



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INFECCIÓN POR ESPECIES DE *Candida no albicans* Y SU RESISTENCIA A
DIVERSOS ANTIFÚNGICOS”**

TESIS

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

PRESENTA

MARÍA DEL SOL HERNÁNDEZ GALVÁN



México, D.F. , Ciudad Universitaria

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL:	Profesor: Jose Alejandro Bonifaz Trujillo
SECRETARIO:	Profesor: Angeles Patricia Manzano Gayosso
1er. SUPLENTE:	Profesor: Misael González Ibarra
2° SUPLENTE:	Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Angeles Patricia Manzano Gayosso

SUSTENTANTE:

María del Sol Hernández Galván

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Instituciones que colaboraron:

Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro" ISSSTE.

Unidad de Investigación Médica en Dermatología y Micología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional. Siglo XXI. IMSS.

Hospital General "Dr. Manuel Gea González" SA.

Agradecimientos

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, y a los que han estado junto a mí todo este tiempo.

A la M. en C. Patricia Manzano, por compartir su tiempo, conocimientos y experiencia, y por ayudarme a culminar esta etapa.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina por su disposición y convivencia.

A los profesores de Micología de la Facultad de Química por ser mi ejemplo e inspiración.

INDICE

	Página
1. Antecedentes	
1.1 Historia	8
1.2 Agente etiológico	11
1.2.1 Clasificación taxonómica	11
1.2.2 Características generales del género <i>Candida</i>	11
1.2.3 Morfología general	12
1.2.4 Características morfológicas de <i>Candida spp.</i>	13
1.2.5 Pruebas bioquímicas	15
1.2.6 Factores de virulencia	16
1.3 Epidemiología	17
1.4 Factores predisponentes	22
1.5 Patogenia	22
1.6 Formas clínicas	23
1.7 Antifúngicos	27
1.8 Frecuencia de la resistencia de <i>Candida spp.</i> a los antifúngicos	30
1.9 Métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos	31
2. Justificación	36
3. Objetivos	37
4. Material y métodos	38
4.1 Aislados	38
4.2 Identificación de levaduras	38
4.3 Medios de cultivo	38
4.4 Pruebas fenotípicas	40
4.5 Pruebas bioquímicas	41
4.6 Pruebas de sensibilidad a antifúngicos	43

4.7 Análisis estadístico.....	49
5. Resultados.....	50
6. Discusión.....	66
7. Conclusiones.....	73
Apéndice.....	74
Anexo 1: Medios de cultivo.....	75
Anexo 2: Tinciones.....	80
Bibliografía.....	81

1. ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA

En el siglo V a.C. Hipócrates (460-370 a.C.) describió las características clínicas de las lesiones bucales que probablemente correspondieron a candidosis bucal, hecho que quedó plasmado en su tratado "Epidemias" como aftas (placas blanquecinas) en pacientes debilitados. Posteriormente Galeno (130-200 a. C.) en base a sus observaciones en los pacientes con aftas bucales consideró que era una patología común en niños enfermizos (1).

En Francia la enfermedad se presentó con alta frecuencia y le denominaron "muguet". En 1839 se reconoció al agente etiológico como un hongo y es entonces cuando comienza a identificarse y describirse las diversas formas clínicas de esta micosis. En 1923 Berkhout acuñó el género *Candida* y con ello se describieron diversas especies aún sin ser reconocido su papel patógeno (2).

A lo largo del tiempo se han dado numerosas aportaciones al estudio de *Candida*. En el cuadro 1 se muestra una breve cronología de los acontecimientos históricos más importantes relacionados con este género.

Cuadro 1. Hechos históricos importantes en el género *Candida*.

Autor	Año	Hecho histórico
Rosen von Rosenstein	1771	Candidosis un trastorno del recién nacido.
Underwood	1784	La Real Sociedad Francesa promueve el estudio de la candidosis Condiciones asociadas a la candidosis bucal y gastrointestinal.
Gmelin	1791	Propuso el género <i>Monilia</i> .
Verón	1835	Candidosis esofágica y postuló transmisión intrauterina.
Langenbeck	1839	Descubrió el organismo causal "planta criptógama" en las lesiones bucales de un paciente con aftas.
David Gruby	1842	Describió el "verdadero muguet" de los lactantes.
Berg	1846	Inoculación de recién nacido sano con material de membranas "aftosas". Relación entre el hongo y el hospedero.
Bennett	1844	Aisló <i>Candida albicans</i> de pacientes con tuberculosis.

Autor	Año	Hecho histórico
D. Gruby	1847	Clasificó al organismo como <i>Sporotrichum</i> .
Wilkinson	1849	Localización vaginal.
Bonorden	1851	Denominó al hongo <i>Monilia candida</i> aislado de la madera en descomposición.
Robin	1853	Designó al microorganismo <i>Oidium albicans</i> .
Zenker	1861	Primer caso de infección sistémica por <i>Candida</i> .
Quinquand	1868	Asignó al hongo <i>Syringospora robinni</i> .
Parrot	1870	Describió la infección intestinal.
Robin	1875	Identificó la relación entre candidosis vaginal materna y bucal del recién nacido.
Reess	1875	Denominó al hongo <i>Saccharomyces albicans</i> .
Grawitz	1877	Describió el carácter dimórfico de la levadura.
Parrot	1877	Describió la forma pulmonar en lactantes y asociación con enfermedad subyacente.
Granitz	1877	Describió la diversidad morfológica de <i>C. albicans</i> .
Zopf	1890	Aceptó el hongo del género <i>Monilia</i> nombrado <i>Monilia albicans</i> . Inició la confusión en la terminología de la enfermedad.
Castellani	1890	Retuvo el término propuesto por Zopf y describió numerosas variedades como nuevas especies, pero después se demostró que eran idénticas a <i>C. albicans</i> .
Schmorl	1890	Afección mucocutánea.
Dubendorfer	1904	Candidosis inguinal y onicomicosis.
Jacobi	1907	Enfermedad cutánea.
Rafin	1910	Cistitis por <i>Candida</i> .
Castellani	1912	Posibilidad de que las especies de <i>Candida</i> diferentes a <i>C. albicans</i> fueran causa de enfermedad.
Berkhout	1923	Creó el género <i>Candida</i> para incluir levaduras con "pocas hifas, los conidios se reproducen y forman hifas pequeñas, hialinas".
Conner	1928	Osteomielitis por <i>Candida</i> .
Joachim-Polayes	1940	Primer caso de endocarditis por <i>Candida</i> .
Miale	1943	Endoftalmitis secundaria a diseminación endógena.
---	1954	Oficialmente se aceptó el género <i>Candida</i> en el VIII Congreso de Botánica, París, Francia.
Benirschke-Raphael	1958	Describieron candidosis congénita.
Kreger-Van Rij	1984	Publicó en "Las levaduras" (The yeasts) un centenar de sinónimos para <i>C. albicans</i> .
Sullivan	1995	Identificó a <i>C. dubliniensis</i> obtenida de un paciente con infección por virus de la inmunodeficiencia humana y candidosis bucal.

Castellani en 1912 propuso que especies diferentes a *C. albicans* podían ser responsables de procesos patológicos, aunque en las

primeras descripciones de estas especies no se reconociera como tal su papel patógeno. Como se observa en el cuadro 2, es apartir de 1923 (al acuñar el género *Candida*) cuando se inicia la descripción de algunas de estas especies.

C. parapsilosis fue aislada en Puerto Rico en 1928 por Ashford (como especie perteneciente al género *Monilia* incapaz de fermentar maltosa), de las heces de un paciente con diarrea. La especie fue llamada *Monilia parapsilosis*, para distinguirla de *Monilia psilosis*, mejor conocida hoy como *C. albicans* (3).

C. glabrata fue clasificada en el género *Torulopsis* (descrito en 1894) por Lodder y De Vries en 1938 debido a su incapacidad de producir pseudohifas. En 1978 se propuso que *T. glabrata* fuera clasificada dentro del género *Candida* (4).

C. lusitaniae fue aislada por do Carmo-Sousa del tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente. En 1979 Merz y Sandford reportaron el primer caso de infección humana por esta especie con resistencia a polienos (anfotericina B y nistatina) aunque la consideraron como una variante de *C. tropicalis*. Actualmente es considerado como patógeno emergente de infecciones nosocomiales sobretodo en pacientes inmunosuprimidos y frecuentemente asociada con resistencia a anfotericina B. La mayoría de los casos reportados en la literatura de donde se ha aislado procede principalmente de tracto respiratorio, sangre, orina y catéteres intravasculares (5).

Cuadro 2. Principales especies de *Candida* no *albicans*.

Especie	Autor	Año
<i>Candida tropicalis</i>	Castellani y Berkhout	1923
<i>Candida krusei</i>	Castellani y Berkhout	1923
<i>Candida zeylanoides</i>	Castellani, Langeron y Guerra	1938
<i>Candida guilliermondii</i>	Castellani, Langeron y Guerra	1938
<i>Candida lusitaniae</i>	Van Under y Do Carmo-Sousa	1959
<i>Candida parapsilosis</i>	Ashford, Langeron y Talice	1959
<i>Candida glabrata</i>	Yarrow y Meyer	1978

1.2 Agente etiológico

1.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de los hongos se ha basado principalmente en criterios morfológicos y en características de sus estructuras de reproducción teleomórfica, sin embargo en las levaduras es necesario considerar las características bioquímicas y fisiológicas para su identificación (6).

Actualmente, la clasificación taxonómica, además se basa en estudios moleculares que analizan el ADN y el ARN de los organismos fúngicos (2,7).

En el cuadro 3 se muestra la clasificación taxonómica del género *Candida* descrita por de Hoog (7).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Candida*.

Reino	<i>Eumycota</i>	
Phylum	<i>Ascomycota</i>	
Clase	<i>Hemiascomycetes</i>	
Orden	<i>Saccharomycetales</i>	
Familia	<i>Candidaceae</i> <i>Endomycetaceae</i> <i>Metschnikowiaceae</i> <i>Saccharomycetaceae</i>	
Género	ANAMORFO <i>Candida</i>	TELEOMORFO <i>Pichia</i>
Especie	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. krusei</i>	<i>Pichia ohmeri</i>

1.2.2 Características generales del género *Candida*.

Se han descrito alrededor de 200 especies, las levaduras de este género están ampliamente distribuidas, en asociación con animales, plantas y

objetos inanimados. La mayoría de estas especies son miembros de la biota normal de las mucosas del aparato digestivo, genitourinario y respiratorio (1,2,8).

La pared celular es una estructura esencial con gran plasticidad que da forma a la célula y la protege de diferentes tipos de estrés ambiental (como los cambios osmóticos). Está constituida por glucano, el cual es el polisacárido estructural más importante (50-60% del peso seco de esta estructura). Estos polímeros están compuestos de unidades de glucosa con uniones principalmente β -1,3 (65-90%). Las glicoproteínas representan del 30–50% del peso y la quitina del 1–2%(9).

Esta estructura interactúa con el medio externo, ya que algunas de sus proteínas son adhesinas, las cuales juegan un papel importante como factor de virulencia del hongo. Además, representa un sitio importante para la acción de los fármacos antifúngicos.

La membrana celular de los hongos es muy similar a la de los mamíferos, la diferencia radica en el ergosterol, el principal esteroide presente en los hongos, mientras que en los mamíferos es el colesterol. La función del ergosterol es ser un biorregulador de la membrana y de la integridad de la célula (10).

1.2.3. Morfología general

La mayoría de las especies de *Candida* presentan morfología macroscópica similar al crecer en medio de agar dextrosa Sabouraud a 28°C por 48 h. Las colonias son blancas, cremosas, planas o umbonadas (sobresaliente), lisas o plegadas. De tal manera que no es una característica que oriente hacia la identificación de la especie. Microscópicamente presenta dos formas: de levadura y de micelio. La forma de levadura denominada blastoconidio, es oval, alargada,

cilíndrica y esférica. Los blastoconidios pueden elongarse formando cadenas cortas de células con constricciones, llamadas pseudohifas.

1.2.4. Características morfológicas de *Candida* spp.

Para la identificación de la levaduras de este género es importante conocer sus características macro y microscópicas a partir de la inoculación en los medios de cultivo tradicionales, además de las pruebas fenotípicas y bioquímicas. En el cuadro 4 y 5 se muestran las pruebas fenotípicas más importantes de las especies de *Candida no albicans*, el patrón de crecimiento en medios de rutina, como el agar dextrosa Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloranfenicol, agar harina de maíz, CHROMagar y suero humano. Se incluyeron también las características de *C. albicans*, lo que nos permite la diferenciación inicial de los aislados en *C. albicans* y *Candida no albicans*.

La única especie que no forma pseudohifas es *C. glabrata*, como consecuencia la forma comensal y la patógena se encuentra en su estado levaduriforme (blastoconidio), de 1-4 μm de diámetro (11).

Cuadro 4. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las especies del género *Candida*.

Agente etiológico	Morfología de la colonia	Forma de la levadura	Clamidoconidios	Tubo germinativo
<i>C. albicans</i> y/o <i>C. dubliniensis</i>	Blanca cremosa o amarillenta, lisa, brillante, blanda. 3-5 mm.	Célula esférica, ovoide o ligeramente cilíndrica. 4-6 X 6-10 μ m	+ (8-12 μ m)	+
<i>C. parapsilosis</i>	Suave, lisa blanca.	Célula ovoide 2.5-4 X 2.5-9 μ m	-	-
<i>C. tropicalis</i>	Lisa y/o rugosa, blanca a amarillenta.	Célula ovoide o globosa 4-8 X 5-11 μ m	+/-	-
<i>C. glabrata</i>	Lisa, blanda, 1-2 mm.	Célula ovoide y/o redonda 1-4 μ m	-	-
<i>C. krusei</i>	Lisa, plana, blanda, seca, crema amarillenta.	Célula cilíndrica, alargada, algunas ovoides. 3-5 X 6-20 μ m	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	Cremosa, blanda, de color blanco, lisa.	Célula ovoide 1.5-6 X 2.5- 10 μ m	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	Opaca, blanda, lisa, plana, crema a amarillo.	Célula ovoide 3-6 X 5-10 μ m	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	Plana, brillante, crema.	Célula ovoide 2-5 X 3-7 μ m	-	-

Cuadro 5. Patrón de crecimiento en agar dextrosa Sabouraud más antibióticos y Cromógeno

Agente etiológico	Resistencia a cicloheximida	CHROM agar <i>Candida</i> ®
<i>C. albicans</i> y/o <i>C. dubliniensis</i>	+	Verde
<i>C. parapsilosis</i>	-	Rosa pálido Blanco
<i>C. tropicalis</i>	+	Azul
<i>C. glabrata</i>	-	Rosa púrpura Blanco
<i>C. krusei</i>	+	Rosa pálido Púrpura
<i>C. lusitaniae</i>	-	Rosa Púrpura grisáceo
<i>C. zeylanoides</i>	+	Rosa pálido
<i>C. guilliermondii</i>	+	Rosa pálido Púrpura

1.2.5. Pruebas bioquímicas

Debido a las características fenotípicas muy similares en las especies del género *Candida* se han introducido otros parámetros para su identificación, como la resistencia a la cicloheximida y el uso de medios adicionados con diversos sustratos cromógenos. La inclusión de éstos últimos y por la actividad enzimática de cada una de las especies, producen una coloración específica, de tal manera que pone de manifiesto las enzimas como hexosaminidasa y fosfatasa alcalina; *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* poseen la primera y *C. krusei* la segunda. Por la diversidad de colores es posible la identificación presuntiva de cuatro de las especies: *C. albicans* y/o *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Así como la asociación de dos o más especies (cuadro 5) (12-13).

Otras pruebas de utilidad son la fermentación (zimograma) y la asimilación de carbohidratos (auxonograma). La asimilación identifica los carbohidratos que puede utilizar la levadura como fuente de carbono; y el zimograma determina la capacidad de fermentación de los mismos. En el cuadro 6 y 7 se muestran los diferentes patrones de ambas pruebas para las especies de *Candida*.

Cuadro 6. Patrón de asimilación de carbohidratos en las especies de *Candida*.

Especie	Asimilación																		
	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lusitanae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

GLU: glucosa, GLY: glicerol, 2KG: 2-ceto-D- gluconato cálcico, ARA: arabinosa, XYL: xilosa, ADO: adonitol, XLT: xilitol, GAL: galactosa, INO: inositol, SOR: sorbitol, MDG: metil - α D- glucópiranosida, NAG: N-acetil-D-glucosamina, CEL: celobiosa, LAC: lactosa, MAL: maltosa, SAC: sacarosa, TRE: trealosa, MLZ: melezitosa, RAF: rafinosa.

Las reacciones de fermentación generalmente no son usadas en el laboratorio de microbiología con excepción de uno o dos carbohidratos.

Cuadro 7. Patrón de fermentación de carbohidratos en las especies de *Candida*.

Especie	Fermentación						
	GLU	GAL	MAL	SAC	LAC	RAF	TRE
<i>C. albicans</i>	+	+	+	V	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	V	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	+	V	-	V	-	-	+
<i>C. zeylanoides</i>	V	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	+	-	+	+

V: variable, GLU: glucosa, GAL: galactosa, MAL: maltosa, SAC: sacarosa, LAC: lactosa, RAF: rafinosa, TRE: trealosa.

1.2.6. Factores de virulencia

El género *Candida* presenta diversos factores de virulencia que le permiten la colonización y la posterior invasión a los tejidos del hospedero. Los factores son producción de adhesinas, de enzimas hidrolíticas, cambio fenotípico y formación de biopelículas.

Las adhesinas son proteínas de superficie de la célula fúngica que promueven la adherencia a las células del hospedero. Estas han sido descritas en *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Las enzimas proteolíticas tienen la capacidad de romper polímeros para proporcionar nutrientes que permitan el crecimiento del hongo.

Dentro del grupo de enzimas que este género produce se encuentran:

- Saps (secreted aspartil proteinases). Son endopeptidasas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos, lo que facilita la adhesión, la invasión a tejidos y la digestión de moléculas. *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son capaces de producir estas proteinasas; mientras que en *C. glabrata* y *C. lusitaniae* no se han identificado este tipo de proteinasas (14).

- Fosfolipasas: Las especies que producen estas enzimas son *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. krusei*, aunque en menor cantidad con respecto a *C. albicans* (15).
- Lipasas: Estas enzimas se han descrito en *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* mientras que en *C. glabrata* no se han detectado.
- Hemolisinas: Se ha demostrado la producción de estas enzimas en *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides* y *C. parapsilosis* (16).

Las biopelículas son comunidades de microorganismos unidos a una superficie que contiene una matriz exopolimérica. La formación de biopelículas por especies de este género les confiere resistencia, principalmente a los antifúngicos, ya que esta estructura limita la penetración del fármaco, además de la protección que les confiere hacia el ataque de las células del sistema inmune.

C. parapsilosis muestra una alta capacidad para producir estas estructuras en medios ricos en glucosa y lípidos, *C. tropicalis* lo hace principalmente en superficies de silicón y catéteres de látex, mientras que *C. glabrata* posee menor capacidad para formar estas estructuras.

1.3. Epidemiología

A partir de los años ochenta los hongos han emergido como una de las causas principales de enfermedad en humanos, especialmente en pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados con enfermedades subyacentes graves (17), además, el número de casos asociados con falla terapéutica se ha incrementado a nivel mundial (18).

McNeil y cols (19) en Estados Unidos de América reportaron un incremento en la mortalidad debido a infecciones fúngicas de 1, 557 muertes en 1980 a 6, 534 en 1997. La mayoría de los casos fueron asociados a infección por *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*. De los

géneros antes mencionados *Candida* es el principal causante de enfermedad en todo el mundo (20).

En 1963 es cuando se comienza a dar importancia clínica a las especies de *Candida*, específicamente a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*. En los últimos años se han identificado más de 17 especies como causantes de enfermedad en el humano y algunas de ellas se han reportado como emergentes (cuadro 8) (21). Aunque se ha documentado un incremento en las infecciones por estas levaduras, más del 90% son atribuidas a cinco especies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*) (22-23).

Cuadro 8. Principales especies de *Candida* no *albicans* causantes de enfermedad en el humano.

<i>Candida ciferrii</i>	<i>Candida norvegensis</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Candida parapsilosis</i> *
<i>Candida glabrata</i> *	<i>Candida pintolopesii</i>
<i>Candida guilliermondii</i> *	<i>Candida pulcherrima</i>
<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Candida humicola</i>	<i>Candida tropicalis</i> *
<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Candida krusei</i> *	<i>Candida viswanathii</i>
<i>Candida lusitaniae</i> *	<i>Candida zeylanoides</i> *

*Especies de *Candida* incluidas en el presente estudio.

Las infecciones por *Candida* han ido cambiando en el mundo. A principios del siglo XX solo *C. albicans* era considerada la única especie con relevancia médica, ya que era responsable del 60–70% de las infecciones, mientras que especies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* eran considerados patógenos ocasionales. Entre los años 1980 y 1990 emergen otras consideradas no patógenas como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* (6).

Actualmente el aislamiento de especies del género *Candida* se han incrementado notablemente como causante de infecciones nosocomiales

y la distribución de las especies de *Candida* ha cambiado con el tiempo, de acuerdo a estudios de Pfaller y cols (24), a partir de 1997 se ha notado una tendencia decreciente en los aislamientos de *C. albicans*, mientras que especies *Candida* no *albicans* como *C. glabrata* y *C. krusei* muestran una tendencia inespecífica, a diferencia del incremento de *C. tropicalis* (4.6% a 7.5%) y *C. parapsilosis* (4.2% a 7.3%) observados entre 1997 y 2003.

El porcentaje de aislamiento de estas especies varió de región a región y por la forma clínica de candidosis. Falagas y cols (25) establecieron la distribución geográfica de las especies de *Candida* causantes de candidemia ocurridos durante el periodo de 1996 al 2009; estos autores identificaron que *C. albicans* fue aislada principalmente en el norte de Europa y Europa central en más del 60% de los casos, mientras que en el resto de Europa y Estados Unidos de América representó el 45-58% de los aislamientos. En América del Sur y Asia en el 40-42%.

C. glabrata puede ser la segunda o tercer causa más común de candidosis después de *C. albicans*, dependiendo de la región geográfica; en Estados Unidos es la segunda especie causante de candidemia (26-28); mientras que en América Latina *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* sustituyen a *C. glabrata* como segundo agente causante de candidemia (26). Por otro lado, existen diversas publicaciones acerca de la variación observada en la frecuencia de *C. glabrata* en América Latina. Colombo y cols (27) en un estudio de diez años (1995-2004) aislaron a esta especie en el 4-7% y en otro (2002-2004) observaron una disminución del 7.4 al 4.7%, así también como en Europa (10.5% a 8.8%) y Asia (12.1% a 7.2%) en el mismo periodo (17). En cambio en Estados Unidos de América y en Reino Unido tienen un alto porcentaje del 18.8–24% y 22.7%, respectivamente, mientras que en países de América del sur solo representa el 5% (28).

Con respecto a la frecuencia de *C. tropicalis* en Estados Unidos de América y en el norte y centro de Europa ha mostrado un decremento en el aislamiento del 11-12% al 4% de los casos, en cambio en otros países ha mostrado un incremento en las infecciones por esta especie, principalmente en América del sur (21-24%) y en países de Asia oriental (22%) (28).

C. parapsilosis es una especie que muestra alta incidencia en América del sur (20.5-21.3%), Asia occidental (30%), Europa occidental (23%) y Oceanía (20%) a diferencia del norte y centro de Europa (1-5%).

Actualmente existen reportes en América Latina (Brasil), Asia (India, Arabia Saudita, Turquía, Japón y Malasia) y Europa (España y Eslovaquia), en donde el porcentaje de aislamientos de *C. parapsilosis* es mayor que *C. albicans*.

Otras especies menos comunes son *C. krusei*, la cual representa del 1-4% de los aislados y *C. guilliermondii* del 3 al 5 % de las candidemias, mientras que otras aún menos comunes 2-9 % (17).

Finalmente en pacientes con enfermedades hematológicas *C. glabrata* es la especie *Candida* no *albicans* aislada con mayor frecuencia (31%), seguida de *C. krusei* (24%); mientras que en pacientes con cáncer *C. albicans* es la especie que predomina (45%) seguida de *C. parapsilosis* (20%) (29).

En el cuadro 9 se presentan algunos estudios realizados por diversos autores en México desde 1993 a 2011, en donde se observa la prevalencia de las especies de *Candida* en diversas formas clínicas.

Cuadro 9. Relación entre las especies de *Candida* y algunas formas clínicas descritas en México.

Autor y año del estudio	Forma clínica	Especies	Porcentaje
Abad J. y cols ³⁰ 1993-2005	Onicomicosis	<i>C. albicans</i>	55.1
		<i>C. parapsilosis</i>	11.9
		<i>C. tropicalis</i>	7.6
		<i>C. glabrata</i>	6.5
		<i>C. krusei</i>	1.6
Manzano P. y cols ³¹ 1997-1998	Diversas formas clínicas	<i>C. albicans</i>	72.0
		<i>C. glabrata</i>	13.0
		<i>C. parapsilosis</i>	8.0
		<i>C. kefyr</i>	2.7
		<i>C. guilliermondii</i>	1.8
		<i>C. krusei</i>	0.9
Manzano P. y cols ³² 1997-2001	Peritonitis	<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>	30.0
		<i>C. tropicalis</i>	20.0
		<i>C. glabrata</i> y <i>C. guilliermondii</i>	10.0
Arroyo S. y cols ³³ 2002-2003	Candidosis pulmonar	<i>C. albicans</i>	52.0
		<i>C. tropicalis</i>	24.0
		<i>C. glabrata</i>	19.0
		<i>C. parapsilosis</i>	5.0
Manzano P. y cols ³⁴ 2004-2007	Onicomicosis	<i>C. parapsilosis</i>	31.9
		<i>C. albicans</i>	22.4
		<i>C. guilliermondii</i>	12.7
		<i>C. famata</i>	6.6
		<i>C. tropicalis</i>	4.2
		<i>C. glabrata</i>	2.4
		<i>C. zeylanoides</i>	1.8
		<i>C. lusitaniae</i> y <i>C. krusei</i>	1.2
Manzano P. y cols ³⁵ 2007	Candiduria	<i>C. glabrata</i>	48.0
		<i>C. albicans</i>	35.0
		<i>C. parapsilosis</i>	4.3
Fernández C. y cols ³⁶ 2008-2011	Candidemia	<i>C. parapsilosis</i>	41.9
		<i>C. albicans</i>	38.7
		<i>C. glabrata</i>	12.9
		<i>C. tropicalis</i>	6.4
		<i>C. albicans</i>	76.0
Martínez R. y cols ³⁷ 2008-2011	Candidosis pulmonar	<i>C. glabrata</i>	10.4
		<i>C. tropicalis</i>	6.7
		<i>C. krusei</i>	3.0
		<i>C. parapsilosis</i>	0.4

1.4 Factores predisponentes

Existen diferentes factores que predisponen al hospedero a adquirir la infección, estos son de etiología variada y se han propuesto diversas clasificaciones que permiten su identificación. En el cuadro 10 se muestran algunos de los factores agrupados en cuatro rubros principales. Es importante destacar que actualmente el oportunismo de este hongo se ha visto beneficiado por el aumento en estos factores, los cuales se pueden presentar solos o combinados favoreciendo la severidad y la extensión de las infecciones (1-2).

Cuadro 10. Factores que predisponen a la infección por especies de *Candida*.

Estados fisiológicos	Inmunodeficiencias y enfermedades debilitantes
Prematurez Infancia Vejez Embarazo	Infección por VIH-SIDA Leucemia Linfomas Sarcomas Diabetes Obesidad Síndrome de Cushing Trasplantes
Factores iatrogénicos	Misceláneos
Antibióticos Glucocorticoides Citotóxicos Inmunosupresores Hormonas sexuales Cateterismo Nutrición parenteral	Drogadicción Quemaduras y heridas Traumatismo (manicura) Cambios de pH Prótesis Ocupación (contacto con humedad intensa)

1.5 Patogenia

Las infecciones (sobre todo las formas invasivas) se presentan generalmente en hospederos susceptibles y la procedencia es habitualmente endógena. En algunos casos es posible la transmisión de hombre a hombre o de animal a hombre.

Para el establecimiento del proceso patológico (principalmente en las formas invasivas) concurren habitualmente dos fenómenos:

- a) La conversión de la levadura comensal a patógena.
- b) La susceptibilidad del hospedero a la infección por *Candida*.

El proceso se inicia por la adherencia de *Candida* a las superficies mucocutáneas, que es un requisito esencial. Este evento se lleva a cabo por la presencia de diferentes moléculas en su superficie, las cuales se unen a las células epiteliales. Una vez producida la colonización, es capaz de invadir los tejidos superficiales y profundos; como consecuencia se genera una respuesta inflamatoria por parte del hospedero que expone a la levadura a los mecanismos de defensa para impedir la invasión y la posterior diseminación.

La integridad mucocutánea, la microbiota bacteriana y el pH ácido de determinadas mucosas dificultan la adherencia y por tanto la colonización (38).

1.6 Formas clínicas

La enfermedad producida por las especies del género *Candida* ha sido conocida con diferentes términos como: "thrush, muguet, algodoncillo, moniliasis, candidiasis y candidosis". Es probable que la palabra "thrush" derive del término escandinavo o anglosajón "torsk", mientras que el significado de la palabra francesa es "le muguet" que significa "lirio de valle" (2).

La candidosis es una infección muy frecuente y polimorfa, su nivel de profundidad y/o diseminación depende del factor de riesgo presente en el hospedero.

Las variedades clínicas son localizada, diseminada, sistémica y alérgica, como se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Formas clínicas de candidosis.

Localizada	Mucosa	Bucal Esofágica Genital
	Cutánea	Intertrigo Onicomycosis
Diseminada	Candidosis mucocutánea crónica Granuloma candidósico	
Sistémica	Tracto urinario Pulmonar Gastrointestinal Endocarditis Meningitis Candidemia	
Alérgica	Candididosis Eccema Asma Gastritis	

A continuación solo se mencionaran brevemente las variedades clínicas de las que se aislaron las diferentes especies de *Candida*, relacionadas con este estudio (1-2).

- Candidosis bucal: Afecta principalmente la lengua, seguido de encías, paladar, carrillos y puede extenderse hacia faringe y por otro lado a comisuras labiales. Se caracteriza por la formación de placas pseudomembranosas, cremosas y blanquecinas, sobre un fondo eritematoso. Generalmente se acompaña de dolor tipo ardoroso. Otras lesiones que se pueden observar son fisuras y exulceraciones (Figura 1).



Figura 1. Candidosis bucal.

- Candidosis esofágica: Puede tener su origen de una candidosis bucal. En la mucosa se observa placas blanquecinas (similares a las bucales) sobre un fondo eritematoso y pequeñas exulceraciones. La sintomatología presente es disfagia, náusea, y dolor tipo ardoroso.
- Candidosis genital
 - Vaginitis: Se manifiesta por abundante exudado blanquecino (leucorrea), espeso, grumoso, no fétido. La mucosa vaginal se observa eritematosa. Los síntomas son intenso prurito, dolor ardoroso vulvar y dispareunia. Es posible que afecte por extensión hacia dentro el cuello uterino y hacia afuera labios mayores y menores, incluso región inguino-crural.
- Balanitis: Se localiza en el glande y anillo balanoprepucial. Se caracteriza por pápulas y pústulas, exulceraciones y fisuras que se pueden extender a escroto o a región inguino-crural. Los síntomas son prurito moderado y posteriormente dolor ardoroso intenso.
- Candidosis cutánea:
 - Intertrigo: En esta forma clínica se afectan pliegues de manos y pies, inter y submamario, axilar, inguinal, umbilical e interglúteo. Se caracteriza por placas eritemato-escamosas, sin un margen preciso, con pápulas satélites, vesículas o pústulas, en ocasiones presenta fisuras y costras melicéricas. La sintomatología común es prurito y dolor de tipo ardoroso.
 - Onicomycosis: Caracterizada por paroniquia (inflamación y dolor alrededor de la uña). La lámina ungueal esta opaca, despulida y con estrías transversales. En ocasiones presenta desprendimiento ungueal (onicolisis) y cambios de coloración de amarillento a verdoso, marrón o negro (Figura 2).

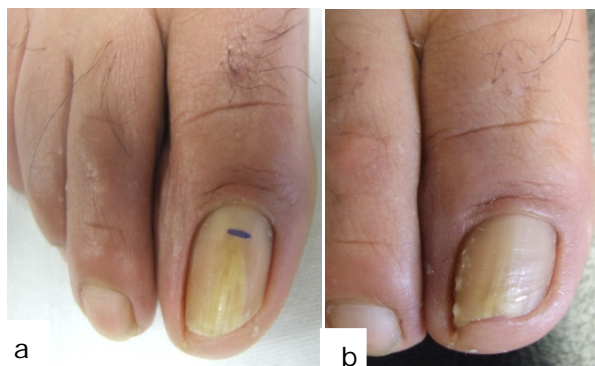


Figura 2.a) Onicolisis por *C. parapsilosis*.b) Posterior a tratamiento con fluconazol.

- Candidosis pulmonar: La variedad bronchialis se caracteriza por tos constante con esputo mucoso o gelatinoso sin afectación al estado general del paciente, a diferencia de la pulmonar en donde además se presenta disnea, dolor torácico y fiebre de predominio nocturno.
- Candidemia: Las manifestaciones clínicas son indistinguibles de otras etiologías con afectación al estado general, presencia de fiebre, precedida de escalofríos y seguida de diaforesis profusa.

En el cuadro 12 se muestra la localización anatómica más frecuente de las diferentes especies de *Candida* no *albicans* como causa de infección, aunque prácticamente todas las especies pueden producir cualquier forma clínica.

Cuadro 12. Sitios anatómicos afectados por las diferentes especies de *Candida* no *albicans*.

Especie	Sitio afectado
<i>C. parapsilosis</i>	Sangre, uñas y endocardio,
<i>C. tropicalis</i>	Vagina, tracto respiratorio, tracto urinario, sistema osteoarticular y SNC
<i>C. glabrata</i>	Tracto urinario, vagina, mucosas y pulmones.
<i>C. krusei</i>	Sangre, mucosas y endocardio.
<i>C. lusitaniae</i>	Sangre, tracto urinario y respiratorio
<i>C. zeylanoides</i>	Ingle, uñas y sangre.
<i>C. guilliermondii</i>	Varios a excepción de pulmón.

1.7 Antifúngicos

En la década de 1940´s existían pocos fármacos disponibles para el uso de infecciones fúngicas sistémicas. El desarrollo de los polienos (anfotericina B) en la década de los 50´s marcó un avance en la terapéutica micológica. La anfotericina B rápidamente se convirtió en el tratamiento de elección para infecciones graves, aunque su uso se asoció a efectos adversos severos como nefrotoxicidad. A pesar de ello representó el estándar de oro contra las infecciones fúngicas.

Los polienos actúan a nivel de la membrana celular del hongo, uniéndose al ergosterol que es su principal componente. Dañan la membrana, alteran su permeabilidad y provocan la pérdida de protones intracelulares consiguiendo un efecto fungicida. La anfotericina B produce también un daño oxidativo sobre los lípidos de la membrana y puede actuar sobre los macrófagos como inmunoestimulante. A pesar de que este fármaco se ha empleado por más de 30 años la resistencia observada es rara.

Dentro de las especies de *Candida*, las menos sensibles a este antifúngico son: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* (39).

Los dos mecanismos de resistencia descritos para estos antifúngicos son (40):

- a) Disminución del ergosterol de la membrana celular del hongo: el ergosterol es sustituido por otros esteroides a los cuales los polienos tienen menor afinidad.
- b) Cambios en la pared de la célula fúngica que conlleva a menor permeabilidad de los polienos.

La búsqueda continua de otros fármacos llevó al desarrollo de los azoles, antifúngicos de amplio espectro y con menos efectos secundarios. En 1981 la FDA (Food and Drug Administration) aprobó el ketoconazol, primer azólico disponible para el tratamiento de infecciones

fúngicas sistémicas y fue considerado el tratamiento de elección en infecciones superficiales.

La introducción de los triazoles de primera generación como fluconazol en 1990 e itraconazol en 1992 representó un gran avance en el tratamiento de las infecciones fúngicas. Los triazoles de segunda generación: voriconazol y posaconazol son más potentes y de mayor actividad contra hongos resistentes a otros antifúngicos (41).

Su mecanismo de acción de los azoles es a nivel de la membrana celular del hongo donde inhiben la desmetilación del lanosterol en el carbono 14 actuando sobre la enzima 14- α -desmetilasa ó CYP51 (ERG11) perteneciente al citocromo P450, ocasionando una depleción del ergosterol y como consecuencia la acumulación de precursores del esterol (lanosterol, 4,14-dimetilzymosterol y 24-metilendihidrolanosterol) (Figura 3).

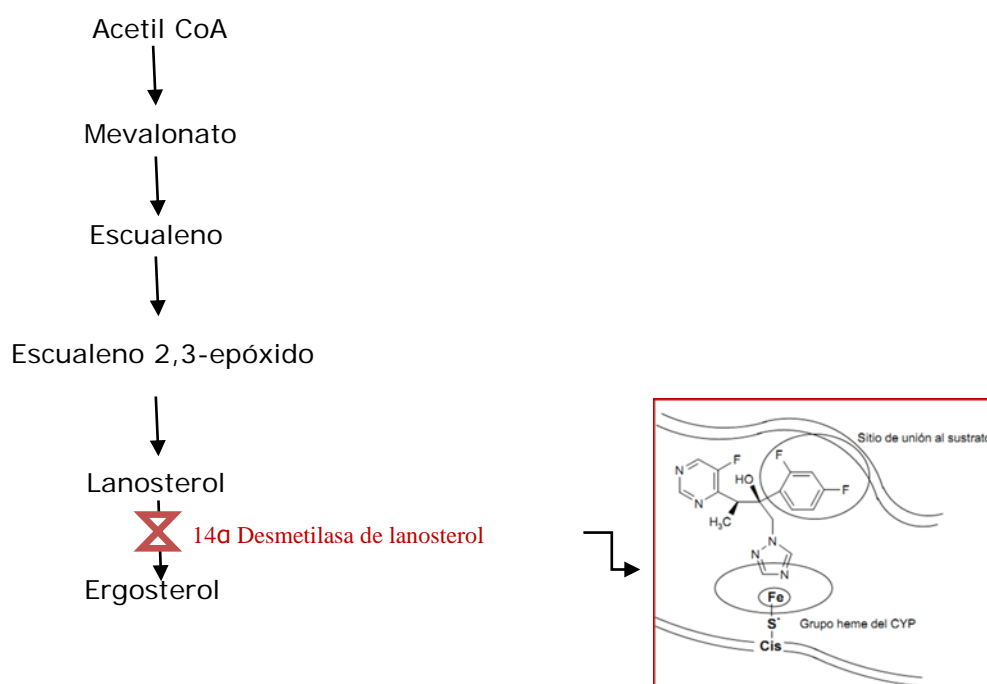


Figura 3. Ruta de biosíntesis del ergosterol.

El resultado es una inhibición en el crecimiento del hongo (acción fungistática). Otros sitios diana de los derivados imidazólicos están

relacionados con enzimas mitocondriales, como la ATPasa y la citocromo-oxidasa (40).

En los derivados azólicos se han descrito tres mecanismos de resistencia (42):

- a) Disminución en la permeabilidad de la membrana del hongo a estos compuestos, como consecuencia de los cambios en la composición del ergosterol. Las cepas que se hacen resistentes por este mecanismo tienen en su membrana niveles altos de esteroides no esterificados.
- b) La enzima sobre la que actúan estos fármacos sufre una mutación que condiciona una menor afinidad para los antifúngicos.
- c) Sobreproducción de las enzimas del citocromo P450. Este fenómeno aumenta la síntesis de esteroides contrarrestando la acción de estos fármacos.

Las equinocandinas son otros antifúngicos útiles en el tratamiento de algunas micosis sistémicas. La caspofungina fue la primera equinocandina aprobada por la FDA para uso clínico (2001), seguida de micafungina (2005) y anidulafungina (2006) (43). Estos son lipopéptidos cíclicos cuyo blanco de acción es la enzima β -(1,3)-glucano sintetasa, inhibiendo la síntesis de β -glucano componente principal de la pared celular de los hongos. La enzima β -(1,3)-glucano sintetasa es un complejo compuesto por una subunidad catalítica denominada *Fks* y una subunidad reguladora llamada *Rho*.

Los mecanismos de resistencia están relacionados con diversos eventos (44):

- a) Mutaciones en la proteína *Fks* en especies de *Candida* que le confieren resistencia.

Candida parapsilosis y *Candida guilliermondii* muestran una sensibilidad reducida a estos antifúngicos como resultados del

polimorfismo en los genes que codifican la subunidad catalítica de la enzima.

b) Activación de rutas alternas, lo que resulta en niveles elevados de polisacáridos principalmente quitina. Una pared celular fúngica con elevados niveles de quitina resulta menos sensible a las equinocandinas.

1.8 Frecuencia de la resistencia de *Candida* spp. a los antifúngicos.

En la década de los 1990´s se describieron los primeros casos de pacientes con candidosis orofaríngea que no respondieron adecuadamente al tratamiento con fármacos azólicos, particularmente en los infectados por virus de la inmunodeficiencia humana.

Después de diversos ensayos *in vitro* realizados por algunos autores se encontró que las especies de *Candida* no *albicans* mostraron resistencia hacia diferentes antifúngicos. En *C. parapsilosis* se ha reportado resistencia a fluconazol del 2.0-4.2%; a voriconazol del 1–2% (45) y a itraconazol del 1.5-4% (46). Frente a equinocandinas mostró valores altos de CMI comparado con otras especies de *Candida*. Con anidulafungina los rangos de CMI fueron de 2–4 µg/mL, mientras que para caspofungina de 1–2 µg/mL (46-49).

Los aislados de *C. glabrata* están asociados con valores altos de CMI frente a los azoles, incluso muestra una sensibilidad disminuida a anfotericina B (50-51). La resistencia a fluconazol se ha observado del 13.3–22.8%, a voriconazol del 6.7–33.3% (48-49, 52). Para ketoconazol del 9.1%, itraconazol del 91%, anfotericina B del 54.5% (10) y caspofungina del 1.1% (52).

C. tropicalis muestra una resistencia a fluconazol del 3.0–6.6% y a voriconazol del 4.7–8.0%; mientras que *C. krusei* fue del 56.5–80.2% y 6.0-8.0%, respectivamente (48); en *C. lusitaniae* del 1.6-6.6% y del

2.0–2.8%, respectivamente (48). Además en el caso de *C. tropicalis* y *C. krusei* se ha documentado un incremento de resistencia hacia anfotericina B en 8.1% y 33.3%, respectivamente (53).

Finalmente, *C. guilliermondii* mostró resistencia hacia fluconazol del 6.3–26.1%, a voriconazol del 4.2–6.0% (48) y a itraconazol del 42.9% (34).

1.9 Métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

Debido al aumento en la incidencia de las infecciones fúngicas y al desarrollo paralelo de cepas resistentes la elección del antifúngico más adecuado ha adquirido un papel relevante, lo que hizo necesario el diseño de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Con estas pruebas y mediante la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (la menor concentración del antifúngico que inhibe el 80% del crecimiento de la levadura), se logró definir los criterios de sensibilidad o resistencia a un agente antifúngico específico, de acuerdo con los puntos de corte de interpretación clínica (54).

El Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) es un organismo estadounidense dedicado a la estandarización de las pruebas de laboratorio. En 1992 publicó el primer documento, M27-P (propuesto), en el cual se establecían las normas para la realización de pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras, utilizando el método de macrodilución. Tres años después se publicó el documento M27-T (nivel tentativo) en el cual se estandarizó el método de microdilución y finalmente en 1997 publicó el método definitivo M27-A (aprobatorio) que incluye los límites de las CMI para las cepas control de calidad y los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. En el 2008 se publicó un nuevo documento el M27-A3 en el que se incluyen los valores de CMI para voriconazol, ravuconazol, y posaconazol para las cepas control de calidad.

Este documento especifica los procedimientos de macrodilución y microdilución en caldo para la determinación de la sensibilidad en levaduras como *Candida spp.* y *Cryptococcus neoformans* (55).

El European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) es un organismo europeo creado por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), cuya función primordial es el desarrollo de estándares para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos. Este Comité plantea los estándares compatibles con los procedimientos de organismos homólogos no europeos como el CLSI.

La finalidad de los estándares es establecer puntos de corte que permitan realizar estudios epidemiológicos, con el propósito de vigilar y controlar el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos.

Cuadro 13. Diferencias entre el método CLSI y EUCAST.

Parámetros	Método	
	CLSI M27A3	EUCAST
Medio de cultivo	RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato	RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato
Suplementación con glucosa (%)	0.2	2
Placas de microdilución	96 pozos fondo redondo	96 pozos fondo plano
Inóculo (UFC/mL)	0.5–2.5X10 ³	0.5–2.5X 10 ⁵
Tiempo de incubación (h)	48	24
Lectura	Visual	Espectrofotométrica
Punto de corte (azoles)	La concentración más baja que inhibe el 80% del crecimiento comparado con el control.	La concentración más baja que inhibe el 50% del crecimiento respecto al control

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

- Dilución en agar o caldo: Se realiza la dilución del antifúngico en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del hongo que se va a

ensayar. Se inocula, se incuba a una temperatura de 35°C y se valora la concentración menor del antimicrobiano que causó la inhibición en el crecimiento.

- Difusión en agar: Se inocula el hongo en la superficie del agar y se deposita un disco con una concentración conocida de antifúngico. Después de incubar a una temperatura de 35°C, se produce una zona de inhibición del crecimiento del hongo alrededor del disco. Dependiendo del tamaño del halo, se puede valorar si el microorganismo es sensible, intermedio, indeterminado o resistente al antifúngico, ya que los diámetros tienen una relación inversa con la CMI.

Otros sistemas de clasificación son los métodos cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos (56).

- 1) Los métodos cuantitativos se basan en diluciones seriadas del antifúngico, obteniendo la CMI en las especies problema. De los más confiables son los métodos de referencia del CLSI descritos en el documento M27-A3 y el EUCAST.

Métodos comerciales:

- a) Sensititre YeastOne: Se basa en una técnica de microdilución, contiene un indicador de crecimiento que detecta las variaciones de pH. El parámetro de sensibilidad *in vitro* es cuantitativo y colorimétrico. Incluye antifúngicos a concentraciones similares a los del documento M27-A.
- b) ASTY colorimetric panel: Incluye diversas concentraciones de los antifúngicos previamente deshidratados y contenidos en los pozos de las galerías. Concentraciones similares a las del documento M27A. Incorpora la presencia de un indicador de pH colorimétrico, el cual permite valorar la CMI cuando se produce el vire del indicador.
- c) Etest: Son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración del antifúngico. Al depositar sobre las placas

de agar inoculadas el antifúngico difunde en el medio. La CMI se determina en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento con el valor de la tira de €.

- 2) Los métodos semicuantitativos estudian la sensibilidad a antifúngicos en dos concentraciones críticas.

Métodos comerciales:

- a) Candifast: Sistema que presenta en la misma galería ocho pruebas para la identificación de levaduras (crecimiento en presencia de actidiona y fermentación de sacarosa, lactosa, trealosa, rafinosa, maltosa, celobiosa y galactosa) y ocho pozos para el estudio de sensibilidad a varios agentes antifúngicos.
- b) Mycototal: Test de microdilución que utiliza un medio semisintético y varios antifúngicos con dos concentraciones críticas.
- c) ATB Fungus 3: Es un sistema no colorimétrico que mide la sensibilidad a 5 antifúngicos (5-Flucitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol).
- d) Fungitest: Método simplificado colorimétrico que incluye antifúngicos a dos concentraciones críticas, lo que nos permite una valoración semicuantitativa.
- e) CHROMagar *Candida* más fluconazol: El medio de CHROMagar lleva incorporado fluconazol, a concentraciones de 8µg de fluconazol por mL de agar.

- 3) Métodos cualitativos:

- a) Difusión en disco: Estudia la sensibilidad en función del halo de inhibición producido por la difusión radial del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Su utilidad está limitada por los problemas de difusión de la mayoría de los antifúngicos.
- b) Metodo M44-A: este documento describe el método de difusión en agar para levaduras del género *Candida*. Las pruebas en medio

sólido y en especial las de difusión son simples de realizar y los resultados se obtienen de forma rápida y son fáciles de interpretar.

2. JUSTIFICACION

En la última década se ha documentado un cambio en la epidemiología de las infecciones fúngicas, principalmente las causadas por especies del género *Candida*, con un aumento en las infecciones ocasionadas por especies de *Candida no albicans*.

Actualmente, los aislamientos de las especies del género *Candida* ocupan la cuarta causa de infecciones nosocomiales, aunado a un incremento en los factores de riesgo que presentan los pacientes, que los predisponen a padecer estas infecciones.

Otro de los fenómenos observado es el aumento en los fracasos al tratamiento con diversos antifúngicos en pacientes con estas micosis; además de las variaciones en la actividad y resistencia *in vitro* de los antifúngicos sobre los aislados levaduriformes.

En México se han reportado algunos estudios epidemiológicos acerca de los aislados de *Candida* spp. de pacientes de diferentes hospitales, donde se ha demostrado el incremento de *C. parapsilosis* como agente causal en algunas formas clínicas y en otras aún predomina *C. albicans*. Por otro lado, en los estudios previos acerca del patrón de sensibilidad antifúngica, fue evidente la variación en la resistencia observada en algunas de las especies de *Candida* a los diversos antifúngicos. Por lo tanto, es importante continuar con los estudios epidemiológicos sobre la frecuencia y sensibilidad en las especies de *Candida no albicans* con la finalidad de llevar a cabo una vigilancia constante de estos dos fenómenos observados y alertar a los médicos clínicos de la importancia de estas levaduras como causa de morbilidad en los pacientes atendidos en los hospitales de nuestro país.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la frecuencia de las especies de *Candida* no *albicans* causantes de infección y la resistencia a diversos antifúngicos.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las especies de *Candida* no *albicans*.
- Asociar la especie de *Candida* con el factor de riesgo.
- Relacionar el aislado clínico de *Candida* spp. con la forma clínica.
- Conocer las especies de *Candida* no *albicans* resistentes a diversos antifúngicos.
- Relacionar la resistencia antifúngica observada con la especie de *Candida*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, descriptivo y observacional de aislados levaduriformes obtenidos de pacientes atendidos en tres hospitales de la Ciudad de México (Hospital General Dr. Darío Fernández ISSSTE, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS y Dr. Manuel Gea González, SA) en un periodo que comprendió de agosto de 2010 a febrero de 2011. Los pacientes fueron divididos en dos grupos: ambulatorios y hospitalizados, y de cada uno de ellos se obtuvieron los siguientes datos: nombre, género, factor de riesgo, forma clínica y espécimen biológico o clave de registro del aislado de origen.

4.1 Aislados

Las muestras biológicas fueron inoculadas en agar dextrosa Sabouraud (ADS) y agar dextrosa Sabouraud adicionado con ciprofloxacino a 50 mg/mL y estreptomina a 30 mg/mL, se incubaron a 28°C durante 48 horas.

4.2 Identificación de levaduras

Para la identificación de los aislados levaduriformes se realizó:

- Examen microscópico directo.
- Frotis con tinción de Gram.

Para verificar la morfología de las levaduras y la ausencia o presencia de bacterias.

4.3 Medios de cultivo

Se prepararon los siguientes medios de cultivo para aislamiento, identificación y conservación:

- Agar dextrosa Sabouraud (ADS).
- Agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida (ADS-C-C).
- Agar Biggy (AB).
- Agar urea de Christensen (AUC)
- CHROMagar *Candida*® (CH-A).

- Harina de Maíz + Tween 80 al 1% (HM).

Todos los aislados problema se resembraron en ADS y se incubaron a 30°C durante 24 h. Posteriormente para la obtención de un cultivo monocelular se realizó una suspensión de 1×10^5 células/mL, de la cual se tomaron 2 μ L, se depositaron en el centro de la placa de CH-A y AB, se distribuyeron por técnica de estría masiva sobre la superficie del agar. Se incubaron a 37°C durante 48 h. Las características de la morfología colonial fueron valoradas: el color y la asociación colonial (cuadro 5). En el CH-A se identificó la coloración específica producida a partir de la actividad enzimática de cada una de las especies (Figura 4), mientras que en el AB se estableció parcialmente si se trataba del género *Candida* al producir una coloración marrón claro a oscuro producida por la reducción de sulfitos a sulfuros.

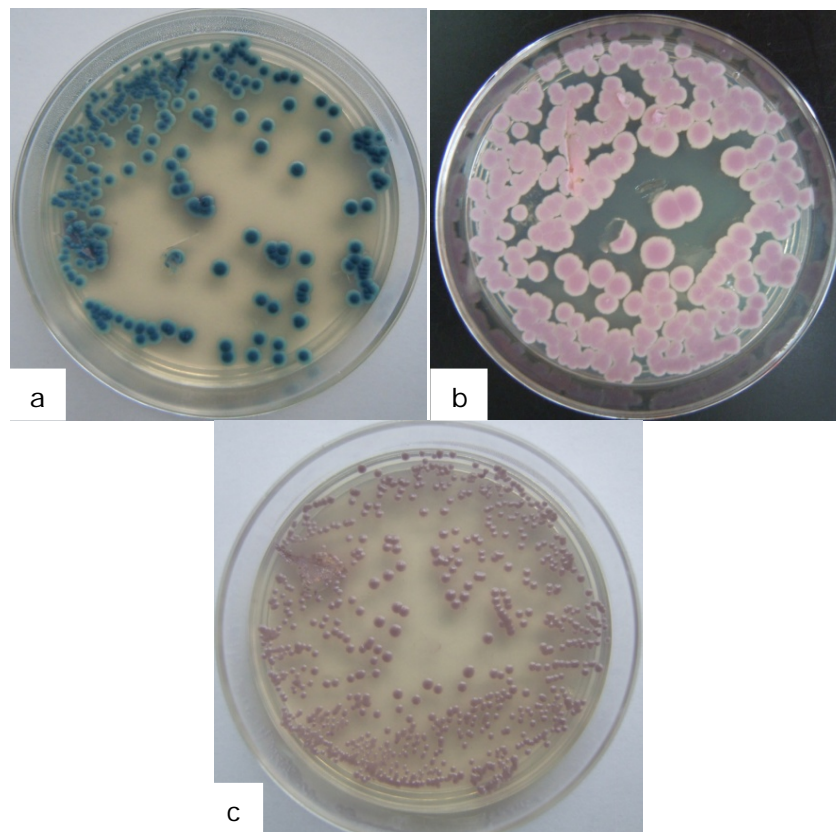


Figura 4. Cultivos en CHROMagar *Candida*®. a) *C. tropicalis*. b) *C. krusei*. c) *C. glabrata*.

Del crecimiento obtenido se seleccionó una colonia de color homogéneo, la cual se tomó y se inoculó en ADS, ADS-C-C y AUC, se incubaron a 28°C por 48 h. El ADS-C-C se utilizó para valorar sensibilidad o resistencia a la cicloheximida y el AUC para detectar la hidrólisis de la urea por el cambio de color en el medio (amarillo a rojo) generado por la producción de amoniac, esto permitió la identificación del género *Candida*.

4.4 Pruebas fenotípicas

Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- Formación de tubo germinativo: Se inoculó una pequeña cantidad de la levadura en 0.5 mL de suero humano y se incubó a 37°C durante 2 h., con un examen en fresco se buscó la producción de tubo germinativo, pseudohifas o levaduras.
- Producción de pseudohifas y clamidoconidios: Por la técnica de Dalmau se inocularon los aislados problema en agar HM, la cual consiste en sembrar la levadura haciendo dos líneas con un centímetro de separación y sobre estas colocar un cubreobjeto (Figura 5). Se incubó a 28°C y la lectura se realizó al colocar la placa a 10X buscando si existe la producción de pseudohifas y clamidoconidios.

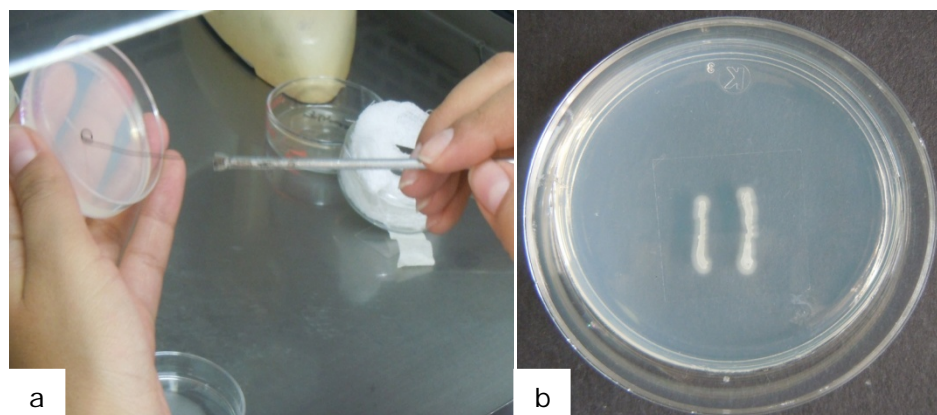


Figura 5. a) Inoculación en agar HM por la técnica de Dalmau. b) Agar HM a las 48 h.

4.5 Pruebas bioquímicas

La asimilación de carbohidratos se realizó con los aislados identificados como *Candida no albicans* mediante el Sistema API 20 C AUX. Este sistema cuenta con 20 cúpulas, de las cuales en 19 tienen un carbohidrato deshidratado y una como control.



La preparación de la galería se realizó de la siguiente forma:

- Se repartió aproximadamente 5 mL de agua destilada en los pozos del fondo de la cámara de incubación para crear una atmósfera húmeda.
- Se retiró la galería de su envoltura y se depositó en el fondo de la cámara antes preparada.
- Se cubrió con la tapa de la cámara de incubación.

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo de 24 h. en ADS, siguiendo las indicaciones del proveedor:

- Se preparó una suspensión de turbidez igual a la del patrón de 2 de McFarland en 1.0 mL de solución salina al 0.85%.
- Se transfirió 135 μ L de la suspensión anterior a la ampolla que contiene el medio del "kit" (API C Medium) y se homogenizó.
- Se abrió la cámara de incubación y se llenó cada cúpula de la galería con 50-60 μ L de la suspensión formando un nivel ligeramente convexo.
- Se cerró la cámara y se incubó a 30°C.

La lectura se realizó a las 48 h. y en los casos de crecimiento escaso se dejó hasta las 72 h. La identificación se llevó a cabo por el perfil numérico obtenido: turbidez mayor que en el control indica una reacción positiva, la que se anotó en la hoja de resultados. De esta forma, se asigna un valor (1, 2 ó 4) para cada pozo lo que permite que se obtenga un perfil de 7 cifras (Figura 6) el cual se introduce en el sistema api Web para obtener la identificación final (Figura 7).




 REF: 116 / 29/09/11
 Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie *API-A:116/ADS C-C (-)*

48 h	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
72 h	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADD	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	DEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HM
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	6			6			5			2			1			3			5		

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Outras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andra tests / Inno testy :

Ident. / Ταυτοποίηση : *C. parapsilosis 99,9%*

Figura 6. Hoja de resultados de API 20C AUX.



API 20 C AUX V4.0 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA: 116 FECHA: 29/09/11
 COMENTARIO:

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galeria	API 20 C AUX V4.0
Perfil	6 6 5 2 1 3 5
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida parapsilosis</i>	99.9	0.54	2KG 88%	MDG 89%	TRE 93%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Candida lusitanae</i>	0.1	0.0	2KG 95%	ARA 1%	CEL 80%	TRE 100%

Figura 7. Sistema api web, ejemplo de identificación del aislado 116.

Con la metodología antes mencionada se realizó la identificación de las levaduras del género *Candida*, además de la tipificación de otros géneros siguiendo el esquema que se muestra en la figura 8. Finalmente, se utilizaron pruebas diferenciales (tinción negativa o tinta china, agar Staib, agar canavanina-azul de bromotimol, agar manitol) para determinar la especie de los otros géneros y también se realizó la asimilación de carbohidratos mediante el Sistema API 20 C AUX.

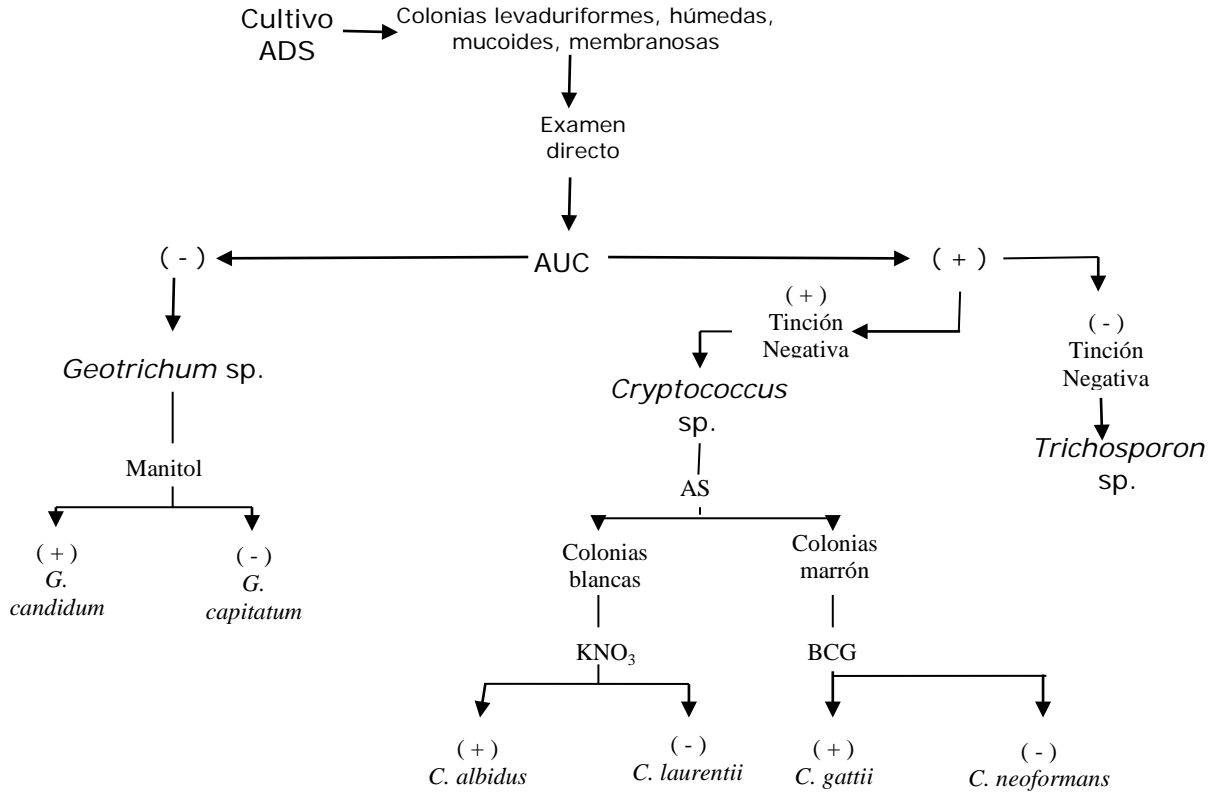


Figura 8. Identificación de géneros diferentes a *Candida*.

4.6 Prueba de sensibilidad a antifúngicos.

A todos los aislados obtenidos se les realizó la prueba de sensibilidad a antifúngicos por el método de microdilución en caldo descrito en el documento M27-A3 del CLSI (57). Los antifúngicos usados fueron: cinco azólicos: ketoconazol (KTZ), fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ) y posaconazol (PZC); dos equinocandinas: caspofungina (CSF) y anidulafungina (ANF) y un polieno: anfotericina B (AMB).

- Preparación de la solución madre.

Se pesó la cantidad correspondiente del antifúngico y se diluyó en 10 mL, los antifúngicos solubles en agua químicamente pura y los insolubles en dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez que se llevó a disolución total, la solución se esterilizó por filtración y se dejó reposar por 20

minutos. Se dosificó finalmente en alícuotas de 500 µL y se almacenaron a una temperatura de -20°C.

La concentración final de la solución madre fue 100 veces mayor a la concentración más alta a probar.

- Preparación de los antifúngicos.

A partir de la solución madre se hicieron las diluciones necesarias para obtener las diferentes concentraciones de los antifúngicos.

El rango de concentraciones utilizadas para los antifúngicos se muestra en el cuadro 14.

Cuadro 14. Concentraciones para los diferentes antifúngicos.

Antifúngico	Concentración máxima µg/mL	Concentración mínima µg/mL
Anfotericina B Posaconazol Itraconazol Ketoconazol Voriconazol Caspofungina	16	0.0313
Anidulafungina	32	0.06
Fluconazol	64	0.125

Se siguieron dos esquemas de trabajo dependiendo de la solubilidad del antifúngico.

Antifúngicos solubles (FLZ y CSF): se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 (con glutamina, sin bicarbonato de sodio y con rojo de fenol como indicador de pH), amortiguado con MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfónico) a concentración final 0.165 mol/L a pH 7.0, el cual se colocó en los tubos en la cantidad indicada, de acuerdo al esquema de la figura 9.

Antifúngicos insolubles (AMB, KTZ, ITZ, VRZ, PZC y ANF): se colocó la cantidad indicada de DMSO en cada tubo y se siguió el esquema de la figura 10.

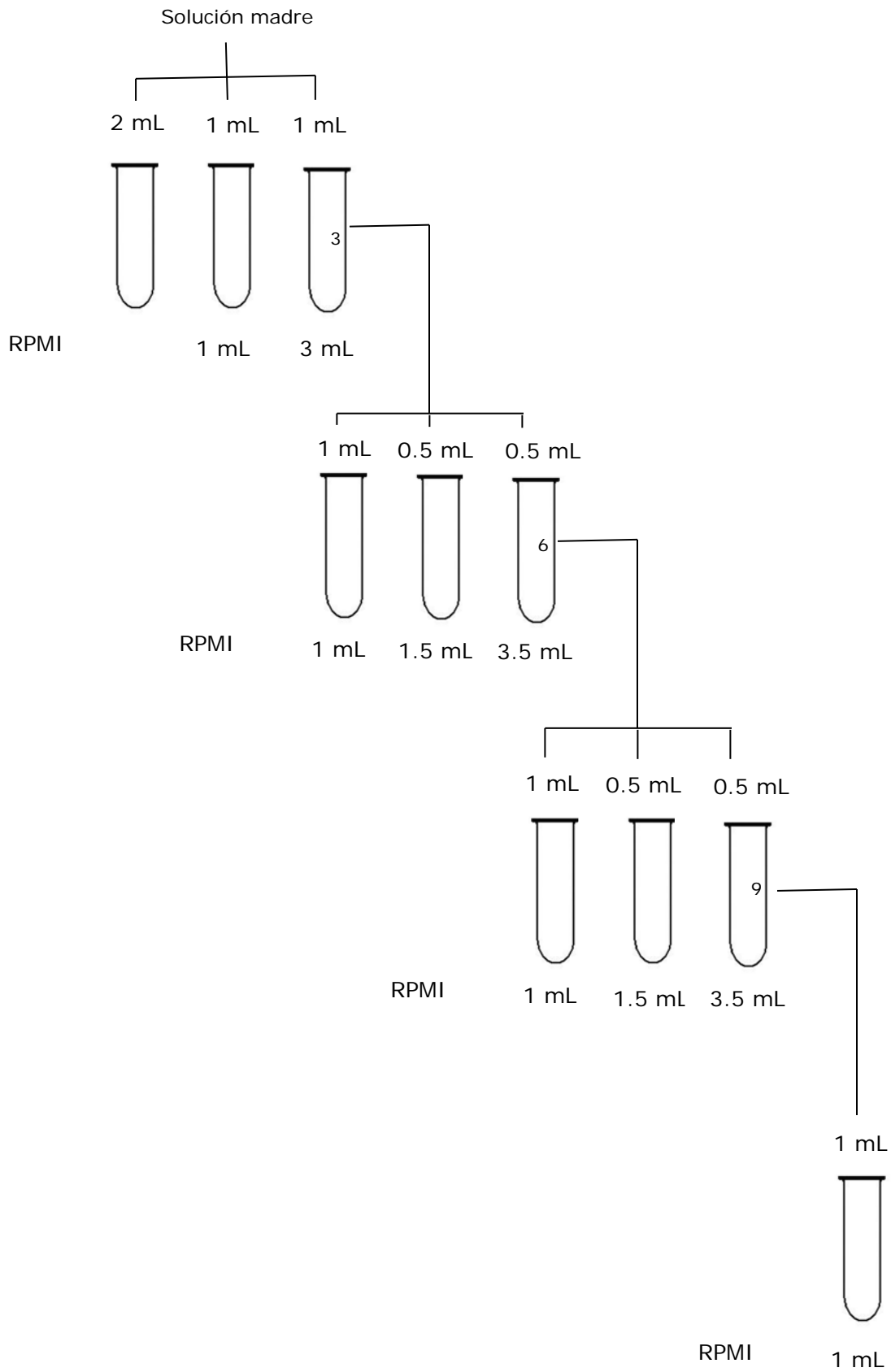


Figura 9. Esquema de preparación de los antifúngicos solubles.

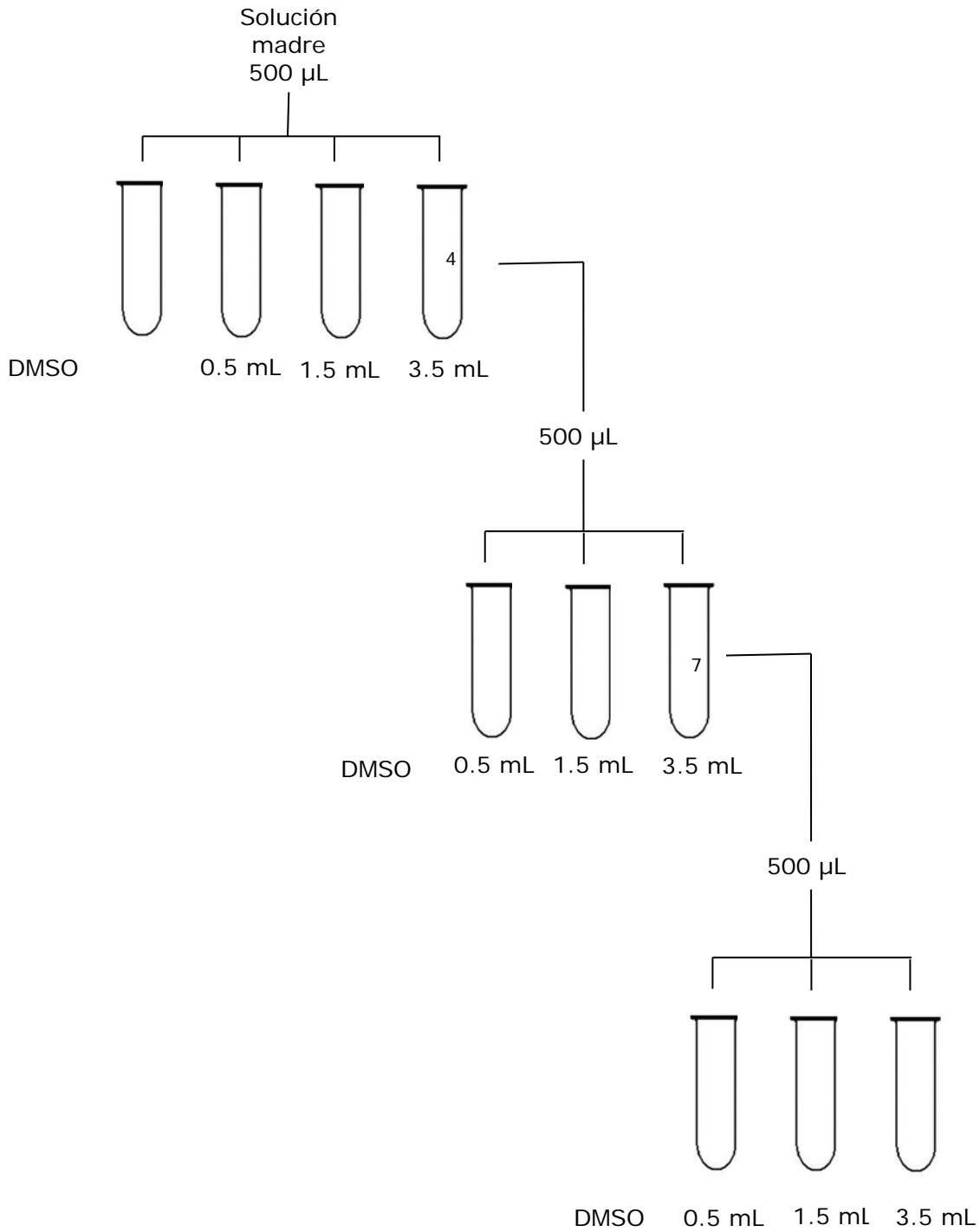


Figura 10. Esquema de preparación de los antifúngicos insolubles.

Una vez que se tienen los tubos con las diluciones anteriores se procede al llenado de las placas.

- Llenado de las placas

Se utilizó una microplaca estéril de 96 pozos (Figura 12), de la siguiente forma:

- En la columna 1 (Figura 11) se colocó la dilución que correspondió a la concentración más alta del antifúngico, de la 2 a la 9 se distribuyeron las concentraciones decrecientes y en la 10 la de menor concentración. La columna 11 correspondió al control de crecimiento y la 12 al control de esterilidad. En el caso de los antifúngicos solubles en la columna 11 y 12 se añadió RPMI, mientras que para los insolubles solo en la columna 12.

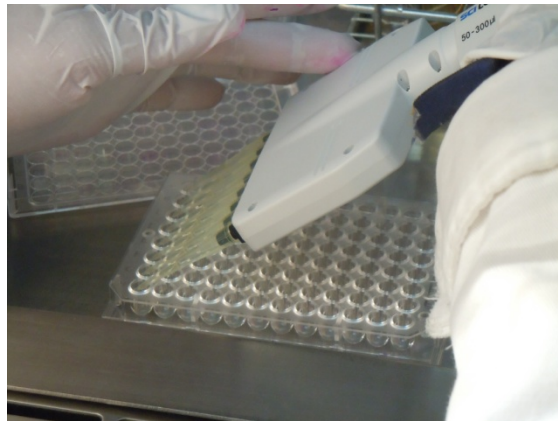


Figura 11. Llenado de la microplaca de 96 pozos.

- Preparación del inóculo

De un cultivo de la levadura problema en ADS de 24 h, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se preparó una suspensión a una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC /mL en solución salina al 0.85%
- La suspensión problema fue diluida 1:1000 en RPMI para obtener $1-5 \times 10^3$ UFC/mL.
- La inoculación de las placas se realizó por filas; en las filas A y B se colocaron las cepas control de calidad: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. En la columna 12 se colocó

100 µL del medio RPMI y de la fila C a la H los aislados problemas.

➤ Incubación a 35°C durante 48 h.

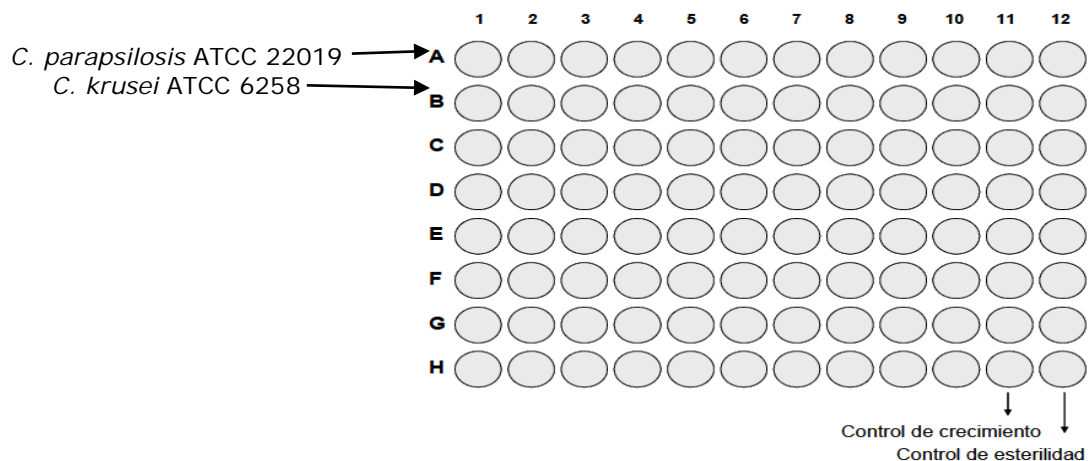


Figura 12. Esquema de inoculación de la microplaca .

De acuerdo con el documento del CLSI, la lectura es visual a las 24 y 48 h. para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Figura 13) con ayuda de un espejo invertido. La CMI se comparó con los puntos de corte establecidos en el documento del CLSI (cuadro 15).

Cuadro 15. Puntos de corte para los antifúngicos empleados.

Antifúngico	Intervalos de las CMI (µg/mL)		
	Sensible (S)	Sensible Dosis Dependiente (SDD)	Resistente (R)
Anfotericina B	<2	--	≥2
Ketoconazol	<1	--	≥1
Fluconazol	<8	16-32	≥64
Itraconazol	<0.125	0.25–0.5	≥ 1
Posaconazol	<1	--	≥ 1
Voriconazol	<1	2	≥4
Caspofungina	<2	--	≥2
Anidulafungina	<2	--	≥2

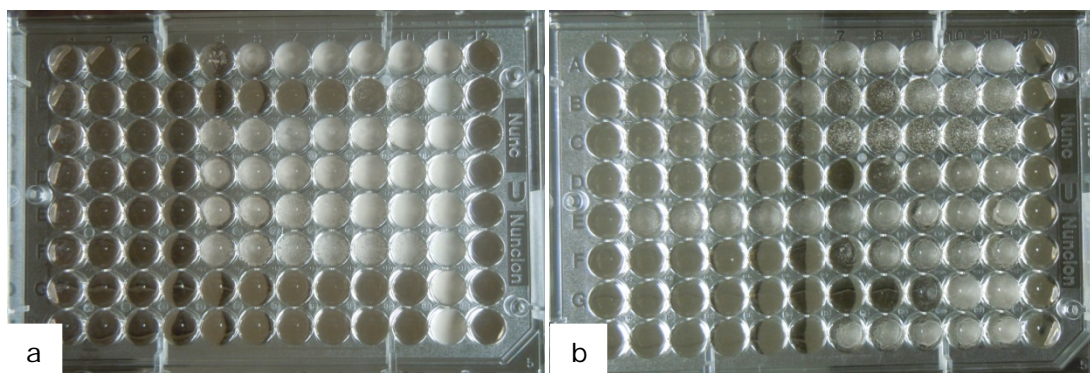


Figura 13. a) Aislados problema resistentes a anidulafungina (fila C-F). b) Aislado problema resistente a caspofungina (fila E).

4.7 Análisis estadístico

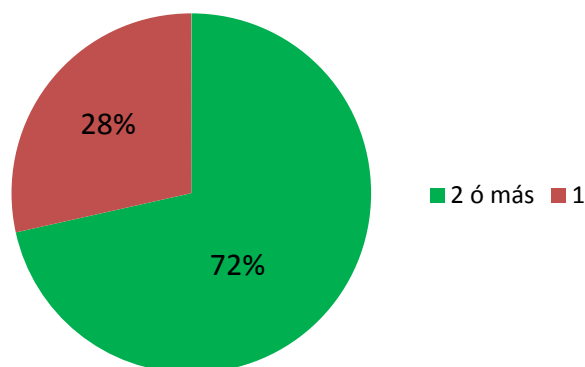
Para el análisis de resultados se calcularon medias y porcentajes de los datos recabados: factores de riesgo y formas clínicas de los pacientes, especímenes biológicos o cultivos procesados, los aislados identificados y las respectivas comparaciones.

Se utilizó la prueba de proporciones y de Chi cuadrado para valorar diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los valores de *Candida albicans* y *Candida no albicans*.

A los datos obtenidos de la actividad y resistencia a los antifúngicos en los aislados clínicos de *Candida* spp estudiados se les realizó cálculos de media.

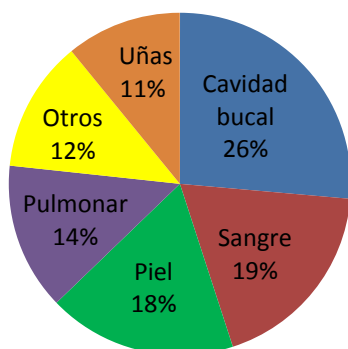
5. Resultados

En este estudio se incluyeron 220 pacientes, el rango de edad fue de 18-84 años, con un promedio de 52 años, de los cuales 165 (75%) correspondió al género femenino. De todos los pacientes 62 (28.2%) correspondieron al primer grupo (ambulatorios) y 158 (71.8%) al segundo grupo (hospitalizados). Es importante notar que el primer grupo presentó solo un factor de riesgo, diabetes mellitus tipo 2 (DM2); mientras que el segundo grupo la asociación de dos o más, como DM2, neoplasias y administración de antimicrobianos por tiempo prolongado (Gráfica 1).



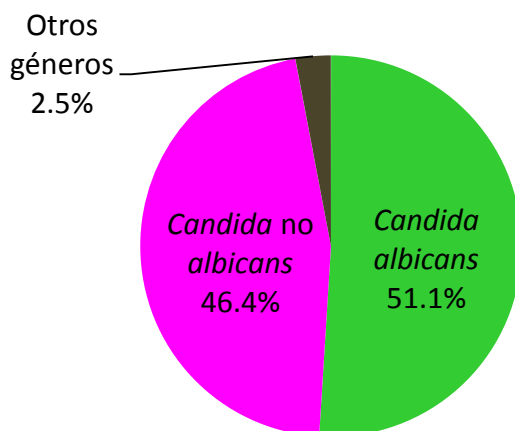
Gráfica 1. Porcentaje de asociación a uno o más factores de riesgo en los pacientes estudiados.

Los aislados levaduriformes se obtuvieron del procesamiento de especímenes biológicos de diversas regiones anatómicas, donde las dos principales fueron cavidad bucal y sangre (Gráfica 2). En la categoría de otros, los aislamientos se recuperaron de vías urinarias, vagina, tracto gastrointestinal, fragmentos de tejido, exudado de úlceras y de heridas quirúrgicas.



Gráfica 2. Localización anatómica de los aislados levaduriformes estudiados.

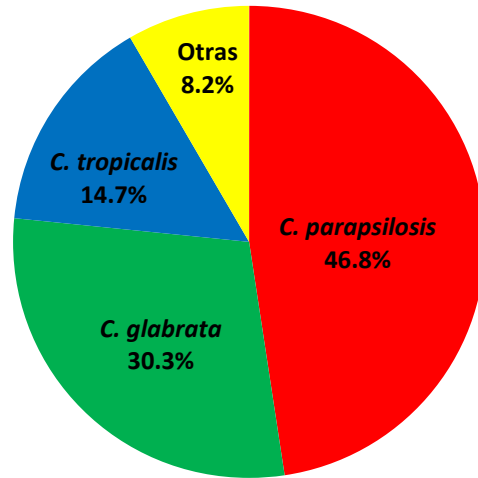
De 220 muestras procesadas se obtuvieron 235 aislados los cuales se dividieron en tres grupos: 120 aislados (51.1%) correspondieron a *C. albicans*; 109 aislados (46.4%) a *Candida no albicans* y 6 aislados (2.5%) a otros géneros diferentes a *Candida* (Gráfica 3). La diferencia observada entre los aislados de *C. albicans* y *Candida no albicans* no fue estadísticamente significativa.



Gráfica 3. Identificación de aislados de *C. albicans*, *Candida no albicans* y otros géneros.

En la gráfica 4 se presenta la distribución de los 109 aislados de *Candida no albicans*, en donde el primer lugar correspondió *C. parapsilosis* (46.8%), seguido de *C. glabrata* (30.3%) y *C. tropicalis*

(14.7%). En la categoría de otras especies (8.2%) se identificaron a las siguientes: *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. zeylanoides*.



Gráfica 4. Distribución de las especies de *Candida no albicans*.

El medio cromogénico fue de utilidad para la detección de asociaciones entre las especies estudiadas (Figura 14), la cual correspondió a 15 (6.4%) (cuadro 16).

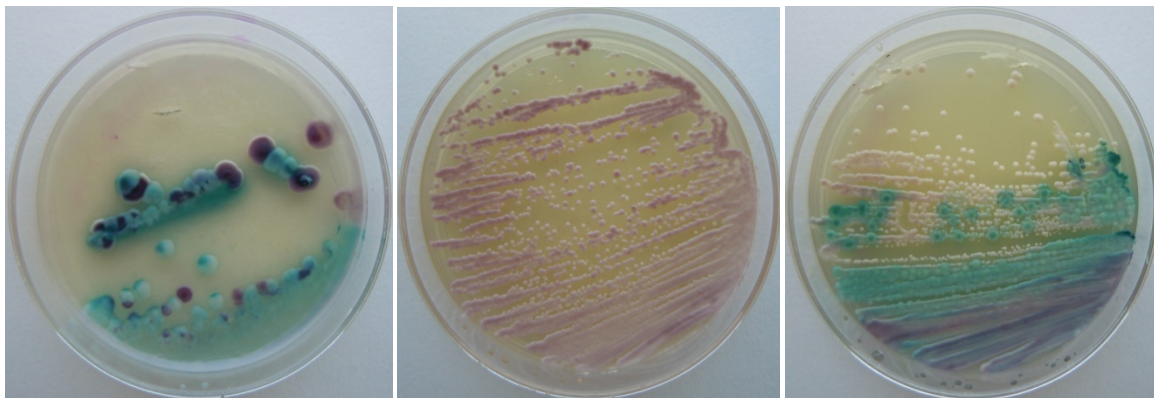


Figura 14. Asociaciones entre especies de *Candida* en CHROMagar *Candida*®.

Cuadro 16. Asociaciones entre especies de *Candida*.

Especies	Número de aislamientos
<i>C. albicans</i> – <i>C. parapsilosis</i>	3
<i>C. albicans</i> - <i>C. glabrata</i>	8
<i>C. glabrata</i> - <i>C. parapsilosis</i>	1
<i>C. albicans</i> - <i>C. tropicalis</i>	1

Es importante mencionar que entre los aislados obtenidos se identificó la asociación de *C. albicans* con *Geotrichum capitatum* y de *C. tropicalis* con *Pichia ohmeri*.

A partir de los aislados levaduriformes y con la metodología empleada se identificaron aislados diferentes al género *Candida*, los resultados se presentan en el cuadro 17.

Cuadro 17. Géneros y especies identificadas diferentes al género *Candida*.

Especies identificadas diferentes a <i>Candida</i>
<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>Cryptococcus humicola</i>
<i>Trichosporon mucoides</i>
<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Geotrichum capitatum</i>

En la figura 15 y 16 se muestran algunas de las pruebas utilizadas para la identificación del género *Cryptococcus*, como la observación de la cápsula con la tinción negativa, la hidrólisis de urea, el crecimiento en agar Staib (AS) y la inoculación en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol y en HM.

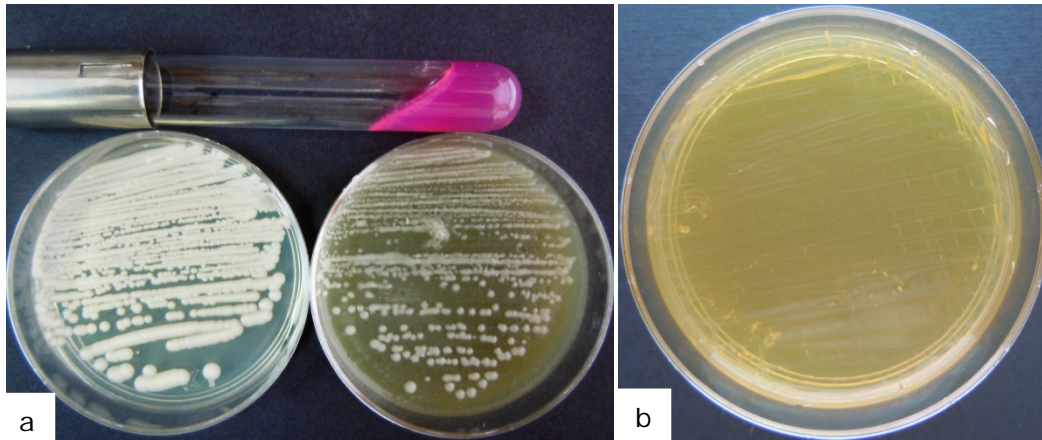


Figura 15. *Cryptococcus albidus*. a) Hidrólisis en AUC; colonias ligeramente mucoides en ADS y colonias blancas en AS. b) Prueba negativa en medio de BCG por *Cryptococcus neoformans*.

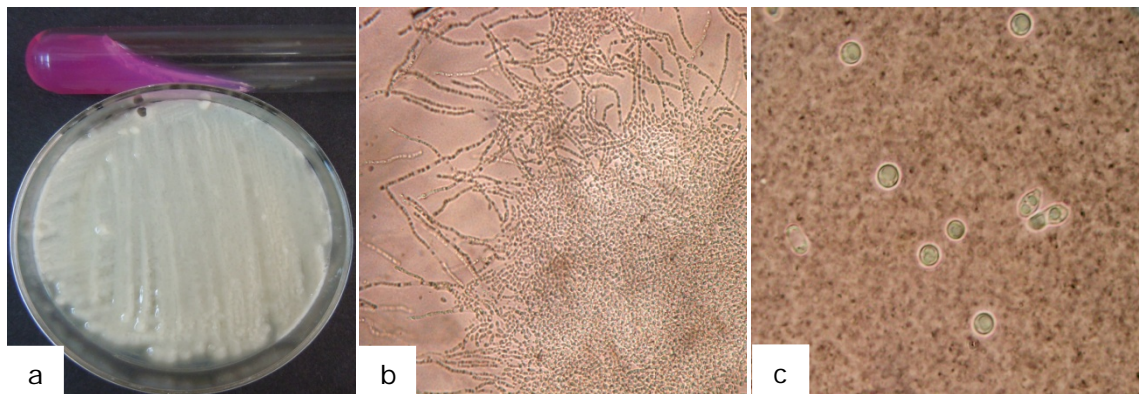


Figura 16. *C. humicola*. a) Hidrólisis en AUC y colonias mucoides en ADS. b) Filamentación en agar HM. c) Tinción negativa con levaduras redondas a ovoides, rodeadas por una cápsula pequeña.

El medio cromogénico también fue de utilidad para la diferenciación entre la asociación de los géneros obtenidos. En el caso de la asociación entre *C. albicans* y *Geotrichum* sp.; estos aislados se obtuvieron de una muestra de líquido de lavado bronquial, de un paciente masculino que cursaba con un padecimiento pulmonar. Se identificó a *G. capitatum* por la asimilación de carbohidratos, la hidrólisis negativa de urea y la prueba negativa de manitol (Figura 17).

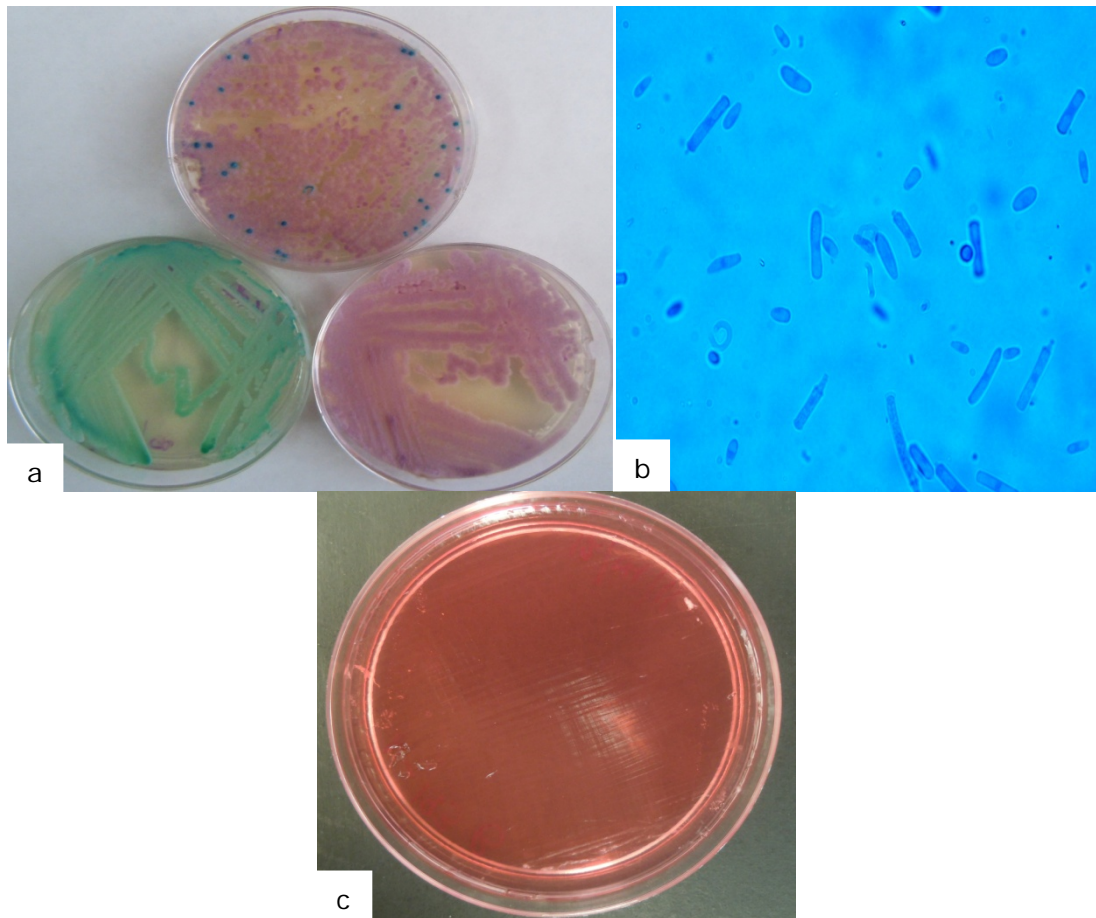


Figura 17. a) Asociación colonial y colonias puras en CRHROMagar Candida®. b) Arthroconidios en el examen directo con azul de algodón de *G. capitatum*. c) Agar manitol negativo.

La distribución de las especies de *Candida* no *albicans* en las diferentes localizaciones anatómicas muestra que *C. parapsilosis* predominó en sangre (65.2%), uñas (68.7%) y piel (88.8%); *C. tropicalis* en pulmón (58.8%); mientras que en la cavidad bucal el porcentaje de aislamiento fue igual para *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (33.3%) (cuadro 18).

Cuadro 18. Distribución de las especies de *Candida* no *albicans* en las diferentes localizaciones anatómicas.

Especies	Sangre	Cavidad bucal	Uñas	Pulmonar	Piel	Otros
<i>C. parapsilosis</i>	15 (65.2%)	3 (33.3%)	11 (68.7%)	0	16 (88.8%)	6 (23.1%)
<i>C. glabrata</i>	7 (30.4%)	3 (33.3%)	0	6 (35.3%)	1 (5.6%)	16 (61.5%)
<i>C. tropicalis</i>	1 (4.4%)	1 (11.1%)	0	10 (58.8%)	0	4 (15.4%)
Otras	0	2 (22.2%)	5 (31.3%)	1 (5.9%)	1 (5.6%)	0
TOTAL	23	9	16	17	18	26

A continuación se presentan dos de los casos clínicos de este estudio, uno correspondió a una candidosis pulmonar y el otro a un intertrigo por *Candida*.

Paciente masculino de 53 años, trabajador de limpia con antecedentes de infección crónica y recurrente de vías respiratorias con administración de antibióticos de amplio espectro. El padecimiento actual de tres meses de evolución, caracterizado por disnea progresiva de grandes a medianos esfuerzos, dolor torácico, tos productiva y secreción sanguinolenta, a franca hemoptisis, mal estado general, hipoventilación y a la percusión claro pulmonar en ambos campos. Se realizó examen directo y frotis de líquido de lavado bronquial, en los cuales se observaron levaduras y pseudohifas. En CHROMagar *Candida*® crecieron colonias de color azul cobalto. La identificación final de la levadura fue *C. tropicalis*. El tratamiento administrado fue fluconazol 200 mg/24 h. durante 30 días con curación clínica y micológica del paciente (Figura 18).

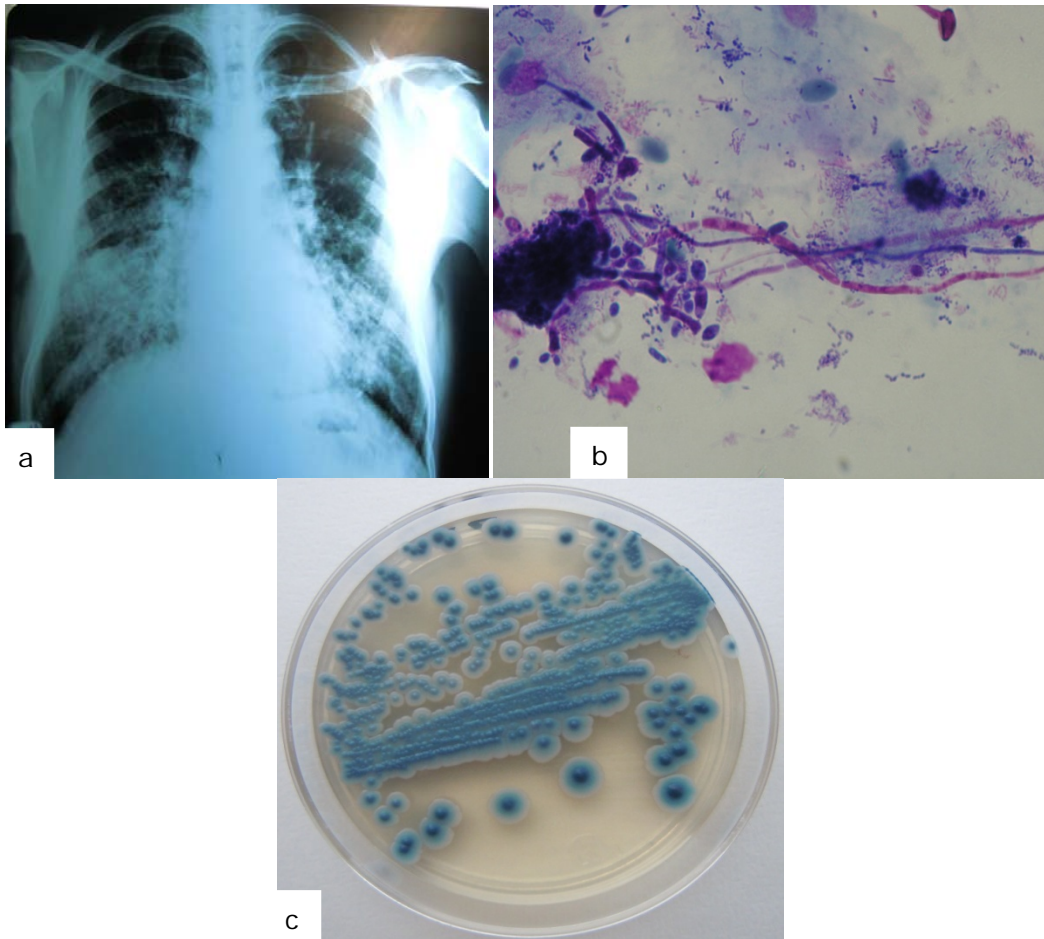


Figura 18. a) Radiografía de tórax con infiltrado pulmonar bilateral b) Frotis Giemsa, levaduras y pseudohifas. c) Colonias azul cobalto de *C. tropicalis* en medio CHROMagar *Candida*®.

Paciente masculino de 53 años, con antecedentes de psoriasis de 3 años de evolución, en tratamiento con esteroides tópicos de alta potencia (betametazona). Presentaba dermatosis diseminada a las ingles y cara anterior de muslos, caracterizado por placas eritematoescamosas (la escama estaba dispuesta en el margen de la placa), con evolución de 3 semanas. Aplicó esteroides de alta potencia, con mejoría parcial y posterior reactivación. El síntoma fue prurito intenso sin predominio de horario. Se realizó examen directo de las escamas con KOH al 15%, en el cual se observó algunas levaduras e hifas hialinas, gruesas, ramificadas y septadas. Las escamas se cultivaron en ADS, ADS-C-C; el crecimiento de las colonias

levaduriformes solo se obtuvieron en ADS. Las colonias en CH-A presentaron una tonalidad rosa pálido. La identificación final de la levadura fue *C. parapsilosis*. El tratamiento administrado fue fluconazol a 100 mg c/24 h. por 20 días con curación clínica y micológica (Figura 19).

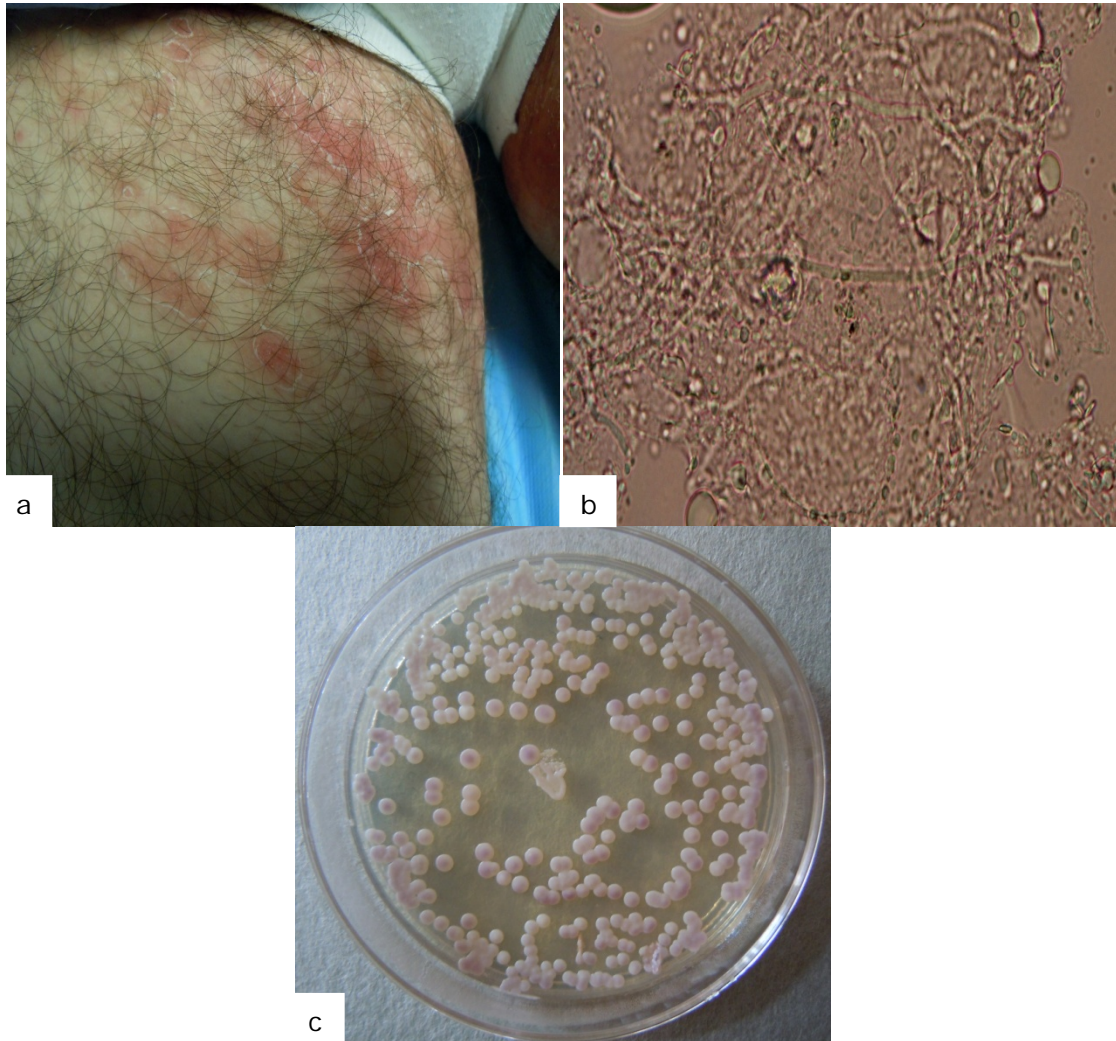


Figura 19. a) Placas eritematoescamosas, la escama distribuida en el margen de la placa. b) En el examen microscópico con KOH al 15%, hifas hialinas, gruesas y algunos blastoconidios. c) Colonias rosa pálido en CH-A de *C. parapsilosis*.

En el cuadro 19 se muestran las CMI de los antifúngicos en los 115 aislados estudiados.

Cuadro 19. Valores de CMI ($\mu\text{g} / \text{mL}$) en los 115 aislados estudiados.

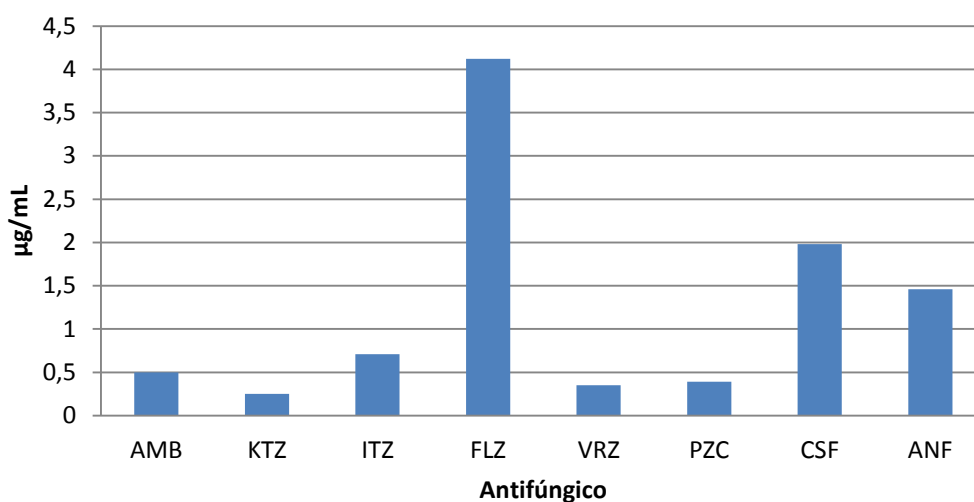
Registro	Especie	AMB	KTZ	ITZ	FLZ	VRZ	PZC	CSF	ANF
1	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.5	0.25	1	0.5	0.125	0.5	4
2	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0.5	1	0.25	0.125	0.5	4
9B	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.125	0.03	0.125	0.06	0.03	0.5	4
10	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.06	0.5	4
14	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.125	1	0.03	0.03	0.5	4
15	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	1	0.5	1	0.25	0.5	0.125	0.06
25	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.25	0.03	0.125	0.06	0.25	0.5	2
29	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	4
30	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.25	0.03	0.125	0.03	0.125	0.5	4
32	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0.5	0.5	0.125	0.125	0.5	4
39	<i>C. parapsilosis</i>	1	1	0.5	0.5	0.125	0.5	0.5	4
379	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.25	0.06	0.125	0.03	0.03	0.5	4
LMM2-11	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.06	0.03	0.125	0.06	0.06	0.5	4
LMM8-11 (1)	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.06	0.03	0.5	1
LMM8-11 (2)	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.06	0.03	0.125	0.06	0.03	0.5	2
P164	<i>C. parapsilosis</i>	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	0.06
P1659	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.25
P1790	<i>C. parapsilosis</i>	0.03	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.06	0.125
P1854	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.03	0.125	0.125	0.03	0.03	1	2
P2840 B	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	1
P3017	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	2
P3031	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
P3802	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	> 16	4
P3896	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	2
P3972	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	4
P4025	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	2
P4278	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	0.125
P001425	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.06	0.06	0.125	0.03	0.03	0.5	1
P004224 B	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	2
P004268	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
B4085	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
B4222	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	4
B4278 B	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
10-533	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.06	0.125	0.03	0.03	0.5	0.25

Registro	Especie	AMB	KTZ	ITZ	FLZ	VRZ	PZC	CSF	ANF
10-529	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.125	0.06	0.25	0.06	0.06	1	2
507	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.06	0.03	4	2
515c	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	0.03	0.03	4	0.03	0.03	0.5	1
1496	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03	0.5	2
14338	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	2
10-580	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.06	0.125	0.03	0.03	1	2
10-657	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	0.5
10-659	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.125	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	2
1175	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.06	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
10567	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.25	0.03	0.03	0.125	0.25
LMM 108-10	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	1	4
10-729	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.06	0.03	0.25	0.03	0.03	0.5	2
116	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	0.25
10-723	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	4
104P N.A	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
L MM - 54/11	<i>C. parapsilosis</i>	2	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	1
32032 R	<i>C. parapsilosis</i>	1	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.5	2
9A	<i>C. glabrata</i>	0.5	1	1	8	2	1	0.125	0.06
13	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.125	1	0.125	0.06
9344	<i>C. glabrata</i>	0.5	4	0.5	1	0.5	0.5	0.125	0.125
16314	<i>C. glabrata</i>	0.25	2	1	2	0.5	1	0.125	0.06
LMM69-10	<i>C. glabrata</i>	0.5	2	0.5	0.5	0.25	0.5	0.125	0.06
10-557	<i>C. glabrata</i>	0.25	2	0.25	0.5	0.125	0.25	0.125	0.06
LMM28-11 B	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.06	0.06	0.125	0.03	0.06	0.25	0.06
P004914	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	4	> 32
B3005	<i>C. glabrata</i>	0.25	2	0.03	16	4	0.03	0.25	0.06
B760810	<i>C. glabrata</i>	0.5	2	2	1	1	2	0.25	0.06
HDF-ORO	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.125	0.25	1	0.125	0.25	0.25	0.06
20129	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.06	0.125	0.5	0.125	0.125	0.125	0.06
10-578	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.03	0.03	0.125	1	0.03	0.5	0.125
20308	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.25	0.06	4	0.5	0.06	0.25	0.06
HDF-LOP	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.125	0.5	2	0.25	0.5	0.125	0.06
10658 ^a	<i>C. glabrata</i>	1	2	2	2	0.25	1	0.25	1
10-795	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.25	0.25	2	0.25	0.06	0.25	0.06
90 vr	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.125	0.5	0.5	0.5	0.25	0.125	0.06
HDF-ESG	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.06	0.06	0.5	0.06	0.125	0.25	0.06
HDF-BAP	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.06	0.125	0.5	0.03	0.06	0.25	0.06

Registro	Especie	AMB	KTZ	ITZ	FLZ	VRZ	PZC	CSF	ANF
27-115	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.125	0.25	0.5	0.125	0.06	0.25	0.06
391	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.25	0.5	1	0.125	0.25	0.125	0.06
13	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.25	0.25	4	0.03	0.03	0.125	0.06
42	<i>C. glabrata</i>	0.125	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
43	<i>C. glabrata</i>	0.125	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
44	<i>C. glabrata</i>	0.125	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
10-602	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.125	0.125	0.5	0.06	0.03	0.25	0.06
10599	<i>C. glabrata</i>	0.125	0.125	0.125	2	0.125	0.03	0.125	0.06
1184	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.125	0.125	1	0.03	0.25	0.125	0.06
82	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.125	0.06	0.25	0.06	0.06	0.125	0.06
100B	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.5	0.5	1	0.25	1	0.25	0.06
101B	<i>C. glabrata</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.125
107	<i>C. glabrata</i>	0.25	0.25	0.03	0.5	0.03	0.03	0.5	0.06
HDF-VA	<i>C. tropicalis</i>	0.25	2	> 16	>64	0.125	0.03	0.125	0.06
20-530	<i>C. tropicalis</i>	0.25	8	> 16	>64	>16	0.03	0.5	0.06
10658	<i>C. tropicalis</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
10660	<i>C. tropicalis</i>	0.25	0.5	1	0.125	2	> 16	0.25	0.06
29330	<i>C. tropicalis</i>	0.5	0.03	0.06	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
3009221	<i>C. tropicalis</i>	0.25	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
3009283	<i>C. tropicalis</i>	1	0.03	0.125	0.125		0.03	0.5	1
HDF-CAR	<i>C. tropicalis</i>	1	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	0.06
2950	<i>C. tropicalis</i>	0.25	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.06	0.06
9344	<i>C. krusei</i>	1	0.5	0.125	16	0.5	0.06	0.5	0.125
10-759	<i>C. krusei</i>	0.125	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.25	1
P2902	<i>C. guilliermondii</i>	1	0.25	0.25	1	0.125	0.03	0.5	2
10-561	<i>C. guilliermondii</i>	0.25	0.125	0.5	0.5	0.06	0.125	16	4
516	<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0.125	0.25	0.5	0.06	0.06	16	2
510	<i>C. guilliermondii.</i>	0.25	0.125	0.25	0.25	0.125	0.25	16	8
10-689	<i>C. guilliermondii.</i>	1	0.03	0.5	0.25	0.06	0.06	16	4
B4917	<i>C. zeylanoides</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.125	0.5	1
B4341	<i>C. lusitaniae</i>	0.5	0.25	0.5	2	0.5	0.25	1	0.5
B004281 B	<i>P. ohmeri</i>	0.5	0.03	0.03	0.125	0.03	0.03	0.125	0.06
20306	<i>P. ohmeri</i>	0.06	0.25	0.25	0.125	0.03	0.03	2	2
11-193B CMN	<i>G. capitatum</i>	0.5	0.125	0.125	0.5	0.125	0.125	16	2
330M	<i>C. albidus</i>	0.5	0.125	0.06	2	0.125	0.03	0.5	0.25

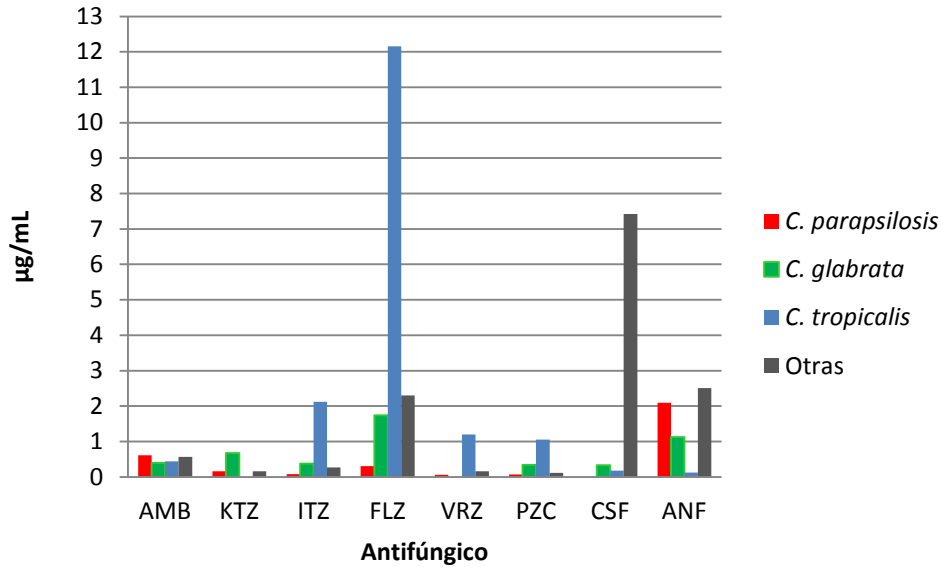
Registro	Especie	AMB	KTZ	ITZ	FLZ	VRZ	PZC	CSF	ANF
10-682 UP	<i>C. humicola</i>	0.25	0.25	0.06	0.25	0.06	0.03	4	> 32
15-358	<i>T. mucoides</i>	0.25	4	>16	64	0.06	0.03	0.125	0.06

En la gráfica 5 se presenta la actividad de todos los antifúngicos frente a los 109 aislados de *Candida* no *albicans*, donde se observa que los valores de CMI con 3 de los 5 azoles estuvieron por debajo de 0.5 µg/mL a diferencia de las CMI con FLZ que fue de 4.12 µg/mL y con ITZ de 0.71 µg/mL. Fue evidente que la CSF presentó menor actividad que ANF.



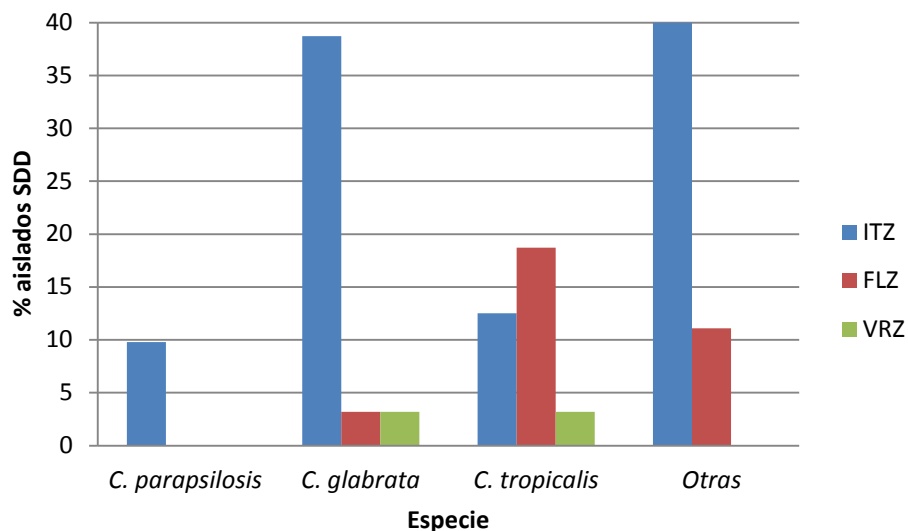
Gráfica 5. Actividad de 8 antifúngicos contra los aislados de *Candida* spp.

Al analizar la actividad de cada uno de los antifúngicos frente a las diferentes especies, es de notar que la AMB fue el antifúngico que presentó la mejor actividad contra todas las especies de *Candida*, mientras que con el resto de los antifúngicos la actividad dependió de la especie de *Candida* (Gráfica 6).



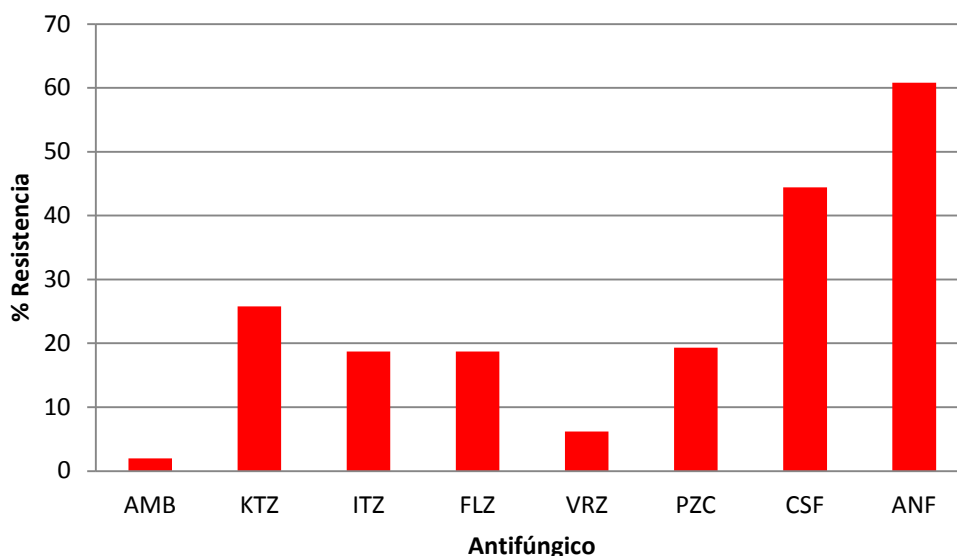
Gráfica 6. Relación entre actividad antifúngica y la especie de *Candida*.

Otro de los criterios analizados con la actividad de FLZ, ITZ y VRZ fue el de sensible dosis dependiente (SD-D), donde en aproximadamente el 40% de los aislados estuvieron incluidos en este criterio, principalmente con los aislados de *C. glabrata*, donde el 38% fue SD-D a ITZ (Gráfica 7).



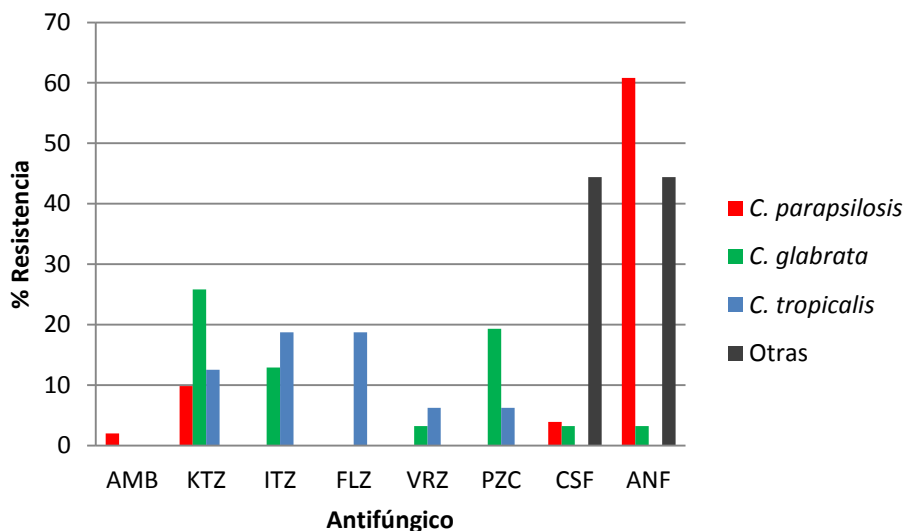
Gráfica 7. Actividad de SD-D de FLZ, ITZ y VRZ frente a *Candida* spp.

El 60.8% de los aislados mostraron resistencia hacia ANF, seguido de CSF en el 44.4% y KTZ en el 25.8%. Para el resto de los antifúngicos la resistencia fue inferior al 20%. Solo el 2% de los aislados mostró resistencia frente a AMB (Gráfica 8).



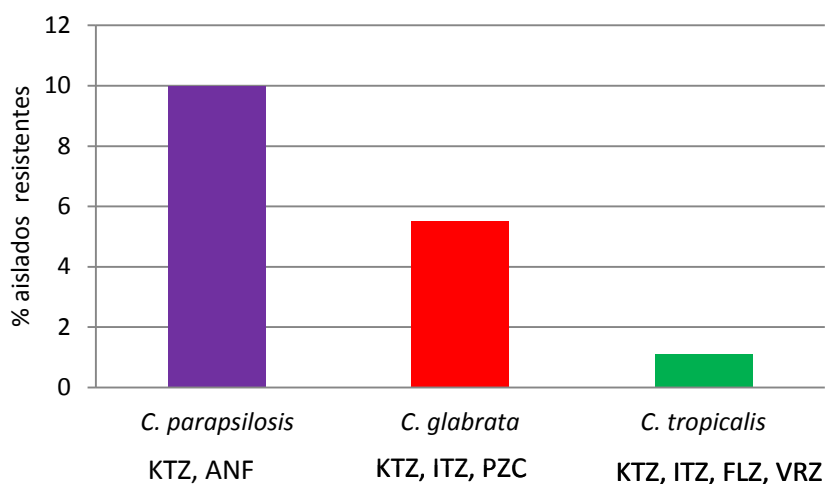
Gráfica 8. Resistencia antifúngica observada en las especies de *Candida no albicans*.

La resistencia antifúngica observada en cada una de las especies de *Candida no albicans* fue la siguiente: *C. parapsilosis* presentó la mayor resistencia frente a las equinocandinas, principalmente con ANF (60.8%). En cambio, los aislados de *C. glabrata* con 4 de los 5 azoles, donde con KTZ fue la mayor resistencia (25.8%) y con equinocandinas el 3.2%. Ninguno de los aislados de *C. glabrata* mostró resistencia a FLZ. *C. tropicalis* mostró resistencia a todos los azoles (ITZ y FLZ, 18.7%). En el 2% de los aislados se observó resistencia hacia AMB (Gráfica 9).



Gráfica 9. Resistencia antifúngica observada en las diferentes especies de *Candida no albicans*.

El porcentaje de aislados levaduriformes con multiresistencia antifúngica fue la siguiente: 1) Aislados resistentes a dos antifúngicos, en el 10% de los aislados de *C. parapsilosis* a KTZ y ANF. 2) Aislados que presentaron la mayor resistencia a KTZ, ITZ y PZC fueron los de *C. glabrata* (5.5%); y 3) Aislados resistentes a KTZ, ITZ, FLZ y VRZ fueron los de *C. tropicalis* (1.1%) (Gráfica 10).



Gráfica 10. Multiresistencia a dos o más antifúngicos en las diferentes especies de *Candida no albicans*.

6. Discusión

En la actualidad es un hecho que las infecciones por *Candida* diferentes a *C. albicans* son causa importante de morbilidad en los hospederos con algún factor de riesgo y es evidente que desde hace más de una década se ha registrado un incremento de estas infecciones y de los diversos factores asociados, donde la población más susceptible es entre la cuarta y sexta década de la vida. En el presente estudio los aislamientos se obtuvieron de pacientes con un amplio rango de edad, aunque la mayoría fue muy similar a la descrita por otros autores (1, 28, 35). Sin embargo, se observó un predominio en el género femenino con respecto al masculino (3:1). De acuerdo con lo reportado por Arenas y cols (2), la afectación en boca, uñas y piel son las localizaciones anatómicas que predominan en mujeres mayores de 60 años, esto podría explicar el predominio en las mujeres observado en el presente estudio.

El 28% de la población de este estudio presentó solo un factor de riesgo (DM2), mientras que el 72% mostró la asociación de dos o más factores de riesgo. En general este hallazgo va relacionado con la forma clínica y con el grupo de edad, como ha sido descrito por otros autores (62-64).

Los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de aislamientos de *Candida albicans* (51.1%) y *Candida no albicans* (46.4%) reflejan que estas últimas especies se encontraron ligeramente por abajo aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa; este resultado es contrario al observado por Mujica y cols (65) y Leite y cols (66) quienes demostraron que los aislamientos de *Candida no albicans* (54.9% y 65.5%, respectivamente) fueron mayores que los de *C. albicans* (40.3% y 34.4%, respectivamente). Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la diferencia radicó en el grupo de población de estudio, la localización anatómica y el factor de riesgo asociado, como también fue reportado por Spiliopoulou y cols (64),

donde en neonatos de muy bajo peso predominaron los aislados de *C. albicans* (67.5%) comparado con las especies de *Candida* no *albicans* (32.5%) obtenidos de hemocultivos y por el contrario Abi-Said y cols (67) notaron un incremento en la incidencia de candidemias causadas por *Candida* no *albicans*.

En el presente estudio se identificó a *C. parapsilosis* (46.8%) como la principal especie diferente a *C. albicans* como causa más común de candidosis. La incidencia de esta especie se encuentra por arriba del rango reportado para América del sur (20.5–21.3%) (28), a pesar de ello el porcentaje de aislamiento fue inferior al de *C. albicans*, pero si es evidente la tendencia al incremento de esta especie como causante de infección principalmente de uñas y de candidemia (3, 24, 35).

En este estudio, *C. glabrata* fue la segunda especie aislada (30.3%), y la frecuencia fue mayor a la descrita por otros autores en Estados Unidos de América, mientras que en América Latina la incidencia de esta especie fue menor (7.4%) (28).

C. tropicalis fue aislada en el 14.7%, esta especie sustituye en algunos países de América Latina a *C. parapsilosis* como segundo agente causal de candidosis (26); aunque en Estados Unidos de América ha mostrado un decremento (28).

C. krusei representó el 1.8% de los aislados, esta incidencia es similar a lo descrito por otros autores (1-4%) (58). *C. guilliermondii* se aisló en una proporción similar a otros autores (4.6%), mientras que *C. zeylanoides* y *C. lusitaniae* se aislaron en una proporción muy baja (0.92%), la cual es inferior a lo observado mundialmente (17) (58). En la actualidad estas especies son consideradas como emergentes.

De todos los aislamientos obtenidos, la asociación entre dos especies diferentes fue del 6.4% de los casos, principalmente *C. albicans* con diversas especies de *Candida* no *albicans*. Es importante mencionar la asociación de *Candida* con otros géneros como *C. albicans*-

G. capitatum; *C. tropicalis*-*P. ohmeri*. Esta asociación entre las especies obtenidas de diversos especímenes biológicos fue observada en el medio cromogénico, el cual ha sido descrito por diversos autores en un rango del 5-21.8% (35,68).

Las diversas especies de *Candida* fueron obtenidas de diferentes localizaciones anatómicas, de las cuales las principales fueron cavidad bucal, sangre y piel.

En cavidad bucal se tuvo un predominio semejante de *C. parapsilosis* y *C. glabrata* (33.3%), sin embargo *C. parapsilosis* es una especie que prevalece más en sangre, uñas y endocardio, mientras que *C. glabrata* presenta politropismo (2, 11, 36).

Se ha reportado que en sangre *C. parapsilosis* muestra una alta incidencia como lo demostró Fernández y cols (36) que fue del 41.9%; en el presente estudio el porcentaje de aislamiento de esta localización fue mayor (65.2%) que lo descrito anteriormente. Este hallazgo coincide con la publicación de Pfaller y cols (59) para América Latina en donde reportó que *C. parapsilosis* es la segunda especie de *Candida* causante de candidemia. De la piel, principalmente en los pliegues se ha aislado hasta en el 88.8% de los casos (66).

Abad y cols (30) reportaron el predominio de *C. albicans* en los casos de onicomicosis, colocando a *C. parapsilosis* como segundo agente causal de estas infecciones. Sin embargo, Manzano y cols (34) describieron a esta especie como la causa del 31.9% de onicomicosis, seguida de *C. albicans* en el 22.4%. En el presente estudio *C. parapsilosis* representó el 68.7% de los aislamientos seguida del grupo de otras (31.3%).

En los aislamientos de origen pulmonar dos especies fueron las más importantes *C. tropicalis* (58.8%), seguida de *C. glabrata* (35.3%). De acuerdo a lo descrito por Arroyo y cols (33) estas especies representan al grupo mayoritario de *Candida* no *albicans* aisladas de

diversos especímenes biológicos, aunque en conjunto correspondieron a más del 50% de los aislamientos en el presente estudio. Por otro lado, Martínez y cols (37) reportaron a *C. glabrata* como primer agente causal de infección y a *C. tropicalis* como segunda especie, aunque en conjunto representaron menos del 20% de los aislamientos. En el presente trabajo, el hallazgo de *C. glabrata* como segunda especie de *Candida* no *albicans*, junto con los aislados de *C. tropicalis* (tercer agente causal de infección) representaron el 45%.

En la literatura existen publicaciones acerca de las diferencias en la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a las especies diferentes a *Candida albicans*. En el presente trabajo, en general la mayoría de los aislados fueron sensibles a los ocho antifúngicos estudiados. Por otro lado, las descripciones acerca de la resistencia de las especies de *Candida* no *albicans*, donde *C. parapsilosis* ha mostrado resistencia del 1-4.2% a fluconazol, voriconazol e itraconazol (46), sin embargo en el presente estudio no se detectó resistencia a ninguno de los tres azoles, solo con KTZ en el 9.8% de los casos.

Con respecto a las CMI observadas con los aislados de *C. parapsilosis* para las equinocandinas fueron en un rango que va del 0.06-4 µg/mL, con una media de 2.1 µg/mL para anidulafungina; en el caso de caspofungina el rango fue de 0.06->16, con una media de 0.52 µg/mL. De acuerdo a los valores de CMI reportados para estos dos antifúngicos el valor obtenido para anidulafungina fue dentro del rango descrito, en cambio con caspofungina inferior al reportado (46-49). En relación a los valores anteriores se observó resistencia hacia caspofungina y anidulafungina en el 3.9% y 60.8%, respectivamente. Un hallazgo interesante fue que el único aislado que presentó resistencia hacia anfotericina B correspondió a esta especie.

Cabe mencionar que los aislados de *C. glabrata* estuvieron asociados con valores altos de CMI con los azoles, donde FLZ presentó

una CMI de 1.6 µg/mL; el 3.2% presentó valores de SD-D y ninguno de los casos mostró resistencia a este antifúngico, a pesar de que esta reportado que esta especie muestra resistencia primaria hacia fluconazol (42). La resistencia hacia ketoconazol (25.8%) y caspofungina (3.2%) fue superior a los valores referidos por otros autores (9.1% y 1.1%, respectivamente); mientras que con voriconazol e itraconazol (3.2% y 12.9%) se encuentran inferiores a los reportes (52).

Con anfotericina B se presentó discrepancia con lo descrito por otros autores (50-51) con respecto a la sensibilidad disminuida que presenta *C. glabrata*, dado que la CMI fue de 0.37 µg/mL es decir, los aislados fueron altamente sensibles a este antifúngico.

Existen diversos reportes en donde se ha demostrado que *C. tropicalis* es una especie que ha mostrado resistencia a FLZ y VRZ. Con voriconazol la resistencia observada fue de 6.2%, la cual se encuentra dentro del intervalo (4.7–8.0%) descrito por otros autores, por el contrario con FLZ fue del 18.7%, el cual se encuentra por arriba del intervalo (3.0–6.6%) (48). También mostró resistencia a ketoconazol (12.5%), itraconazol (18.7%) y posaconazol (6.2%). Es evidente que fue la única especie que presentó resistencia hacia todos los azoles empleados en este estudio. Aunque se ha descrito resistencia de *C. tropicalis* frente a anfotericina B (53), en este trabajo no se observó, así como también con las equinocandinas; hallazgo similar a la descripción de Ostrosky y cols (62), quienes reportaron valores de CMI en *C. tropicalis* de 0.03-0.125 µg/mL con anidulafungina.

Dentro del grupo de Otras, solo *C. guilliermondii* mostró resistencia hacia ambas equinocandinas en el 80% de los casos, mientras que no se observó para ningún antifúngico azólico a diferencia de lo descrito por otros autores (34,48).

Llama la atención que *C. krusei* no mostró resistencia a ninguno de los antifúngicos a pesar de considerar que esta especie presenta resistencia primaria a FLZ (48).

Otra de las especies que ha mostrado resistencia primaria hacia anfotericina B fue *C. lusitaniae* (60-61), sin embargo, el único aislado que se obtuvo mostró una CMI de 0.05 µg/ml, valor considerado como sensible. Estos resultados muestran concordancia con lo descrito por Godoy y cols (58) para América Latina, en donde los valores de CMI para esta especie son similares y no existe resistencia hacia anfotericina B. Los valores de CMI para fluconazol y caspofungina fueron 2 µg/mL y 1 µg/mL, respectivamente. En el caso de fluconazol el valor encontrado representa el límite superior del rango de CMI descrito para esta especie (0.25-2 µg/mL), mientras que con caspofungina el valor de CMI fue superior al rango (0.125-0.5 µg/mL) (62).

Otro de los fenómenos observados en este estudio es la multiresistencia que presentaron algunas de las especies de *Candida* a dos, tres y cuatro de los antifúngicos en el 16.6% de los aislados. *C. parapsilosis* fue la especie que mostró multiresistencia a KTZ-ANF (40%), y a ANF-CSF (13.3%). *C. glabrata* a KTZ-ITZ-PZC (40%), mientras que *C. tropicalis* a los cuatro antifúngicos KTZ-ITZ-FLZ-VRZ (6.7%). Existen publicaciones en donde se propone que este fenómeno puede ser producto de los mecanismos específicos de resistencia conocidos, los cuales son capaces de generar resistencia cruzada a varios antifúngicos con mecanismos de acción similares o relacionados. Sin duda alguna la infección por una especie multiresistente podría tener repercusiones importante para el paciente y para el ambiente hospitalario por representar un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones caracterizadas a su vez por una alta morbimortalidad. De tal manera que por la diferencia en el perfil de sensibilidad a los antifúngicos

observado en este estudio es importante realizar pruebas de sensibilidad antifúngica y hacer una correlación con la clínica para evitar los fracasos en el tratamiento de las infecciones causadas por especies de *Candida* no *albicans*.

7. Conclusiones

1.- Aumento de las infecciones ocasionadas por levaduras del género *Candida*, principalmente por especies de *Candida* no *albicans*, de las cuales *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* fueron las tres especies causantes de infección.

2.- *C. parapsilosis* fue causa importante de onicomicosis, candidemia e intertrigo.

3.- *C. tropicalis* fue la causa de la mayoría de los casos de candidosis pulmonar.

4.- El 78% de las especies de *Candida* no *albicans* se aisló de pacientes que presentaron dos o más factores de riesgo.

5.- *C. parapsilosis* presentó la mayor resistencia a anifulfungina, mientras *C. glabrata* a cinco de los ocho antifúngicos, con excepción de fluconazol y anfotericina B; y *C. tropicalis* a los cinco azoles empleados.

6.- Por los resultados obtenidos es necesario realizar la identificación de las especies de *Candida*, incluyendo un medio cromógeno, ya que es de gran ayuda para evidenciar las asociaciones de especies. Así como las pruebas de sensibilidad, dado que existen diferencias en la actividad de los antifúngicos frente a estas especies, lo que permitiría la instauración de un tratamiento adecuado para el control oportuno de estas infecciones.

8. Apéndice

Abreviaturas

AB-agar Biggy

ADS-agar dextrosa Sabouraud

ADS-C-C -agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida

ANF-anidulafungina

AMB-anfotericina B

AS-agar Staib

AUC-agar urea de Christensen

BCG-agar canavanina-glicina-azul de bromotimol

CH-A-CHROMagar *Candida*®

CLSI-Clinical Laboratory Standard Institute

CMI-concentración mínima inhibitoria

CSF-caspofungina

DMSO-Dimetilsulfóxido

DM2-Diabetes mellitus tipo 2

EUCAST-European Comitte for Antimicrobial Susceptibility Testing

FLZ-fluconazol

HM-agar harina de maíz + Tween 80

ITZ-itraconazol

KOH-hidróxido de potasio

KTZ-ketoconazol

PZC-posaconazol

SD-D-sensible dosis dependiente

VRZ-voriconazol

Anexo 1

Medios de cultivo

➤ Agar dextrosa Sabouraud.

Para 1000 mL de agua destilada:

Agar. 15.0 g.
Dextrosa. 40.0 g.
Peptona de carne. 5.0 g.
Peptona de caseína.5.0 g.

pH final 5.6 ± 0.2

Suspender 65 gramos del polvo en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante un minuto hasta disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

➤ Agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida.

Para 1000 mL de agua destilada:

Harina de soja digerida
por enzimas papaicas 10.0 g.
Dextrosa 10.0 g.
Agar 15.6 g.
Cicloheximida 0.4 g.
Cloranfenicol 0.05g.

pH final 6.9 ± 0.2

Suspender 36 gramos del polvo en un litro de agua destilada, calentar con agitación constante hasta ebullición. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

➤ Agar Biggy.

Para 1000 mL de agua destilada

Citrato de amonio

y bismuto 5.0 g.

Sulfito de sodio 3.0 g.

Dextrosa 10.0 g.

Glicina 10.0 g.

Extracto de levadura 1.0 g.

Agar 16.0 g.

pH final 6.8 ± 0.2

Suspender 45 gramos del polvo en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante no más de un minuto. Agitar circularmente para dispersar el material insoluble, esterilizar a 121°C durante 15 min, verter en cajas de Petri.

➤ CHROMagar *Candida*®.

Para 1000 mL de agua destilada:

Agar 15 g.

Peptona 10.2 g.

Mix Cromogénico 22 g.

Cloranfenicol 0.5 g.

pH final 6.1

Pesar 47.7 gramos del polvo en un litro de agua destilada estéril y tapar el matraz. Calentar el medio y llevar a ebullición hasta su disolución completa. Esterilizar dos minutos mediante ebullición. Dejar enfriar y verter en cajas de Petri.

➤ Harina de Maíz + Tween 80 al 1%

Para 1000 mL de agua destilada:

Harina de maíz,

infusión (sólidos) 2.0 g.

Agar 15.0 g.

pH final 6.0 ± 0.2

Suspender 17 gramos del polvo en un litro de agua purificada. Agregar polisorbato (Tween) 80 al 1%. Mezclar y calentar agitando frecuentemente, llevar a ebullición durante un minuto para disolver completamente el polvo y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Verter en cajas de Petri.

➤ Agar urea de Christensen

Para 1000 mL de agua destilada

Tripteína 1.0 g.

Glucosa 1.0 g.

Cloruro de sodio 1.0 g.

Fosfato monopotásico 2.0 g.

Rojo de fenol 0.012 g.

Agar 15.0 g.

pH final 6.8 ± 0.2

Suspender 24 gramos del polvo en 950 mL de agua, dejar reposar por dos minutos y esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 mL de una solución de urea al 40% esterilizada por filtración previamente. Mezclar y verter en tubos.

➤ RPMI

Para 1000 mL de agua ultrapura

RPMI 1640 10 g.

MOPS34.5 g.

Glucosa0.2g.

Disolver 34.5 gramos de MOPS en 200-300 mL de agua ultrapura, ajustar a pH=7 con NaOH 1 M, agregar el RPMI y aforar a 1000 mL con agua ultrapura. Esterilizar por filtración.

➤ Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (BCG)

Solución A

Glicina 10g.

KH₂PO₄1g.

MgSO₄ 1g.

Tiamina-HCl1mg.

Sulfato de

L. canavanina 30mg.

Agua destilada 100 mL.

Disolver los ingredientes y esterilizar por filtración, pH final=5.6

Solución B

Azul de bromotimol 0.4g.

NaOH 0.01N64 mL.

Agua destilada916 mL.

Agar 20g.

Mezclar perfectamente el azul de bromotimol, NaOH y 36 mL agua destilada. Agregar el agar y el resto de agua destilada. Mezclar y esterilizar a 121°C por 15 min. Enfriar a 50°C y agregar 100 mL de la solución A, mezclar y verter en cajas Petri.

➤ Medio Staib

Para 1000 mL de agua destilada

Semilla de niger 50 g.

Glucosa 1g.

Fosfato de potasio

dihidrogenado 1g.

Creatinina 1g.

Penicilina 20 U/mL.

Estreptomycinina 40 μ m/ mL.

Agar 18g.

Pulverizar la semilla niger, hervirla en agua destilada durante 30 min, filtrar a través de una gasa y reponer el volumen de agua perdido. Añadir y disolver la glucosa, el potasio, la creatinina y el agar. Esterilizar a 121°C durante 20 min. Dejar que baje la temperatura del medio a 50°C y añadir los antibióticos en ambiente estéril, homogeneizar y verter en cajas de Petri.

Anexo 2

Tinciones

➤ Gram

- 1.- Hacer un frotis delgado del material de estudio, y permitir secar al aire.
- 2.- Fijar el material al calor pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero Bunsen.
- 3.- Aplicar cristal violeta cubriendo toda la superficie. Dejar por un minuto y lavar con agua destilada.
- 4.- Aplicar lugol durante un minuto y lavar con agua destilada.
- 5.- Aplicar el decolorante alcohol-acetona hasta que no se arrastre más violeta y lavar con agua destilada.
- 6.- Aplicar sobre la superficie safranina durante un minuto y lavar.
- 7.- Colocar el extendido en posición vertical permitiendo su escurrimiento y secado.

Bibliografía

1. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 3 ed. México: Editorial Mc Graw Hill;2010. p 279-302.
2. Arenas R. Micología médica ilustrada. 3 ed. México: Editorial Mc Graw Hill;2008. p 218-238.
3. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 2008;21:606-625.
4. Kwon K, Bennett J. Candidiasis (moniliasis, thrush, Candida paronychia, Candida endocarditis, bronchomycosis, mycotic vulvovaginitis, candidosis), In C. Cann. Philadelphia, Pa (ed.), Medical mycology Lea and Febiger;1992.p 280–336.
5. Merz W.G. *Candida lusitanae*: Frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. J Clin Microbiol 1984;20:1194-1195.
6. Calderone R. *Candida* and Candidiasis. Estados Unidos: Editorial ASM PRESS;2002. p 3-13.
7. Segal E, Elad D. Candidiasis en Topley and Wilson´s Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology, Ed 10, Hodder Arnold, Washington D.C;2005.p 579-623.
8. Castrillón L, Palma A, Padilla C. Factores de virulencia en *Candida* sp. Dermatol Rev Mex 2005;49:12-27.
9. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol 2008;25:78-82.
10. Mc Ginnis M, Tyring S. Introduction to Mycology. En Barón S., editor. Medical Microbiology. Galvestone Texas;1996
11. Fidel P, Vazquez J, Sobel J. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999;12:80-96.

12. Alfonso C , López M, Arechavala A, Perrone M, Guelfand L, Bianchi M, et al .Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar. Rev Iberoam Micol 2010;27:90-93.
13. Odds F, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol 1994;32:1923-1929.
14. Pichova I, Pavlickova L, Dostal J., Dolejsi E, Hruskova O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Eur J Biochem 2001;268:2669-2677.
15. Clancy C., Ghannoun M, and M. H. Nguyen, Programs Abstr. 3^{6th} Annu Meet Infect Dis Soc Am, abstr. 317, 1998.
16. Luo G, Samaranayake L, Yau J. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. J Clin Microbiol 2001;39(8):2971-2974.
17. Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007;20:133-163.
18. Manzano P, Méndez L, Hernández F, López. La Resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. R Gac Méd Méx 2008;144(1):23-26.
19. McNeil M, Nash S, Hajjeh R, Phelan M, Conn L, Plikaytis B, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. Clin Infect Dis 2001;33:641–647.
20. Rees J, Pinner R, Hajjeh R, Brandt M, Reingold A. The epidemiological features of invasive mycotic infection in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: results of a population based laboratory active surveillance. Clin Infect Dis 1998;27:1138-1147.
21. Colombo L, Nucci M, Salomao R, Branchini M, Richtmann M, Derossi M, et all. High rate of non-albicans candidemia in Brazil tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;34:281-286.

22. Pfaller M, Diekema D. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 2004;42:4419–4431.
23. Rex J, Pfaller M. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis 2002;35:982–989.
24. Pfaller M, Diekema D, Rinaldi M, Barnes R, Hu B, Veselov A, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 2005;43:5848–5859.
25. Falagas M, Roussos N, Vardakas K. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. J Infect Dis 2010;14:954-966.
26. Nucci M, Marr K. Emerging fungal diseases. Emerg Infect Dis 2005;41:521-526.
27. Colombo L, Nucci M, Salomao R, Branchini M, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazil tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;34:281-286.
28. Fidel P, Vazquez J, Sobel J. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999;12:80-96.
29. Hochem R, Hanna H, Kontoylannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis. Cancer 2008;112:2493-2499.
30. Abad J, Bonifaz A, Ponce R. Onicomycosis por *Candida* asociada con diabetes mellitus. Dermatol Rev Mex 2007;51(4)135-144.
31. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Bazán-Mora E, Méndez-Tovar LJ, González-Monroy J, López-Martínez R. Identificación y tipificación de levaduras aisladas de pacientes de un hospital de la ciudad de México Rev Arg Microbiol 2000;32:1-6.

32. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar Lj, González-Monroy J, López-Martínez R. Fungal peritonitis in 15 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Mycoses* 2003;46:425-429.
- 33.-Arroyo S, Moncada D, Arenas R, Vick R. Determinación de las especies de *Candida* en muestras respiratorias de pacientes con ventilación mecánica. *Rev Hosp Gral Dr. M. Gea González* 2007;8(1)5-9.
34. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez J, et al. Levaduras causantes de onicomiosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Rev Iberoam Micol* 2011;28(1)32-35.
35. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Zavala-Velázquez N, Méndez-Tovar LJ, Naquid-Narváez J, Torres-Rodríguez J, et al. Candiduria en pacientes con diabetes melitus tipo 2. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2008;46(6):603-610.
36. Fernández C, Bonifaz A, Hernández M, Araiza J. Especies de *Candida* aislados de hemocultivos de pacientes del Hospital General de México OD. Simposio de Micología, UAM, 2011.
37. Martínez R, Hernández M, Araiza J, Bonifaz A. Micosis pulmonares causados por hongos levaduriformes aislados en el laboratorio de micología del Hospital General de México. Simposio de Micología, UAM, 2011.
38. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:462-478.
39. Balkis M, Leidich S, Mukherjee P, Ghannoum M. Mechanisms of fungal Resistance. *Drugs* 2002;62:1025-1040.
40. Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans* 1993;21:1039-1047.

41. Maertens J. History of the development of azole derivatives. Clin Microbiol Infect 2004;10(Suppl.1):1-10.
42. Ghannoum M, Rice L. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12:501-517.
43. Healey K, Katiyar S, Castanheira M, Pfaller M, Edlind T. *Candida glabrata* mutants demonstrating paradoxical reduced caspofungin susceptibility but increased micafungin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:3947-3949.
44. Munro C. Fungal echinocandin resistance. Biol reports 2010;2:66.
- 45.-.Pfaller M, Espinel A, Boyken L, Hollis R., Kroeger J, Messer S, et al. Comparison of the Broth Microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing with the 24-Hour CLSI BMD Method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. J Clin Microbiol 2011;49(3):845-850.
46. Ostrosky-Zeichner L, Rex J, Pappas P, Hamill R, Larsen R, Horowitz H, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 blood-stream *Candida* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(10):3149–3154.
47. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. J Clin Microbiol 2006;44:760–763.
48. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Messer S, Tendolkar S, Diekema D. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: a comparison with caspofungin by CLSI-recommended methods. J. Clin. Microbiol 2006;44:3533–3538.
49. Ostrosky-Zeichner L, Kontoyiannis D, Raffalli J, Mullane K, Vazquez J, Anaissie E. International, open-label, noncomparative, clinical trial of micafungin alone and in combination for treatment of newly diagnosed

and refractory candidemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005;24:654–661.

50. Vazquez J, Dembry L, Sanchez V, Vazquez M, Sobel J, Dmuchowski C, Zervos M. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. J Clin Microbiol 1998;36:421–426.

51. Vazquez J, Kauffman C, Sobel J, Perri M, Zervos M. A comparative study of in vitro susceptibility of *Candida* species, p 178. In Program and Abstracts of the 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1998.

52. Lyon G, Karatela S, Sunay S. Antifungal Susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. J Clin Microbiol 2010;(48):1270-1275.

53. Chakrabarti A, Mohan B, Shrivastava S, Marak A, Ray P. Change in distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candidaemia cases in a tertiary care centre during 1996-2000. Indian J Med Res 2002;116:5-12.

54. Duarte C, Pulido N, Rivas P, Sánchez R, Cortés J, Cuervo S, et al. Comparación de métodos de microdilución CLSI M27-A2 y EUCAST en aislamientos de *Candida* spp. en pacientes con cáncer. Infectio 2010;14:107-115.

55. Rex J, Pfaller M, Galgiani J, Bartlett M, Espinel A, Ghannoum M. et al. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin Infect Dis 1997;24:235-247.

56.- Tapia C. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev Chil Infect 2009;26(2):144-150.

57. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved

standard. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA(2008).

58. Godoy P, Tiraboschi I, Severo L, Bustamante B, Calvo B, Almeida L et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin America hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98(3):401-405.

59. Pfaller M, Diekema D, Jones R, Sader H, Fluit A, Hollis R, Messer A. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Clin Microbiol 2001;39:3254-3259.

60. Pfaller M, Messer S, Hollis R. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;20: 127-133.

61. Hadfield T, Smith M, Winn R, Rinaldi M, Guerra C. Mycoses caused by *Candida lusitanae*. Rev Infect Dis 1997;9:1006-12.

62. Ostrosky-Zeichner L, Inurria N, Rodriguez J, Chen E, Paetznick V. Comparative *in vitro* activity of isavuconazole (ISA) against medically important yeasts and moulds. In: Programs and abstracts of the 49th annual ICAAC. San Francisco 2009. Poster M-1707.

63. Kennedy W A, Laurier C, Gautrin D, Ghezzob H, Pared M, Maloa JL. Occurrence and risk factors of oral candidiasis: treated with oral antifungals in seniors using inhaled steroids. J Clin Epidemiol 2011;53:696-701.

64. Spiliopoulou A, Dimitriou G, Jelastopulu E, Giannakopoulos I, Anastassiou E, Christofidou M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. Mycopathologia. DOI 10.1007/s11046-011-9498-3.

- 65.- Mujica M, Finquelievich J, Jewtuchowicz V, Iovannitti C. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clinicas. Periodo 199-2001. Rev Argent Microbiol 2004;36;107-112.
- 66.- Leite Júnior DP, Yamamoto AC, Martins ER, Teixeira AF, Hahn RC, et al. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Canaiba, Mato Gross, Brasil. An Bras Dermatol 2011;86:675-680.
67. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous Candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infec Dis 1997;24:1122-1128.
68. Jensen J, Muñoz P, Guinea J, Rodriguez M, Peláez T, Bouza E. Mixed fungemia: incidence, risk factors and mortality in a General Hospital. Clin Infect Dis;2007;44:109-114.