandinas • Triterpenos glicosilados
PIRIMIDINAS (análogos precursores de ácidos nucleicos):	<ul style="list-style-type: none"> • 5-Fluorocitosina (Flucitosina)
OTROS:	Griseofulvina, Ioduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato

TABLA 1.5.2. ANTIFÚNGICOS, CLASIFICACIÓN SEGÚN SITIO DE ACCIÓN

ANTIFÚNGICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA	Polienos, azoles, alilaminas, tiocarbamatos
ANTIFÚNGICOS QUE ACTÚAN SOBRE LA PARED	Lipopéptidos.
ANTIFÚNGICOS QUE ACTÚAN SOBRE EL NÚCLEO	Pirimidinas fluoradas, misceláneos.

1.5.3 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS ANTIFÚNGICOS SEGÚN SU SITIO DE ACCIÓN (Figura 1.5.2).

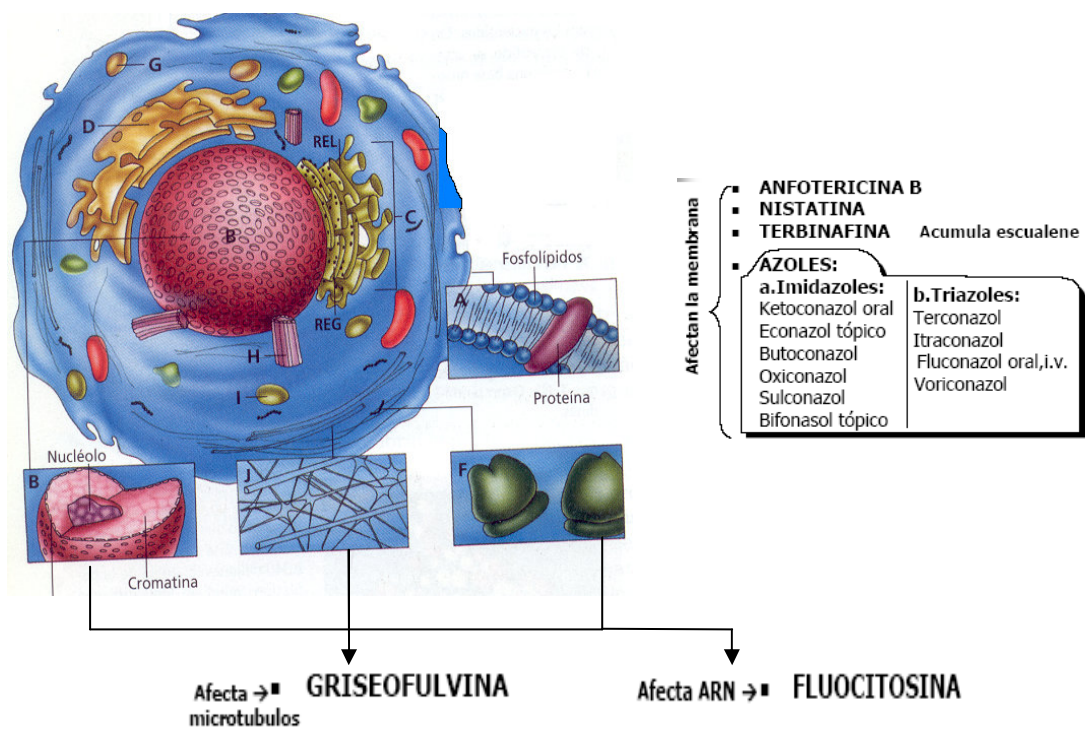


Figura 1.5.2 Sitio de acción de algunos los antifúngicos (Sanglard, 2002)

1.5.3.1 Antifúngicos que actúan sobre membrana citoplasmática

La membrana plasmática desempeña una importante función en la división celular y el metabolismo. Las partículas lipídicas llamadas esteroides constituyen aproximadamente el 25 %

de la membrana celular pero el contenido difiere entre la célula fúngica y la de los mamíferos. En las células de los mamíferos predomina el colesterol y en las células fúngicas el ergosterol. Polienos, azoles y alilaminas inhiben la síntesis de ergosterol o se fijan al mismo modificando la permeabilidad de la membrana plasmática.

POLIENOS: Los polienos alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular.

La **anfotericina B** es el agente más conocido de esta familia; es extraído de la bacteria *Streptomyces nodosus*. Puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección. Su estructura anfipática con un polo hidrófilo, debido a una cadena polihidroxilo a lo largo de un eje y otro lipófilo, por otra de hidrocarburo poliénico a lo largo del otro, le permite situarse entre los fosfolípidos y unirse al ergosterol de la membrana fúngica (figura 1.5.3) . Con ello la desorganiza, alterando su gradiente de protones, produciendo inestabilidad osmótica, pérdida de su integridad y dando lugar a la salida de los componentes citoplasmáticos. Esta alteración de la permeabilidad se expresa en un aumento de los canales de potasio, a bajas concentraciones y, a altas, la formación de poros de 40- 105 nm. Este mecanismo fungicida la convierte en el más potente antifúngico, tanto *in vitro* como *in vivo* por lo que sigue siendo considerada para el tratamiento de micosis sistémicas y el fármaco de elección para las micosis diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. La nefrotoxicidad es el principal inconveniente de la anfotericina B y se atribuye a la utilización de desoxicolato sódico y fosfato sódico como excipiente. Para reducirla se han desarrollado nuevas formas farmacéuticas con la misma eficacia, y menos efectos tóxicos (Girmenia et al., 2002; Hsieh, 1998 et al, 2000).

Otro miembro de esta familia es la **nistatina**, el primer antifúngico tópico en utilizarse en la práctica clínica. Tiene actividad sobre levaduras y está indicada en candidiasis de las mucosas y en la profilaxis de candidiasis orofaríngea en inmunodeprimidos.

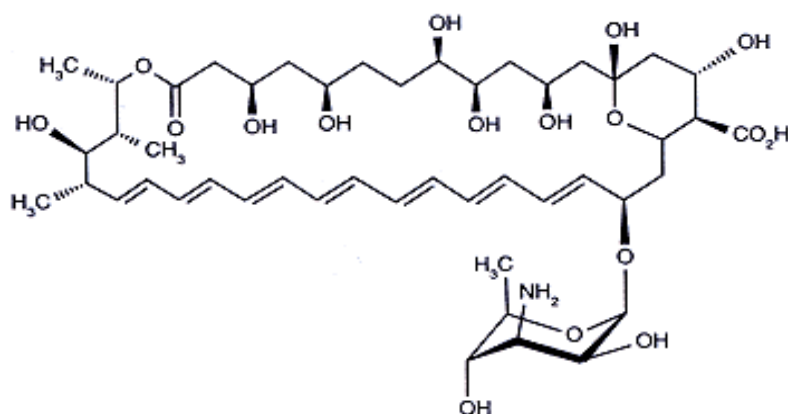


Figura 1.5.3 Estructura química de la anfotericina B.

AZOLES: Los azoles tienen un anillo con átomos de nitrógeno (N) libres unidos mediante enlace carbono-nitrógeno (C-N) a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad etc. En función del número de nitrógenos que posee el anillo se dividen en imidazoles: miconazol y ketoconazol y triazoles: fluconazol, itraconazol, voriconazol (Tabla 1.5.3). Tienen actividad fungistática por inhibición de la demetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450, ello lleva a la acumulación de metil esteroides y a la reducción de la concentración de ergosterol, un esteroide esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica.

Tabla 1.5.3. Relación de diferentes antifúngicos azólicos (Abete, 1998).

Derivados imidazólicos	Derivados triazólicos
Climazol	Fluconazol
Clotrimazol	Itraconazol
Econazol	Terconazol
Fenticonazol	Vibucanazol
Isoconazol	Voriconazol
Ketoconazol	
Miconazol	

La incidencia de efectos adversos de este grupo es escasa, con mayor frecuencia ocurren molestias gastrointestinales: náuseas, vómitos, dolor, distensión abdominal y diarrea; cefalea y exantema. Son importantes las interacciones farmacológicas con inhibidores o inductores de las enzimas del sistema del citocromo P 450.

El **ketoconazol** oral está disponible desde 1981 y es el único imidazol que se usa actualmente para el tratamiento de infecciones sistémicas (figura 1.5.4). Alcanza concentraciones altas en los tejidos grasos, pero pobres en el LCR. Hoy es un fármaco de segunda línea, ya que, debido a su menor selectividad sobre las membranas de los hongos en relación a la de los mamíferos, determina una mayor toxicidad.

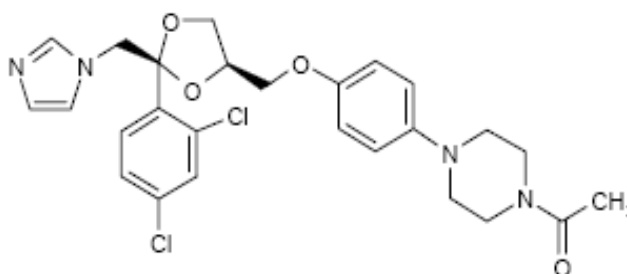


Figura 1.5.4 Estructura química de ketoconazol

Los triazoles se sintetizaron mediante el agregado de un N más al anillo anterior, con la consecuente ampliación del espectro y disminución de su actividad sobre las células humanas. Todos tienen actividad frente a dermatofitos, *Candida*, *Malassezia* y se emplean en el tratamiento de tinea corporis, tinea pedis, tinea cruris y otras dermatofitosis localizadas. También son eficaces adyuvantes del tratamiento sistémico de la tinea capitis y tinea barbae.

El **fluconazol** fue introducido al mercado en 1990, siendo el primer derivado triazolico de uso clínico. La inserción de dos átomos de flúor en posición 2 y 4 del anillo fenil le confiere cierta polaridad a la molécula, lo que favorece su hidrosolubilidad, la posibilidad de administración intravenosa y una serie de características de metabolización y eliminación que le convierten en un fármaco completamente diferente al resto de los imidazoles (Figura 1.5.5). Los triazoles, y fundamentalmente fluconazol, disponen de unas claras ventajas con relación a los imidazoles, como son: menor inhibición hormonal, menor interacción con medicamentos, formulación parenteral, mejor distribución en tejidos, menor alteración gastrointestinal, mayor estabilidad en su metabolismo y una vida media más prolongada.

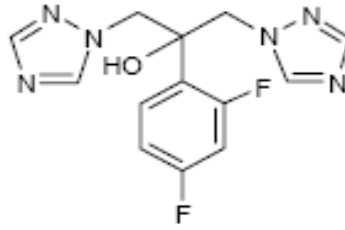


Figura 1.5.5 Estructura química del fluconazol

El fluconazol es apto para el tratamiento de micosis superficiales y profundas (*Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans*), su espectro es reducido y carece de acción contra *Aspergillus* spp.; además se describe resistencia de *C. glabrata* y *C. krusei*. Tiene buena actividad frente a *C. immitis*, *C. neoformans* y *P. brasiliensis*. Carece de efecto frente a *Aspergillus*., *Fusarium*, *Scedosporium* y *Penicillium*. Actualmente se observa en pacientes infectados por VIH, un aumento progresivo de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol.

ALILAMINAS: las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo.

Integra esta familia la **terbinafina** (figura 1.5.6), indicada en tinea pedis, tinea corporis, tinea cruris; pitiriasis versicolor y onicomicosis. La ventaja principal de la terbinafina se debe a un alto margen de seguridad en el hombre porque no tiene ningún efecto inhibitorio sobre el sistema del citocromo P-450; debido a esto, comparada con los derivados azólicos, presenta un menor potencial de interacción con otras drogas. Los efectos adversos son leves o moderados, transitorios, y se manifiestan a nivel gastrointestinal o cutáneo.

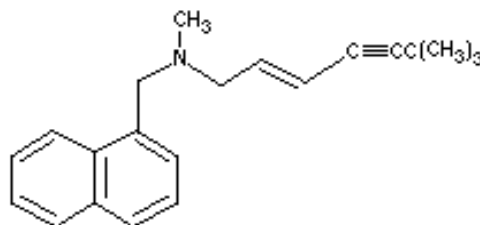


Figura 1.5.6 Estructura química de la terbinafina

1.5.3.3 Antifúngicos que actúan sobre membrana citoplasmática

Las **pirimidinas fluoradas** actúan como antimetabolitos. La más conocida de este grupo es la **fluocitosina** o **5-fluorocitosina** (figura 1.5.8) que inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos. Este fármaco se convierte en 5-fluorouracilo (5-fu), el cual es fosforilado e incorporado al arn, convirtiéndose en un dexosinucleotido. Este compuesto inhibe a la timidilato sintetasa e impide la síntesis de proteínas de la célula. El espectro antifúngico es reducido. Es activo frente a *Cándida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Algunas cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *zigomicetos* pueden ser sensibles (Pitisuttithum et al, 2005) .

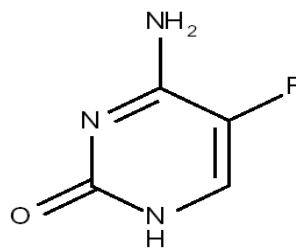


Figura 1.5.8 Estructura química de la 5-fluorocitosina

La **griseofulvina** (figura 1.5.9) detiene el crecimiento de la célula en la fase de mitosis. Inicialmente se usaba para el control de plagas en agricultura, hasta que se comprobó experimentalmente su actividad sobre dermatofitos en cobayos y se introdujo más tarde en la medicina humana. Fue ampliamente usada para reducir y erradicar las grandes epidemias de tinea en Europa después de la segunda guerra mundial. Se descubrió en 1939 a partir del hongo *Penicillium griseofulvum*, autorizándose para uso humano en 1958 (Gupta et al, 2004).

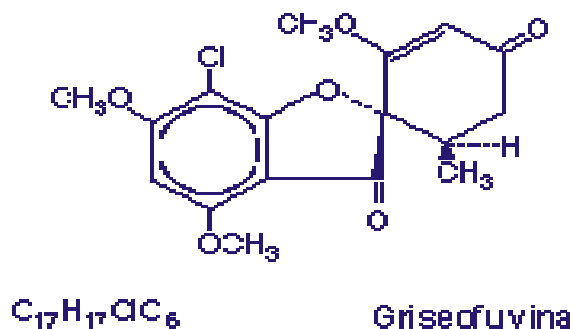


Figura 1.5.9 Estructura química de la griseofulvina

1.5.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

Cuando se habla de resistencia en antifúngicos hay que tener en cuenta los siguientes conceptos:

1. *Resistencia intrínseca*. Cuando ningún miembro de una especie es sensible a un antifúngico. Por ejemplo, *C. krusei* y fluconazol.

2. *Resistencia primaria*. Se aplica a una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico que posee una resistencia natural al mismo sin haber estado en contacto previamente. Por ejemplo, cepas de *C. albicans* y 5-fluorocitosina.

3. *Resistencia secundaria*. Cuando una cepa previamente sensible adquiere resistencia al antifúngico tras haber estado en contacto con él. Por ejemplo, *C. albicans* y 5-fluorocitosina o fluconazol (Abete, 1998)

En la sección anterior se describieron los antifúngicos de acuerdo al mecanismo de acción y en esos mismos sitios se producen modificaciones para hacerse resistentes a los fármacos mencionados. El objetivo último de los antifúngicos que actúan en membrana celular es el ergosterol, siendo el encargado de la integridad de la célula fúngica. Los azoles inhiben una enzima dependiente del citocromo P-450, la 14- α - desmetilasa (14 α DM), provocando disminución del ergosterol y la acumulación de esteroides metilados. Todo ello altera la estructura y función de la membrana (sobre todo el transporte de nutrientes y síntesis de quitina). El resultado final es una disminución del crecimiento celular, causando un efecto fungistático. Esta propiedad fungistática de los azoles implica en muchas ocasiones tratamientos prolongados y está directamente relacionado con el desarrollo de resistencias secundarias. Entre los mecanismos de resistencia descritos en los azoles están implicados: a) pérdida de afinidad de la 14 α DM, debida a mutaciones del gen ERG 11 que es el que codifica su síntesis; b) superproducción de 14 α DM, asociada a mutación del mismo gen ERG 11; y c) expulsión del azol al exterior celular mediante sistemas de transporte activo, MSF –codificado por el gen MDR1- y ABC –codificado en *Candida* por los genes CDR1 a CDR5- (Sanglard, 2002).

El mecanismo de acción de los polienos es doble: formación de poros en la membrana plasmática y bloqueo de la ATPasa de la membrana con daño oxidativo directo sobre ésta. A pesar del uso generalizado de la amfotericina B en los últimos 40 años, la resistencia

secundaria a este antifúngico sigue siendo escasa, debido a que los propios cambios estructurales de la membrana para evitar la acción del antifúngico reducen la virulencia de la levadura y su tasa de crecimiento, facilitando su destrucción por los mecanismos defensivos del hospedero, por lo que la relevancia clínica de esta resistencia es escasa, siendo excepcional en inmunocompetentes y muy rara en neutropénicos.

Las especies de *Candida* más proclives a desarrollar resistencia a los polienos suelen hacerlo mediante alguno de estos mecanismos: 1) por mutación de los genes *pol1* a *pol5*, aumentando la actividad catalasa y reduciendo el daño oxidativo sobre la membrana; o 2) por defecto en los genes *ERG2* y *ERG3*, que modifican la composición de la membrana y disminuyen la presencia de ergosterol o lo sustituyen por otros esteroides metilados (Sanglard, 2002).

El glucano, componente principal de la pared celular de los hongos es la diana de acción de las equinocandinas, éstas actúan inhibiendo la beta glucanosintetasa, lo que provoca una disminución de la síntesis de glucano e indirectamente de lanosterol y ergosterol. Los conocimientos que se tienen sobre mecanismos de resistencia se basa sobre resultados de obtenidos con mutantes de laboratorio, sobre todo *Saccharomyces cerevisiae* (mutaciones de los genes *GNS1*, *FKS1* y *RHO1*) y *C. albicans* (la mutación del *CDR2p* active el sistema de achique ABC y elimina activamente la equinocandina del interior de la célula fúngica) (Bartizal et al., 1997).

La resistencia intrínseca o adquirida a la 5-fluorocitosina es el resultado de la ausencia o disfunción de una o más de las enzimas necesarias para su transformación intracelular, y puede deberse a dos mecanismos fundamentales: a) ausencia o disfunción enzimática (generalmente causada por mutaciones de los genes *FCY1* y *FCY2*); y b) aumento de la síntesis de pirimidinas, debido a un defecto en la regulación de su biosíntesis. La resistencia secundaria a este antifúngico es un problema grave debido a que cualquier especie sensible puede desarrollarla (Abete, 1998).

Para prevenir la resistencia a los agentes antifúngicos se pueden tomar las siguientes medidas:

- Uso racional de los antifúngicos.
- Uso de dosis apropiadas (no únicas, ni bajas).
- Utilización de terapias combinadas

- Antifúngico apropiado para el agente aislado
- Estrategias de seguimiento y vigilancia de la resistencia.

1.6. PRUEBAS “*in vitro*” DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Las prácticas terapéuticas para combatir las micosis han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca. En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de resistencias *in vitro*, que muestran cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos. Por eso parece cada vez más importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos. Además, desde la aparición de nuevas moléculas antifúngicas (candinas, sordarinas) y de nuevas estrategias terapéuticas (presentaciones lipídicas de los polienos, terapia combinada), la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica u otra (Rex et al., 2001).

La realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos está indicada en las micosis invasoras, las micosis orofaríngeas que no responden al tratamiento y las producidas por patógenos fúngicos emergentes. El *National Comité for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), hoy *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), ha estandarizado un método de microdilución para determinar la sensibilidad de las levaduras (documento M27-A2) y los hongos filamentosos (documento M38-A). Sin embargo, la preparación de las diluciones de antifúngicos por estos métodos es laboriosa y requiere mucho tiempo. Por ello, se han desarrollado métodos más sencillos y prácticos para un laboratorio clínico, como el *E-test*® y el método colorimétrico *Sensititre YeastOne*® (Cantón et al., 2005). A continuación se describen brevemente éstos y otros métodos para detectar la sensibilidad a los diferentes antifúngicos.

1.6.1. Métodos de referencia para levaduras

En 1982, el NCCLS creó un subcomité con la finalidad de establecer protocolos de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* a las levaduras. Sin embargo, no se publicó el primer documento (M27-P) (NCCLS, 1992) hasta 1992. Se propuso el método de dilución en caldo para levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, que se fue perfeccionando para dar lugar en 1995 al documento M27-T (NCCLS, 1995) y, en 1997, al M27-A (NCCLS, 1997). Este último protocolo hace referencia tanto a métodos de microdilución

como de macrodilución en medio líquido usando RPMI como medio de cultivo; en él, se definen los puntos de corte para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Sin embargo, debido a que este método presentaba algunas dificultades en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los azoles, se elaboró el nuevo documento M27-A2 (NCCLS, 2002). Este documento recomienda una adición del 2% de glucosa al medio y una determinación de las CMI a las 24 horas para una mejor interpretación de la lectura. Este método también presenta importantes limitaciones ya que no incluye la forma de crecimiento de levadura de los hongos dimórficos y no describe rangos de CMI ni puntos de corte para equinocandinas o nuevos triazoles.

1.6.2. Métodos de referencia para hongos filamentosos

En 1998, se publicó el primer documento (M38-P) (NCCLS, 1998) que describe un método de referencia para determinar la sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Sin embargo, los primeros estudios demostraron una falta de correlación con los resultados *in vivo*. Debido a ello, se llevaron a cabo nuevos trabajos para intentar establecer las condiciones más apropiadas para obtener una buena concordancia. Los resultados derivados de esos estudios se reúnen en el documento M38-A (NCCLS, 2002). Dicho documento recomienda los métodos de microdilución y macrodilución para *Rhizopus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Sporothrix schenckii* y *Pseudallescheria boydii*. Sin embargo, los métodos de referencia para hongos filamentosos presentan una serie de limitaciones ya que no incluyen algunos hongos filamentosos de importancia clínica como los dermatofitos o los hongos dimórficos; además, este documento no aporta puntos de corte para ningún antifúngico.

1.6.3. Sensititre YeastOne®

Este método de microdilución se basa en la dilución del antifúngico en medio líquido usando RPMI 1640 con glucosa y con un indicador de pH (azul Alamar®). Cuando se produce crecimiento del hongo, la actividad metabólica reduce el indicador presente en el medio, que cambia de azul a rosa. Datos obtenidos por varios autores (Carrillo, et al., 2001) han mostrado un alto porcentaje de concordancia entre el Sensititre YeastOne® (Figura 1.6.1) y el método de referencia para *Candida spp.* y *Cryptococcus spp.*



Figura 1.6.1 Imagen de la prueba comercial **Sensititre YeastOne®**

1.6.4. Neo-sensitabs™

Este método se basa en la difusión del antifúngico en forma radial sobre el agar creando un gradiente de concentración. Así, en función del diámetro de inhibición obtenido, la cepa se clasifica como sensible, moderadamente sensible o resistente (Figura 1.6.2). El método está estandarizado solamente para bacterias y levaduras. Los diámetros de las zonas de inhibición con este método muestran una buena correlación con las CMI obtenidas con el método de microdilución (CLSI) (Carrillo et al., 1999). Los antifúngicos están comercializados en forma de discos o tabletas. No está estandarizado para hongos filamentosos.

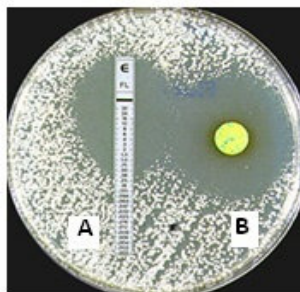


Figura 1.6.2 Imagen de dos pruebas de difusión en agar, utilizando tabletas Neo-sensitabs™(B) y mediante tiras Etest con varias concentraciones de antifúngico (A)

1.6.5. Etest®

Es un método basado en medio sólido que se basa en la difusión en el agar de varias concentraciones de antifúngicos incorporados a una tira de plástico inerte, la cual da lugar a la formación de una elipse de inhibición de crecimiento. Es una técnica fácil de realizar, con un alto grado de reproducibilidad y una buena concordancia con el método de microdilución del CLSI. Estudios comparativos entre el Etest® y el método de referencia han mostrado una excelente correlación en el caso de levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus* (Pfaller et al.,

1998). En el caso de los hongos filamentosos, existen pocos estudios comparativos con el método de referencia, pero los pocos datos de los que disponemos muestran resultados muy esperanzadores (Meletiadis et al., 2002).

1.6.7. ASTY colorimetric panel® y Fungitest®

Son métodos colorimétricos también comercializados para determinar la sensibilidad antifúngica de las levaduras. El ASTY colorimetric panel se ajusta más a las condiciones de experimentación del método de referencia, mientras que el Fungitest® (figura 1.6.3) presenta problemas para detectar cepas resistentes al fluconazol e itraconazol (Carrillo et al., 2001).

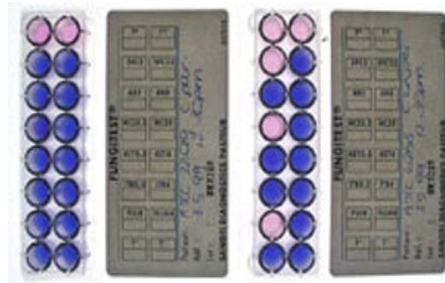


Figura 1.6.3 Imagen de la prueba comercial Fungitest®

1.6.8. Difusión en agar

Un método rápido y simple de comprender es el de difusión en agar utilizando discos impregnados del antifungico. Ha habido mucho interés de la investigación dentro de los estudios de susceptibilidad a antifungicos vía los métodos de E-test (ET) y de la difusión del disco (DD) debido a su facilidad relativa y a la carencia de necesidad del equipo especializado (Charles y col, 2006) y por este motivo el CLSI elaboró el documento M44-A para el uso de la técnica de difusión en placa pero en hongos.

1.7 JUSTIFICACIÓN

Las infecciones fúngicas han adquirido una gran importancia en las últimas dos décadas, debido no sólo a su mayor frecuencia de aparición (aumento de pacientes con estado de inmunodepresión avanzada) sino también a su alta morbilidad y mortalidad. Paralelamente se ha observado un incremento en la aparición de nuevas especies patógenas, tanto de levaduras como de hongos filamentosos.

Todas estas circunstancias han conducido a los clínicos a usar con más frecuencia los antifúngicos y a hacerlo a dosis altas, originando en muchos casos la aparición de resistencias, especialmente a los derivados azólicos, relacionadas con el uso de estos fármacos, y como consecuencia de todos estos problemas ha surgido la necesidad de investigar nuevos agentes antifúngicos.

Por las razones antes expuestas, los estudios de sensibilidad "*in vitro*" a los antifúngicos se hacen cada vez más necesarios, para poder conocer la actividad "*in vitro*" de los antifúngicos clásicos y nuevos, y así elegir la alternativa terapéutica con mayor probabilidad de éxito.

El *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2005) antes *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002) recomienda para determinar la concentración mínima inhibitoria de hongos levaduriformes y filamentosos la metodología de microdilución descrita en los documentos M27-A2 y M38-A respectivamente (NCCLS, 2002). De este modo podemos ubicar a los distintos aislamientos en sensibles, sensibles según la dosis y resistentes. Pero dicha metodología implica el uso de equipo y material especial de costo elevado, y que no debe reutilizarse, además el tiempo de montaje implica varios días desde que se comienza a preparar el material, por lo que es importante tener alternativas a este método que permitan en forma rápida y más económica determinar si una cepa es sensible o resistente a determinado antifúngico, lo cual es muy relevante en la investigación de nuevos compuestos antifúngicos, debido a que no tiene ningún caso realizar la prueba de microdilución si no existe actividad antifúngica o esta es muy pobre.

1.8 HIPÓTESIS

Si se utilizan diferentes medios de cultivo que cuenten con las características necesarias de nutrientes para lograr un crecimiento óptimo del hongo y una técnica estandarizada; entonces es posible detectar diferencias a la sensibilidad a un antifúngico específico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo entre los halos de inhibición del crecimiento de hongos filamentosos y levaduriformes de relevancia clínica, frente a algunos antifúngicos azólicos en diferentes medios de cultivo siguiendo las recomendaciones del documento de referencia M44-A del CLSI (antes NCCLS); para lograr la confiabilidad del método y su uso frecuente en el laboratorio de investigación de nuevos compuestos antifúngicos.

2.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Efectuar la prueba de difusión en placa utilizando discos impregnados de ketoconazol, y fluconazol frente a los hongos *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. parapsilosis*, *A. fumigatus* y *A. flavus* tomando como guía el documento M44-A de CLSI (antes NCCLS).
- Obtener la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de hongos levaduriformes y filamentosos empleando las recomendaciones planteadas en los documentos M27-A2 y M38-A (CLSI antes NCCLS) respectivamente. Y determinar la resistencia o sensibilidad a los antifúngicos empleados.

3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Figura 3.1 DIAGRAMA DE PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR EN BASE AL DOCUMENTO M44-A DEL CLSI (NCCLS, 2004)

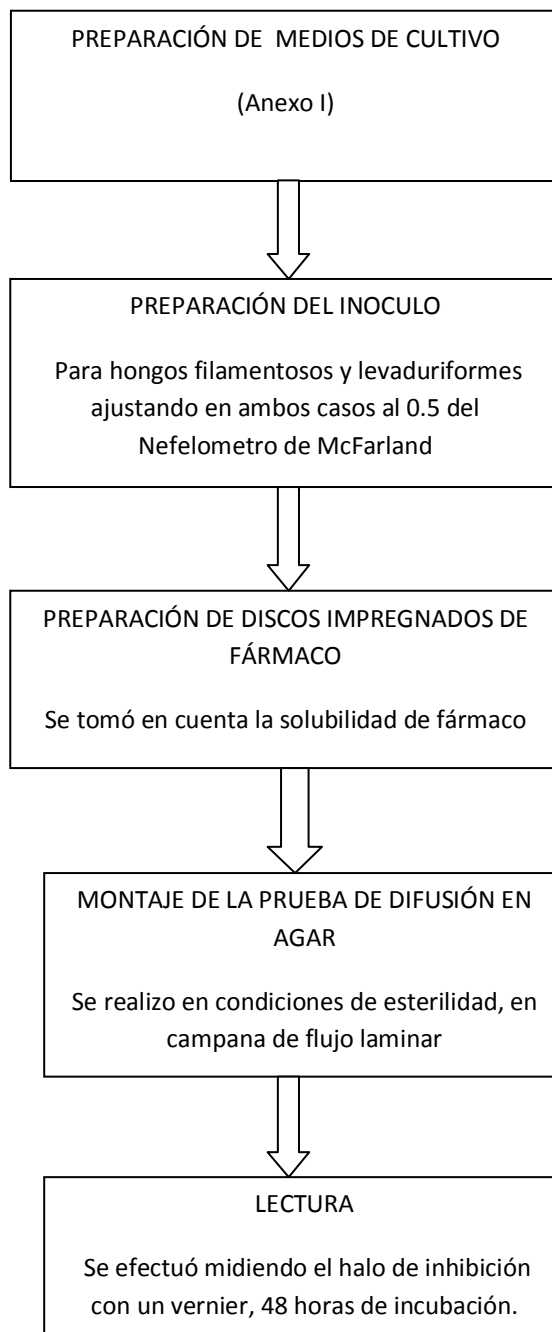
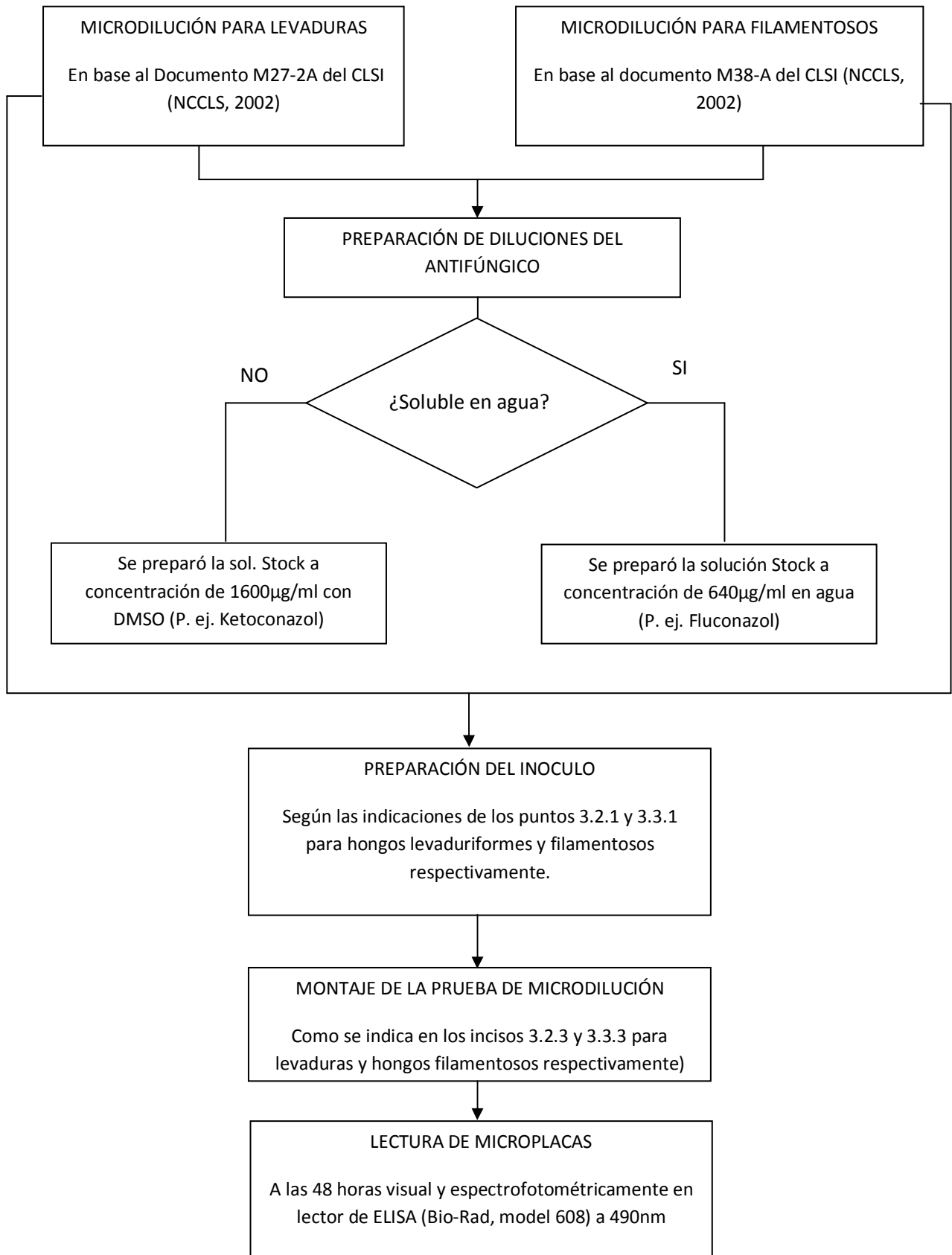


Figura 3.2 DIAGRAMA DE MICRODILUCIÓN PARA HONGOS LEVADURIFORMES Y FILAMENTOSOS EN BASE A LOS DOCUMENTOS M27-A2 Y M38-A RESPECTIVAMENTE.



3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR PARA LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS EN BASE AL DOCUMENTO M44-A (CLSI antes NCCLS, 2004)

MICROORGANISMOS

Para efectuar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos se emplearon hongos filamentosos y levaduriformes provenientes del cepario de micología de la sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC-UNAM). A su vez dichas cepas fueron donadas por el InDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Clínica), perteneciendo algunas a la colección ATCC.

Las cepas utilizadas fueron las levaduras *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC y *Cryptococcus neoformans* y, los hongos filamentosos *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* ATCC 204304. Las cepas se conservaron en agar Sabouraud-Dextrosas (SDA) (Bioxon) a 4°C hasta el momento del ensayo.

ANTIFÚNGICOS

Los antifúngicos ensayados fueron FLUCONAZOL, soluble en agua y KETOCONAZOL, insoluble en agua.

Se recomienda utilizar la sal pura del antifúngico para tener la potencia adecuada y asegurar la confiabilidad del método. En este caso no se consiguió la sal pura del fluconazol por lo que se empleó la forma farmacéutica en capsulas (Diflucan, Pfizer), comprobando su efectividad, al realizar la prueba de microdilución con la cepa de *C. parapsilosis* ATCC propuesta en el documento M27-A2 del CLSI (Antes NCCLS, 2002).

El Ketoconazol se utilizó como sal pura de potencia adecuada.

MEDIOS DE CULTIVO

Para la prueba de difusión en placa se emplearon los medios: Agar Müller-Hinton Modificado (MHM) (Bioxon); según lo recomendado por el CLSI (Antes NCCLS, 2002) en el documento M44-A, el medio RPMI 1640 (Sigma) con glutamina y sin bicarbonato sódico tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma) y ajustado a pH 7±0,1 y el agar Czapek (Dibico).

Para conservar y resembrar las cepas fue utilizado el medio agar dextrosa papa (ADP, Bioxon) para hongos filamentosos y el agar Sabouraud-Dextrosa (SDA, Bioxon) para las levaduras.

3.1.1 PREPARACION DE INÓCULO

LEVADURAS

1. Se sembraron las levaduras por estría en un tubo con SDA utilizando asa bacteriológica.
2. Fueron incubadas a 35°C por 24 a 48 horas de acuerdo a la cepa.
3. Pasado ese tiempo se tomó con asa bacteriológica una porción de colonia y se preparó con ésta una suspensión de levaduras en 5 ml de solución salina al 0.85% (SSF) estéril llegando a igualar la turbidez del Nefelómetro de Mc Farland 0.5 para obtener una concentración aproximada de 10^6 UFC/ml.

HONGOS FILAMENTOSOS

1. Para inducir el crecimiento de conidios, los hongos filamentosos puros se sembraron por picadura utilizando un asa en L en agar dextrosa papa (ADP) y se incubaron a 35°C hasta óptima conidiación, aproximadamente por siete días.
2. Después de los siete días se preparó el inóculo tomando una asada del cultivo y depositándola en 5 ml de solución salina al 0.85% (SSF) estéril buscando obtener una suspensión cuya turbidez fuera la del 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland.

3.1.2 PREPARACION DE DISCOS

Los discos se prepararon con la cantidad de antifúngico equivalente al contenido en cada uno de los pocillos de la prueba de microdilución (observar tablas); es decir, multiplicar la concentración final del fármaco en cada uno de los pocillos por el volumen total correspondiente a 0.2 ml o 200 µl, ver tablas 3.1.1 y 3.1.2.

**Tabla 3.1.1 PREPARACIÓN DE DISCOS IMPREGNADOS CON ANTIFÚNGICO SOLUBLE EN AGUA
(FLUCONAZOL)**

# de pozo	Conc. Final ($\mu\text{g/ml}$)	Vol. Final (ml)	μg finales en disco
1	64	0.2	12.8
2	32	0.2	6.4
3	16	0.2	30.2
4	8	0.2	1.6
5	4	0.2	0.8
6	2	0.2	0.4
7	1	0.2	0.2
8	0.5	0.2	0.1
9	0.25	0.2	0.05
10	0.125	0.2	0.025

1. Se preparó una solución stock de 2.56 mg/ml de fluconazol (Pfizer) en 2 ml de agua estéril (cantidad de medicamento en polvo equivalente al peso de principio activo indicado).
2. Se tomaron 0.5 ml de la solución antes preparada y aforaron a 1ml, a su vez de esta última tomaron 0.5 ml y aforaron a 1 ml, y así sucesivamente hasta obtener las 10 diluciones equivalentes; en cantidad de fármaco, a la microdilución.
3. Se tomó 5 μl de cada dilución preparada y se aplicó a discos estériles de papel filtro Whatman #5 (Schleicher and Schuell) preparados previamente en el laboratorio utilizando una perforadora, quedando con un diámetro final de 6mm.
4. Se permitió el secado total de los discos a temperatura ambiente, fueron depositaron en tubos ependorff estériles y de este modo estaban listo para ser utilizados, de no realizarse la prueba inmediatamente se guardaron en refrigeración a 4°C por no mas de dos semanas.

Tabla 3.1.2 PREPARACIÓN DE DISCOS IMPREGNADOS CON ANTIFÚNGICO INSOLUBLE EN AGUA (KETOCONAZOL)

# de pozo	Conc. Final (µg/ml)	Vol. Final (ml)	µg finales en disco
1	16	0.2	3.2
2	8	0.2	1.6
3	4	0.2	0.8
4	2	0.2	0.4
5	1	0.2	0.2
6	0.5	0.2	0.1
7	0.25	0.2	0.05
8	0.125	0.2	0.025
9	0.0625	0.2	0.0125
10	0.0313	0.2	0.00626

1. Se Preparó una solución stock de concentración 2.56mg/ml de ketoconazol (Sigma) en 2 ml de dimetil sulfoxido (DMSO, J.T. Baker).
2. Se tomaron 0.5 ml de la solución anterior y aforaron a 2 ml con DMSO, esta fue la concentración número 1.
3. A partir de la dilución antes preparada se hicieron diluciones 1:1 con DMSO (como en el punto 2 de preparación de discos con antifúngicos solubles en agua).
4. De la dilución uno a la diez se tomo 5µl e impregnó en los discos estériles de papel Watman #5 (Schleicher and Schuell).
5. Finalmente se permitió el secado de los discos a temperatura ambiente y fueron utilizados o almacenados del mismo modo que los de fluconazol.

3.1.3 MONTAJE DE PRUEBA

- Una vez ajustado el inóculo al 0.5 de Mc Farland, se sumergió un hisopo estéril a dicha suspensión; éste se roto varias veces y presiono firmemente contra la pared interna del tubo para remover el exceso de inóculo.
- Posteriormente se inoculó cada una de las placas de agar (Müller Hinton modificado (Bioxon), RPMI (Sigma) y Czapeck (Dibico); cuya superficie no presente humedad) por sembrado masivo usando el hisopo.

- Se permitió la absorción del inóculo por 5 a 10 minutos.
- Se dispensaron los discos; previamente impregnados y secos, con pinza estéril en la placa de agar y presionaron ligeramente para asegurar el contacto pleno con la superficie del medio de cultivo. La cantidad máxima de discos por placa fue de 5 para evitar traslape de halos de ser éstos muy grandes.
- Se incubaron las placas en forma invertida a 35°C por 48 horas

NOTA: Finalmente la prueba se realizó utilizando únicamente 5 de las concentraciones más representativas (que produjeron halo de inhibición) de los fármacos ensayados, para cada una de las cepas y medios de cultivo.

3.1.4 LECTURA DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR

- Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición con un vernier, reportándose el resultado en milímetros.
- La prueba se realizó por triplicado.

3.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA PARA LEVADURAS EN BASE AL DOCUMENTO M27-A2 DEL CLSI (NCCLS, 2002)

MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas fueron las levaduras *Candida parapsilosis* 22019, *C.albicans* 90027 y *Cryptococcus neoformans* provenientes del cepario de micología de la sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC-UNAM). Para su crecimiento las cepas se sembraron en agar Sabouraud-dextrosa (SDA, Bioxon), y se conservaron en refrigeración a 4°C.

ANTIFÚNGICOS

Para esta técnica también se utilizó el fluconazol y el ketoconazol llevándose a cabo las diluciones en agua y DMSO (J.T. Baker) respectivamente.

3.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

1. Se sembró una asada de colonia de levadura en forma de estría en un tubo con SDA, siendo incubado a 35°C por 24 a 48 horas dependiendo de la cepa.
2. Pasado este tiempo se tomó con asa bacteriológica una porción de colonia y se preparó con ésta una suspensión de levadura en 5 ml de SSF estéril llegando a igualar la turbidez del Nefelometro de McFarland 0.5 para obtener una concentración aproximada de 10^6 UFC/ml.
3. A continuación se realizó una dilución 1:1000 tomando 10µl del inóculo anteriormente ajustado y añadiéndolo a 10 ml del medio RPMI 1640 de este modo se obtuvo una concentración aproximada de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml.

3.2.2 PREPARACIÓN DE DILUCIONES DEL ANTIFÚNGICO

Se prepararon las soluciones Stock en recipientes estériles (Anexo III)

- *Fármacos insolubles en agua (Ketoconazol)* a una concentración de 1600µg/ml con DMSO (J.T. Baker).
- *Fármacos solubles en agua (fluconazol)* a una concentración de 640µg/ml con RPMI.

NOTA. De no utilizarse de inmediato es importante almacenar a -20°C

La preparación de cada una de las diluciones se realizó como se indica en las tablas 3.2.1 y 3.2.2. para fármacos insolubles y solubles en agua respectivamente.

Indicaciones para fármacos insolubles en agua (ketoconazol):

- Se marcaron 10 tubo ependorff de 2 ml con los números del 1 al 10 y adyacente al número la letra "i" que indicaba tubos iniciales.
- Se agregó la cantidad marcada de DMSO (J.T. Baker) a cada uno de los tubos utilizando micropipetas de 100 y 1000µl, a continuación se adiciono el volumen de solución stock propuesto en la tabla correspondiente (tabla 3.2.1) a los tubos del 1i al 4i se agitó en vortex (Baigger) por 20 segundos cada uno.

- Del tubo 4i recién preparado se tomaron volúmenes de 500, 250 y 250 μl para vaciarlos en los tubos marcados con 5i, 6i y 7i respectivamente, se agito cada tubo en vortex (Baigger).
- A continuación del tubo 7i recién agitado se tomaron los volúmenes de 500, 250 y 250 μl con micropipeta de 1000 μl siendo adicionados a los tubos 8i, 9i y 10i respectivamente, se mezclaron del mismo modo que los anteriores.
- Se marcaron otros 10 tubos ependorff con los números del 1 al 10 y a cada uno se agregó un volumen de 1960 μl de RPMI(Sigma)
- Con micropipeta de 100 μl se adicionaron 40 μl de las diluciones preparadas en los tubos iniciales del 1i al 10i a los tubos 1 al 10 que contenían RPMI (Sigma) respectivamente; de este modo la concentración máxima del disolvente DMSO (J.T. Baker) fue del 2% de este modo se aseguró su no intervención en el crecimiento del hongo.

Tabla 3.2.1 DILUCIONES PARA ANTIFÚNGICOS INSOLUBLES EN AGUA (Ketoconazol)

Tubos iniciales	Agregar vol. (μl) de DMSO	De la solución	Transferir un vol. (μl) de__	Obteniendo concentración inicial $\mu\text{g}/\text{ml}$ de	Marcar otros tubos con	Adicionar vol. de RPMI μl	Trnasferir un vol (μl) de tubos iniciales	[]final $\mu\text{g}/\text{ml}$
1i	0	Stock	1000	1600	1	1960	40	32
2i	500	Stock	500	800	2	1960	40	16
3i	750	Stock	250	400	3	1960	40	8
4i	1750	Stock	250	200	4	1960	40	4
5i	500	4i	500	100	5	1960	40	2
6i	750	4i	250	50	6	1960	40	1
7i	1750	4i	250	25	7	1960	40	0,5
8i	500	7i	500	12,5	8	1960	40	0,25
9i	500	7i	250	6,25	9	1960	40	0,125
10i	750	7i	250	3,12	10	1960	40	0,06

Indicaciones para fármacos solubles en agua (fluconazol):

- En este caso sólo fue necesario marcar una serie de tubos ependorff con los números del 1 al 10 y a cada uno agregar el volumen de RPMI (Sigma) indicado en la tabla 3.2.2
- De la solución Stock; perfectamente homogeneizada, se tomaron los volúmenes de 200 y 200µl siendo transferidos a los tubos 1 y 2, se mezclaron por 20 segundos en vortex (Baigger).
- A su vez del tubo 2 recién preparado, se tomó en dos ocasiones el volumen e 500 µl siendo adicionados a los tubos 3 y 4, también se agitaron en vortex (Baigger)por 20 segundos.
- A continuación del tubo 4 se extrajeron los volúmenes de 500, 250 y 250 µl para adicionarse a los tubos 5, 6 y 7 respectivamente, se mezclaron en vortex (Baigger)por 20 segundos.

Tabla 3.2.2 DILUCIONES PARA ANTIFÚNGICOS SOLUBLES EN AGUA

TUBO	RPMI (µl)	De la solución	Se transfirió un volumen de (µl)	[] final µg/ml
1	800	Stock	200	128
2	1800	Stock	200	64
3	500	Tubo 2	500	32
4	1500	Tubo 2	500	16
5	500	Tubo 4	500	8
6	750	Tubo 4	250	4
7	1750	Tubo 4	250	2
8	500	Tubo 7	500	1
9	750	Tubo 7	250	0.5
10	1750	Tubo 7	250	0.25

3.2.3 MONTAJE DE PRUEBA DE MICRODILUCIÓN

1. En microplacas de 96 pozos fondo redondo se adicionaron 100µl de cada dilución preparada del antifúngico más 100 µl del inóculo previamente ajustado a la concentración aproximada de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml.
2. La primer columna de la placa se utilizó para el control negativo (C-) que correspondió a 200µl del medio RPMI y la última columna o numero 12 perteneció al control positivo (C+) constituido por 100 µl de RPMI más 100 µl del inóculo, estos dos controles sirvieron como referencia esencial para la obtención de los resultados.
3. Se Incubó a 35°C por 24 horas (lectura visual de la placa) y 48 horas (segunda lectura visual y con el lector de ELISA (Bio-Rad, model 608)) a longitud de onda igual a 490nm.

NOTA: La preparación del inóculo se realizó el mismo día que se corrió la prueba y todo el procedimiento se realizo en campana de flujo laminar.

3.2.4 LECTURA DE LAS MICROPLACAS

1. Se leyeron las microplacas a las 24 h de incubación mediante un espejo invertido
2. Se Observó el pozo del control positivo (C+) y el pozo del control negativo (C-) o de esterilidad, en el primero debe haber crecimiento y en el segundo no, si esto es correcto se procede a la lectura.
3. En forma visual se determino el porcentaje de inhibición del crecimiento en cada uno de los pozos (con antifúngico e inóculo) en comparación con el control positivo (C+) que corresponde al 100% de crecimiento. Reportándose con 4 cruces 100% de crecimiento, con tres cruces 75% de crecimiento, con dos cruces 50% de crecimiento, con una cruz 25% de crecimiento y con el numero cero la ausencia visible de crecimiento.
4. La lectura final se realizó a las 48 horas de nuevo en forma visual y en lector de ELISA (Bio-Rad, model 608) a una longitud de onda de 490nm.

5. Se obtuvo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que en el caso de los antifúngicos azólicos corresponde a la concentración más baja de antifúngico que inhiba el 50% del crecimiento del inoculo con respecto al control positivo.

3.3 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA PARA HONGOS FILAMENTOSOS EN BASE AL DOCUMENTO M38-A DEL CLSI (NCCLS, 2002)

MICROORGANISMOS

Las cepas ensayadas fueron los hongos filamentosos *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* ATCC 204304 provenientes del cepario de micología de la sección de Ciencias de la Salud Humana de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC-UNAM). Para su crecimiento las cepas se sembraron en agar dextrosa-papa (ADP, Bioxon), y se consrvaron en refrigeración a 4°C.

ANTIFÚNGICOS

Para esta técnica también se utilizó el fluconazol y el ketoconazol llevandose a cabo las diluciones en agua y DMSO (J.T. Baker) respectivamente.

3.3.1 PREPARACIÓN DE INOCULO

1. Las cepas hongos filamentosos puros se sembraron en agar dextrosa-papa (ADP, Bioxon) por picadura con asa en forma de "L" y se incubaron a 35°C hasta lograr óptima conidiación, aproximadamente por siete días
2. En un tubo de ensaye con 5ml de solución salina al 0.85% (SSF) estéril se preparó una suspensión que igualara la turbidez del 0.5 del Nefelometro de McFarland, se adicionó un poco de Tween 20 (aproximadamente 0.01 ml) para facilitar la preparación del inoculo.
3. Se permitió reposar por tres a cinco minutos (3 a 5min)
4. La parte superior del homogenizado se transfirió a un tubo estéril y se mezcló en vortex (Baigger) por 15 segundos.
5. Se ajusto la solución a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml; efectuando la cuenta de conidios en la cuadrícula grande de la cámara de Neubauer (debido a que el tamaño de conidios es distinto para cada especie, se realizaron las diluciones necesarias en SSF para obtener la concentración de conidios sugerida).

6. Se realizó una dilución 1:50 en RPMI (Sigma), tomando 100µl del inóculo antes ajustado y adicionándolo a 4.9 ml del medio RPMI (Sigma); esta suspensión final corresponde a una concentración de conidios aproximada de 0.4×10^4 a 5×10^5 UFC/ml.

3.3.2 PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE ANTIFÚNGICO

Se siguió el mismo procedimiento que para la preparación de diluciones de antifúngico indicada para levaduras, por consiguiente se siguieron las indicaciones del punto 3.2.2 y de las tablas 3.2.1 y 3.2.2.

3.3.3 MONTAJE DE PRUEBA

Se siguió el mismo procedimiento que para la microdilución de hongos levaduriformes; es decir:

1. En microplacas de 96 pozos fondo redondo se adicionaron 100µl de cada dilución preparada del antifúngico más 100 µl del inóculo previamente ajustado a la concentración aproximada de 0.4×10^4 a 5×10^5 UFC/ml
2. La primera columna de la placa se utilizó para el control negativo (C-) que correspondió a 200µl del medio RPMI (Sigma) y la última columna o número 12 perteneció al control positivo (C+) constituido por 100 µl de RPMI (Sigma) más 100 µl del inóculo, estos dos controles sirvieron como referencia esencial para la obtención de los resultados.
3. Se incubó a 35°C por 48 horas (lectura visual y con el lector de ELISA (Bio-Rad, modelo 608)) a longitud de onda igual a 490nm.

NOTA: La preparación del inóculo se realizó el mismo día que se corrió la prueba y todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar.

3.3.4 LECTURA DE MICROPLACAS

1. Se leyeron las microplacas a las 48 h de incubación mediante un espejo invertido
2. Se observó el pozo del control positivo (C+) y el pozo del control negativo (C-) o de esterilidad, en el primero debe haber crecimiento y en el segundo no, si esto es correcto se procede a la lectura.
3. En forma visual se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento en cada uno de los pozos (con antifúngico e inóculo) en comparación con el control positivo (C+) que corresponde al 100% de crecimiento. Reportándose con 4 cruces 100% de

crecimiento, con tres cruces 75% de crecimiento, con dos cruces 50% de crecimiento, con una cruz 25% de crecimiento y con el número cero la ausencia visible de crecimiento.

4. La lectura final en lector de ELISA (Bio-Rad, model 608) a una longitud de onda de 490nm.
5. Se obtuvo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que en el caso de los antifúngicos azólicos; utilizados en este experimento, corresponde a la concentración más baja de antifúngico que produjo una inhibición importante del crecimiento (50%) con respecto al pocillo del control positivo.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR EN BASE AL DOCUMENTO M44-A (CLSI/NCCLS, 2004).

En el caso de la investigación de nuevos compuestos antifúngicos es muy importante determinar si el compuesto o extracto en estudio presenta actividad antifúngica, para esto se puede seguir la metodología de difusión en agar. En este experimento de tesis se busco obtener evidencia de la efectividad de dicho método para reconocer a las cepas de levaduras y hongos filamentosos sensibles o no a determinado antifúngico, y a su vez elegir el medio de cultivo que evidencie esta actividad con mayor claridad.

La prueba de difusión en agar se encuentra estandarizada para levaduras del género *Candida* y el fármaco fluconazol en el documento M44-A del CLSI antes NCCLS (2004), y en esta metodología se recomienda el uso del medio de cultivo Müller-Hinton modificado al adicionar 2% de glucosa y 0.5µg/ml de azul de metileno (Hope, Pharmaceuticals) (MHM). Debido a que la investigación de nuevos compuestos antifúngicos es de reciente implementación en el laboratorio de micología medica de la FESC-UNAM resultó importante determinar si el medio recomendado es adecuado para las cepas de *Candida* y además para otras levaduras como *C. neoformans* e incluso para hongos filamentosos como *A. fumigatus* y *A. flavus*; o si es posible emplear otros medios de cultivo y, que proporcionen datos confiables.

En la tabla 4.1.1 se mencionan los promedios y desviación estándar de halos de inhibición de levaduras obtenidos al utilizar discos impregnados con diferentes concentraciones de fluconazol en los medios de cultivo Müller-Hinton Modificado (MHM) y RPMI con agar. Antes de montar la prueba de difusión en agar se comprobó el crecimiento de las cepas de levaduras y hongos filamentosos ensayados en los tres medios de cultivo del estudio, y no se observo crecimiento alguno de ninguna levadura ensayada en el medio Czapek, por lo que no se utilizo para el ensayo con levaduras.

De acuerdo a la tabla 4.1.1 y su respectiva grafica (4.1.1) los discos de 64µg/ml proporcionaron halos más grandes y fáciles de medir, lo que nos lleva a decir que existe sensibilidad de las cepas ensayadas a dicho fármaco (fluconazol), de los dos medios de cultivo empleados sólo el Müller-Hinton Modificado (MHM) arrojó valores de sensibilidad para todas las levaduras investigadas.

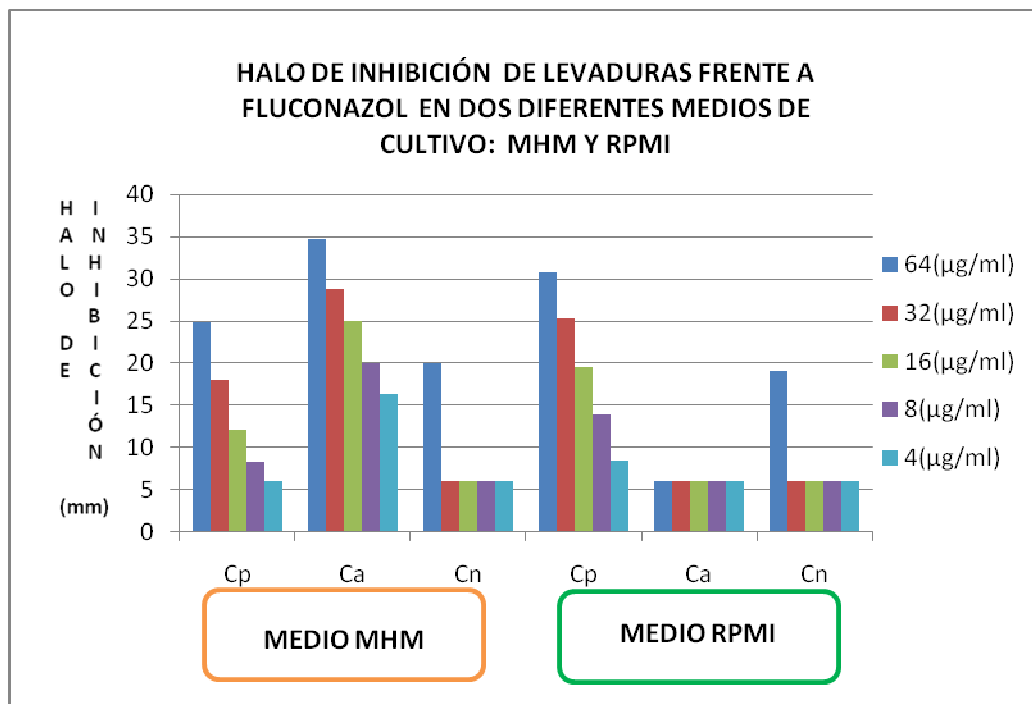
Tabla 4.1.1 PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LEVADURAS (*C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. neoformans*) FRENTE A FLUCONAZOL EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: AGAR MÜLLER-HINTON CON AZUL DE METILENO Y GLUCOSA (MHM) Y RPMI 1640 CON AGAR

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DE FLUCONAZOL (µg/ml)	PROMEDIO DE HALO (mm) <i>C.p</i> *	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) <i>C.p</i> *	PROMEDIO DE HALO (mm) <i>Ca</i> *	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) <i>Ca</i> *	PROMEDIO DE HALO (mm) <i>Cn</i> *	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) <i>C.n</i> *
**M-H	64	24.8	3.9	34.7	5	20	3
	32	18	4.3	28.8	3.5	6	0
	16	12	3.3	25	4.5	6	0
	8	8.2	2.6	20	5.8	6	0
	4	6	0	16.3	2.3	6	0
**RPMI	64	30.7	4.9	6	0	19	1
	32	25.2	4.3	6	0	6	0
	16	19.5	5.2	6	0	6	0
	8	13.8	6	6	0	6	0
	4	8.3	2.7	6	0	6	0

*Cp = *Candida parapsilosis*; Ca = *Candida albicans* y Cn = *Cryptococcus neoformans*

**M-H = Agar Müller-Hinton Modificado y RPMI: Agar RPMI 1640

Gráfica 4.1.1



En la tabla 4.1.2 y en las graficas 4.1.2 y 4.1.3 se muestra que con el uso de ketoconazol el halo de inhibición es mucho más evidente que con fluconazol (ver tabla 4.1.1) lo que indica la mayor potencia del ketoconazol, también se evidencia la relación directa de la cantidad de fármaco en los discos con respecto al tamaño del halo (ver figura 4.1.1). La reproducibilidad de la prueba para *C. parapsilosis* y *C. albicans* es muy buena en el medio Müller-Hinton modificado (MHM) al obtenerse una desviación estándar inferior a 2, pero resultó complicado obtener una buena reproducibilidad en todos los casos porque son muchos las variables que deben controlarse adecuadamente, desde la preparación y llenado de las placas, que el inóculo se haya estandarizado, que no haya humedad en las placas al montar la prueba; pero en general los valores obtenidos indican la sensibilidad al antifúngico, lo que daría la pauta para realizar la microdilución y determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).

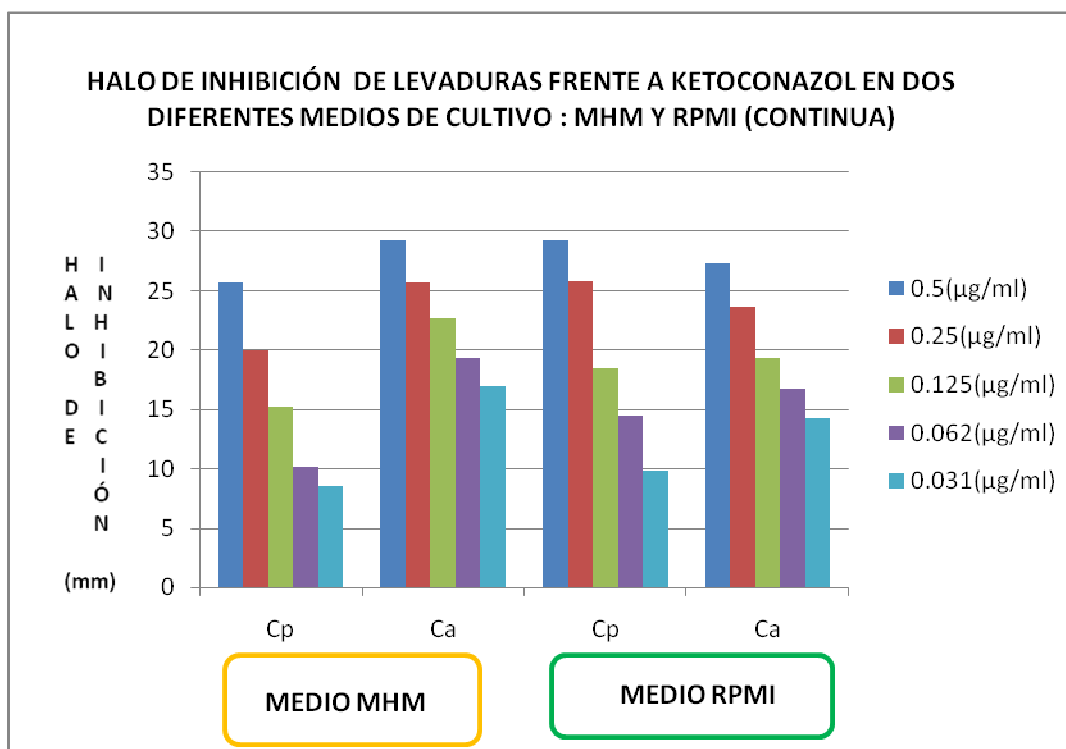
Tabla 4.1.2 PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LEVADURAS (*C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. neoformans*) FRENTE A KETOCONAZOL EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: AGAR MÜLLER-HINTON CON AZUL DE METILENO Y GLUCOSA (MHM) Y RPMI 1640 CON AGAR

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DE KETOCONAZOL (µg/ml)	PROMEDIO DE HALO (mm) *C.p	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) *C.p	PROMEDIO DE HALO (mm) *Ca	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) *C.a	CONCENTRACIÓN DE KETOCONAZOL (µg/ml)	PROMEDIO DE HALO (mm) *Cn	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) *C.n
**M-H	0.5	25.7	1.7	29.3	2.1	8	34.7	3.1
	0.25	20	1.6	25.7	1.5	4	31	2.6
	0.125	15.2	0.96	22.7	1.2	2	24.3	2.5
	0.062	10.2	3.5	19.3	1.2	1	13	4.6
	0.031	8.5	3	17	4.4	0.5	10.3	2.5
**RPMI	0.5	29.3	1.3	27.3	3.8	8	32.3	1.5
	0.25	25.8	1.9	23.7	5.1	4	31.3	1.5
	0.125	18.5	3.5	19.3	6	2	28.7	3
	0.062	14.5	3	16.7	3.5	1	16.7	4.5
	0.031	9.8	2.6	14.3	4.9	0.5	8.3	2.1

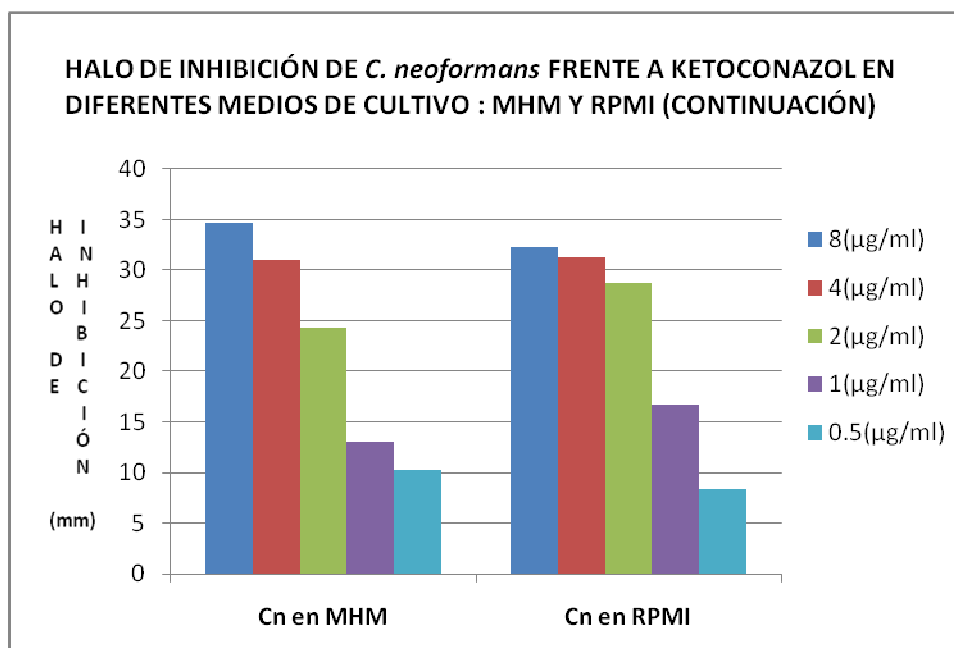
*Cp = *Candida parapsilosis*; Ca = *Candida albicans* y Cn = *Cryptococcus neoformans*

**M-H = Agar Müller-Hinton Modificado y RPMI: Agar RPMI 1640

Gráfica 4.1.2



Gráfica 4.1.3



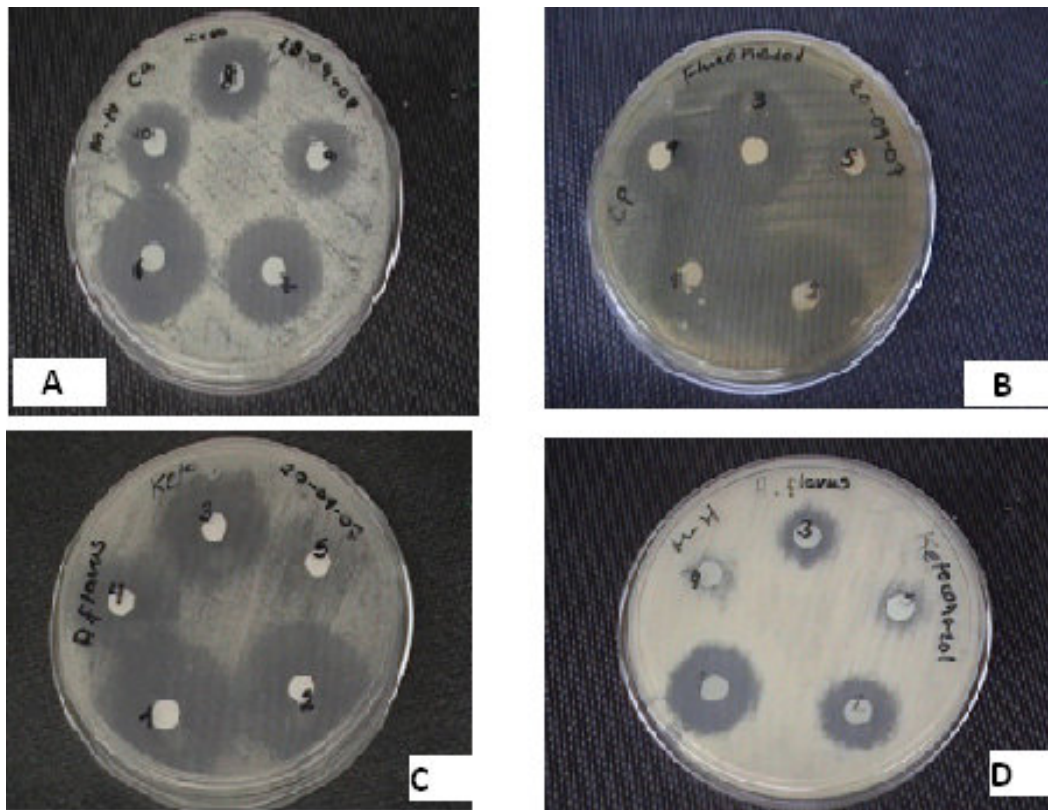


Figura 4.1.1 Esta imagen indica la sensibilidad a los diferentes fármacos empleados en el ensayo. Se observan los halos de inhibición de A) *C. albicans* en medio M-H y ketoconazol, B) *C. parapsilosis* en RPMI y fluconazol. C) *A. flavus* en medio Czapek y ketoconazol y D) *A. flavus* en medio M-H y ketoconazol.

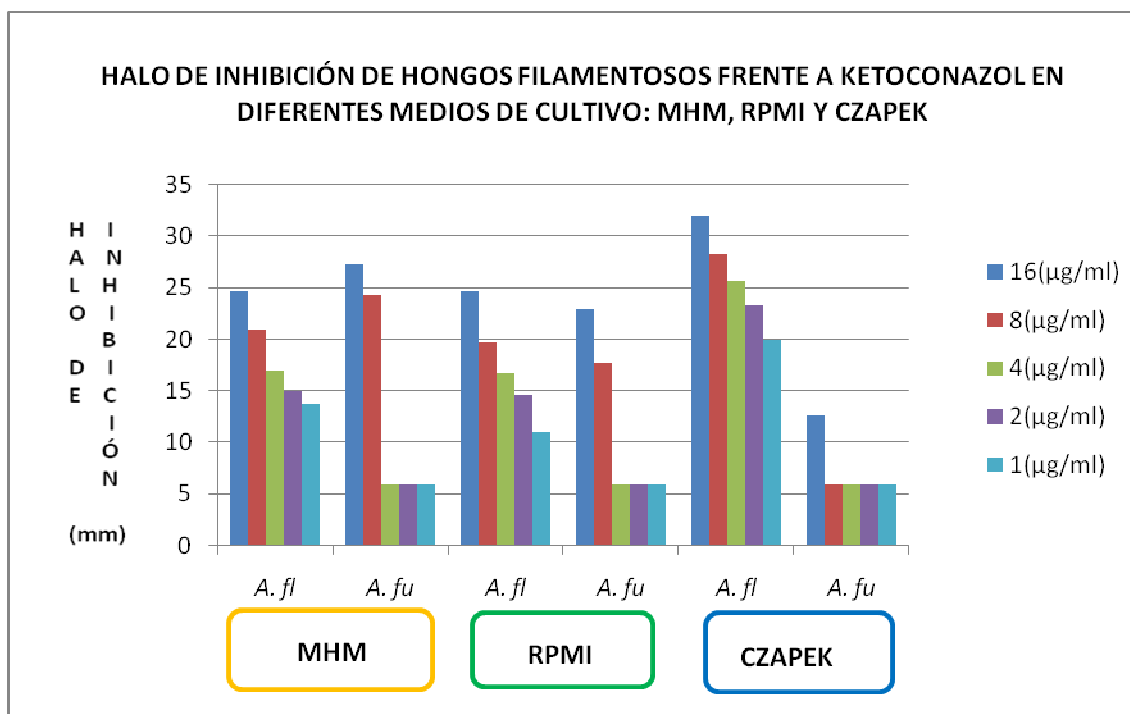
Los hongos filamentosos ensayados fueron *A. flavus* y *A. fumigatus*, ambos clasificados como oportunistas y muy difíciles de erradicar cuando provocan infección sistémica. En este experimento también se pudo obtener evidencia de sensibilidad al ketoconazol en los tres medios de cultivo utilizados (ver tabla 4.1.3 y Gráfica 4.1.4), siendo más evidente con la cantidad más alta, por lo que de realizarse nuevamente la prueba se recomendarían los discos de 16µg/ml.

Tabla 4.1.3 PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS (*A. fumigatus* y *A. flavus*) FRENTE A KETOCONAZOL EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: AGAR MÜLLER-HINTON CON AZUL DE METILENO Y GLUCOSA (MHM), RPMI 1640 CON AGAR Y CZAPEK

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DE KETOCONAZOL (µg/ml)	PROM. DE HALO (mm)		DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	
		A. Fl*	A. Fu*	A. Fl*	A. Fu*
**M-H	16	24.7	27.3	2.1	1.2
	8	21	24.3	5.2	0.58
	4	17	6	4.6	0
	2	15	6	4	0
	1	13.8	6	3	0
**RPMI	16	24.7	23	2.5	1
	8	19.7	17.7	3.2	1.53
	4	16.7	6	2.5	0
	2	14.7	6	1.5	0
	1	11	6	2	0
CZAPEK	16	32	12.7	1	2.1
	8	28.3	6	0.6	0
	4	25.7	6	0.6	0
	2	23.3	6	1.5	0
	1	20	6	0	0

*A.fl= *A. flavus*, y A. fu= *A. fumigatus* **M-H = Agar Müller-Hinton Modificado y RPMI: Agar RPMI 1640

Gráfica 4.1.4



1.2 RESULTADOS DE PRUEBA DE MICRODILUCIÓN

En este proyecto se utilizó la prueba de microdilución en base a la metodología estándar del CLSI (antes NCCLS, 2002) para hongos levaduriformes presente en el documento M27-A2 y para hongos miceliales encontrada en el documento M38-A; de este modo se obtuvo la concentración mínima inhibitoria de los hongos en estudio *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *A. flavus* y *A. fumigatus*

En la tabla 4.2.1 se muestra la respuesta de cada levadura ensayada (*C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. neoformans*) frente a los dos antifúngicos evaluados. La concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) se definió como la concentración más baja de antifúngico que provocó la inhibición del 50% o más de crecimiento de levaduras con respecto al control positivo (sin antifúngico) que se tomo como 100% de crecimiento, la prueba se practico por triplicado mostrándose la totalidad de resultados en el Anexo IV.

Según los criterios señalados en el documento M27-A2, las cepas se pueden clasificar en sensibles(S), sensibles según la dosis (SDD) y resistentes (R) dependiendo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que posean. Los puntos de corte que se tomaron para definir la sensibilidad a los antifúngicos en el presente estudio fueron los propuestos por *Silva et al., 2002* (Tabla 4.2.2)

En base a los valores señalados en la tabla 4.2.1 siguiendo los criterios señalados en la tabla 4.2.2 las levaduras estudiadas fueron sensibles al ketoconazol y fluconazol.

Tabla 4.2.1 PROMEDIO DE CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI) OBTENIDO A PARTIR DE LA PRUEBA DE MICRODILUCIÓN PARA LEVADURAS EN BASE AL DOCUMENTO M27-A2 (NCCLS/CLSI 2002)

CEPA	CMI (µg/ml) DE KETOCONAZOL LECTURA VISUAL	CMI (µg/ml) DE KETOCONAZOL LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA A 490nm	CMI (µg/ml) DE FLUCONAZOL LECTURA VISUAL	CMI (µg/ml) DE KETOCONAZOL LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA A 490nm
<i>C.parapsilosis</i>	0.031 (S)	0.031-0.062 (S)	0.5-2 (S)	0.25-1 (S)
<i>C.albicans</i>	0.031-0.062 (S)	0.031 (S)	0.125 (S)	0.125-2 (S)
<i>C.neoformans</i>	0.031-0.062 (S)	0.031 (S)	0.125-1 (S)	0.125-2 (S)

µg/ml= Concentración del fármaco en microgramos por mililitro

Tabla 4.2.2 Criterios de susceptibilidad de las levaduras frente a antifúngicos de administración sistémica (Silva, 2002).

Criterios	Anfotericina B	Itraconazol	Ketoconazol	Fluconazol
Sensible (S)	<1	<0.125	<0.125	<8
Sensible según la dosis (SDD)		0.25-0.5	0.25-0.5	16-32
Resistente (R)	>2	>1	>1	>64

En la figura 4.2.1 hay un ejemplo de cómo se observa el comportamiento del crecimiento de las levaduras *C. albicans* y *C. parapsilosis* en la microplaca frente al fluconazol y ketoconazol. En el mismo esquema se ve el control positivo y negativo del crecimiento de microorganismos; en el primero (C+) el crecimiento es evidente a simple vista debido a que no contiene fármaco que lo inhiba y el medio RPMI es rico para lograr su crecimiento óptimo, en el segundo caso no se ve crecimiento alguno lo que asegura que no hubo contaminación de la prueba y se puede proceder a la lectura.

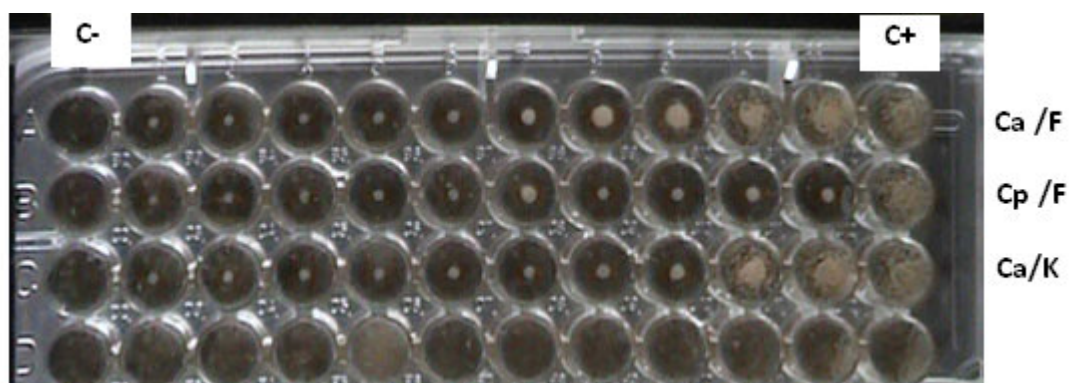


Figura 4.2.1 Imagen de la prueba de microdilución en placa para levaduras después de seguir las recomendaciones propuestas por el CLSI (NCCLS, 2002). Se observa el comportamiento del crecimiento de *C. albicans* frente a fluconazol y ketoconazol (Ca/F y Ca/K respectivamente) y de *C. parapsilosis* con fluconazol (Cp/F).

En el caso de de hongos filamentosos se siguieron los criterios propuestos por Catalán et al., 2006, los cuales indican que *A. fumigatus* es sensible si CMI es igual o menor a $0.39 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ y *A. flavus* si su CMI es igual o menor a $0.15 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$; es decir, los hongos ensayados fueron sensibles al ketoconazol (ver tabla 4.2.3). La totalidad de resultados se muestran en el Anexo V.

No se realizó el estudio con fluconazol porque *Aspergillus sp* presenta resistencia natural a dicho compuesto.

Tabla 4.2.3 PROMEDIO DE CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI) OBTENIDO A PARTIR DE LA PRUEBA DE MICRODILUCIÓN PARA HONGOS FILAMENTOSOS EN BASE AL DOCUMENTO M38-A (NCCLS/CLSI 2002)

CEPA	CMI ($\mu\text{g/ml}$) DE KETOCONAZOL LECTURA VISUAL	CMI ($\mu\text{g/ml}$) DE KETOCONAZOL LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA A 490nm
<i>A. flavus</i>	0.062-1 (S)	0.031-1 (S)
<i>A.fumigatus</i>	0.125 (S)	0.062-0.5 (S)

$\mu\text{g/ml}$ = Concentración del fármaco en microgramos por mililitro

5. DISCUSIÓN

En las últimas décadas las micosis han adquirido una gran importancia y uno de los principales indicadores de este hecho es la continua e imparable notificación de casos clínicos (Sandvend, 2000; Rodero et al., 2005). Aunque se debe destacar que este incremento ha ido al parejo de muchos avances médicos que han logrado aumentar la esperanza de vida de la población en general.

Se describen con creciente frecuencia infecciones producidas por los más diversos organismos fúngicos como son los Mucorales o *Scedosporium inflatum*, pero la mayoría de las infecciones siguen siendo producidas por dermatofitos, *Malassezia*, *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*. Estos tres últimos agentes están asociados a infecciones invasoras con un pronóstico más sombrío; es decir, presentan alta morbilidad y mortalidad, en parte debido a las enfermedades subyacentes que predisponen a estas micosis y, en parte, a la mortalidad directa asociada a la acción patógena de estos microorganismos (Cuenca et al, 2002). Este aumento en la incidencia de infecciones fúngicas, también ha llevado a una utilización mayor de los fármacos que se encuentran en el mercado y ya se han reportado casos de resistencia secundaria asociada al consumo de estos fármacos (Mellado et al., 2002).

También ha surgido la necesidad de investigar nuevos antifúngicos de origen sintético y natural, por lo que disponer de técnicas adecuadas y estandarizadas para el estudio de sensibilidad a estos nuevos fármacos y a los ya existentes es el objetivo actual de muchos laboratorios clínicos y de investigación.

En este estudio se buscó evaluar la eficacia de la prueba de difusión en agar; utilizada como método de rutina en bacteriología, para determinar la sensibilidad a fluconazol y ketoconazol de *C. albicans*, *C.parapsilosis*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* y *A. flavus* en diferentes agares que se encuentran en el laboratorio de micología médica (MHM, Czapek y RPMI). El experimento se realizó siguiendo varias recomendaciones del documento de referencia M44-A (CLSI/NCCLS, 2004), incluso para cepas no señaladas en dicho documento como son *C. neoformans* y los hongos filamentosos. Al aplicar esta técnica se logró observar la formación del halo de inhibición, cuando menos en la concentración más alta del fármaco empleado, lo que indica que la difusión radial de los fármacos fue adecuada para poder clasificar a las cepas empleadas como sensibles o no, y también en un momento dado poder predecir la concentración mínima

inhibitoria (CMI) aproximada en base al tamaño del halo de inhibición como lo señala el documento M44-A del CLSI (2004).

En base al comportamiento del halo de inhibición en los tres diferentes medios de cultivo se puede señalar que para levaduras el más adecuado es el Müller-Hinton modificado, porque en este medio el crecimiento de todas las cepas fue óptimo y la difusión tanto de ketoconazol como de fluconazol se logro en todos los casos. En cambio con el medio RPMI no se observo halo de inhibición de *C.albicans* con discos impregnados de fluconazol, aun cuando la prueba de microdilución señala que esta cepa es sensible a este fármaco (Tabla 4.1.1). En el medio de cultivo Czapek no se realizo la prueba de difusión en agar, debido a que las cepas de las levaduras ensayadas no lograron crecer en este medio, dicho comportamiento se pudo deber a que el medio Czapek es de composición muy pobre (sólo contiene sacarosa y algunas sales metalicas además del agar) lo que no favoreció su crecimiento.

Aspergillus fumigatus y *A. flavus* se probaron en los tres medios de cultivo señalados (MHM, RPMI y Czapek), utilizando únicamente al ketoconazol como antifúngico, estas especies tienen resistencia innata al fluconazol, por lo que no se produjo halo de inhibición con discos impregnados con este fármaco.

Una vez realizada la técnica de difusión en agar, se observo con los tres medios de cultivo halos adecuados para poder ser medidos con vernir y que no presentaban efecto de colonias dentro del halo. Pero en el medio Czapek se logro observar los halos más grandes, lo que indica que en este medio hay mayor facilidad para la difusión radial del ketoconazol, a pesar de ser un fármaco insoluble en agua; además como se señala en líneas arriba, las levaduras no pueden crecer en este medio, por lo que es mas selectivo, y se corre menor riesgo de contaminación por levaduras.

La prueba de microdilución para levaduras y hongos filamentosos en base a los documentos del CLSI (NCCLS, 2002) M27-A2 y M38-A respectivamente, permitió clasificar a las cepas utilizadas como sensibles, porque se encontraron dentro de los rangos de puntos de corte propuestos en los documentos antes señalados, y por otros investigadores que también han realizado la prueba como Silva et al., 2002 y Catalán, 2006.

El método de microdilución en placa presenta varios inconvenientes para implementarse como procedimiento habitual en los laboratorios clínicos (CLSI/NCCLS, 2002), pero es el de referencia para determinar la sensibilidad de los hongos a los diferentes antifúngicos, por esta razón a raíz de los resultados obtenidos en este experimento, se propone implementar el método de difusión en agar como técnica de tamizaje para elegir los compuestos que presenta actividad antifúngica y solamente con estos realizar la prueba de microdilución, con todos los cuidados que esta implica.

Un aspecto mencionado en los resultados es que efectuamos la interpretación de éstos en base a puntos de corte que son establecidos luego del análisis minucioso y constatación de las distribuciones de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente antimicrobiano (básicamente, como se distribuye y funciona el fármaco en el paciente), correlacionando datos clínicos de resultados individuales de CMI con la respuesta del paciente, finalmente es posible también establecer los puntos de corte de la técnica de difusión en agar una vez conocidos los de microdilución.

En la metodología de referencia se mencionan los puntos de corte de varios fármacos antifúngicos, utilizando esto como guía es posible realizar la técnica de difusión en agar, y prever con cierto grado de confianza la sensibilidad de una cepa a determinado antifúngico con solo realizar esta técnica con las precauciones señaladas en la metodología.

Cabe mencionar que debido a la falta de correlación entre las condiciones de la prueba "*in vitro*" y el contexto "*in vivo*", los resultados de una prueba de sensibilidad a antifúngicos no puede ni debe usarse como factor de predicción del resultado terapéutico del uso de determinado agente antifúngico pero el reconocimiento temprano y exacto de la existencia de hongos resistentes a determinado fármaco es una ayuda significativa para el manejo óptimo de los pacientes. Por lo tanto, las pruebas de sensibilidad "*in vitro*" para detectar la resistencia proporcionan datos valiosos que al ser usados junto con una identificación y aislamiento adecuados, además de la historia clínica del paciente es posible optimizar el tratamiento, aumentando las posibilidades de una evolución favorable (Cuenca et al., 2002).

6. CONCLUSIONES

- Debido a la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos, a procesos infecciosos producidos por hongos que no las producían o saprofitos y a la amplia utilización de antifúngicos el implementar y desarrollar métodos reproducibles y estándar de evaluación “*in vitro*” es obligatorio para instaurar el tratamiento más adecuado, y para la investigación de nuevos compuestos antifúngicos.
- Se logro determinar la CMI de las levaduras *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. neoformans* en base a la metodología del documento M27-A2 del CLSI (NCCLS, 2002), de acuerdo a los criterios documentados en la literatura se consideraron como sensibles(S).
- Se consiguió obtener los valores de CMI de *A. fumigatus* y *A. flavus* llevando a cabo la metodología de microdilución tomando como guía al documento M38-A del CLSI (NCCLS, 2002), y de acuerdo a la literatura citada se clasificarón como sensibles(S).
- La prueba de difusión en agar en base al documento M44-A, permitió elegir el medio más adecuado para el ensayo con levaduras y con hongos filamentosos. De los tres agares empleados el MHM es el mejor para determinar la sensibilidad de levaduras (*C. albicans*, *C.parapsilosis* y *C. neoformans*), por haber sido el más reproducible y proporcionar resultados con los dos fármacos probados (fluconazol y ketoconazol). Para los hongos filamentosos el medio de elección fuel el Czapek porque los halos que proporcionó fueron bien definidos y fáciles de medir, además de que en este medio no crecen las levaduras, disminuyendo el riesgo de contaminación por estos microorganismos.

7. ANEXOS

ANEXO I

7.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

7.1.1 PREPARACIÓN DE AGAR CZAPEK

Rehidratar 49g del medio en un litro de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición y completa disolución del medio. Esterilizar a 121°C (15lb de presión) 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C y vaciar en cajas petrí estériles.

7.1.2 MEDIO RPMI-1640 (SIGMA)

Medio sintético recomendado para las pruebas de susceptibilidad antifúngica, con glutamina sin bicarbonato y con rojo de fenol como indicador de pH. Debe ser ajustado a PH 7 a 25 °C con MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfónico) (concentración final 0.165 mol/L).

7.1.3 PREPARACIÓN DE MEDIO RPMI 1640

Rehidratar 10.4g del medio de cultivo RPMI 1640 en un volumen de 900 ml de agua destilada. Agregar 34.53 g de MOPS como buffer. Si la formulación de RPMI no contiene rojo de fenol agregar 5.3 mg de dicho indicador, ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio 10N cuyo volumen es medido. Finalmente ajustar el volumen a un litro con agua destilada y mezclar perfectamente. Esterilizar por filtración.

7.1.4 PREPARACIÓN DE RPMI 1640 CON AGAR NOBLE

Rehidratar 10.4g del medio RPMI 1640 en 400 ml de agua destilada. Agregar 34.53g de MOPS como buffer, si no contiene rojo de fenol adicionar 5.3 mg, llegar a un pH de 7 con NaOH 10N., finalmente ajustar el volumen a 500ml con agua destilada y mezclar perfectamente. Esterilizar por filtración.

En otro matraz pesar 15g de agar noble e hidratar con 500ml de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición y completa disolución del agar. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Dejar enfriar un poco.

Como último paso agregar el medio RPMI 1640 antes preparado al agar noble recién esterilizado e incorporar perfectamente. Proceder al llenado de las cajas petrí.

7.1.5 PREPARACIÓN DE MEDIO MULLER-HINTON CON 2% DE GLUCOSA Y 0.5µg/ml DE AZUL DE METILENO.

Pesar 38g del medio e hidratarlo con 1000ml de agua destilada, mezclar y calentar agitando frecuentemente hasta completa clarificación. Una vez clarificado el medio agregar 2% de glucosa (dextrosa); es decir, 20g de glucosa, también adicionar 500µg de azul de metileno. Incorporar perfectamente. Finalmente esterilizar a 10 libras (115°C) por 10 minutos.

NOTA: Tener mucha precaución en el llenado de las placas, éste debe llegar a una altura entre 3-5 mm para lograr una buena difusión.

ANEXO II

7.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

7.2.1 ESTÁNDAR DE TURBIDEZ PARA PREPARACIÓN DEL INÓCULO (0.5 del Nefelometro de McFarland)

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 , equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO_4 se prepara como sigue:

1. Una alícuota de 0,5 ml de 0,048 m/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) se agrega a 99,5 ml de H_2SO_4 de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
2. La densidad correcta del estándar de turbidez debería verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
3. La suspensión de Sulfato de Bario debe transferirse en alícuotas de 4 a 6 ml a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
4. Estos tubos deben ser bien sellados y almacenados en la obscuridad a temperatura ambiente.
5. El estándar de turbidez debe ser bien agitado en un vortex mecánico antes de usar y se debe revisar que haya una apariencia turbia uniforme. Si aparecen partículas grandes debe ser reemplazado. Suspensiones de partículas de latex pueden agregarse para agitar invirtiendo el tubo suavemente sin usar vortex.
7. El estándar de Sulfato de Bario debe ser reemplazado o verificado su densidad mensualmente.

7.2.2 SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA (SSF)

Pesar 0.85 g de cloruro de sodio (NaCl) agregarlos a un matraz volumétrico y aforar a 100ml con agua destilada y desionizada.

Tabla 7.3.3 Diámetro del halo de inhibición (mm) en los medios de cultivo Muller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar y Czapek para la cepa *Cryptococcus neoformans* y utilizando como antifúngico FLUCONAZOL.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DE ANTIFÚNGICO (µg/ml)	TAMAÑO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO (mm)	DESVIACIÓN ESTANDAR (S)
M-H	64	23	17	20	20	3
	32	6	6	6	6	0
	16	6	6	6	6	0
	8	6	6	6	6	0
	4	6	6	6	6	0
RPMI	64	18	20	19	19	1
	32	6	6	6	6	0
	16	6	6	6	6	0
	8	6	6	6	6	0
	4	6	6	6	6	0

Tabla 7.3.4 Diámetro del halo de inhibición (mm) en los medios de cultivo Muller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar y Czapek para la cepa *Candida parapsilosis* y utilizando como antifúngico KETOCONAZOL.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DEL ANTIFÚNGICO (µg/ml)	TAMAÑO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)				PROMEDIO (mm)	DESVIACION ESTANDAR (S)
M-H	0.5	26	24	28	25	25.7	1.7
	0.25	20	18	22	20	20	1.6
	0.125	16	15	16	14	15.2	0.96
	0.062	14	12	6	9	10.2	3.5
	0.031	12	10	6	6	8.5	3
RPMI	0.5	29	31	29	28	29.3	1.3
	0.25	27	27	23	26	25.8	1.9
	0.125	22	21	16	15	18.5	3.5
	0.062	17	17	13	11	14.5	3
	0.031	12	10	6	11	9.8	2.6

Tabla 7.3.5 Diámetro del halo de inhibición (mm) en los medios de cultivo Muller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar y Czapek para la cepa *Candida albicans* y utilizando como antifúngico KETOCONAZOL.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DEL ANTIFÚNGICO (µg/ml)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
M-H	0.5	31	30	27	29.3	2.1
	0.25	27	26	24	25.7	1.5
	0.125	24	22	22	22.7	1.2
	0.062	20	18	20	19.3	1.2
	0.031	20	12	19	17	4.4
RPMI	0.5	30	23	29	27.3	3.8
	0.25	28	18	25	23.7	5.1
	0.125	25	13	20	19.3	6
	0.062	20	13	17	16.7	3.5
	0.031	20	11	12	14.3	4.9

Tabla 7.3.6 Diámetro del halo de inhibición (mm) en los medios de cultivo Muller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar y Czapek para la cepa *Cryptococcus neoformans* y utilizando como antifúngico KETOCONAZOL.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DEL ANTIFÚNGICO (µg/ml)	TAMAÑO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO (mm)	DESVIACIÓN ESTANDAR (S)
M-H	8	38	32	34	34.7	3.1
	4	34	30	29	31	2.6
	2	22	27	24	24.3	2.5
	1	8	14	17	13	4.6
	0.5	8	10	13	10.3	2.5
RPMI	8	34	31	32	32.3	1.5
	4	33	30	31	31.3	1.5
	2	32	26	28	28.7	3
	1	12	21	17	16.7	4.5
	0.5	6	10	9	8.3	2.1

Tabla 7.3.7 Diámetro del halo de inhibición (mm) en los medios de cultivo Muller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar y Czapek para la cepa *Aspergillus flavus* y utilizando como antifúngico KETOCONAZOL.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DEL ANTIFÚNGICO (µg/ml)	TAMAÑO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO (mm)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)
M-H	16	24	23	27	24.7	2.1
	8	24	15	24	21	5.2
	4	21	12	18	17	4.6
	2	19	11	15	15	4
	1	14	11	13	13.8	3
RPMI	16	25	22	27	24.7	2.5
	8	21	16	22	19.7	3.2
	4	17	14	19	16.7	2.5
	2	16	13	15	14.7	1.5
	1	13	11	9	11	2
CZAPEK	16	33	31	32	32	1
	8	28	29	28	28.3	0.6
	4	25	26	26	25.7	0.6
	2	25	22	23	23.3	1.5
	1	20	20	20	20	0

Tabla 7.3.8 Diámetro del halo de inhibición (mm) en los medios de cultivo Muller-Hinton con azul de metileno y glucosa (MHM), RPMI 1640 con agar y Czapek para la cepa *Aspergillus fumigatus* y utilizando como antifúngico KETOCONAZOL.

MEDIO DE CULTIVO	CONCENTRACIÓN DEL ANTIFÚNGICO (µg/ml)	TAMAÑO DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO (mm)	DESVIACIÓN ESTANDAR (S)
M-H	16	28	28	26	27.3	1.2
	8	24	25	24	24.3	0.58
	4	6	6	6	6	0
	2	6	6	6	6	0
	1	6	6	6	6	0
RPMI	16	23	22	24	23	1
	8	19	16	18	17.7	1.53
	4	6	6	6	6	0
	2	6	6	6	6	0
	1	6	6	6	6	0
CZAPEK	16	11	12	15	12.7	2.1
	8	6	6	6	6	0
	4	6	6	6	6	0
	2	6	6	6	6	0
	1	6	6	6	6	0

ANEXO IV

7.4 DATOS TOTALES OBTENIDOS AL EFECTUAR LA PRUEBA DE MICRODILUCIÓN SIGUIENDO LAS RECOMENDACIONES DEL DOCUMENTO M27-A2 DEL CLSI (NCCLS, 2002)

Tabla 7.4.1 Lectura visual de la prueba de microdilución en placa a las 48 h utilizando como antifúngico KETOCONAZOL. Se realizaron tres repeticiones las cuales se señalan a continuación como prueba 1, 2 y 3.

		CONCENTRACIÓN (µg/ml)											
CEPA	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	C+	C-	CMI
Cp	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0	0.031
Ca	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	4	0	0.031
Cn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0.031
Cp	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	4	0	0.031
Ca	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	4	0	0.031
Ca	0	0	2	2	2	2	2	2	2	3	4	0	0.062
Cn	0	0	0	0	1	1	1	1	1	4	4	0	0.062
Cp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0.031
Ca	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	4	0	0.031
Cn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0.031

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

Cp: Candida parapsilosis, Ca: Candida albicans, Cn: Cryptococcus neoformans

Tabla 7.4.2 Lectura espectrofotométrica a 490 nm de la prueba de microdilución en placa a las 48 h utilizando como antifúngico KETOCONAZOL. Se realizaron tres repeticiones.

		CONCENTRACIÓN µg/ml)											
CEPA	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	C+	C-	CMI
Cp	0.253	0.253	0.253	0.257	0.256	0.262	0.263	0.287	0.348	0.354	0.476	0.258	0.031
Ca	0.249	0.263	0.268	0.271	0.261	0.285	0.32	0.353	0.357	0.421	0.912	0.291	0.031
Cn	0.24	0.236	0.239	0.241	0.242	0.242	0.245	0.254	0.272	0.376	0.621	0.267	0.031
Cp	0.244	0.256	0.267	0.268	0.268	0.276	0.291	0.297	0.3	0.381	0.393	0.286	0.062
Ca	0.308	0.309	0.31	0.402	0.443	0.46	0.462	0.467	0.468	0.478	0.855	0.329	0.031
Cn	0.117	0.191	0.201	0.204	0.204	0.209	0.209	0.213	0.25	0.364	0.732	0.3	0.031
Cp	0.208	0.209	0.213	0.214	0.214	0.217	0.219	0.219	0.219	0.228	0.383	0.233	0.031
Ca	0.228	0.229	0.272	0.277	0.287	0.321	0.326	0.335	0.354	0.381	1.272	0.293	0.031
Cn	0.132	0.191	0.193	0.2	0.2	0.199	0.2	0.207	0.21	0.217	0.621	0.267	0.031

Cp: Candida parapsilosis, Ca: Candida albicans, Cn: Cryptococcus neoformans

Tabla 7.4.3 Lectura visual de la prueba de microdilución en placa a las 48 h utilizando como antifúngico FLUCONAZOL. Se realizaron tres repeticiones las cuales se señalan a continuación.

CEPA	CONCENTRACIÓN (µg/ml)										C+	C-	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125			
Cp	0	0	0	0	1	2	3	3	3	3	4	0	2
Ca	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	4	0	0.125
Cn	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	0	0.125
Cp	0	0	0	0	2	2	3	3	4	4	4	0	2
Ca	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	4	0	0.125
Cn	0	0	0	0	0	1	2	4	4	4	4	0	1
Cp	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4	4	0	0.5
Ca	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	4	0	0.125
Cn	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	0	0.25

Lectura visual; 4: Crecimiento = control +; 3: crecimiento del 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control + y 0 sin crecimiento comparada con el Control negativo (C-)= 0% de crecimiento y Control (+)=100% de crecimiento. CMI: concentración mínima inhibitoria.

Cp: Candida parapsilosis, Ca: Candida albicans, Cn: Cryptococcus neoformans

Tabla 7.4.4 Lectura espectrofotométrica a 490 nm de la prueba de microdilución en placa para levaduras a las 48 h utilizando como antifúngico FLUCONAZOL. Se realizaron tres repeticiones las cuales se señalan a continuación.

CEPA	CONCENTRACIÓN (µg/ml)										C+	C-	CMI
	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125			
Cp	0.244	0.251	0.25	0.255	0.253	0.283	0.332	0.426	0.435	0.466	0.504	0.251	1
Ca	0.256	0.272	0.297	0.281	0.394	0.313	0.258	0.327	0.519	0.549	0.877	0.238	0.125
Cn	0.218	0.228	0.228	0.239	0.239	0.238	0.238	0.243	0.245	0.256	0.378	0.245	0.125
Cp	0.28	0.263	0.289	0.422	0.428	0.469	0.512	0.703	1.007	1.029	0.883	0.286	0.5
Ca	0.266	0.279	0.28	0.291	0.318	0.339	0.408	0.412	0.454	0.701	0.433	0.286	2
Cn	0.211	0.216	0.227	0.229	0.238	0.241	0.346	0.434	0.564	0.622	0.412	0.27	2
Cp	0.351	0.344	0.42	0.463	0.486	0.504	0.511	0.52	0.538	0.964	1.301	0.255	0.25
Ca	0.226	0.232	0.235	0.238	0.241	0.247	0.262	0.313	0.317	0.343	0.397	0.245	0.25
Cn	0.22	0.225	0.231	0.231	0.244	0.263	0.353	0.474	0.542	0.63	0.82	0.257	0.5

Control negativo (C-) y Control positivo (+) CMI: concentración mínima inhibitoria.

Cp: Candida parapsilosis, Ca: Candida albicans, Cn: Cryptococcus neoformans

ANEXO V

7.5 DATOS TOTALES OBTENIDOS AL EFECTUAR LA PRUEBA DE MICRODILUCIÓN SIGUIENDO LAS RECOMENDACIONES DEL DOCUMENTO M38-A DEL CLSI (NCCLS, 2002)

7.5.1 Lectura visual de la prueba de microdilución en placa a las 48 h utilizando como antifúngico KETOCONAZOL. Se realizaron tres repeticiones las cuales se señalan a continuación.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE KETOCONAZOL µg/ml										C+	C-	CMI
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031			
Afl	0	0	0	1	1	1	1	2	2	3	4	0	0.062
Afu	0	0	1	1	1	1	2	2	4	4	4	0	0.125
Afl	0	0	0	0	2	3	4	4	4	4	4	0	1
Afu	0	0	1	1	1	2	2	2	3	3	4	0	0.125
Afl	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	0	0.25
Afu	0	0	0	0	2	2	2	2	3	3	4	0	0.125

Lectura visual; 4: Crecimiento = control +; 3: crecimiento del 75% comparado con el control +; 2 un 50% de reducción del crecimiento comparada con el control + y 0 sin crecimiento comparada con el control - . CMI: concentración mínima inhibitoria.

Afl: Aspergillus flavus y Afu: Aspergillus fumigatus

7.5.2 Lectura visual de la prueba de microdilución en placa a las 48 h utilizando como antifúngico KETOCONAZOL. Se realizaron tres repeticiones las cuales se señalan a continuación.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE KETOCONAZOL µg/ml										C+	C-	CMI
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031			
Afl	0.239	0.243	0.244	0.252	0.304	0.351	0.37	0.369	0.382	0.414	0.817	0.254	0.031
Afu	0.234	0.262	0.262	0.268	0.323	0.338	0.371	0.475	0.528	0.545	0.552	0.256	0.5
Afl	0.234	0.236	0.237	0.246	0.292	0.293	0.317	0.337	0.348	0.35	0.921	0.252	0.031
Afu	0.297	0.275	0.293	0.307	0.312	0.319	0.321	0.332	0.334	0.46	0.575	0.289	0.062
Afl	0.201	0.214	0.195	0.203	0.199	0.22	0.308	0.368	0.36	0.404	0.398	0.214	0.5
Afu	0.205	0.204	0.207	0.228	0.24	0.242	0.275	0.282	0.298	0.341	0.491	0.216	0.062

Afl: Aspergillus flavus y Afu: Aspergillus fumigatus

8. REFERENCIAS

1. ABETE, J. FORTÚN. 1998. Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles. *Medicine*; Vol 7(91) España. Pág.4231-4241
2. ALCALÁ, HERNÁNDEZ P. MUÑOZ, GARCÍA Y E. BOUZA, SANTIAGO. 1998. Nuevos antifúngicos. *Medicine*. Vol 7 (91). España. Pág. 4251-4262
3. ALLEVATO, MIGUEL ANGEL J. NEGRONI, RICARDO. GALIMBERTI, RICARDO. 2007. Antifúngicos ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*; 30: 8. Argentina
4. ARENAS, GUZMAN ROBERTO. 2003. *Micología medica ilustrada*. 2ª ed. Editorial McGraw-Hill. España. Pág 448
5. AZANZA, JOSÉ RAMÓN. GARCÍA-QUETGLAS, EMILIO Y SÁDABA, BELÉN. 2007. Farmacología de lo azoles. *Rev Iberoam Micol*. Vol 24. España. Pág. 223-227
6. BARRY AL, PFALLER MA, RENNIE RP, FUCHS PC, BROWN SD. 2002. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 1781-4.
7. BARTIZAL K, GILL CJ, ABRUZZO GK, et al. 1997. In vitro preclinical evaluation studies with echinocandin antifungal. *Antimicrob Agents Chemother*; Vol. 41. Pág. 2326-2332
8. BONIFAZ, ALEXANDRO.2000. *Micología médica básica*. 2ª ed. Editorial Méndez. México.
9. CANTÓN, EMILIA. VIUDES, ÁNGEL Y PEMÁN, JAVIER. 2001. Infección sistémica nosocomial por Levaduras. *Rev Iberoam Micol*. Vol 18. Pág. 51-55
10. CANTÓN, E. PEMÁN, J. 2005. "Actividad del voriconazol sobre levaduras aisladas de hemocultivo determinada por dos métodos". *Rev Esp Quimioterap*, Diciembre 2005; Vol.18 (Nº 4). Pág. 308-312
11. CARRILLO-MUÑOZ, A. J., L. ABARCA, G. QUINDÓS. 2001. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol*. Vol. 18. España. Pág. 150-155
12. CARRILLO-MUÑOZ, A. J., J. PEMÁN, M. GOBERNADO. 1999. Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Rev. Esp. Quimioterap*. Vol. 12. España.181-204
13. CASADEVALL, ARTURO. VECCHIARELLI, ANNA. Y MONARI, CLAUDIA . 1998. Specific Antibody to *Cryptococcus neoformans* Alters Human Leukocyte Cytokine Synthesis and Promotes T-Cell Proliferation. *Infect Immun*, Marzo Vol. 66, No. 3. USA. Pág. 1244-1247
14. CASADEVALL, ARTURO. Y PIROFSKI, LIISE-ANNE. 2001. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 184. USA.Pág.337-344
15. CATALÁN, MERCEDE. MONTEJO, JUAN CARLOS. 2006. Antifúngicos sistémicos.Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol*. Vol 23. España. Pág. 39-49
16. CUENCA-ESTRELLA, MANUEL Y RODRÍGUEZ-TUDELA, JUAN LUIS. 2002. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol*. Vol. 19. Pág 133-138

17. ESCOBAR, CLARA MARÍA. Y ZULUAGA, ANGELA. 2004. Nuevos antimicóticos y su uso en la dermatología. *Med Cutan Iber lat Am*. Vol 32. España. Pág. 231-242
18. GADEA, IGNACIO Y CUENCA-ESTRELLA, MANUEL. 2004. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; vol. 22 (1); Pág: 32-39
19. GREGORI VALDEZ S. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm* Vol39, Nº2 Ciudad de la Habana Mayo- Ago
20. GUARRO, JOSEP. GENÉ, JOSEPA. STCHIGEL, ALBERTO M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical microbiology reviews*. Vol. 12 No. 3 España. Pág. 454–500.
21. GUPTA AK, BLUHM R. 2004. Ciclopirox (Loprox) gel for superficial fungal infections. *Skin Therapy Lett*. Vol.7 España. Pag:4-5.
22. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, FRANCISCA. CÓRDOVA-MARTÍNEZ, ERIKA. MANZANO-GAYOSSO, PATRICIA. LÓPEZ-ALVAREZ, ROCÍO. BAZÁN-MORA, ELVA Y LÓPEZ-MARTÍNEZ, RUBÉN. 2003. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud pública de México*. vol.45, no.6, noviembre-diciembre. Pág. 455-460
23. HSIEH, S. M. C. C. HUNG, M. Y. CHEN, P. R. HSUEH, S. C. CHANG. 1998. Efficacy and adverse effects of higher dose amphotericin B monotherapy for cryptococcal meningitis in patients with advanced HIV infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* Vol.31. Pág.23-239
24. KENDRICK, B. 2000. *The Fifth Kingdom*. Focus Information Group, Newburyport. USA.
25. LÓPEZ, MARTÍNEZ R. MÉNDEZ, TOVAR L.J. HERNÁNDEZ, HERNÁNDEZ F. CASTAÑÓN, OLIVARES R. 1995. *Micología Médica-Procedimientos para el diagnóstico del laboratorio*. Ed. Trillas. México.
26. LUMBRERAS, CARLOS. LIZASOAIN, MANUEL Y AGUADO, JOSÉ MARÍA. 2003. Antifúngicos de uso sistémico *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol 21(7). España. Pág.366-80
27. MACOLA, OLANO SILVIA. 1998. Generalidades de micología. *Microbiología y parasitología médica*. Cuba. Pág. 459.463 MELLADO, EMILIA. CUENCA-ESTRELLA, MANUEL Y RODRÍGUEZ-TUDELA, JUAN LUIS. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol. 20(10). España. Pág.523-30
28. MELETIADIS, J., J. W. MOUTON, J. F. MEIS, B. A. BOUMAN, P. E. VERWEIJ. 2002. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed Standard for antifungal susceptibility
29. MELLADO, EMILIA. CUENCA-ESTRELLA, MANUEL Y RODRÍGUEZ-TUDELA, JUAN LUIS. 2002. "Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos". *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol.20 (10). Pág. 523-30
30. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.2002 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. Second Edition. NCCLS document M27-A2. NCCLS, Wayne.

31. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. NCCLS document M38-A. NCCLS, Wayne.
32. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline; M44-A. Wayne, Pa, USA
33. PEMAN, JAVIER. 2001. Guía practica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Editorial Ergon. España.
34. PITISUTTITHUM, P., NEGRONI, R., GRAYBILL, J Y COL. 2005.Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. J. Antimicrob. Chemother.56. Pág. 745-755.
35. QUINDÓS, GULLERMO.2002. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Revista Iberoamericana de Micología, Vol. 19. Pág. 1-4.
36. REX JH, PFALLER MA, WALSH TJ, *et al.* 2001. "Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges". Clin Microbiol Rev. Vol. 14 Pág.643-658.
37. RODERO L, DAVEL G, SORIA M, VIVOT W, CÓRDOBA S, CANTEROS C. 2005. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. Rev Argent Microbiol; 37: 189-95
38. ROMERO, M. CANTÓN, E. PEMÁN, J. Y GOBERNADO, M. 2005. Antifúngicos inhibidores de la síntesis del glucano. Rev Esp Quimioterap, Diciembre; Vol.18 (Nº 4): Pag.281-299
39. RUÍZ, HERRERA JOSÉ. 2001. El asombroso reino de los hongos. Avances y perspectivas. Vol 20 Sep-Oct México. Pág. 275-281
40. SANDVEND, P. Epidemiology of candidemia. 2000. Rev Iberoam Micol; Vol. 17. Pág.73-81
41. SANGLARD, DOMINIQUE. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. Institute of Microbiology. University Hospital Lausanne. Suiza. Pág. 42-48
42. SILVA, V. VÍCTOR. DÍAZ, J. M CRISTINA. FEBRÉ, NALDY.2002. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. Rev Chil Infect; Vol. 19 (Supl. 2). Chile Pág 149-156
43. VANDEN, BOSSCHE HUGO. 1997. Mechanisms of antifungal resistance. Rev Iberoam Micol. Vol 14. España. Pag. 44-49
44. VARGAS, BERNARDO. PARCHA, CARMEN. Y REYES, ARENAS EUGENIO. 2005. Antifúngicos de Uso Clínico. Análisis de un Laboratorio de Micología. Ciencia y Trabajo. Número 15. Enero – Marzo. Chile. Pág. 9-16
45. VELASCO, CASTREJÓN ÓSCAR Y TAY, ZAVALA JORGE. 2004. Introducción a la micología médica. 2ª ed. Editorial Méndez. México.