



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**CUAUTILÁN**

**DETERMINAR LOS PERFILES DE SENSIBILIDAD FRENTE A ANTIMICÓTICOS EN CÉLULAS  
PLANCTÓNICAS DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE MUESTRAS CLÍNICAS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A :**

**LUIS URIEL GONZALEZ GUTIERREZ**

**ASESORES: DR. ENRIQUE SALAS TELLEZ**

**DRA. ALMA LUCILA NÚÑEZ DEL ARCO**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018**



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.

## DEDICATORIAS

Este trabajo y lo que conlleva lo dirijo especialmente a mis padres, por todo el apoyo, esfuerzo y cuidados brindados, por los consejos que me han orientado a tomar las decisiones mas importantes en la vida y haber forjado mi personalidad y carácter. Por darme la mejor de las herencias.

A mis hermanos por apoyarme en cada aspecto y hacerme ver que la constancia y superación trae mejores recompensas. Y mostrarles que no hay imposibles para superarse y lograr cualquier meta que se propongan.

A mis tías Lidia Gonzalez, Velia Gutiérrez, Martha Gonzalez y Amalia Gutiérrez, por aconsejarme, ayudarme y no dejarme rendir.

A mis tíos Simón Serrano e Ismael Gutiérrez por su gran ejemplo de esfuerzo y constancia para triunfar y superarse.

Al Dr. Enrique Salas y a la Dra. Alma Nuñez por darme la oportunidad de realizar este proyecto y por su inmenso apoyo y asesoría.

A Pilar Netzahualcoyotl, por la motivación, optimismo, cariño y ayuda que me dio a lo largo de cada gran momento, compartir experiencias, desvelos y alentarme a ver lo que hay en mi y usarlo para triunfar.

A mis amigos Fernanda Velez, Carlos Carapia, Yael Garcia, Liliana Contreras, Cinthya Ortega y Teresa Resendiz por su gran amistad y apoyo desde el inicio hasta término de la carrera.

A Estefany Villafuerte, Elizabeth Torres, Yuritzzy Flores por mostrarme que siempre debo buscar superarme y no conformarme, salir adelante por mi determinación y esfuerzo.

A todos aquellos que conocí por azares del destino, con quienes dentro o fuera de clases conviví, aprendí, sufrí y divertí a lo largo de la licenciatura, servicio social y tesis. Con especial recuerdo a Cesar Gonzalez, Quetzalli Angeles, Gabriela Sedano, Gabriel Lima, Araceli Mejia, Anaid Gonzalez, Carlos Delgadillo, Brenda Patiño, Karen Ayala, Erik Gutierrez, Daniel Anaya, Gustavo Lopez, Emilia Mendez.

## ÍNDICE

- I. Índice de abreviaturas
- II. Índice de tablas
- III. Índice de imágenes
- IV. Índice de gráficas
- V. Índice de diagramas
1. Introducción
  - 1.1. Candidosis
  - 1.2. Sinonimia
  - 1.3. Taxonomía
  - 1.4. Descripción del género *Candida*
  - 1.5. Estructura antigénica
  - 1.6. Serología
  - 1.7. Patogenia
  - 1.8. Factores de virulencia
    - 1.8.1. Enzimas
    - 1.8.2. Adhesinas
    - 1.8.3. Adaptación al pH
    - 1.8.4. Transición morfológica
    - 1.8.5. Apareamiento (entrecruzamiento)
    - 1.8.6. Switching fenotípico
  - 1.9. Formación de biopelículas
    - 1.9.1. Análisis Composicional de la matriz de biopelícula de *C. albicans*
      - 1.9.1.1. Proteínas
      - 1.9.1.2. Carbohidratos
      - 1.9.1.3. Lípidos
      - 1.9.1.4. Ácidos Nucleicos
    - 1.9.2. Estructura de la matriz de biopelícula de *C. albicans*
    - 1.9.3. Funciones de la matriz de biopelícula de *C. albicans*
    - 1.9.4. Estabilidad mecánica, interacciones adhesivas y cohesivas
    - 1.9.5. Resistencia a los fármacos antifúngicos
    - 1.9.6. Protección del sistema inmune del hospedero
  - 1.10. Inmunidad
  - 1.11. Epidemiología
  - 1.12. Tratamiento
    - 1.12.1. Anfotericina B
      - 1.12.1.1. Descripción
      - 1.12.1.2. Mecanismo de acción
      - 1.12.1.3. Indicaciones
      - 1.12.1.4. Efectos secundarios

- 
- 1.12.2. Nistatina
    - 1.12.2.1. Descripción
    - 1.12.2.2. Mecanismo de acción
    - 1.12.2.3. Indicaciones
    - 1.12.2.4. Efectos secundarios
  - 1.12.3. Terbinafina
    - 1.12.3.1. Descripción
    - 1.12.3.2. Mecanismo de acción
    - 1.12.3.3. Indicaciones
    - 1.12.3.4. Efectos secundarios
  - 1.12.4. Ketoconazol
    - 1.12.4.1. Descripción
    - 1.12.4.2. Mecanismo de acción
    - 1.12.4.3. Indicaciones
    - 1.12.4.4. Efectos secundarios
  - 1.12.5. Fluconazol
    - 1.12.5.1. Descripción
    - 1.12.5.2. Mecanismo de acción
    - 1.12.5.3. Indicaciones
    - 1.12.5.4. Efectos secundarios
  - 1.13. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)
  - 1.14. Concentración Fungicida Mínima (MFC)
  2. Justificación
  3. Hipótesis
  4. Objetivos
    - 4.1. Objetivo general
    - 4.2. Objetivos particulares
  5. Metodología
  6. Resultados
  7. Análisis de resultados
  8. Conclusiones
  9. Referencias
  10. Anexos
    - I. Disposición de residuos
    - II. Preparación de reactivos
    - III. Identificación y origen de muestra
    - IV. Promedio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las muestras
    - V. Concentración mínima fungicida de las muestras

## I. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Página
MIF	Factor inhibidor de migración	3
PMN	Polimorfonuclear	4
Als1p	Proteína de tipo aglutinina 1	5
Als5p	Proteína de tipo aglutinina 5	5
Hwp1p	Proteína de pared de hifa 1	5
Mnt1	Gen glicolípido 2 alfa manosiltransferasa 1, responsable de la glicosilación	5
ALS1	Gen codificante de la proteína de tipo aglutinina 1	5
ALA1	Gen codificante de la ligasa Alanina-tRNA	5
HWP1	Gen codificante de la proteína de pared de hifa 1	5
PHR1	Proteína 1 sensible al pH	5
PHR2	Proteína 2 sensible al pH	5
MTL	Gen codificante de proteína similar de tipo apareamiento	5
MTLa	Idiotipo que codifica un homeodominio con acción endonucleasa en MTL	5
MTL $\alpha$	Idiotipo que codifica un homeodominio con acción endonucleasa en MTL	5
RMN	Resonancia magnética nuclear	7
MGCx	Complejo glucano manano	7
eDNA	DNA extracelular	8
DNAsa	Desoxirribonucleasa	10
ROS	Especies reactivas de oxígeno	11
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos	11
CO	Nosocomiales	12
IC	Candidiasis invasivas	12
IFI	Infecciones fúngicas invasivas	12
BSI	Infecciones del torrente sanguíneo	13
ICU	Unidad de cuidados intensivos	14
GI	Gastrointestinal	15
VIH/SIDA	Virus de la inmunodeficiencia humana Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	23
SSI	Solución salina isotónica	23
MIC	Concentración mínima inhibitoria	24
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute	24
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy	24
EUCAST	European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing	24
MFC	Concentracion fungicida minima	25
SDC	Caldo Dextrosa Sabouraud	27
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud	27
DMSO	Dimetilsulfóxido	28
YPD	Extracto de levadura peptona y dextrosa	30

PBS	Amortiguador fosfato salino	30
RPM	Revoluciones por minuto	30
OPC	Candidiasis orofaríngea	41
CNCA	<i>Candida</i> no <i>Candida albicans</i>	45
ERG11	Gen que codifica lanosterol 14-alfa desmetilasa	45
UPC2	Gen que codifica la proteína de control de captación de esterol 2	45
Erg11p	Proteína lanosterol 14-alfa desmetilasa	45
ERG3	Gen que codifica la proteína Delta (7) -esterol 5 (6) -desaturasa	46
ATP/ABC	Cassette de enlace para adenosín trifosfato	46
CDR1	Gen que codifica para una proteína transportadora del flujo ABC pleiotrópico de múltiples fármacos CDR1	46
CDR2	Gen que codifica para una proteína transportadora del flujo ABC pleiotrópico de múltiples fármacos CDR2	46
CDR1p	Proteína transportadora del flujo ABC pleiotrópico de múltiples fármacos CDR2	46
MFS	clase principal de superfamilia facilitadora	46
TAC1	Activado transcripcional de los genes CDR	46
LOH	Perdida de heterogeneidad	46
PNA-FISH	Ácido nucleico peptídico- hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia	48
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	49

## II. ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	Página
1	Taxonomía	1
2	Nombres anamorfos y teleomorfos de especies de <i>Candida</i> .	2
3	Variedades clínicas de Candidosis	4
4	Distribución de especies de aislamientos de <i>Candida</i> de pacientes con IC: programa de vigilancia global ARTEMIS, 2001 a 2007.	12
5	Distribución de especies de <i>Candida</i> en adultos y niños con candidemia, reportados por diferentes programas de vigilancia.	13
6	Carga de candidemia de inicio temprano en los Estados Unidos	13
7	Distribución de especies, área geográfica y variaciones temporales entre aislamientos en sangre de <i>Candida</i>	14
8	Incidencia, tasas de exceso de mortalidad y costos atribuibles a candidemia	16
9	Dilución de los antimicóticos insolubles en agua.	29
10	Dilución de los antimicóticos solubles en agua.	29



### III. ÍNDICE DE IMÁGENES

Número	Título	Página
1	Estructura química de Anfotericina B	17
2	Estructura química de la Nistatina	19
3	Estructura química de la Terbinafina.	20
4	Estructura química del Ketokonazol.	21
5	Estructura química del Fluconazol.	22
6	Colocación de las diluciones de las muestras y antimicóticos. Control de crecimiento o Control +); cepa a prueba sin antimicótico.	32
7	Ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i> frente Anfotericina B.	38
8	Ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i> frente Nistatina.	38
9	Ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i> frente Terbinafina.	39
10	Ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i> frente Ketokonazol.	39
11	Ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i> frente Fluconazol.	40

#### IV. ÍNDICE DE GRAFICAS

Número	Titulo	Página
1	Distribución de las muestras de <i>C. albicans</i> según género y origen.	33
2	Inhibición de crecimiento de muestras de <i>C. albicans</i> ante los antimicóticos.	34
3	Concentración mínimas inhibitoria.	35
4	Concentración mínima fungicida.	36
5	Sensibilidad de <i>C. albicans</i> ante antimicóticos.	37

## V. ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Número	Título	Página
1	Preparación de diluciones de antimicóticos para llenado de placas de microtitulación.	28
2	Preparación de inóculo de <i>C. albicans</i> para llenado de placa de microtitulación por método de microdilución.	30
3	Procedimiento para obtener la MIC de <i>C. albicans</i> ante diversos antimicóticos.	31
4	Procedimiento para obtener la MFC de <i>C. albicans</i> ante diversos antimicóticos.	32

## INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una micosis cosmopolita causada por diversas especies de *Candida*, la especie con mayor incidencia en casos clínicos es *C. albicans* aunque en las últimas décadas se tiene una mayor incidencia en los aislamientos de otras especies. Esta infección puede presentar una gran variedad de cuadros clínicos, muchas veces relacionado con el estado inmunológico del paciente afectando principalmente mucosas (boca, vagina etc.), uñas, piel y de manera excepcional puede afectar otros órganos como pulmones e intestinos con tendencia a una evolución aguda o crónica y generalmente severas (Jagath, 2012; Lopez 2012).

## Candidosis

Micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *Candida albicans* y el grupo *Candida* no *C. albicans*; se presenta una variedad de cuadros clínicos; afecta en particular mucosas (boca, vagina, etc), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestino (Arenas, 2001; Bonifaz, 2015).

## Sinonimia

Candidiasis, moniliasis, muguet, trush, algodoncillo (Bonifaz, 2015).

## Taxonomía

Con la actual taxonomía basada en la secuenciación genética, se le ordena al género de *Candida* dentro del tipo de levaduras ascosporadas. Por su genética están relacionadas con el género *Saccharomyces*, siendo *C. glabrata* la especie más cercana. La taxonomía de *Candida* spp. se presenta en el Tabla 1. (Bonifaz, 2015).

Tabla 1.- Taxonomía de <i>Candida</i> spp.	
<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hemiascomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycetes</i>
<b>Genero</b>	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma</i> (estados teleomorficos)
<b>Especies</b>	A los estados anamorficos se les denomina <i>Candida</i> y los ejemplos más importantes son: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> (sensu stricto), <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i> . Las especies de <i>Candida</i> reportadas con menor frecuencia son <i>C. ciferrii</i> , <i>C. kefyri</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. rugosa</i> y <i>C. zelanoidea</i> , entre otras.

(Bonifaz, 2015).

En el Tabla 2 podemos observar los nombres de los estados anamorfos (estadio reproductivo asexual y teleomorfo (estadio reproductivo sexual) de especies oportunistas de este género. (Bonifaz, 2015).

Tabla 2.- Nombres anamorfos y teleomorfos de especies de <i>Candida</i> .	
Nombre anamorfo	Nombre teleomorfo
<i>Candida albicans</i>	No descrito
<i>Candida ciferrii</i>	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	No descrito
<i>Candida famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida glabrata</i>	No descrito
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Pichia ohmeri</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ( <i>K. fragilis</i> )
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Candida metapsilosis</i>	No descrito
<i>Candida orthopsilosis</i>	No descrito
<i>Candida parapsilosis</i>	No descrito
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomada</i>
<i>Candida tropicalis</i>	No descrito

(Bonifaz, 2015).

#### Descripción del género *Candida*

El género *Candida* incluye un variado número de especies cerca de 200, pero solo 58 son oportunistas en animales y humanos y, de estas, seis a ocho especies son las que presentan más infecciones humanas (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*; sobresaliendo *C. albicans*). Se pueden utilizar la fermentación con azúcares y métodos de asimilación y definir la especie de las *Candida* más comunes (Bonifaz, 2015; Brooks et al, 2011).

Por lo regular el género *Candida* tiene características definidas; en medios de agar a 24 h a 37 °C o a temperatura ambiental, las especies de *Candida* producen colonias blandas de color crema con un olor a levadura. En cultivos o en los tejidos, especies de *Candida* proliferan en forma de levaduras ovales gemantes (3 a 6 µm de diámetro). Son levaduras con ausencia de pigmentos (melánicos y carotenoides); forma celular variable, es decir las células pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares (Bonifaz, 2015; Brooks et al, 2011).

El género de *Candida* tiene pared celular compuesta principalmente por mananos, glucanos y quitina; su reproducción es por gemación holoblástica o blastoconidios y pueden formar pseudohifas. Las pseudohifas se caracterizan por proliferar en un plano por debajo de la superficie del agar, cuando las yemas siguen creciendo pero no se desprenden y así producen cadenas de células alargadas que muestran muescas o constricciones en los tabiques entre las células. A diferencia de otras especies de *Candida*; *C. albicans* es dimórfica; además de las formas de levadura y pseudohifas también produce hifas verdaderas. La especie *C. glabrata* tiene la peculiaridad entre

los patógenos de ese grupo, de que produce solamente levaduras y no pseudohifas (Bonifaz, 2015; Brooks et al, 2011; Castañón, 2012).

La frecuencia de *C. albicans* según la topografía clínica de donde se aislé, se puede encontrar en 40% hasta 85% de los casos. Esta frecuencia ha ido en disminución por diversos factores, entre ellos la resistencia a fármacos, de manera que hoy en día el grupo denominado *Candida* no *Candida albicans* está en aumento. (Bonifaz, 2015).

Dos técnicas morfológicas sencillas permiten diferenciar *C. albicans*, que es el patógeno más frecuente, de otras especies de *Candida*: después de incubación en suero durante unos 90 minutos a 37°C, las levaduras de *C. albicans* comienzan a formar hifas verdaderas o tubos germinativos, la otra prueba es en medios con deficiencia de nutrientes *C. albicans* produce grandes clamidosporas esféricas (Brooks et al, 2011).

### Estructura antigénica

*C. albicans* presenta diferencias antigénicas en las mananoproteínas de la pared celular, identificándose los serotipos A y B. El serotipo A posee los determinantes antigénicos 1, 4, 5 y 6, en tanto el serotipo B carece del epitopo 6. Los cuales cruzan antigénicamente con las otras especies de *Candida* y, de manera excepcional, con especies de *Salmonella* C1. Es importante enfatizar que en los pacientes con SIDA predomina el serotipo B, que es considerado menos virulento. El antígeno es un polisacárido de N-acetil glucosamina, el cual puede utilizarse para intradermorreacción (candidina) con varios fines. Este antígeno se maneje como una prueba *in vivo* para valorar la inmunidad celular. Con fines diagnósticos solo es útil para la investigación de hipersensibilidad en pacientes alérgicos (rinitis y asma). Se han definido otros antígenos más que incluyen proteasas secretadas, una enolasa inmunodominante y proteínas de choque térmico (Bonifaz, 2015; Brooks, et al 2011).

### Serología

Se valoran tanto precipitinas como aglutininas; aunque estas pueden ser positivas en individuos normales, tienen una gran utilidad en candidosis profundas y sistémicas, por ejemplo, endocarditis, candidosis pulmonar y visceral, es decir, lo que se ha dado en llamar “candidosis ocultas”. (Bonifaz, 2015).

Es importante valorar la inmunidad celular, no con fines diagnósticos, sino porque presenta un panorama de la actividad celular; las pruebas más utilizadas son intradermorreacción, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y fagocitosis. (Bonifaz, 2015).

### Patogenia

Considerada como una clásica enfermedad producida por hongos patógenos oportunistas, la candidosis cuenta con diversas variedades clínicas (Tabla 3) y requiere forzosamente de factores predisponentes: la mayor parte de las veces se produce de manera endógena, casi siempre atribuible a dos procesos: el desequilibrio de la flora microbiana que favorece el incremento de levaduras de *Candida*, la cual se puede deber a cambios en el pH, acumulación de nutrientes como

el glucógeno o la disminución de la flora bacteriana por antibióticos; o bien debido a enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en el número o función de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y B. Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras (p. ej., vía cateterismo o drogadicción), en los que se inoculan los microorganismos de manera directa al torrente circulatorio. (Bonifaz, 2015).

TABLA 3.- Variedades clínicas de Candidosis	
Candidosis	Tipo clínico
Mucocutánea	Oral
	Genital (vaginosis y balanitis)
	Mucocutanea crónica
	Gastrointestinal
	Bronquial/Pulmonar
Cutánea	Intertrigos
	Onicomycosis (perionixis, onicolisis y onixis)
	Del área del pañal
	Pustulosis
	Granulomatosa
	Cutánea congénita
Sistémica	Tracto urinario
	Meningitis
	Endocarditis
	Candidemia (fungemia)
Miscelánea	Otitis (otomicosis)
	Úlceras corneales (oculomicosis)
	Endoftalmitis
Alérgica	Candididosis (ides)
	Eccema
	Rinitis, alveolitis y asma
	Gastritis alérgica

Bonifaz, 2015

La candidosis superficial (cutánea o de mucosas) surge por un incremento en el número local de células de *Candida* y daño de la piel o del epitelio, que permite la invasión local por las levaduras y por las pseudohifas. Aparece candidosis sistémica cuando *Candida* penetra en la corriente sanguínea y las defensas del hospedador no bastan para contener la proliferación y la diseminación de dichas células. Desde la sangre *Candida* infecta riñones, se fija a las prótesis valvulares del corazón o produce candidosis en cualquier otro sitio (como artritis, meningitis o endoftalmitis). La arquitectura histológica local de las lesiones cutáneas o mucocutaneas se caracteriza por reacciones inflamatorias que van desde abscesos piógenos hasta granulomas crónicos. Las células contienen innumerables levaduras gemantes y pseudohifas. El incremento importante del número de *Candida* en vías gastrointestinales suele surgir después de administrar antibióticos antibacterianos por la boca, y las levaduras se incorporan a la circulación al cruzar la mucosa intestinal (Brooks et al, 2011).

## Factores de virulencia

### Enzimas

Se ha reportado como factores de virulencia de las especies de *Candida* a diversas enzimas; las más importantes son: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas, y hialuronidasas. En forma específica: aspartil-proteinasa secretora, fosfolipasas y lipasas. (Bonifaz, 2015).

### Adhesinas

Son proteínas y polisacáridos que permiten la adherencia a diversos tipos de superficies, incluso las hidrofóbicas y favorecen al fenómeno de tigmotropismo (crecimiento sobre superficies solidas); las más importantes son manoproteínas, mananas; su presencia está bien comprobada en *C. albicans* y *C. glabrata*. Las más importantes son: Als1p, Als5p, Hwp1p y Mnt1 y los genes que codifican para su producción son: ALA1, ALS1 y HWP1. (Bonifaz, 2015; Castrillón, 2005).

### Adaptación al pH

Las diversas especies de *Candida* tienen una gran adaptación a diversos medios y sustratos, así, la capacidad de soportar los cambios del pH es el mejor ejemplo. Esta propiedad está regida por dos genes (PHR1 y PHR2); ambos se activan o inactivan en diferentes condiciones, el primero se activa en pH neutro o ligeramente básico (cuando está en sangre o piel alcalinizada) y se inactiva en medio ácido, accionándose a su vez el segundo (por ejemplo en vagina) (Bonifaz, 2015; Castrillón, 2005).

### Transición morfológica

Es la capacidad que tienen estas levaduras de cambiar morfológicamente de blastoconidio y pseudohifa e hifa. Este cambio es estipulado por las condiciones ambientales y se considera uno de los más significativos factores de patogenicidad y virulencia. Es preciso enfatizar que esta propiedad hace que dichas levaduras se comporten como hongos dimórficos; las formas de pseudofilamentos y filamentos son las que marcan infección. Este proceso tiene excepción en *C. glabrata*, que no sufre cambios morfológicos, por lo que se considera una levadura monomorfológica, muy parecida a *Saccharomyces* (Bonifaz, 2015).

### Apareamiento (entrecruzamiento)

En particular *C. albicans*, posee locus de apareamiento (MTL), con dos alelos (MTLa y MTL $\alpha$ ); esto permite el cambio físico de las cepas y sus propiedades por ejemplo está relacionado con el switching (Bonifaz, 2015).

### Switching fenotípico

Entendido como la capacidad que tienen estas levaduras de hacer grandes cambios fenotípicos, como son diferencias en la macromorfología colonial (colonias lisas, rugosas), y cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas. Este fenómeno de cambio fenotípico se da a manera de una estrategia del agente frente a las diferentes células que ataca y medios que soporta. (Bonifaz, 2015).



### Formación de biopelículas

La percepción de los microorganismos como formas unicelulares de vida se basa en el modo de crecimiento como cultivo puro; sin embargo, la mayor parte de los microbios persisten unidos a las superficies dentro de un ecosistema estructurado, como biopelículas y no como organismos libres en flotación (planctónico). Es una propiedad de patogenicidad, la cual presentan diversos agentes, como las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.*, y otras levaduras. Una biopelícula es una comunidad de microorganismos incrustados dentro de una matriz extracelular compuesta por un conglomerado de materiales exopolímeros autoproducidos que permanecen unidos y a su vez adheridos a una superficie, esto confiere protección contra una variedad de agresiones medioambientales. Esta conformación le da alta capacidad defensiva, persistencia y mayor resistencia al ataque de los antibióticos y antimicóticos. La formación de biopelícula es un contribuyente importante a las tasas de mortalidad inaceptablemente altas asociadas con estas infecciones. *C. albicans* y *C. parapsilosis* son las especies con mayor capacidad de formar estas biopelículas, esto representa uno de los principales factores de virulencia. Las localizaciones donde se han estudiado este fenómeno son: mucosa oral, vaginal e incluso catéteres: se calcula que en promedio de un 50% de las infecciones tiene origen en una biopelícula; debido a la importancia de la matriz durante el modo de crecimiento de la biopelícula, los estudios de las últimas dos décadas se han centrado en su composición, estructura y funciones biológicas. (Bonifaz, 2015; Douglas, 2002; Pierce, 2017; Ramage, 2013)

### Composición de la matriz de biopelícula de *C. albicans*

La composición de la matriz es dinámica y puede verse afectada por el medio ambiente; por tanto, los cambios en las condiciones de crecimiento tales como medio de crecimiento, temperatura, pH, etc. pueden conducir a alteraciones de la composición. En conjunto, los análisis bioquímicos han revelado la composición global de la matriz de biopelícula de *C. albicans*, con componentes únicos que representan cada una de las cuatro principales clases macromoleculares, incluyendo polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Más recientemente, los análisis más profundos que conducen a la identificación de los biopolímeros en la matriz han sido facilitados por la implementación de la instrumentación de vanguardia y poderosas técnicas. Hasta la fecha, esto ha dado como resultado un catálogo bastante completo de los componentes individuales de la matriz de biopelícula (Elke, 2008; Pierce, 2017).

### Proteínas

Las proteínas representan aproximadamente el 55% del peso seco de la matriz extracelular de *C. albicans*, más de lo que se pensaba anteriormente y que superaba en mucho el contenido de carbohidratos en masa. Se identificaron varias proteínas y glicoproteínas extraídas de la matriz de biopelícula utilizando técnicas proteómicas (electroforesis en gel bidimensional y espectrometría de masas), y hubo una sorprendente similitud entre las proteínas de la matriz y los componentes proteínicos presentes en los sobrenadantes líquidos de los cultivos planctónicos. Estos resultados parecen sugerir que los materiales secretados durante el crecimiento algo "artificial" en el laboratorio en condiciones planctónicas, de otra forma, formarán parte de la matriz durante el

crecimiento como biopelícula, que son el modo más probable de crecimiento durante la infección. Las proteínas que se encuentran en la matriz de biopelícula incluyeron algunas que se predijo que forman parte del secretoma (principalmente las glicoproteínas), pero también muchas proteínas sin secreción de señal, con un predominio de las enzimas glicolíticas, así como las proteínas de choque térmico. Un estudio más reciente utilizando más poderosas técnicas proteómicas avanzadas resultó en la identificación de un total de 565 diferentes proteínas en la matriz, lo que representa un total de 458 actividades distintas. Confirmando los resultados del estudio anterior, estos incluyeron varias proteínas predichas para ser secretadas pero también muchas sin una señal de la secreción. Esto sugiere una vía de secreción no canónica y/o la acumulación de proteínas después de la muerte celular. Un análisis de ontología funcional indicó que un total de 16 diferentes vías metabólicas se representaron, con una preponderancia de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, y también algunas enzimas potencialmente implicadas en la degradación de la matriz para promover la dispersión de biopelícula. (Pierce, 2017)

### Carbohidratos

Al igual que la mayoría de las matrices de biopelículas bacterianas, los polisacáridos representan un componente importante de la matriz de biopelícula de *C. albicans*, que representa aproximadamente el 25% de su peso seco. Por otra parte, en comparación con todos los otros biopolímeros, la fracción de carbohidratos muestra el mayor grado de complejidad dentro de la matriz de biopelícula de *C. albicans*. La arabinosa, la manosa, la glucosa y la xilosa constituyen los monosacáridos más abundantes de la reserva total de hidratos de carbono, aunque su abundancia relativa varía en fracciones de alto peso molecular frente a fracciones de bajo peso molecular. Cuando las diferentes fracciones fueron sometidas a análisis por RMN, reveló la presencia de tres grandes exopolisacáridos. Estos son similares a los componentes polisacáridos principales de la pared celular de *C. albicans*, aunque sus proporciones relativas y estructura en el material exopolímero de biopelícula son diferentes. Los polisacáridos más abundantes en la matriz de biopelícula de *C. albicans* (que constituyen aproximadamente el 87%) son mananos específicamente,  $\alpha$ -1,2 ramificados y  $\alpha$ -1,6 mananos. Estos polisacáridos de manano se encuentran asociados con  $\beta$ -1,6 glucanos lineales (ramificados en oposición a la pared celular), que constituyen aproximadamente el 13% de todos los carbohidratos en un aparente (MGCx), apuntando a una compleja interacción físico-química entre los residuos de glucano y manano. Además, cada componente MGCx tiene características estructurales diferentes que en la pared fúngica; por ejemplo, el manano encontrado en la matriz de biopelícula existe como una estructura mucho más grande (hasta 12.000 residuos de manosa) en comparación con el manano de la pared celular (aproximadamente 150 residuos). Contrariamente a lo que se pensaba anteriormente, el  $\beta$ -1,3-glucano -que representa el polisacárido de la pared celular principal y se demostró previamente que desempeñaba un papel importante en la resistencia a los fármacos de biopelícula, representaba sólo una pequeña porción de la fracción total de carbohidratos de la matriz de biopelícula. Además, la microscopía electrónica indicó que el  $\beta$ -1,3-glucano se distribuye escasamente a lo largo de la matriz de biopelícula. De nota, la quitina no se detectó en la matriz extracelular, corroborando aún más las diferencias de composición entre la matriz de biopelícula y la pared celular. (Pierce, 2017)

### Lípidos

Los lípidos también se han detectado en la matriz de biopelícula de *C. albicans*, donde representan aproximadamente el 15% de su peso seco. El uso de estado de la técnica “lipidomics” permitió la identificación de los diferentes tipos de lípidos presentes en la matriz. El perfil lipídico asociado con la matriz de biopelícula de *C. albicans* incluye principalmente glicerolípidos (99,5%), con una proporción mucho menor de esfingolípidos (0,5%). La matriz se enriquece en glicerolípidos neutros (89,2%), mientras que los glicerolípidos polares son menos abundantes (10,4%). También están presentes diferentes ácidos grasos en estas fracciones lipídicas, siendo los más abundantes los ácidos oleico y linoleico presentes en los glicerolípidos neutros. Los ácidos palmitoleico, palmítico, esteárico y mirístico están presentes en cantidades menores. La fosfatidiletanolamina fue la clase más abundante de glicerolípidos polares en la matriz. No es sorprendente que el ergosterol, el estero principal en las membranas celulares de hongos, parezca ser el único estero detectado en la matriz de la biopelícula, aunque a concentraciones muy modestas. Además, de acuerdo con los informes anteriores, pequeñas cantidades de Prostaglandina E2, un precursor de eicosanoides-se encuentran también en la matriz extracelular de biopelícula de *C. albicans* (Pierce, 2017).

### Ácidos Nucleicos

El eDNA se ha identificado casi universalmente como parte de la matriz extracelular en biopelícula en diferentes especies bacterianas. Lo mismo ocurre con *C. albicans*, donde la presencia de eDNA se ha descrito en la matriz de biopelícula en una variedad de condiciones de crecimiento, que constituyen alrededor del 5% del peso de la matriz. Los mecanismos propuestos implicados en la liberación de eDNA en la matriz incluyen lisis celular, detección de quórum, y la excreción de las vesículas que contienen el DNA. Recientemente se demostró que el DNA presente en la matriz de biopelícula de *C. albicans* se compone en su mayor parte de secuencias aleatorias no codificantes. (Pierce, 2017)

### Estructura de la matriz de biopelícula de *C. albicans*

Los diferentes constituyentes exopoliméricos de la matriz extracelular de *C. albicans* interactúan entre sí para dar lugar a la arquitectura matricial global, dando como resultado la formación de una red polimérica tridimensional hidratada cohesiva que es característica del estilo de vida de la biopelícula. Aunque los procedimientos exactos para el montaje de los materiales de matriz no se entienden completamente, investigaciones recientes han comenzado a arrojar a la luz este proceso. Como se mencionó anteriormente, los estudios han demostrado la presencia de MGCxs, lo que indica estrechas interacciones entre estos dos exopolisacáridos de matriz. Un informe más reciente que utiliza una combinación de enfoques genéticos y bioquímicos añadió información importante sobre las contribuciones de los mananos y glucanos a la estructura de la matriz. Se demostró que la interferencia con la síntesis o exportación de un constituyente individual resultó en concentraciones alteradas de los otros polisacáridos, lo que indica que la biogénesis de la matriz requiere la entrega coordinada de los exopolisacáridos individuales de la matriz. Sin embargo, también se observó que las biopelículas mezcladas que contienen las cepas mutantes de las diferentes vías restaurado estructura y función de la matriz. Estas observaciones apuntan al hecho de que el ensamblaje de la

matriz está coordinado extracelularmente y son fuertemente sugestivos de un comportamiento de la comunidad en el que los mutantes que carecen de un polisacárido pueden ser complementados por células vecinas que carecen de un polisacárido diferente. (Pierce, 2017; Pranab, 2004)

Aparte de estas interacciones entre exopolisacáridos, otras interacciones de varios componentes que implican los diferentes constituyentes de la matriz también es probable que se produzcan. Estos pueden incluir tanto las interacciones físico-químicas y el enredo de biopolímeros que pueden contribuir aún más a la estabilidad de la biopelícula. Por ejemplo, los estudios han demostrado un papel predominante para eDNA como un componente clave de la matriz de biopelícula de *C. albicans* proporcionando la integridad estructural necesaria para el mantenimiento de biopelícula. Esto indica un papel importante para eDNA en el proceso general de ensamblaje de la matriz, posiblemente como un "conector" entre los diferentes componentes de la matriz. También es probable que las proteínas de la matriz pueden actuar como intermediarios de enlaces covalentes entre los diferentes exopolisacáridos, similar a lo que ocurre en la pared celular. Además, estas interacciones multicomponentes entre los diferentes exopolímeros de la matriz producen propiedades emergentes, llevando a los autores a postular que, como un todo, la matriz de biopelícula de *C. albicans* muestra las "propiedades de una amalgama" (Pierce, 2017; Pranab, 2004).

Cabe destacar que la estructura general de la matriz de biopelícula también puede cambiar dependiendo de las condiciones ambientales. Por ejemplo, la formación de biopelícula de *C. albicans* en condiciones de flujo normalmente resulta en el aumento de la producción de matriz de la biopelícula. Este es un método por el cual las biopelículas pueden aumentar la resistencia de su matriz estructural en respuesta a las tensiones mecánicas impuestas por las fuerzas de cizalla (Franca, 2011; Pierce, 2017).

#### **Funciones de la matriz de biopelícula de *C. albicans***

La matriz de biopelícula es de importancia crítica para muchos aspectos asociados con el modo de crecimiento de biopelícula de *C. albicans*. La matriz de biopelícula media las interacciones adhesivas y cohesivas, proporcionando estabilidad mecánica a las biopelículas, controlando la dispersión de las células de la biopelícula, e incluso puede actuar como un sistema digestivo que proporciona una fuente de nutrientes para el consorcio de células. La matriz de biopelícula de *C. albicans* desempeña un papel preponderante en la protección de las células de biopelícula de los insultos medioambientales, lo que constituye una barrera física que protege las células de las biopelículas del ataque del sistema inmunológico y del tratamiento antifúngico durante el tratamiento. (Pierce, 2017; Ramage, 2005)

#### **Estabilidad mecánica, interacciones adhesivas y cohesivas**

Como se mencionó anteriormente, la estructura global de la matriz de biopelícula es esencial para la estabilidad mecánica de la biopelícula; como tal, recientemente se conoce como el "Super pegamento de hongos". Los diferentes componentes exopoliméricos de la matriz interactúan entre sí, y la red polimérica hidratada resultante media la fuerza cohesiva crítica para el mantenimiento de biopelícula. Algunos de los componentes de la matriz también están involucrados en la

colonización inicial a través de la adhesión a los sustratos abióticos y bióticos, así como en la fijación a largo plazo a las superficies. Además, la disolución de estas fuerzas adhesivas y cohesivas es necesaria para la dispersión de biopelícula. (Pierce, 2017)

### **Resistencia a los fármacos antifúngicos**

Quizás la función clínicamente más relevante asociada con la matriz de biopelícula de *C. albicans* es su papel en la resistencia a los fármacos antifúngicos. Aunque la resistencia es multifactorial, la protección ejercida por la matriz es un contribuyente importante a los altos niveles de resistencia mostrada por biopelículas de *C. albicans*. Los primeros estudios del grupo de Douglas ya mostraron una correlación entre la abundancia de la matriz y los niveles de resistencia a Fluconazol y Anfotericina B. Los resultados de los experimentos de pruebas de susceptibilidad utilizando células desagregadas de los biopelícula también indicaron una contribución de la matriz a la resistencia. Posteriormente, el grupo de los Andes demostró un papel predominante para  $\beta$ -1,3 glucano en la matriz exopolimérica en la resistencia de las biopelículas al Fluconazol, principalmente a través de un mecanismo de secuestro de fármacos, por lo que la unión a este componente de la matriz evita que el fármaco alcance sus objetivos celulares. Un estudio de Vedyappan et al. reveló un efecto similar sobre la resistencia a Anfotericina B, y otros estudios extendió estas observaciones a otras clases de agentes antifúngicos y también otras especies de *Candida*. Otro componente de la matriz con un papel en la resistencia a los fármacos antifúngicos es el eDNA. Martins et al. informaron de que la adición de DNAsa mejora la susceptibilidad de los biopelículas maduros de *C. albicans* contra algunos, pero no todos los agentes antifúngicos. Aunque el mecanismo preciso por el cual el eDNA contribuye a la resistencia a los fármacos sigue siendo poco claro, puede ser debido a la penetración reducida del fármaco. (Castrillón, 2010; Pierce, 2017)

Dependiendo de la configuración del locus del tipo de apareamiento, *C. albicans* puede formar dos tipos de biopelículas: una biopelícula a/ $\alpha$  "patogénico" y una biopelícula "sexual" a/a o  $\alpha/\alpha$ . Las biopelículas patógenas se consideran impermeables, impenetrables y resistentes a los fármacos, mientras que las biopelículas sexuales carecen de estos rasgos. Curiosamente, estas diferentes propiedades están principalmente relacionadas con las diferencias en la matriz (Pierce, 2017; Pranab, 2004).

### **Protección del sistema inmune del hospedero**

La matriz extracelular también confiere protección a células y mediadores solubles del sistema inmune del huésped, lo que constituye un impedimento importante para un tratamiento eficaz. La matriz envolvente puede enmascarar eficazmente epítopos de pared celular en la superficie de células de *C. albicans* que son importantes para el reconocimiento por el huésped, contribuyendo a la evasión inmune. Quizás los más estudiados hasta la fecha son las interacciones entre las biopelículas de *C. albicans* y los neutrófilos. Xie et al. informaron que las biopelículas maduras eran resistentes a la muerte por los neutrófilos y no desencadenan las ROS, a pesar de que los neutrófilos conservaron su viabilidad y potencial de activación funcional. Este efecto fue mediado por glucanos de matriz que actúan como un mecanismo de señuelo para prevenir la activación de neutrófilos. Recientemente, Nett y col. Informaron que la matriz extracelular de biopelícula de *C. albicans* daña

la formación de NET. Este deterioro también se asoció con la supresión de la producción de ROS. Los autores afirman que la falta de NETs contribuye a la evasión inmune y proporciona una ventaja de supervivencia a las células dentro de las biopelículas en comparación con sus homólogos planctónicos. Además, la matriz de biopelícula es responsable de la impenetrabilidad de biopelícula  $\alpha/\alpha$  patogénica de *C. albicans* por los leucocitos polimorfonucleares. (Castrillon, 2010; Pierce, 2017)

### Inmunidad

Debido a que las especies de *Candida* son pobladores normales de las mucosas, el contacto con el sistema inmune se inicia prácticamente desde el nacimiento. Entre los mecanismos de protección del organismo sobresale la presencia de transferrina sérica, anticuerpos y la misma inmunidad celular. En algunos pacientes con candidosis recurrente se pueden observar bajos niveles de transferrina; en cambio en pacientes diabéticos con frecuencia se encuentran anticuerpos anti-*Candida* que prácticamente no existen en personas normales; sin embargo, la mayor parte de la protección inmunológica se debe a la inmunidad celular, ya que defectos a este nivel siempre conllevan la presencia de candidosis (Bonifaz, 2015; Castañon, 2012).

### Epidemiología

La candidosis es una enfermedad cosmopolita, sin duda alguna, es la micosis que más se presenta en todo el mundo y la primera oportunista. El hábitat de las diversas especies de *Candida* es el humano y algunos animales homeotermicos. No se aísla del suelo ni de detritus vegetal; los raros aislamientos que se han hecho de estas fuentes se consideran por contaminación fecal. Diversas especies de *Candida* son componentes de la flora habitual del cuerpo; se presentan desde los primeros días del nacimiento y tienen una gran predilección por las mucosas. Una enfermedad endógena favorecida por algún factor de predisposición del paciente, ocasionalmente puede llegar a ser exógena por introducción de grandes inóculos de levadura a través de catéteres, jeringas o consecuencia de una relación sexual debido a la balanitis. Enfermedad común en lactantes, debido a infección en mucosas durante el parto, el padecimiento afecta a ambos sexos por igual, solo los casos genitales son más frecuentes en la mujer por las condiciones anatómicas propias de la vagina. Ocupacionalmente se encuentra en casos específicos, en particular de candidosis interdigital y onicomycosis de las manos, sobre todo en personas que mantienen las manos húmedas por largos periodos, como lavanderas, afanadoras, amasadoras de pan y tortilla, y limpiadoras de fruta y pescado (Bonifaz, 2015; Castañon, 2012).

Aunque *C. albicans* usualmente es considerada por ser un patógeno endógeno (la infección surge del propio paciente), la transmisión exógena ocurre de paciente a paciente por medio de las manos del personal de salud. *C. albicans*, represento el 88% de todas las infecciones fúngicas CO en los Estado Unidos entre 1980 y 1990. Wilson y col., Pfaller y Diekema, quienes usaron datos de un estudio hospitalario nacional, para mostrar que las IC se incrementaron o fueron estables entre 1996 y 2003 de 22 a 29 infecciones por 100,000 en la población. Una encuesta realizada en los Estados Unidos entre 2001 y 2007 encontró que *Candida* spp representa el 64% de IC en pacientes hospitalizados y que del 95% al 97% de estas infecciones son asociadas a cinco especies; *C. albicans*,

*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Tabla 4). Zilberberg y col. estudiaron las tendencias entre adultos y niños hospitalizados por candidemia en México y Dinamarca y se encontró que la incidencia de candidemia ocasionada por *C. albicans* es del 50% entre 2004 y 2007 (Tabla 5) (Abi-Said, 1997; Calderone, 2012).

Tabla 4.- Distribución de especies de aislamientos de <i>Candida</i> de pacientes con IC, 2001 a 2007.							
% del total por año (No de probadas)							
Especies	2001 (21,804)	2002 (24,680)	2003 (33,106)	2004 (33,406)	2005 (28,412)	2006 (29,167)	2007 (31,078)
<i>C. albicans</i>	65.4	61.4	62.3	62.8	65.9	65.1	64.0
<i>C. glabrata</i>	11.1	10.7	12.1	11.7	11.2	11.7	12.0
<i>C. tropicalis</i>	7.5	7.4	7.6	7.5	7.6	8.0	8.3
<i>C. parapsilosis</i>	6.9	6.6	7.3	6.7	5.6	5.9	5.4
<i>C. krusei</i>	2.5	2.6	2.7	2.3	2.4	2.5	2.6

Calderone, 2012

Tabla 5.- Distribución de especies de <i>Candida</i> en adultos y niños con candidemia, reportados por diferentes programas de vigilancia.							
% del total							
	País	Años	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
<b>Adultos</b>	Dinamarca	2004-2006	59	21	3	5	4
	México	2004-2007	40	19	21	12	4
<b>Niños</b>	Dinamarca	2004-2006	75	0	16	0	0
	México	2004-2007	27	1	49	16	2

Calderone, 2012

Mientras que *C. albicans* representa del 45% de BSI por *Candida* en pacientes con tumores sólidos, fue solamente observada en el 14% de pacientes con neoplasias hematológicas. Las BSI causadas por *Candida* han mostrado tener algunas de las más altas tasas de terapia inapropiada y mortalidad hospitalaria entre todos los agentes etiológicos examinados. La causa más común de terapia inapropiada para BSI causada por *Candida* es el epleo de una terapia empírica inicial, seguido por la incorrecta dosificación de fluconazol. Aunque una terapia inadecuada ha sido ligada directamente a la mortalidad; así, a pesar de contar con fármacos nuevos, potentes y no tóxicos, fallan en la administración de estas infecciones (Calderone, 2012; Castañón, 2012).

Las consecuencias de candidemia en pacientes hospitalizados son severas, ya que estos pacientes han mostrado ser un doble riesgo de muerte en hospitales que en pacientes con BSI no causadas por *Candida* (Tabla 6). Se estima que la mortalidad atribuida a candidemia y otras formas de IC



reportadas de estudios retrospectivos dirigidos en instituciones individuales y de estudios de vigilancia poblacional demuestran que la candidemia no lleva menos riesgo de muerte durante la hospitalización hoy que hace 20 años, a pesar de la introducción de nuevos agentes antifúngicos con mayor seguridad, espectro y potencia contra más especies de *Candida*. El tratamiento de candidemia se encuentra a menudo inadecuado debido al retraso en la administración de la terapia, tratamiento con un agente al cual el organismo es resistente, inadecuada dosis o duración del tratamiento, o la ausencia de algún tratamiento. El peso de la evidencia de estos estudios sugiere que la candidemia o IC es asociada con un exceso substancial de mortalidad del 10 al 49%. (Almirante, 2005; Calderone, 2012).

Tabla 6.- Carga de candidemia de inicio temprano en los Estados Unidos			
Parámetro	Tipo de BSI		
	<i>Candida</i>	Gram-Pos	Gram-Neg
Mortalidad (%)	28.3	20.0	10.0
Duración de la estancia (LOS) (días)	13.7	10.6	8.0
Costo (\$)	30,219	18,526	12,305

Calderone, 2012

Un estudio de población en los Estados Unidos basado en candidemia encontró que la remoción de catéteres vasculares, además de recibir al menos 5 días de tratamiento antifúngico, fue independientemente asociado con una disminución del riesgo tanto para una mortalidad temprana y tardía por candidemia. Finalmente, Parkins y col., encontró que una terapia con Fluconazol para el cual el organismo fue susceptible *in vitro* fue asociado con una reducción significativa en toda causa de mortalidad, de 46 a 27%. La terapia con Fluconazol llega a considerarse inadecuada cuando existe una dosificación inadecuada y resistencia *in vitro*, una terapia inadecuada es un predictor de muerte en hospital. Así, la reducción de la tasa de mortalidad debido a candidemia o IC es dependiente a la administración de una terapia antifúngica apropiada (dosis y fármacos correctos) temprana en el curso de la infección y por una adecuada duración. (Antoniadou, 2003; Calderone, 2012).

Es claro que entre las varias especies capaces de causar IC en todo el mundo, *C. albicans* predomina; aunque el aislamiento ha disminuido con el tiempo en varias ubicaciones geográficas. Igualmente la frecuencia en muestras de sangre varía de acuerdo a la edad de los pacientes y las condiciones globales, regionales o locales. Globalmente una tendencia decreciente en la tasa de aislamientos (disminución del 7% a 10%) fue notado alrededor de un periodo de 4 años (2004 a 2008); aunque esta disminución aparenta haberse estabilizado en los últimos años (Tabla 7) (Calderone, 2012).



Tabla 7.- Distribución de especies, área geográfica y variaciones temporales entre aislamientos en sangre de *Candida*

Ubicación	Periodo de estudio	No. de aislamientos	% del total de especies					
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. guilliermondii</i>
Estados Unidos	2008	571	38	28	21	9	0	0
México	2004-2007	398	32	8	38	15	3	1

Calderone, 2012

Los factores de riesgo asociados con candidemia o IC han sido bien establecidos y no han cambiado substancialmente en más de dos décadas. Es importante entender que estos factores de riesgo en el hospital son constantes y que los individuos hospitalizados están en un riesgo alto de adquirir candidemia durante la hospitalización como resultado de su subyacente condición médica. Aquellos que están determinados a ser factores de riesgo independientes de IC incluyen; exposición de agentes antimicrobianos de amplio espectro, quimioterapias cancerígenas, colonización en mucosas por *Candida* spp., catéter vascular permanente (especialmente catéter venoso central), nutrición total parenteral, estadios prolongados en unidad de cuidados intensivos (ICU) (>7 días), ventilación mecánica, neutropenia, neoplasias hematológicas, pancreatitis, cirugías anteriores (especialmente cirugía GI), infantes prematuros, pacientes mayores de 70 años de edad, falla renal y hemodiálisis. (Agvald, 2007, Calderone, 2012).

Sin los factores de riesgo específicos o exposiciones, la probabilidad de pacientes de alto riesgo de contraer candidemia en el hospital es aproximadamente 2 veces mayor por cada clase de antibióticos que reciben, 7 veces mayor si ellos tienen un catéter venoso central, 10 veces mayor si *Candida* ha sido encontrada colonizando otro sitio anatómico y 18 veces mayor si el paciente se le realiza hemodiálisis; la hospitalización en la ICU provee la oportunidad de transmisión de *Candida* entre pacientes, y ha mostrado ser un factor de riesgo adicional. Cuando dos o más de estos factores de riesgo están presentes, la probabilidad de infección incrementa exponencialmente. Así, Wenzel y Gennings han demostrado que en un paciente quien ha recibido 8 diferentes antimicrobianos y ha cultivado *Candida* a partir de una herida quirúrgica con exudado afluente, el riesgo de desarrollar candidemia fue 832 veces que de un paciente similar sin terapia antimicrobiana o colonización de *Candida* (Calderone, 2012).

Debido a que la falta de recomendaciones clínicas específicas y que las pruebas de diagnóstico lentas e insensibles complican el reconocimiento temprano y tratamiento de IC varios autores concuerdan con el uso de los factores de riesgo clínicos para identificar pacientes quienes pueden beneficiarse de terapias fúngicas empíricas o profilácticas basadas en herramientas clínicas apropiadas. Desafortunadamente, los factores de riesgo predominantes de IC son iatrogénicas comunes además de las condiciones nosocomiales. Sin embargo, la estratificación significativa de factores de riesgo

identificados será requerida para identificar estos pacientes con riesgos elevados quienes obtendrían beneficios máximos de intervenciones terapéuticas tempranas. Idealmente las decisiones terapéuticas deberían ser guiadas por un diagnóstico rápido y/o un esquema de estratificación de riesgo en orden para maximizar los beneficios y disminuir el riesgo de toxicidad farmacológica y desarrollo de resistencia. La carga de IC es tremenda en términos de morbilidad, mortalidad y costos (Tabla 8), es claro que debemos hacer más que simplemente buscar mejores agentes terapéuticos, si estamos teniendo un impacto de esta magnitud (Baddley, 2001; Calderone, 2012).

Tabla 8.- Incidencia, tasas de exceso de mortalidad y costos atribuibles a candidemia					
Periodo de estudio	Lugar, población	No de casos/ 100,000/año	Mortalidad %	LOS (días)	Costo (\$)
2000	Estados Unidos/ Pediátricos	43.0	10.0	21.1	92,266
2000	Estados Unidos/ Adultos	30.0	14.5	10.1	39,331

Calderone, 2012

El conocimiento de epidemiología local y regional tanto de las especies prevalentes y su susceptibilidad a los agentes antifúngicos disponibles es ahora más importante. Áreas fértiles de búsqueda incluyen medidas rápidas de diagnóstico, estratificación de riesgo, y gestión de estrategias de evaluación (tiempo óptimo, dosis, y duración de terapia antifúngica) para IC. (Calderone, 2012).

### Tratamiento

Depende del tipo de candidosis y del factor predisponente al que esté ligado; por tanto, a veces la terapia es muy sencilla y solo requiere tratamientos tópicos, mientras que en otras situaciones es necesario que sea por vía sistémica y por tiempo prolongado (Bonifaz, 2015).

Algunos son tan sencillos que su único objetivo es corregir el pH, por ejemplo, las soluciones ácidas (una cucharada de vinagre blanco en un litro de agua) son muy útiles para lavados vaginales y en la candidosis del área del pañal. Se utilizan soluciones básicas (solución saturada de bicarbonato de sodio) para hacer colutorios (para candidosis oral asociada a prótesis dentales). Se pueden emplear también toques de violeta de genciana al 1%, para los casos de perleche candidósico. (Bonifaz, 2015; Quindos 2009).

## Anfotericina B

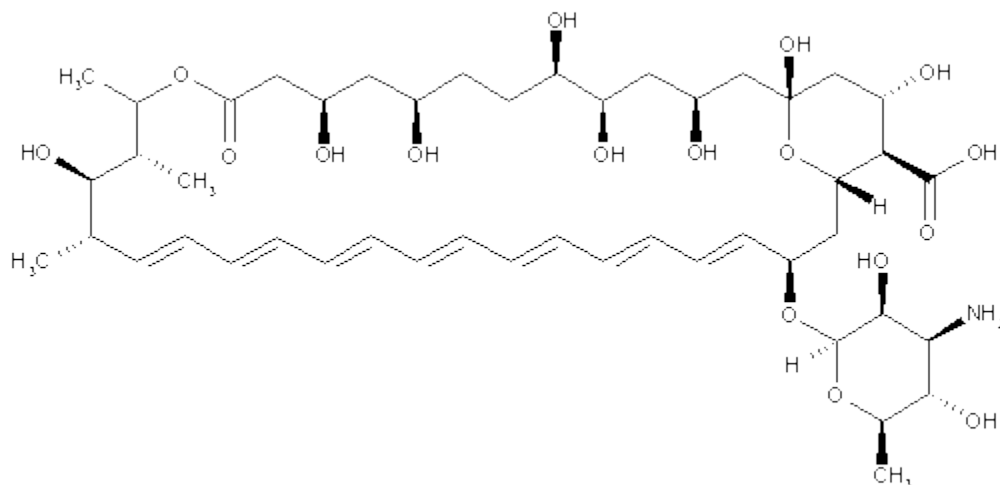


Imagen 1.- Estructura química de Anfotericina B

### Descripción

La Anfotericina B es el principal antibiótico poliénico, metabolito de *Streptomyces*; es el fármaco más eficaz contra las micosis sistémicas graves. De empleo solo para las formas profundas y sistémicas, sobre todo las que no respondan a los azoles sistémicos, como el caso de pacientes neutropénicos. Posee espectro amplio y rara vez genera resistencia. El empacado de dicho fármaco en liposomas y emulsiones lipídicas ha permitido obtener eficacia extraordinaria y resultados excelentes en los estudios clínicos. Las presentaciones mencionadas se pueden obtener y posiblemente sustituyan a las actuales. Los preparados lipídicos son menos tóxicos y permiten el empleo de concentraciones de anfotericina B mayores. (Bonifaz, 2015; Brooks et al, 2011)

Es importante mencionar que la mayoría de las cepas de *C. lusitanae* son resistentes intrínsecamente a la anfotericina B, y que cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* pueden tener una sensibilidad intermedia a este fármaco (Bonifaz, 2015).

### Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de los poliénicos entraña la formación de complejos con ergosterol en la membrana del hongo, lo cual la daña y permite la fuga de su contenido. La Anfotericina B posee mayor afinidad por el ergosterol que por el colesterol, que es el esteroide predominante en la membrana celular de mamíferos. La anfotericina B se administra por vía endovenosa, en la forma de micelas con desoxicolato sódico disuelto en una solución glucosada. El fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos, pero apenas si penetra en el líquido cefalorraquídeo. Dicho producto se fija firmemente al ergosterol en la membrana celular, interacción que altera su fluidez y posiblemente origina poros en esa estructura, a través de la cual salen iones y pequeñas moléculas. A diferencia de otros antimicóticos, la anfotericina B tiene acción fungicida. Las células de mamíferos

no poseen ergosterol y son relativamente resistentes a tales acciones. La Anfotericina B se fija débilmente al colesterol de las membranas de células de mamíferos, interacción que pudiera explicar sus efectos tóxicos; en cantidades pequeñas tiene efecto inmunoestimulante. (Brooks, et al 2011)

### **Indicaciones**

La anfotericina B tiene un espectro amplio y posee eficacia demostrada contra muchas de las más graves micosis sistémicas incluyendo la candidosis. La respuesta al fármaco es influida por la dosis y la frecuencia de administración, el sitio en que esta la infección micótica, el estado inmunitario del paciente y la susceptibilidad inherente del patógeno. Es poca la penetración en las articulaciones y el sistema nervioso central, y en algunas infecciones se recomienda la administración intrarraquídea o intraarticular. (Brooks, et al 2011)

La dosis utilizada para la forma clásica (desoxicolato) es de 0.25 a 0.75 mg/kg de peso (en los casos muy graves se puede usar dosis de 1 a 15 mg/kg/día), que equivale en un paciente normal a 5 a 25 mg aplicados tres veces por semana, con todos los controles del fármaco; incluso se puede administrar de manera concomitante con derivados azólicos. Si se emplean otros tipos de Anfotericina B, las dosis recomendadas son; para la forma lipídica: 5 mg/kg/día, con un rango entre 2 y 6 mg /kg/día, para la liposomal la dosis estándar es de 3mg/kg/día, con un rango de 3 a 5 mg/hg/día y para la dispersión coloidal (complejo colesteril-sulfato) la dosis es de 3 a 4 mg/kg/día (Bonifaz, 2015).

### **Efectos secundarios**

Todos los pacientes presentan reacciones adversas a la anfotericina B, aunque han disminuido enormemente con las nuevas presentaciones en lípidos. (Brooks, et al 2011)

Entre las reacciones agudas que suelen surgir con la administración intravenosa del fármaco están fiebre, escalofríos, anemia, alteraciones de electrolitos, disnea e hipotensión, mismas que pueden ser aliviadas por la administración previa o simultánea de hidrocortisona o acetaminofén. Durante el tratamiento aparece tolerante a los efectos secundarios agudos. (Brooks, et al 2011)

Los efectos secundarios crónicos por lo común son consecuencia de nefrotoxicidad. La administración del fármaco casi siempre ocasiona hiperazoemia y hay que medir con gran precisión y en forma seriada los niveles de creatinina y de iones séricos. A menudo surgen hipocalcemia, anemia, acidosis tubular renal, cefaleas, náusea y vómito. Algunos de los efectos tóxicos en riñones son reversibles, pero se sabe que disminuye en forma permanente la función glomerular y tubular de los riñones. Dicho daño pudiera guardar relación con la dosis total de anfotericina B administrada. Los efectos tóxicos disminuyen grandemente con las presentaciones lipídicas del antimicótico (Brooks, et al 2011)

## Nistatina

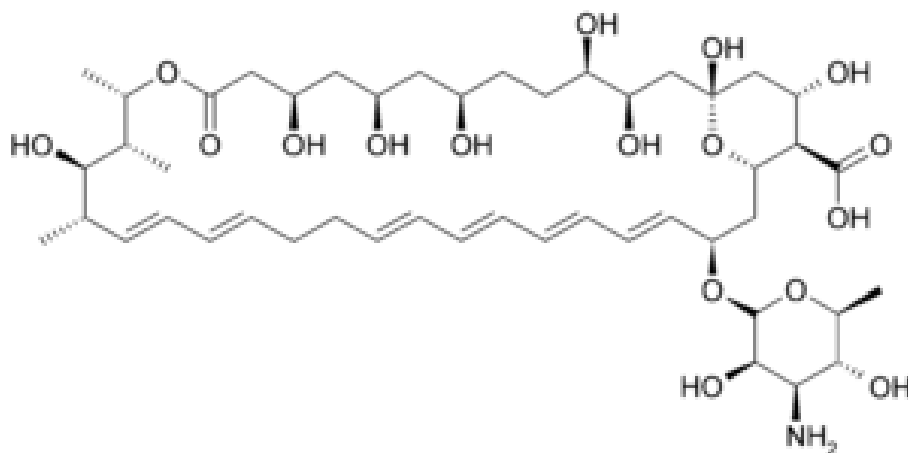


Imagen 2.- Estructura química de la nistatina

### Descripción

La nistatina es un antibiótico poliénico con algunas semejanzas estructurales con la Anfotericina B. (Brooks, et al 2011)

### Mecanismo de acción

Tiene un mecanismo similar de acción a la anfotericina B. (Brooks, et al 2011)

### Indicaciones

Se le puede usar para combatir candidosis locales de la boca y la vagina. También suprime la candidosis esofágica subclínica y la proliferación excesiva de *Candida* en vías gastrointestinales. (Brooks, et al 2011)

### Efectos secundarios

No muestra absorción a nivel general ni tiene efectos secundarios. Sin embargo, es demasiado toxica para administrar parenteral. (Brooks, et al 2011)

## Terbinafina

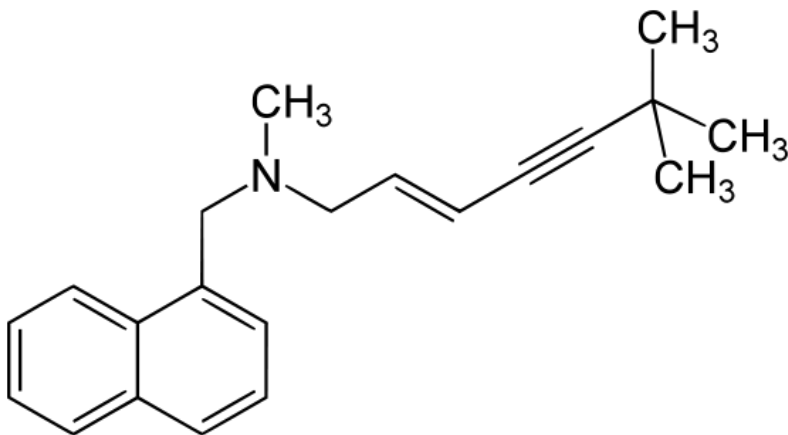


Imagen 3.- Estructura química de la Terbinafina.

### Descripción

La terbinafina es un alilamínico (Brooks, et al 2011).

### Mecanismo de acción

Bloquea la síntesis de ergosterol al inhibir la epoxidasa de escualeno (Brooks, et al 2011).

### Indicaciones

Es un fármaco ingerible usado para tratar dermatofitosis y ha sido muy eficaz para combatir infecciones de uñas y otras dermatofitosis. Para el tratamiento a largo plazo de la tiña de las uñas puede administrarse la terbinafina de manera intermitente, así como el itraconazol y el fluconazol, y para ello seguir un protocolo en días alternos (Brooks, et al 2011).

### Efectos secundarios

Sus efectos secundarios no son frecuentes, pero comprenden molestias gastrointestinales, cefaleas, reacciones de la piel y disminución del sentido del gusto (Brooks, et al 2011).

## Ketoconazol

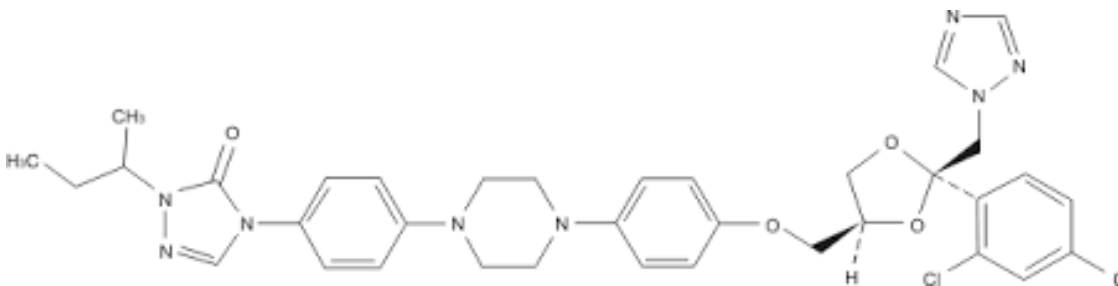


Imagen 4.- Estructura química del ketokonazol.

### Descripción

Antimicóticos de la familia de los azólicos, es de tipo imidazol. (Brooks, et al 2011)

### Mecanismo de acción

Interfiere en la síntesis de ergosterol; bloqueando la desmetilación  $14\alpha$ , que depende del citocromo P450, del lanosterol, precursor del ergosterol en los hongos y del colesterol en células de mamíferos. Sin embargo, los citocromo P450 de hongos son 100 a 1000 veces más sensibles a los azólicos que los sistemas de mamíferos. Los compuestos de esta categoría han sido creados para mejorar su eficacia, disponibilidad y farmacocinética y aminorar sus efectos secundarios; son fungistáticos. (Brooks, et al 2011)

### Indicaciones

Fármaco ingerible que se usa para combatir infecciones micóticas sistémicas y localizadas de muy diversa índole. Aún está en fase de evaluación las indicaciones para usarlo, pero ha remplazado a la anfotericina b para tratar muchas micosis menos graves, porque puede administrarse por vía oral y es menos tóxico (Brooks, et al 2011).

El ketoconazol es útil para tratar candidosis mucocutánea crónica, dermatofitosis y las formas no meníngeas de blastomycosis, dermatofitosis y las formas no meníngeas de blastomycosis, coccidiomycosis, paracoccidioidomycosis e histoplasmosis (Brooks, et al 2011).

En adultos la dosis es de 200 a 400 mg/día, y en niños mayores de 3 años de 3mg/kg/día; se recomienda para candidosis de piel y mucosas. Para el caso exclusivo de la candidosis vaginal se sugiere usar 400 mg/día en un tiempo promedio de cinco a 10 días; solo en caso de pacientes diabéticas o muy inmunosuprimidas es necesario continuar por más tiempo. Su uso debe considerarse con cuidado debido a los efectos colaterales (hepáticos). (Bonifaz, 2015)

### Efectos secundarios

Los efectos secundarios de los azólicos provienen más bien de su capacidad de inhibir las enzimas del citocromo P450 de mamíferos. El ketoconazol es el más tóxico y en dosis terapéuticas puede inhibir la síntesis de testosterona y de cortisol y ocasionar así diversos efectos reversibles como ginecomastia, cambios hormonales, hepatotoxicidad, neuropatía, perturbaciones de vías GI, disminución de la libido, impotencia, irregularidades menstruales y a veces insuficiencia suprarrenal. Todos los azólicos antimicóticos originan incrementos asintomáticos en los niveles de las pruebas de función hepática y casos ocasionales de hepatitis (Brooks, et al 2011).

Los azólicos antimicóticos interactúan con las enzimas del citocromo P450 encargadas del metabolismo de fármacos, y por esa razón surgen algunas interacciones medicamentosas importantes. A veces aumentan las concentraciones de los azólicos mencionados cuando se utilizan isoniazida, fenilhidantoína o rifampicina. La administración de los antimicóticos también hace que los niveles séricos de ciclosporinas, fenilhidantoína, hipoglucemiantes orales, anticoagulantes, digoxina y quizá otros más, aumenten más de lo previsto. Se necesita a veces la medición seriada de los niveles de ambos fármacos en suero para estar dentro de límites terapéuticos apropiados (Brooks, et al 2011).

### Fluconazol

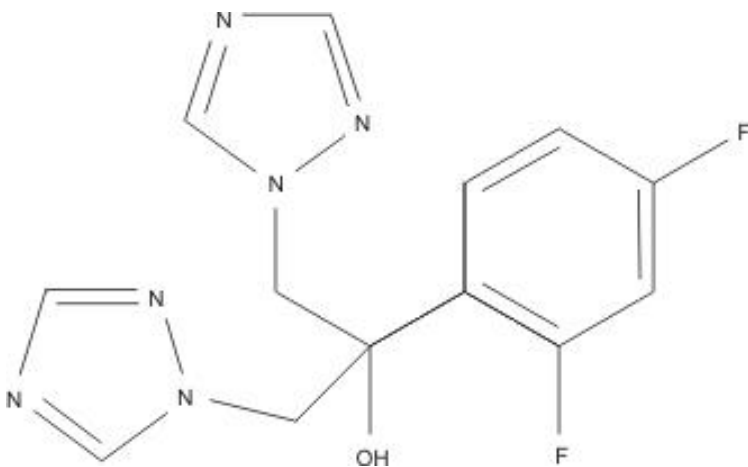


Imagen 5.- Estructura química del fluconazol.

### Descripción

Antimicóticos de la familia de los azólicos, es de tipo triazolico. De los compuestos de esta categoría el fluconazol es el que mejor penetra en el sistema nervioso central. Se han demostrado especies de *Candida*, aspergilosis y otros mohos invasores oportunistas, resistentes al fluconazol. (Brooks, et al 2011)



### Mecanismo de acción

Interfiere en la síntesis de ergosterol; bloqueando la desmetilación  $14\alpha$ , que depende del citocromo P450, del lanosterol, precursor del ergosterol en los hongos y del colesterol en células de mamíferos. Sin embargo, los citocromo P450 de hongos son 100 a 1000 veces más sensibles a los azólicos que los sistemas de mamíferos. Los compuestos de esta categoría han sido creados para mejorar su eficacia, disponibilidad y farmacocinética y aminorar sus efectos secundarios; son fungistáticos. (Brooks, et al 2011)

### Indicaciones

Fármaco ingerible que se usa para combatir infecciones micóticas sistémicas y localizadas de muy diversa índole, se emplea principalmente para tratar muchas micosis menos graves, porque puede administrarse por vía oral y es menos tóxico (Brooks, et al 2011).

El Fluconazol es considerado como uno de los medicamentos de elección para profilaxis en pacientes inmunosuprimidos VIH/SIDA, trasplantes, largos periodos hospitalarios y con candidosis orofaríngea y los pacientes inmunocompetentes con candidemia; su dosificación depende del peso, pero se sugieren dosis de 50 a 100 mg/día. Para los casos de candidosis sistémica e invasiva, su nivel de evidencia es C-1 (Bonifaz, 2015; Brooks et al, 2011).

Uno de los medicamentos más activos para la candidosis; se maneja a dosis de 100 a 150 mg/dosis única, es decir, para un adulto normal, sin algún factor predisponente severo (inmunosupresión) y que tenga, por ejemplo, una candidosis oral o genital, una sola dosis de 150 mg/día es suficiente, con lo que más de 85% de los casos logran una resolución. Otros casos requieren de más dosis. Se sugiere el manejo de este fármaco en niños a la dosis de 3 a 6 mg/día (en algunos países existe una presentación pediátrica en gotero); o bien en niños entre seis y 10 años en una sola dosis de 50 mg. Para los casos severos de candidosis se debe aumentar la dosis a 200 a 400 mg/día (Bilgen, 1995; Bonifaz, 2015).

Cabe citar que también es posible administrarlo por vía intravenosa; su presentación es compatible con la mayoría de las soluciones (dextrosa al 20%, Hart-Mann, Ringer, solución salina isotónica [SSI]). Mucho se ha discutido sobre la resistencia al fluconazol de cepas de *Candida* sp.; la mayoría son sensibles, en particular las de *C. albicans*; sin embargo, algunas cepas de *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* (sensu stricto) y *C. krusei*, con facilidad adquieren resistencia, esta última de manera intrínseca, de aquí la importancia de identificar el agente causal (Bilgen, 1995; Bonifaz, 2015).

### Efectos secundarios

Los efectos secundarios de los azólicos provienen más bien de su capacidad de inhibir las enzimas del citocromo P450 de mamíferos. El fluconazol en dosis terapéuticas recomendadas no afecta de manera significativa la esteroidogénesis de mamíferos, pero llega a ocasionar perturbaciones de vías GI, mareos y lesiones de piel. Todos los azólicos antimicóticos originan incrementos

asintomáticos en los niveles de las pruebas de función hepática y casos ocasionales de hepatitis (Brooks, et al 2011).

Los azólicos antimicóticos interactúan con las enzimas del citocromo P450 encargadas del metabolismo de fármacos, y por esa razón surgen algunas interacciones medicamentosas importantes. A veces aumentan las concentraciones de los azólicos mencionados cuando se utilizan isoniazida, fenilhidantoina o rifampicina. La administración de los antimicóticos también hace que los niveles séricos de ciclosporinas, fenilhidantoina, hipoglucemiantes orales, anticoagulantes, digoxina y quizá otros más, aumenten más de lo previsto. Se necesita a veces la medición seriada de los niveles de ambos fármacos en suero para estar dentro de límites terapéuticos apropiados (Bilgen, 1995; Brooks, et al 2011).

### **Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) es una medida de sensibilidad del microorganismo, determinada como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento ante un determinado microorganismo después de su incubación en condiciones normalizadas. La MIC es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad del microorganismo; S (Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual), I (Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones fuertes concentraciones locales o aumento de la posología) y R (Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento) (Romero, 2012).

Para determinar las MIC existen diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de forma rutinaria, y de manera semicuantitativa, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards), BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Estas técnicas pueden ser métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados. Se puede realizar mediante: Difusión en agar (Disco placa y E test), Dilución Medio sólido y Medio líquido (micro/macrodilución) y Mecanizados-Automatizados (Romero, 2012).

En medicina, la concentración mínima inhibitoria no sólo se usa para determinar la concentración de antimicrobiano que recibirá el paciente sino también el tipo de antimicrobianos a utilizar, lo que a su vez reduce la oportunidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos (Romero, 2012).

### **Concentración Fungicida Mínima (MFC)**

Es un criterio utilizado para los hongos que habitualmente se conoce como Concentración Fungicida Mínima (MFC). Tiene como utilidad determinar si un agente antimicrobiano es fungistático o fungicida. Un agente fungicida se refiere a la reducción de 99,9% en las unidades formadoras de colonias a partir de un inóculo de subcultivo puro, mientras que un agente fungistático es el que reduce o inhibe el crecimiento del hongo. Se determina usualmente a partir del último pozo que dio positivo en la MIC (por método de microdilución en microplaca) y de los tres pozos siguientes, que muestran visualmente una inhibición del crecimiento completa, se cultiva en placas de medio de cultivo para propiciar el crecimiento de los microorganismos y así determinar si la MIC encontrada es solo la inhibición fungistática o también es la concentración fungicida, o bien si existe crecimiento determinar la MFC del agente antimicrobiano (Romero, 2012).

## JUSTIFICACIÓN

En las últimas dos décadas, prácticamente todas las publicaciones sobre el tema de la resistencia antimicótica en especies de *Candida* han comenzado con descripciones del impacto creciente de la resistencia antimicótica en el tratamiento de la candidiasis invasiva, reiteración de una cambiante epidemiología globalmente en infecciones por *Candida* por especies resistentes que no son *C. albicans*, y la petición de diagnósticos mejorados y nuevos agentes antifúngicos para combatir la creciente marea de resistencia antimicótica. Mientras que estas declaraciones tienen algo de verdad, de alguna manera distorsionan y simplifican en exceso la realidad clínica de la resistencia antimicótica encontrada por los médicos que atienden a pacientes con candidiasis invasiva (Calderone, 2012).

Actualmente aun con los enfoques que se han aplicado para el diagnóstico y tratamiento de candidiasis, se sigue teniendo una gran cantidad de pacientes que llegan a los hospitales con estas infecciones así como una elevada mortalidad, los tratamientos llegan a ser ineficaces y más especies adquieren resistencia ante los antimicóticos disponibles, es necesario tener un continuo monitoreo de los perfiles de sensibilidad que presenta *Candida* spp. ante los diversos antimicóticos que suelen emplearse para su tratamiento, así como ir cambiando de acuerdo a esos resultados las indicaciones terapéuticas para obtener un tratamiento eficaz.

## HIPÓTESIS

- Los perfiles de sensibilidad que se obtendrán mediante la determinación de la MIC y MFC ante diferentes antimicóticos en muestras de provenientes de casos clínicos, mostraran que las dosis sugeridas a emplear durante una Candidiasis son ineficientes y que se ha generado resistencia ante los antifúngicos más comunes (fluconazol y ketokonazol) empleados para el tratamiento de infecciones que *Candida albicans* causa en el ser humano.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar los perfiles de sensibilidad a diferentes antimicóticos mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Fungicida (MFC), de muestras de *Candida albicans*, provenientes de muestras clínicas de humanos, para evaluar la eficacia de los antimicóticos que se ofrecen comúnmente como tratamiento para infecciones causadas por *Candida*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Proporcionar más información para el uso clínico de los agentes antimicrobianos probados aportando perfiles de sensibilidad detectando la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Fungicida.
- Estandarizar la técnica de microdilución en placas de microtitulación para el estudio de la sensibilidad ante antimicóticos

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas utilizadas

A partir de muestras provenientes de aislamientos de exudados faríngeos, vaginales, secreciones y urocultivos de pacientes que acuden al Hospital Regional Tlalnepantla ISSEMyM en el Laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 se realizó la identificación de *Candida albicans* mediante el uso de Chromoagar además de la revisión de morfología mediante la tinción de Gram y otras pruebas, como control positivo se utilizó la cepa de referencia *Candida albicans* ATCC 32354 para la experimentación. Los aislamientos se mantuvieron en refrigeración a temperatura de 4-8 °C en tubos de ensaye en medio SDA.

### Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Se prepararon los antimicóticos (anfotericina B, nistatina, terbinafina, ketokonazol y fluconazol) (Diagrama 1) como el inóculo de *C. albicans* y la cepa de referencia (Diagrama 2) y se siguió la metodología propuesta por el CLSI (Documentos M27-A3) para determinar la MIC (Diagrama 3), esta metodología consiste en la microdilución de los antimicóticos, se realizó un cambio en el medio de cultivo empleado, se utilizó el medio SDC (Caldo dextrosa Sabouraud) en vez del medio RPMI 1640.

### Concentración Mínima Fungicida (MFC)

A partir de las placas donde se determinó la MIC y presentó una lectura de inhibición del 100%, fueron inoculadas por triplicado en placas de SDA, se incubaron a 37°C realizando lectura del medio a las 72 horas posterior a su inoculación, comprobando que la inhibición al 100% obtenida en la MIC sea efectivamente una concentración en donde la levadura ya no logre un desarrollo posterior aun en un medio de cultivo rico para su crecimiento (Diagrama 4) Si existe crecimiento se determina como MFC la concentración del antimicótico en donde ya no exista crecimiento alguno.

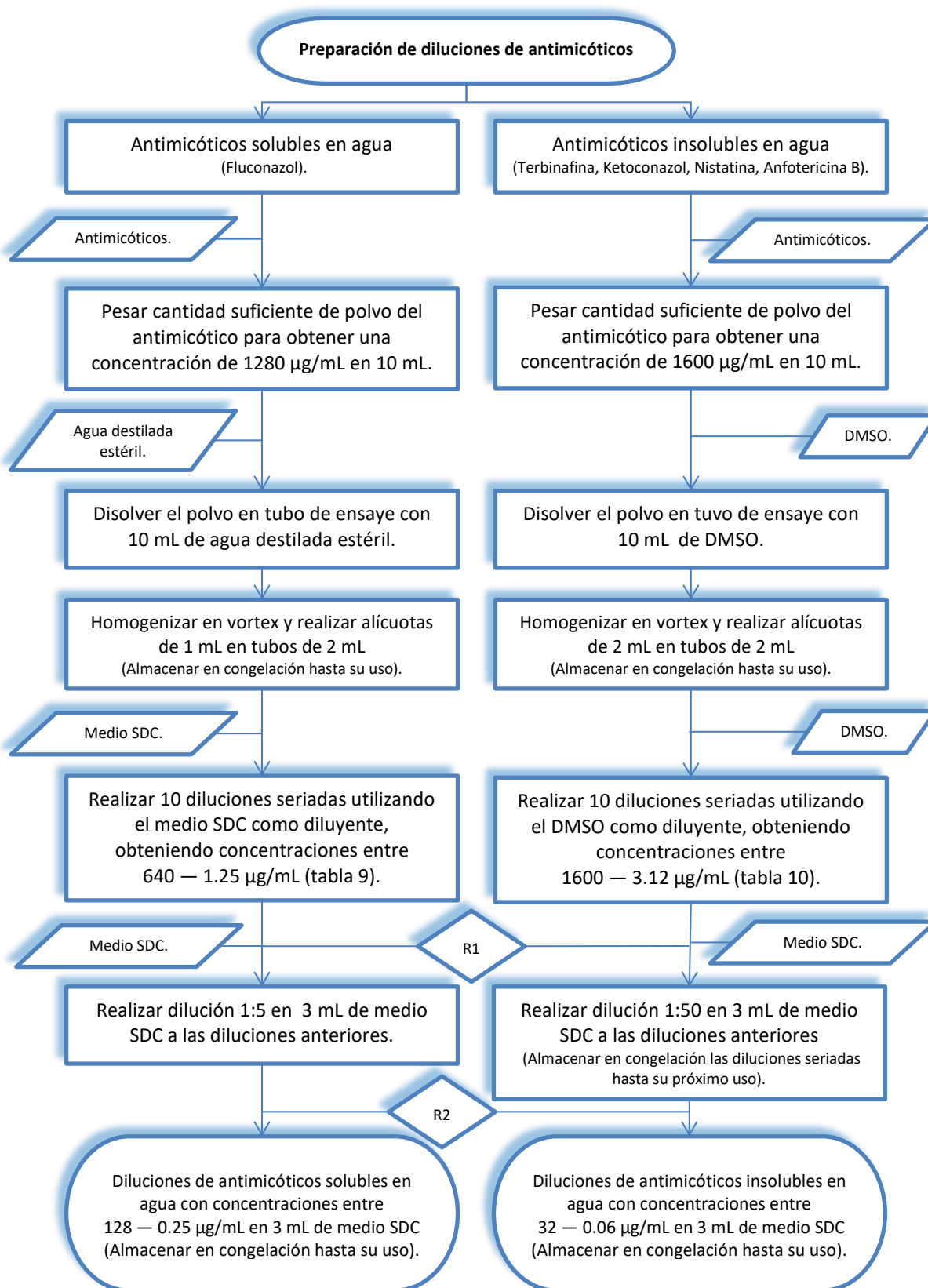


Diagrama 1. Preparación de diluciones de antimicóticos para llenado de placas de microtitulación.

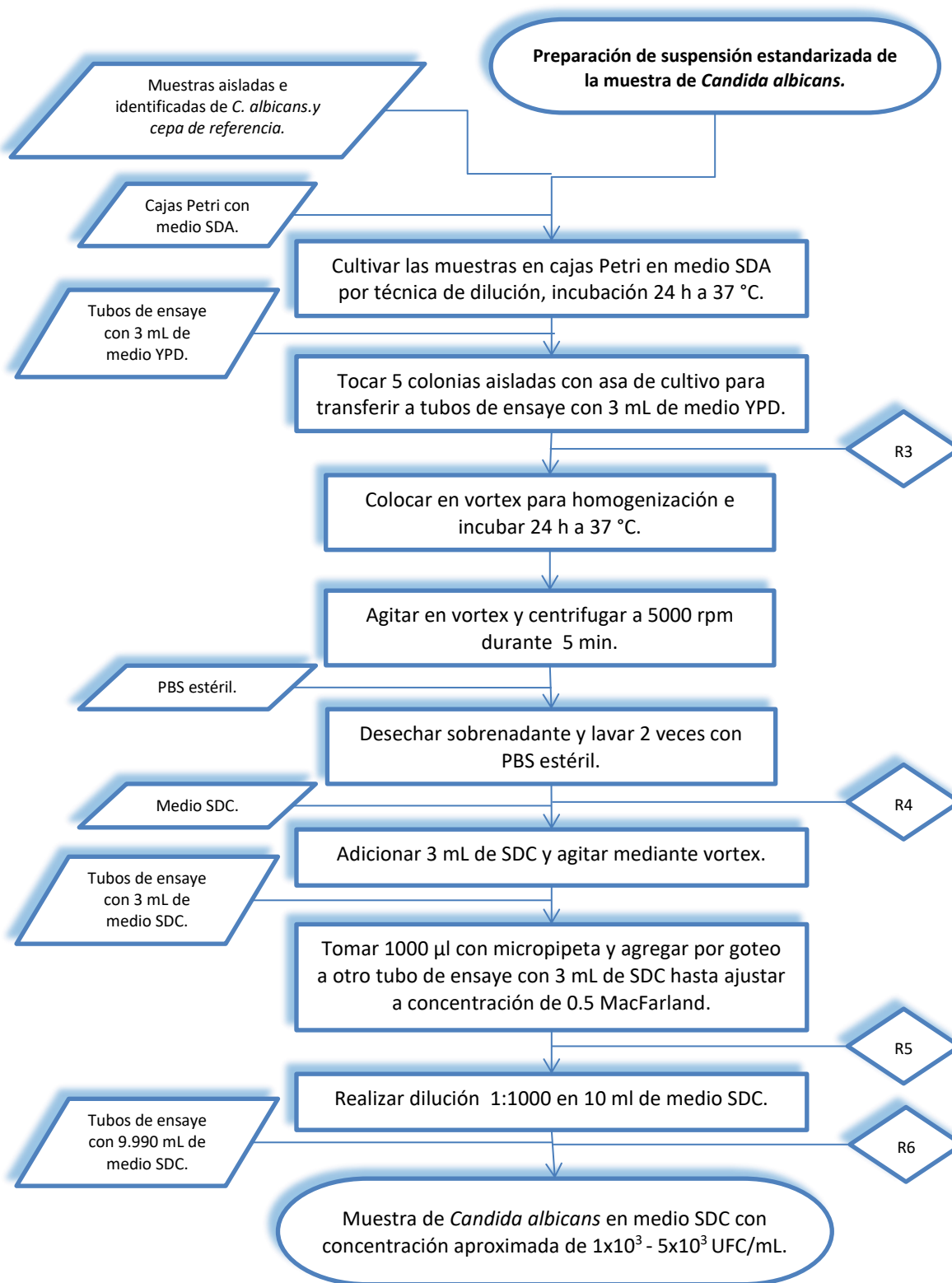


**Tabla 9.- Dilución de los antimicóticos insolubles en agua.**

Tubo No.	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo No.
1	1600 µg/mL	0.5 mL	0.5 mL de DMSO	800 µg/mL	2
1	1600 µg/mL	0.25 mL	0.75 mL de DMSO	400 µg/mL	3
1	1600 µg/mL	0.25 mL	1.75 mL de DMSO	200 µg/mL	4
4	200 µg/mL	0.5 mL	0.5 mL de DMSO	100 µg/mL	5
4	200 µg/mL	0.25 mL	0.75 mL de DMSO	50 µg/mL	6
4	200 µg/mL	0.25 mL	1.75 mL de DMSO	25 µg/mL	7
7	25 µg/mL	0.5 mL	0.5 mL de DMSO	12.5 µg/mL	8
7	25 µg/mL	0.25 mL	0.75 mL de DMSO	6.25 µg/mL	9
7	25 µg/mL	0.25 mL	1.75 mL de DMSO	3.12 µg/mL	10

**Tabla 10.- Dilución de los antimicóticos solubles en agua.**

Tubo No.	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo No.
0	1280 µg/mL	1 mL	1 mL de SDC	640 µg/mL	1
1	640 µg/mL	0.5 mL	0.5 mL de SDC	320 µg/mL	2
1	640 µg/mL	0.5 mL	1.5 mL de SDC	160 µg/mL	3
3	160 µg/mL	0.5 mL	0.5 mL de SDC	80 µg/mL	4
3	160 µg/mL	0.25 mL	0.75 mL de SDC	40 µg/mL	5
3	160 µg/mL	0.25 mL	1.75 mL de SDC	20 µg/mL	6
6	20 µg/mL	0.5 mL	0.5 mL de SDC	10 µg/mL	7
6	20 µg/mL	0.25 mL	0.75 mL de SDC	5 µg/mL	8
6	20 µg/mL	0.25 mL	1.75 mL de SDC	2.5 µg/mL	9
9	2.5 µg/mL	1 mL	1 mL de SDC	1.25 µg/mL	10



**Diagrama 2.-** Preparación de inóculo de *Candida albicans* por método de microdilución para llenado de placa de microtitulación.

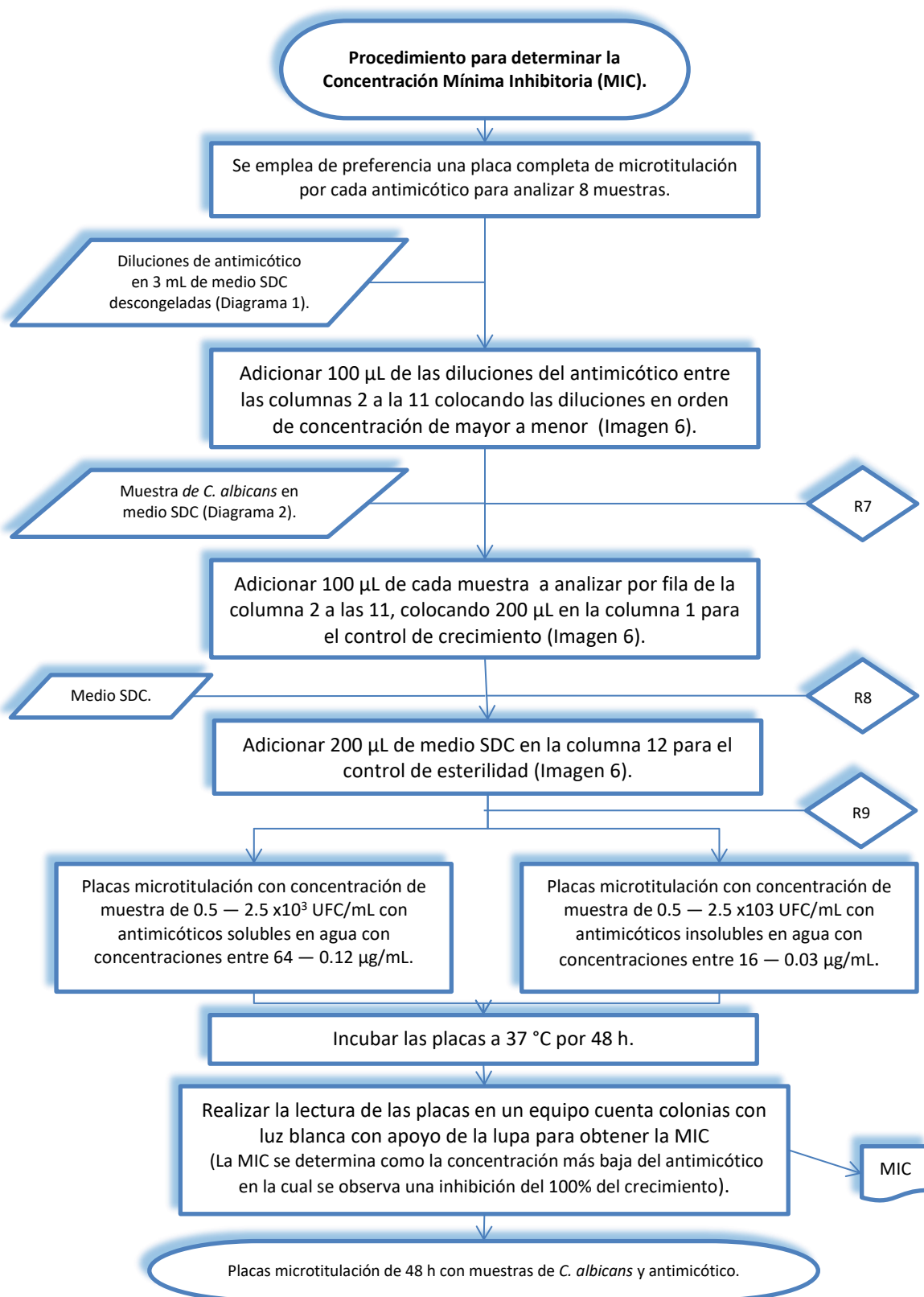


Diagrama 3.- Procedimiento para obtener la MIC de *C. albicans* ante diversos antimicóticos.

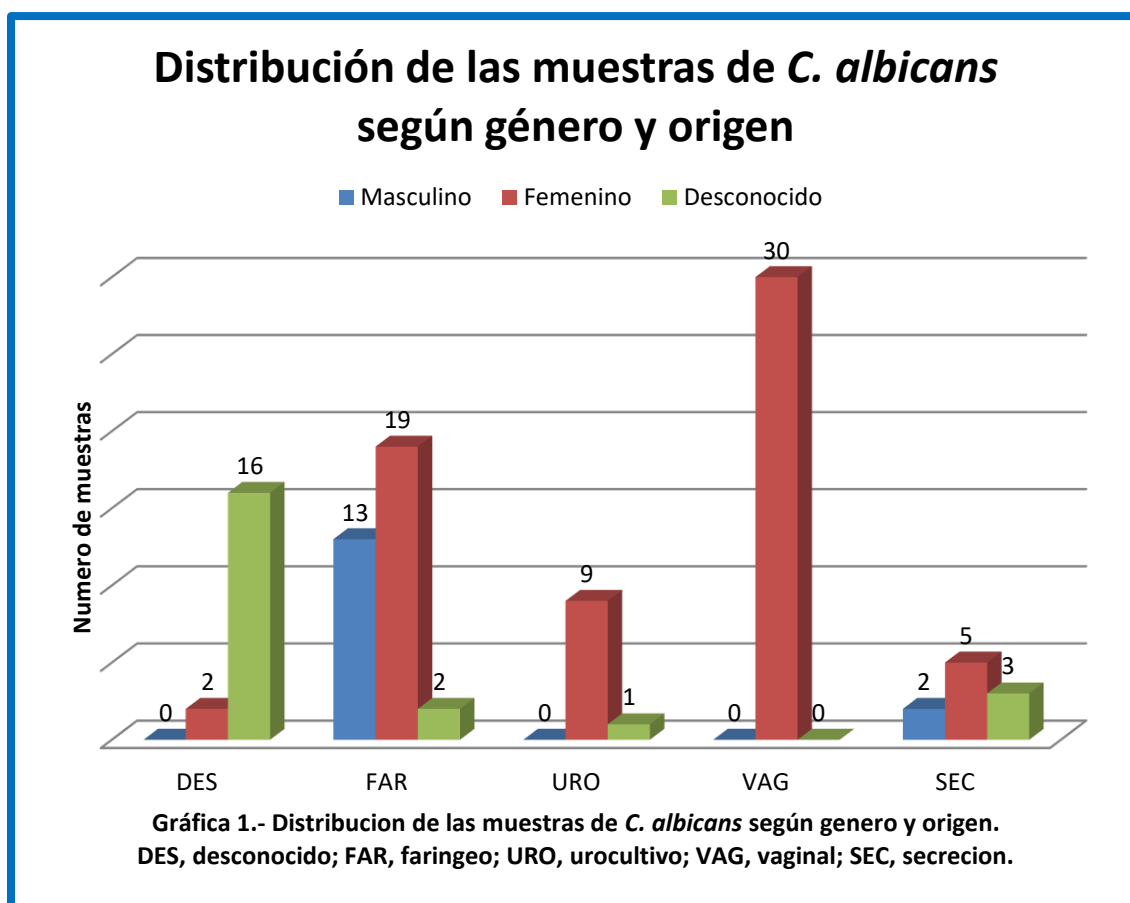


## RESULTADOS

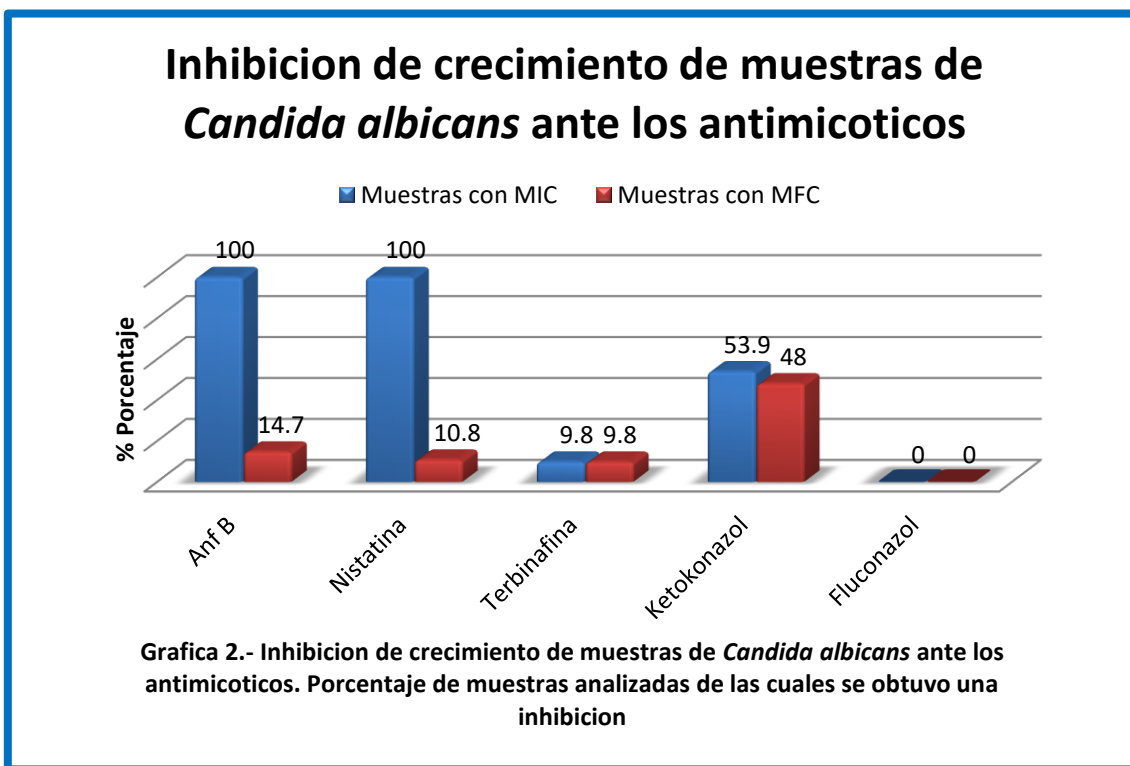
Se analizaron un total de 102 muestras clínicas provenientes de pacientes que acudieron al Hospital Regional de Tlalnepantla ISSEMyM, empleándose como control positivo la cepa de referencia *Candida albicans* ATCC 32354.

De las 102 muestras analizadas de *Candida albicans*, la distribución de acuerdo al género del paciente y sitio de obtención se muestran en la gráfica 1. En donde se encuentra que la mayoría de las muestras analizadas de *C. albicans* provenientes de pacientes femeninas son de exudado vaginal (30) y exudado faríngeo (19). En pacientes masculinos la mayor cantidad de aislamientos de *C. albicans* provenían de exudado faríngeo (13).

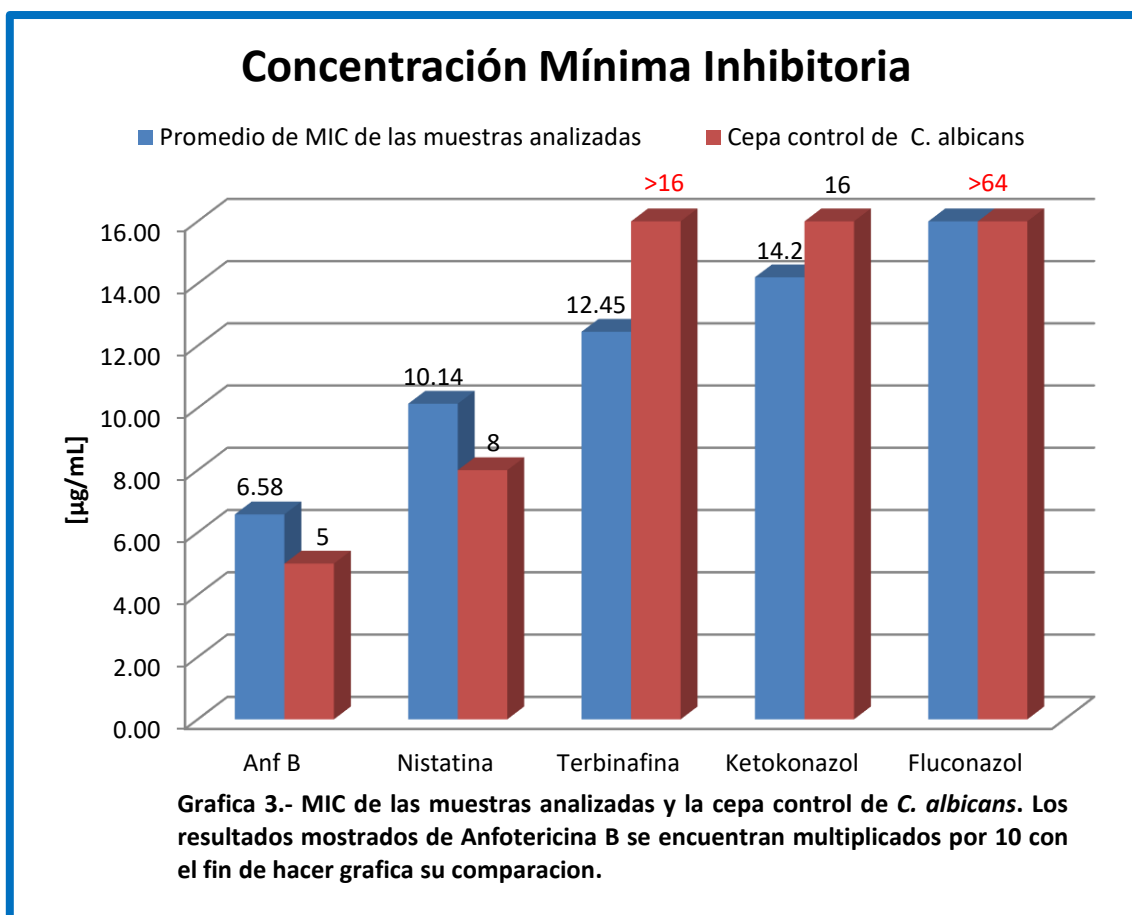
Se encuentra también un grupo de muestras categorizado como DES en la gráfica 1, de este grupo se desconoce el sitio de obtención de la muestra clínica. También se tenían muestras de las cuales se conoce el sitio de obtención de la muestra, pero se desconoce el género del paciente del cual proviene la muestra, se categoriza en la gráfica 1 como Desconocido.



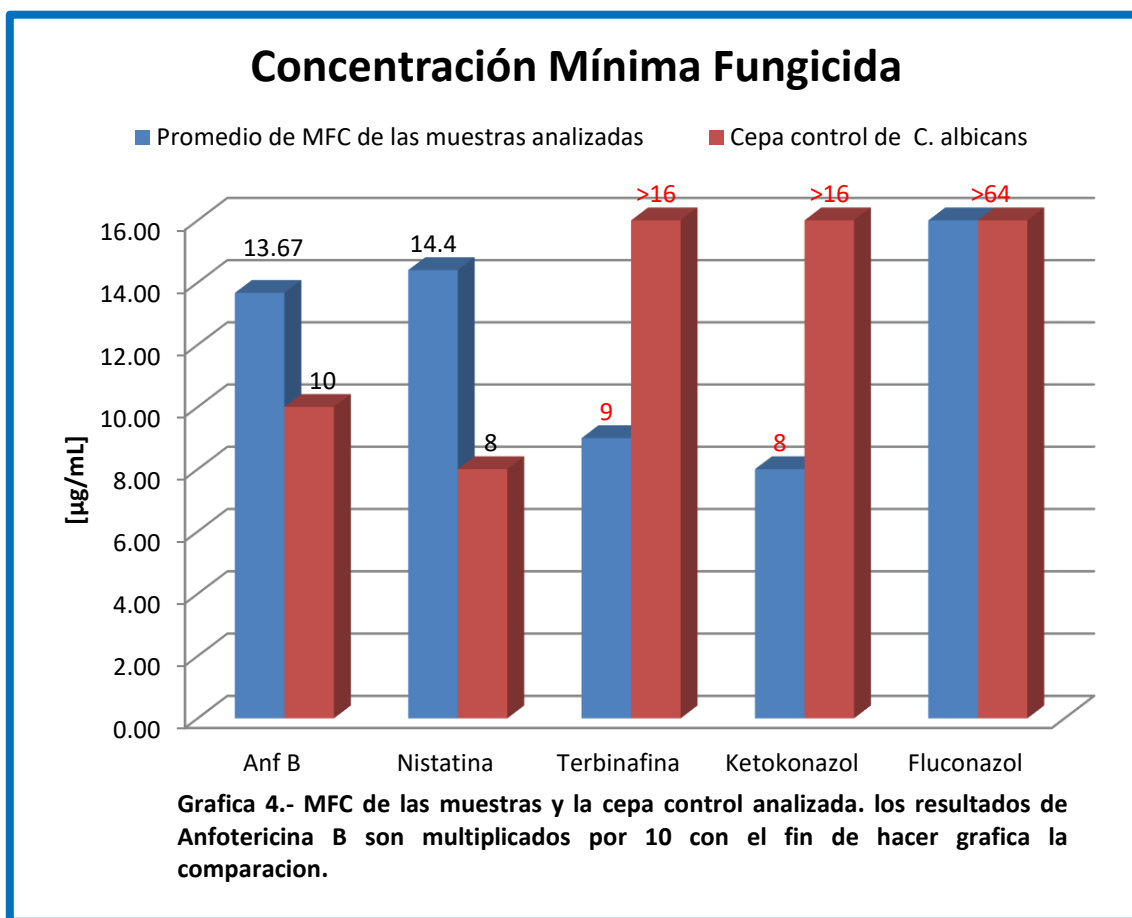
De las muestras analizadas con los antimicóticos, en anfotericina B y nistatina presentaron una inhibición dentro de los rangos de concentración del antimicótico que propone el CLSI, por lo cual se logró obtener una MIC en el 100% de las muestras para estos dos antimicóticos, aunque en el caso del ketoconazol y terbinafina, los rangos de concentración de los antimicóticos propuestos por el CLSI no fueron suficientes para poder observar una inhibición completa en todas las muestras analizadas, lográndose observar una inhibición completa solo en el 53.9% de las muestras probadas ante ketokonazol y solo un 9.8% de las muestras probadas con terbinafina (Grafica 2). En la gráfica 2 también se visualiza que no se obtuvo una MFC en todas las muestras sino de solo un porcentaje. Por ejemplo del 100% de las muestras solo se obtuvo la MFC en un 14.7% en el caso de anfotericina B, esto se debe en gran parte a que la MIC también fue la MFC. Se obtuvo una mayor cantidad de muestras con MFC por parte de las muestras analizadas con ketoconazol (48% de las muestras), a diferencia de anfotericina B, la MIC no fue la MFC en la mayoría de las muestras. Para fluconazol no se logró obtener una inhibición completa en ninguna muestra analizada de *C. albicans* con los rangos de antimicótico propuestos por el CLSI.



Los datos que se muestran en rojo en la gráfica 3 ejemplifican que no logro obtenerse una MIC debido a que no se obtuvo inhibición completa aun en la mayor concentración probada del antimicótico. En anfotericina B la MIC de las muestras de *C. albicans* analizadas se determinó como 0,658 µg/mL, en la gráfica 3 se multiplica esta concentración por 10 con el fin de hacer grafica la comparación, en este antimicótico la MIC tuvo una concentración mayor a la cepa de referencia (0.5 µg/mL). Con los antimicóticos nistatina, terbinafina y ketoconazol se obtuvieron rangos de inhibición muy parecidos (10.14 µg/mL, 12.45 µg/mL y 14.2 µg/mL, respectivamente), aunque como se observó en la gráfica 2, en nistatina se logró inhibición de todas las muestras y en terbinafina y ketoconazol la MIC se determinó solo con el 9.8% y 53.9% respectivamente de las muestras a las cuales se observó una inhibición completa con los rangos de concentración de antimicótico propuestos por el CLSI. La cepa de referencia de *C. albicans*, en nistatina se determinó una MIC de 8 µg/mL. En terbinafina la cepa de referencia de *C. albicans* no tuvo una inhibición completa. Aunque en ketoconazol la cepa de referencia de *C. albicans* tuvo una MIC de 16 µg/mL. Para fluconazol no se obtuvo ninguna inhibición completa (grafica 2) dentro del rango de las concentraciones propuestas por el CLSI, la máxima concentración de fluconazol empleada para la experimentación fue de 64 µg/mL (grafica 3).

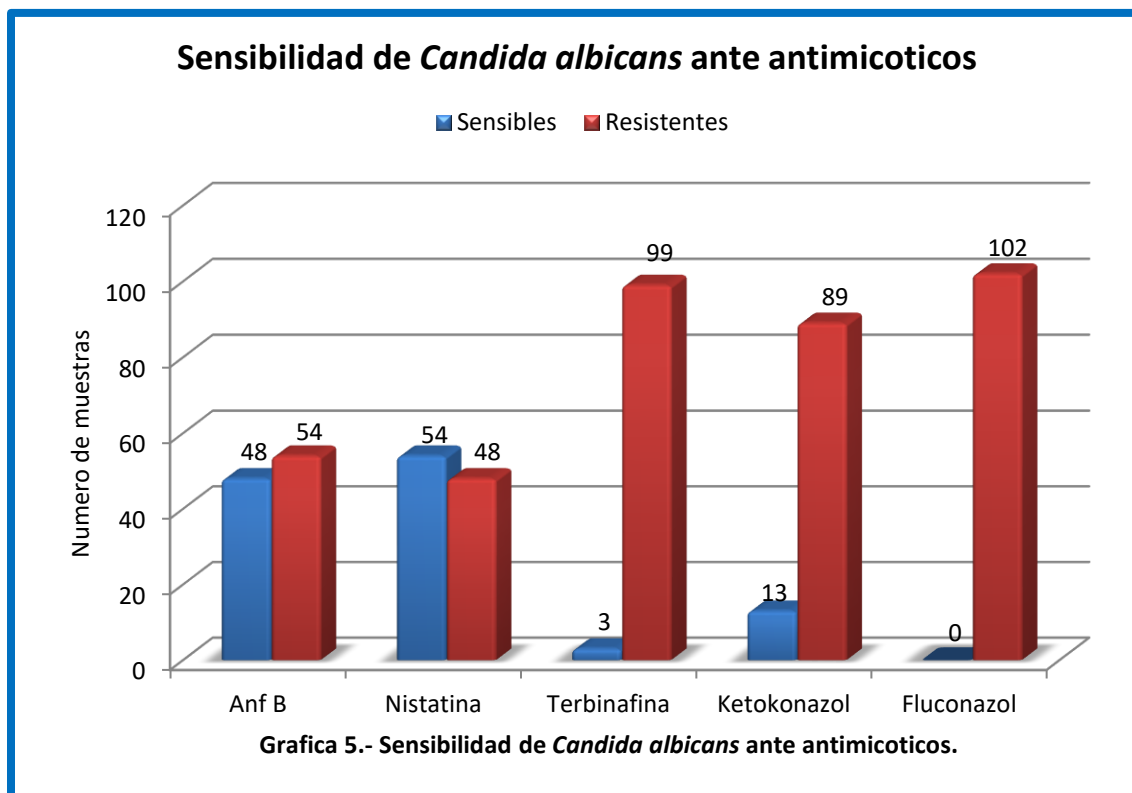


Comparando anfotericina B tanto en la gráfica 3 y gráfica 4, se observa que sube casi por el doble su MFC (1.367  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a comparación de su MIC (0,658  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en muestras analizadas y cepas control (MFC de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y MIC de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para nistatina su MFC es igual a su MIC en la cepa de referencial, pero si se eleva la MFC (14.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en las muestras analizadas en comparación de la MIC (10.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se encuentra en terbinafina una diferencia significativa entre la MIC y MFC de las muestras analizadas, pero la cantidad de muestras de las cuales se obtuvieron estos datos (solo del 9.8% de las muestras analizadas) es insuficiente para lograr esta determinación. La MFC de terbinafina (9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y ketoconazol (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se encuentra marcado de color rojo en la gráfica 4 debido a que es un valor obtenido solo de 2 y 1 muestras respectivamente, la mayoría de las muestras de las que se obtuvo MIC y se buscó obtener una MFC resulto en que la concentración mayor empleada del antimicótico no cumplió como fungicida, se puede observar en el anexo V. La MFC de la cepa de referencia es superior a la concentración de antimicóticos probada propuesta por el CLSI tanto en terbinafina y ketokonazol. Debido a que no se logró obtener una inhibición completa de las muestras analizadas con fluconazol, no fue posible tampoco determinar una MFC para este antimicótico.





Para determinar si existe sensibilidad o resistencia se calculó de acuerdo a la MIC obtenida, se observa que de los antimicóticos probados a las mismas concentraciones *Candida albicans* tiene mayor sensibilidad por anfotericina B y nistatina (gráfica 5), se obtiene también una inhibición por parte de terbinafina y ketokonazol, pero con menor eficacia a esa concentración. En fluconazol no se observó actividad a esas concentraciones.



En las imágenes 7 -11 se puede ver como se evaluó la inhibición que se logró obtener a través de los diversos antimicóticos a distintas concentraciones, con la anfotericina B se aprecia con mejor detalle (Imagen 7), debido que fue este el antimicótico donde se obtuvo un rango mayor de inhibición desde los 16 – 0.5 µg/mL, con la nistatina (Imagen 8) puede compararse con la anfotericina B que su rango de inhibición fue menor, pero que logra obtenerse una constante inhibición. El ejemplo que se aprecia con la terbinafina (Imagen 9) demuestra que existe inhibición con este antimicótico, pero que no fue así con todas las muestras analizadas. Con ketokonazol (Imagen 10) y fluconazol (Imagen 11), no es apreciable a simple vista la inhibición completa de *Candida albicans*, pero si logra observarse una disminución en el crecimiento de *Candida albicans*, reforzando la idea que probando estos antimicóticos a concentraciones más altas podría lograr verse una inhibición al 100 de *Candida albicans*.

C+ 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.12 0.06 0.03 C- [µg/mL]

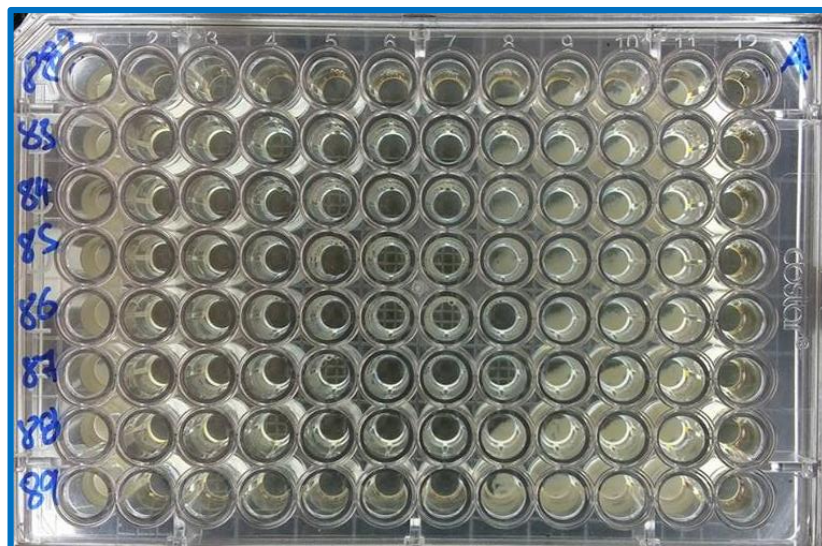


Imagen 7.- Ensayo de sensibilidad *in vitro* de *C. albicans* ante antifúngico (Anfotericina B). C+: Control de crecimiento positivo, C-: Control de crecimiento negativo. Las concentraciones de Anfotericina B se muestran en la parte superior de la imagen [µg/mL].

C+ 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0.12 0.06 0.03 C- [µg/mL]

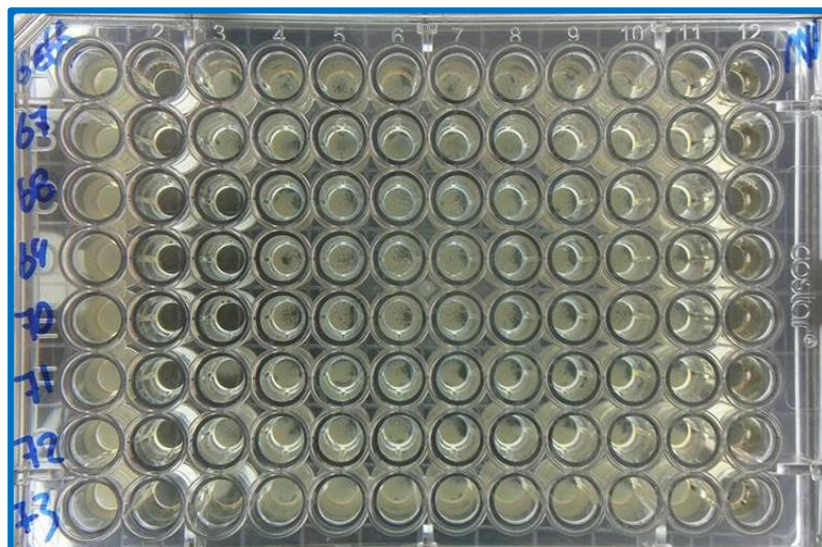
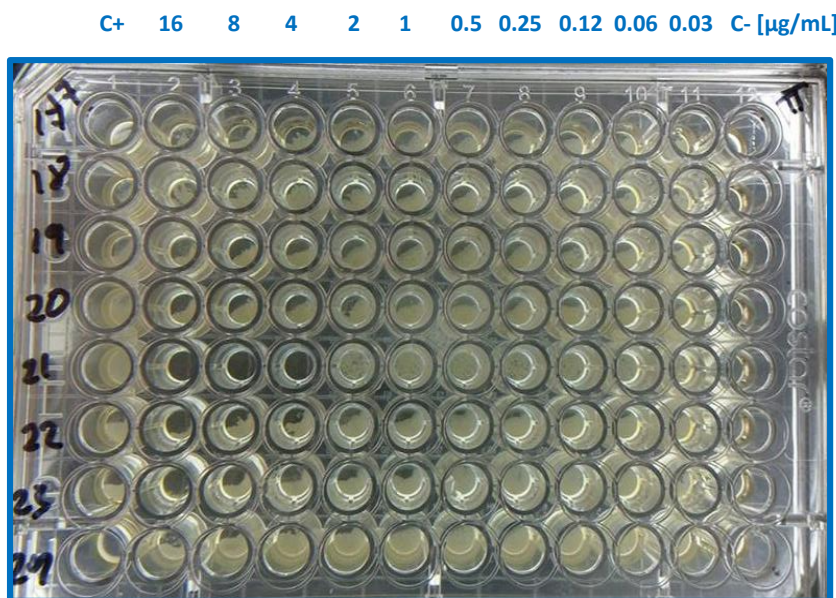
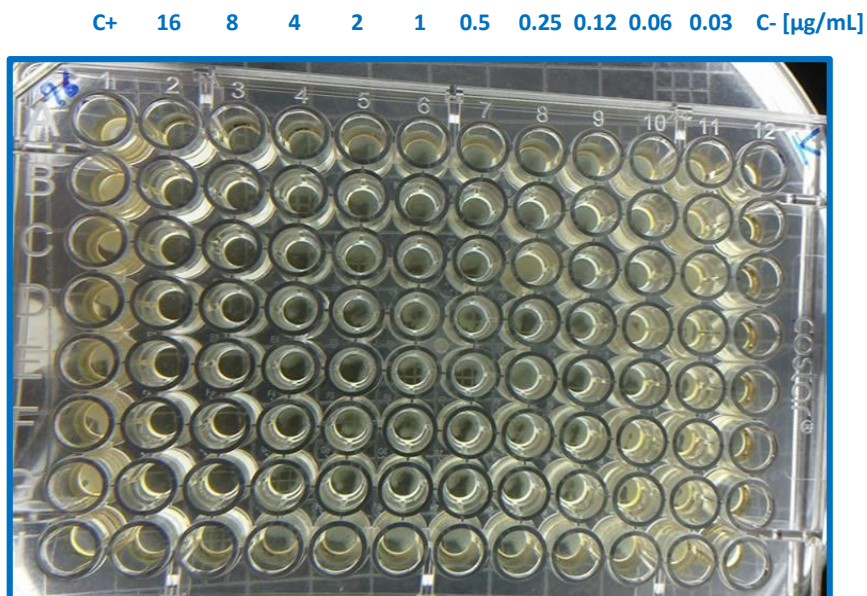


Imagen 8.- Ensayo de sensibilidad *in vitro* de *C. albicans* ante antifúngico (Nistatina). C+: Control de crecimiento positivo, C-: Control de crecimiento negativo. Las concentraciones de Nistatina se muestran en la parte superior de la imagen [µg/mL].

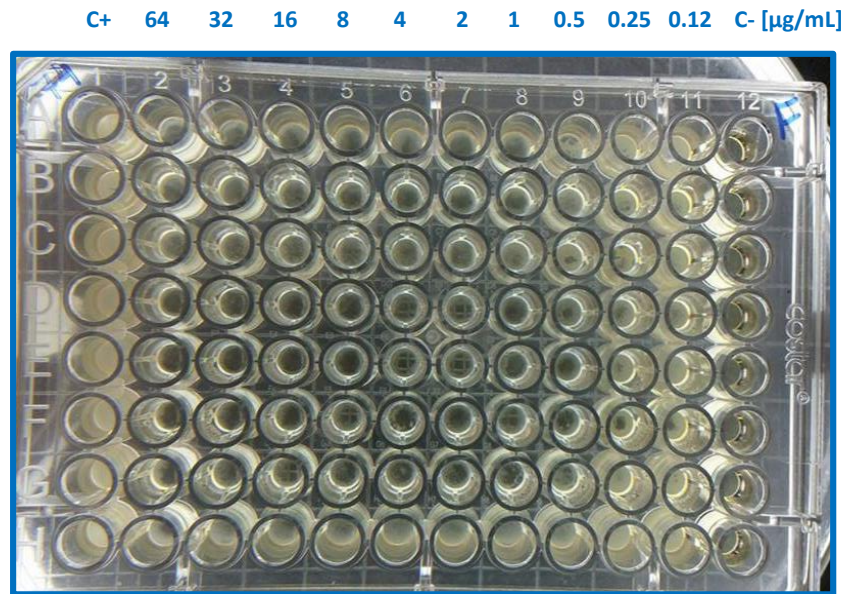


**Imagen 9.-** Ensayo de sensibilidad *in vitro* de *C. albicans* ante antifúngico (Terbinafina). C+: Control de crecimiento positivo, C-: Control de crecimiento negativo. Las concentraciones de Terbinafina se muestran en la parte superior de la imagen [ $\mu\text{g/mL}$ ].



**Imagen 10.-** Ensayo de sensibilidad *in vitro* de *C. albicans* ante antifúngico (Ketokonazol). C+: Control de crecimiento positivo, C-: Control de crecimiento negativo. Las concentraciones de Ketokonazol se muestran en la parte superior de la imagen [ $\mu\text{g/mL}$ ].





**Imagen 11.-** Ensayo de sensibilidad *in vitro* de *C. albicans* ante antifúngico (Fluconazol). C+: Control de crecimiento positivo, C-: Control de crecimiento negativo. Las concentraciones de Fluconazol se muestran en la parte superior de la imagen [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].

## DISCUSIÓN

Las especies de *Candida* representan aproximadamente el 75% de todas las infecciones fúngicas invasivas en pacientes hospitalizados, y son cinco especies que causan aproximadamente el 95% de todas estas infecciones; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. La candidiasis es una enfermedad que ha sido reportada en cada continente. La variación ocurre en los tipos de candidiasis que se refleja en la mayoría de las condiciones subyacentes que predispone al paciente a esta enfermedad. Por ejemplo, en países con una muy alta incidencia de pacientes con virus de inmunodeficiencia (VIH/SIDA), las formas esofágicas y orofaríngeas de candidiasis representan los tipos más comunes. Las muestras analizadas incluyendo ambos géneros de pacientes son en su mayoría obtenidas de cultivo faríngeo (34), de los cuales son 19 femeninos y 13 masculinos. En pacientes con VIH/SIDA especialmente, candidiasis de mucosas, o OPC, permanece como uno de los tipos más comunes de infección en todo el mundo, pero especialmente en grupos de edad de pacientes pediátricos y adultos mayores en países desarrollados. La OPC es la más frecuente infección fúngica en niños y adolescentes en Sudáfrica quienes son VIH positivos. Un nivel de 13.8% de candidiasis oral se observó entre 87 individuos pediátricos de 5 orfanatos en Sudáfrica. En Gabón, la prevalencia de VIH/SIDA fue del 27.7% en un hospital de la población, y entre los pacientes afectados, la OPC (37%) fue la más común de todas las infecciones oportunistas. Un estudio en Tanzania demostró que *C. albicans* (84.5%) fue la especie más común aislada de 250 pacientes infectados con VIH con OPC. En china, la causa líder de enfermedades orales en pacientes con VIH/SIDA es candidiasis (66%) de todos los pacientes. En India, la causa líder de infecciones oportunistas en pacientes con VIH/SIDA es candidiasis (88%). Estos datos sirven para enfatizar que en ciertas condiciones, las tasas de candidiasis son las más altas entre las poblaciones de pacientes. Además, la OPC no se ha erradicado de ningún lugar. (Baily, 1997; Calderone, 2012).

El espectro de candidiasis de mucosas además incluye enfermedad vaginal. De las muestras que se analizaron después de las obtenidas de cultivo faríngeo, se obtuvieron de exudado vaginal (30, lo que equivale al 29.4% de las muestras analizadas o el 46.2% de las muestras femeninas). La estimación que se tiene sobre la incidencia de candidiasis vaginal causada por especies de *Candida* afecta alrededor del 70% a 75% de mujeres jóvenes de edad fértil (más frecuentemente); del 40% a 50% de estos individuos tendrán una reaparición, y 5% a 8% desarrollara candidiasis vaginal recurrente, definido como cuatro o más episodios por año. En cuanto a genero las muestras analizadas son en mayor proporción muestras femeninas (65) y de muestras masculinas (15). Se ha encontrado que entre los factores predisponentes para generar candidiasis vaginal se encuentra la diabetes, el embarazo o la administración de antibacterianos que alteran la flora microbiana, el pH ácido local o secreciones, por lo cual el tracto urinario femenino por sus características fisiológicas y químicas favorece la colonización de bacterias y hongos patógenos. Además por parte ocupacional se favorece más la aparición de esta enfermedad en mujeres que en hombres, debido a que quienes mantienen las manos húmedas por largos periodos, factor predisponente para candidiasis, llegan a ser más mujeres que hombres. Cabe resaltar que entre las existen muestras analizadas de algunas se desconoce el género y ubicación anatómica de obtención (16) (Baily, 1997; Calderone, 2012).

Las 102 muestras de *C. albicans* analizadas fueron probadas ante 5 antimicóticos empleando las concentraciones y metodologías sugeridas por el CLSI, esta metodología obtuvo rangos de inhibición visible completa en algunos antimicóticos (se observó una inhibición completa del 100% de muestras en anfotericina B y nistatina, del 53.9% en ketokonazol y 9.8% en terbinafina) pero fue insuficiente para encontrar una inhibición completa visible de algunas muestras en algunos antimicóticos (en fluconazol no se logró visualizar una inhibición completa a los rangos de antimicótico trabajados). De las muestras analizadas donde hubo una MIC se buscó la MFC, encontrándose en relación al total de las muestras analizadas un resultado para el 14.7% en anfotericina B, nistatina 10.8%, terbinafina 9.8%, ketokonazol 48%, pero fluconazol de la cual no se obtuvo MIC tampoco pudo obtenerse una CMF (0%).

Los fármacos antifúngicos que son actualmente usados en tratamiento para pacientes de candidiasis incluyen los polienos anfotericina B (AmpB), azoles y las equinocandinas. Estos compuestos se unen a la membrana de ergosterol y perturban funciones de la membrana, inhiben la síntesis de ergosterol (un proceso esencial para el crecimiento del hongo) (azoles), o inhiben la síntesis de  $\beta$ -1, 3 glucano de la pared celular (equinocandinas). La estandarización de las pruebas de sensibilidad antifúngica especialmente con respecto a especies de *Candida* ha llevado a la vigilancia activa de la resistencia. De ningún modo hay un acuerdo completo sobre la importancia de la resistencia a los fármacos y la aparición de candidiasis. (Calderone, 2012).

La MIC de anfotericina B encontrada fue de 0.658  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la cepa de referencia, determinándose que de las 102 muestras analizadas 48 fueron sensibles ante anfotericina B y 54 fueron resistentes. La MFC de anfotericina B que se encontró fue de 1.367  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de solo 15 muestras de las 102 de las cuales se obtuvo MIC y de 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la cepa de referencia. Aunque en puntos de corte interpretativos de anfotericina B no han sido bien establecidos, los aislamientos de *Candida* con MICs  $>1\mu\text{g}/\text{ml}$  son inusuales y posiblemente resistentes o, por lo menos, pueden requerir altas dosis de anfotericina B para un tratamiento óptimo (Calderone, 2012).

Comparadas con *C. albicans*, es ahora evidente que *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. orthopsilosis*, *C. kefyr*, *C. lipolytica* y *C. rugosa* exhiben disminución de susceptibilidad ante anfotericina B. *C. krusei* se ha observado una disminución de la susceptibilidad ante anfotericina B (MIC<sub>90</sub>, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). *C. lusitanae*, tiene capacidad para desarrollar rápidamente resistencia ante anfotericina B durante el curso de la terapia. Si bien diferentes especies de *Candida* se encuentran sensibles o resistentes ante anfotericina B, es evidente que es necesaria la identificación de la especie y no solo del género para iniciar un tratamiento, además de la realización de un antibiograma, debido a que para las distintas especies se exhibe distinta susceptibilidad. La resistencia a anfotericina B puede desarrollarse secundariamente durante el tratamiento, y pruebas repetidas de susceptibilidad a Anfotericina B son recomendadas para pacientes en terapia con anfotericina B con infecciones persistentes ya sea con cualquiera de las especies. (Calderone, 2012).

La nistatina es uno de los principales agentes antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal y bucofaringea y es quizás el más utilizado en Cuba; sin embargo, con frecuencia

se presentan casos de mujeres que padecen vaginitis crónica por *Candida*, las cuales responden solo parcialmente al tratamiento antifúngico tópico y pueden tener ataques recurrentes severos. Muchas veces las razones de esta recurrencia no llegan a precisarse, lo que hace sugerir un fallo terapéutico no inherente al hongo o la aparición de cepas con sensibilidad disminuida o resistente a este fármaco. Para nistatina se encontró una MIC de 10.14  $\mu\text{g/mL}$ , y de 8  $\mu\text{g/mL}$  de la cepa de referencia, determinándose como 54 muestras sensibles y 48 resistentes. Solo 5 muestras de las 102 de las cuales se obtuvo MIC obtuvieron una MFC de 14.4  $\mu\text{g/mL}$  y de 8  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa de referencia. Un estudio de susceptibilidad *in vitro* frente a nistatina para 104 cepas aisladas de lesiones de candidiasis bucofaríngea de 97 pacientes VIH/sida. Encontró que todas las cepas se comportaron como sensibles a la nistatina, con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) menores que 16  $\mu\text{g/mL}$ . De las otras especies, *Candida lusitanae* mostró el mayor valor absoluto de MIC de nistatina para una cepa (4 $\mu\text{g/mL}$ ). Zida y col. encontraron una tasa de resistencia a la nistatina del 6,3% para todos los aislamientos clínicos. Un estudio en Cuba necesitaron de concentraciones menores o iguales de 8  $\mu\text{g/mL}$  para inhibir el 100 % de las cepas de *C. albicans* (Fernandez, 2001; Santa, 2010; Zida, 2017).

La nistatina, al igual que los compuestos azólicos, es considerada por muchos como el medicamento de elección para el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal y aunque la prescripción de medicamentos en las mujeres embarazadas requiere de un cuidadoso análisis entre la necesidad de tratamiento de la madre y el riesgo de daño fetal, en la actualidad se considera este antifúngico como un fármaco seguro durante todos los períodos del embarazo y la posibilidad de algún tipo de afectación en el feto es muy poco probable. En concordancia con lo observado por Hussain-Qadri y col. que determinaron las MICs de la nistatina frente a aislamientos de *Candida spp.* mediante un macrométodo de dilución en caldo, donde 99 % de los aislamientos fue inhibido por concentraciones menores o iguales que 8  $\mu\text{g/mL}$ . En muchos casos las pacientes se automedican, lo que implica que siguen un desarrollo inadecuado de tratamiento y esto conduce, a su vez, a fallos terapéuticos. Existen pocos trabajos publicados sobre la sensibilidad *in vitro* a la nistatina, por lo que los criterios de resistencia y sensibilidad son aspectos que no están claramente definidos. Según varios autores, la aparición de resistencia *in vitro* a la nistatina es un evento que aparece con muy poca frecuencia (Fernandez, 2001; Santa, 2010; Zida, 2017).

Para terbinafina se encontró una MIC de 12.45  $\mu\text{g/mL}$ , y de 16  $\mu\text{g/mL}$  de la cepa de referencia. Determinando que de las 102 muestras analizadas, 3 fueron sensibles y 99 resistentes. La MFC es de 9  $\mu\text{g/mL}$  de solo 2 muestras de las 10 muestras de las cuales se obtuvo MIC y de 16  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa de referencia siendo la concentración más alta empleada no se logró determinar la MFC para la cepa de referencia, la cual debe ser superior a los 16  $\mu\text{g/mL}$ . Para definir la actividad anti-*Candida* de la terbinafina, un estudio probó el fármaco contra 350 aislamientos clínicos nuevos y cepas de referencia mediante el uso las directrices del CLSI M27-A. De los cuales 259 aislamientos clínicos, obtuvieron una MIC<sub>90</sub> de 4  $\mu\text{g/mL}$ . Se ha observado que la terbinafina es muy activa contra *C. parapsilosis* y ha mostrado actividad potencialmente interesante contra aislamientos de *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. humicola* y *C. lusitanae*. Además se ha visto que no es activa contra los aislamientos de *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis* en ese ensayo. *Cryptococcus laurentii* y

*Cryptococcus neoformans* fueron altamente susceptibles a la terbinafina. Las MIC de *C. albicans* y *C. parapsilosis* son compatibles con la eficacia clínica conocida de la terbinafina en infecciones cutáneas, mientras que la relevancia clínica de sus actividades frente a las otras especies aún no se ha determinado. La terbinafina es activa *in vitro* contra una amplia gama de hongos patógenos, incluidos dermatofitos, mohos, hongos dimórficos y algunas levaduras, pero estudios anteriores indicaron que el fármaco tenía poca actividad contra *Candida albicans*. Por el contrario, los estudios clínicos han demostrado que la terbinafina tópica y oral es activa en la candidiasis cutánea y las infecciones de las uñas de *Candida*. (Ryder, 1998)

Para ketokonazol se encontró una MIC de 14.2 µg/mL y de 16 µg/mL de la cepa de referencia. Obteniéndose 13 muestras sensible y 89 resistentes. La MFC es de 8 µg/mL de una sola muestra de la cual se pudo determinar su MFC de las 55 muestras de las cuales se pudo obtener una MIC. Los valores MIC del ketoconazol en un estudio del antimicótico se evaluaron en 66 muestras de *Candida albicans*, estas cepas se aislaron de 26 pacientes infectados por VIH-1 con candidiasis recurrente oral. Cada episodio de candidosis oral observado en estos pacientes fue tratado oralmente con ketoconazol (200 mg/día) hasta la desaparición clínica de las lesiones. Los valores de MIC más frecuentes fueron 20 µg/mL y 10 µg/mL, observados en 37 y 19 aislamientos respectivamente. Solo las cepas de cinco pacientes mostraron cambios en su susceptibilidad al ketoconazol. Este hecho podría indicar que una cepa diferente causa la reaparición posterior de las lesiones orales, en lugar de la selección de fármacos de las cepas fúngicas resistentes. Estos resultados enfatizan el papel de las características del hospedador en la aparición de infecciones por *Candida*, señalando la falla progresiva de la respuesta inmunológica como el factor más importante responsable de la recurrencia de la candidosis oral durante la infección por VIH-1 (Bruatto, 1992).

Con respecto al ketoconazol, Coelho y col, encontraron valores de MIC entre 32 y 64 µg / mL para la mayoría de las muestras. Los niveles plasmáticos de este antifúngico varió de 1 a 8 µg / ml, mostrando, por lo tanto, que la mayoría de las muestras (88,9%) presentan resistencia "in vitro" a la misma. Ahí no se observaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras de VIH positivo y negativo pacientes. Resultados similares fueron obtenidos por Maffei y col, quienes aplicaron la misma técnica (Coelho, 2012)

Uno de los principales descubrimientos de las últimas décadas en el campo de los antifúngicos fue el desarrollo de nuevos azoles, principalmente fluconazol. Con una alta eficacia contra levaduras, especialmente *Candida albicans*, y baja toxicidad, este fármaco revolucionó el enfoque terapéutico de la candidiasis y posibilitó el concepto de profilaxis. Aunque para fluconazol no se pudo obtener una inhibición completa entre las 102 cepas analizadas ni la cepa de referencia, la concentración mayor usada de este antimicótico fue de 64 µg/mL concentración recomendada por el CLSI, se considera que las 102 muestras fueron resistentes, por lo cual no pudo determinarse ni la MIC ni la MFC. Para hacer una segunda evaluación se sugiere adicionar al antibiograma concentraciones mayores a 64 µg/mL. Debido a que según lo observado en las placas de microtitulación (Imagen 11) se encuentra una disminución del crecimiento a mayor concentración empleada. Sin embargo, varios años de uso extensivo de fluconazol pueden haber sido responsables por el desarrollo de



resistencia a Fluconazol en *Candida spp.*, resistencia que ha sido bien caracterizada en *C. albicans*. Oxman y col. encontraron que entre los aislamientos resistentes a fluconazol identificados en dos hospitales de los EE. UU., *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* representaron el 48% de las cepas resistentes a Fluconazol. A medida que la epidemiología de la candidemia cambia para incluir más instancias de especies de CNCA, también se ha vuelto crucial caracterizar la resistencia a fluconazol en estas especies. Se han observado varios mecanismos que implican genes de la ruta de biosíntesis de ergosterol; otros implican transportadores de fármacos, cambios en la ploidía y pérdida de heterocigosidad (Baily, 1997; Berkow, 2017).

Muchos aislamientos clínicos de *C. albicans* han identificado varias mutaciones que se asociaron con una mayor expresión del gen ERG11, lo que genera una mayor producción de ergosterol, el objetivo de los azoles, diluyendo la actividad del fluconazol y da como resultado resistencia. En muchos casos, el nivel de sobreexpresión es mínimo o se observa en combinación con otras mutaciones de resistencia, lo que dificulta la evaluación del impacto directo de dicha sobreexpresión en el fenotipo resistente. Aunque se ha observado que la sobreexpresión de ERG11 es independiente de UPC2 (un factor de transcripción de clúster de zinc que se induce al agotarse el ergosterol, lo que resulta en actividad transcripcional constitutiva y aumento de la producción de Erg11p) en algunos aislamientos de *C. albicans*. Las mutaciones puntuales en la región codificante del gen ERG11 afectan la susceptibilidad al fluconazol, conduciendo a sustituciones de aminoácidos que alteran la estructura de la proteína y hacen que la unión de los azoles sea menos eficaz. Se han descrito más de 140 sustituciones en ERG11 de *C. albicans*, las sustituciones afectan principalmente en el sitio catalítico predicho de la enzima, lo que indica que esta enzima es muy permisiva para cambios estructurales. Varios estudios han identificado una mayor expresión de ERG11 en aislamientos clínicos resistentes a fluconazol en comparación con aislamientos sensibles (Baran, 2001; Berkow, 2017).

El desarrollo de vías de derivación dentro de la biosíntesis de esteroides también puede ocurrir y dar como resultado resistencia al fluconazol. Considerado un mecanismo infrecuente de resistencia, esto se debe principalmente a mutaciones de pérdida de función en ERG3. La inactivación de la enzima que codifica este gen permite a la célula eludir la producción de esteroides metilados tóxicos en presencia de los azoles y minimiza el efecto del Fluconazol sobre la célula. (Berkow, 2017).

Además una falla en las proteínas de transporte del fármaco antifúngico da como resultado la acumulación del mismo intracelularmente, generando resistencia. En *Candida spp.*, Hay dos clases principales de proteínas de flujo: la clase principal de superfamilia facilitadora (MFS) y la familia de casete de unión a ATP (ABC). Las proteínas de transporte ABC tienen una amplia especificidad de sustrato y dependen de la hidrólisis de ATP para obtener energía. De las 28 proteínas ABC individuales predichas en *C. albicans*, dos están bien caracterizadas y definitivamente ligadas a la resistencia a fluconazol (Cdr1p y Cdr2). Muchos aislamientos resistentes al fluconazol sobreexpresan CDR1 y CDR2, y la eliminación de uno o ambos genes da como resultado la reducción de esta resistencia (Berkow, 2017).

Los miembros de la clase MFS tienen un rango más estrecho de especificidad de sustrato. Hay aproximadamente 95 proteínas de transporte MFS predichas en el genoma de *C. albicans*. Solo Mdr1p, se ha relacionado con la resistencia a fluconazol; se ha observado sobreexpresión de MDR1 en aislamientos clínicos resistentes de *C. albicans* y la eliminación de MDR1 de aislamientos que sobreexpresan reduce la resistencia (Berkow, 2017).

También se han identificado mecanismos adicionales de resistencia a fluconazol que implican amplificación génica. Un estudio analizó el número de copias de genes en aislamientos clínicos de *C. albicans* y determinó que los cromosomas aneuploides eran siete veces más comunes en aislamientos resistentes a fluconazol que en comparación con aislamientos susceptibles. También se ha informado en *C. albicans* que la formación de isocromosomas del cromosoma 5 (chr5) se asocia con la resistencia al fluconazol. Los aumentos o reducciones en la resistencia podrían vincularse, respectivamente, con la ganancia o pérdida de este isocromosoma chr5, ya que la duplicación de este segmento concede copias adicionales de ERG11, UPC2 y TAC1 (Berkow, 2017).

Se han reportado en aislamientos clínicos de *C. albicans* casos de pérdida de heterocigosidad (LOH) de regiones genómicas específicas asociadas a los genes implicados en los mecanismos de resistencia a fluconazol, con mutaciones puntuales que surgen en el estado heterocigótico y evolucionan a homocigosis (Berkow, 2017).

Es bastante raro encontrar un aislamiento con resistencia de alto nivel atribuible a un único mecanismo, con mucha frecuencia, es la combinación de mecanismos múltiples, adquiridos por etapas a lo largo del tiempo, lo que da lugar a una resistencia de alto nivel. Esto se observa clínicamente en pacientes sometidos a tratamiento con fluconazol a largo plazo. La importancia funcional de las mutaciones individuales varía en términos de impacto sobre la resistencia. (Berkow, 2017).

Por ahora se considera que *C. albicans* permanece susceptible a fluconazol. Aunque varios datos demuestran que a pesar de que el fluconazol permanece activo contra muchas de las más comunes especies de *Candida*, 13 de las 31 especies identificadas en una encuesta global exhibieron una disminución en la susceptibilidad de este azol en el orden en el que se ha visto con las especies resistentes conocidas *C. glabrata* y *C. krusei*. Tendencias longitudinales de un periodo de 7 años del 2001 al 2007, muestra tendencias no consistentes hacia un incremento en la resistencia al fluconazol entre las especies más comunes de *Candida* incluyendo *C. albicans* sobre una escala global. (Calderone, 2012).

Las especies de *Candida* pueden desarrollar resistencia a los agentes antifúngicos a través de una variedad de mecanismos que pueden dar como resultado el fracaso del tratamiento. Los hongos generalmente no tienen mecanismos similares a los de las bacterias para transferir genes de resistencia extracromosómica, y la transformación de hongos diploides con ADN es generalmente más difícil que con las bacterias. Se conoce relativamente menos sobre el impacto de la resistencia antifúngica adquirida (a través de mutaciones genéticas) sobre la virulencia en especies de *Candida*, en bacterias y hongos, la aparición de resistencia antimicrobiana resulta en una desventaja

competitiva contra el organismo susceptible al medicamento dentro del huésped. Una hipótesis alternativa para explicar la similitud en el resultado de las infecciones debidas a especies de *Candida* resistentes y susceptibles a los antimicóticos es que las especies resistentes a los hongos son generalmente menos virulentas que las cepas susceptibles a los antimicóticos. Graybill y col. examinaron esta cuestión en *C. albicans* al probar la virulencia de aislamientos sensibles y resistentes a azoles en un modelo de ratón, pero no encontraron una relación directa entre la susceptibilidad de fluconazol y la virulencia en su modelo (Calderone, 2012).

La mayoría de los pacientes con micosis invasivas probablemente fracasan debido a los factores subyacentes del hospedador, en lugar de la resistencia adquirida al fármaco. El concepto de resistencia clínica en pacientes con candidemia se refiere a la interacción de los factores específicos del huésped y del patógeno que afectan el resultado clínico. Los factores que están directamente relacionados con el fármaco (dosis inadecuada, interacciones medicamentosas y toxicidad) con frecuencia pueden corregirse, muchos factores relacionados con el hospedador pueden requerir de días a semanas antes de que se observe mejoría, si es que lo hace. Una de las causas por las cuales falla el tratamiento en las especies de *Candida* es la resistencia mediada por las biopelículas que estas especies generan. Las biopelículas de *C. albicans* requieren concentraciones antifúngicas hasta 1.000 veces más altas que las células planctónicas. Curiosamente, los exopolisacáridos de la biopelícula, incluido el B-1,3 D-glucano, pueden unirse directamente a la anfotericina B y al fluconazol, lo que limita drásticamente su penetración y actividad contra las células incrustadas en la matriz de polisacáridos. (Calderone, 2012)

Aunque la terapia antifúngica es importante, su impacto sobre la supervivencia de los pacientes con candidemia a menudo se ve eclipsado por la gravedad de la enfermedad subyacente del huésped. Muchos médicos consideran que la candidemia es un indicador más de un empeoramiento del estado clínico o un evento terminal asociado con una enfermedad subyacente incurable en lugar de una complicación independiente que causa la muerte del paciente. Con la disminución del número de autopsias realizadas en la mayoría de las instituciones, se ha vuelto cada vez más difícil evaluar la verdadera mortalidad atribuible de la candidiasis invasiva y su correspondiente impacto de la resistencia a los hongos. Morrell y col. informaron que el riesgo de mortalidad por todas las causas en el hospital para pacientes con candidemia aumentó de 11.1% a 33.1% si el tratamiento antifúngico no se inicia dentro de las 12 h de un hemocultivo positivo. (Calderone, 2012).

Hasta la última década las técnicas para la prueba de susceptibilidad antifúngica no estaban bien estandarizadas, lo que dificulta la evaluación de la relación entre los resultados de la prueba MIC y el resultado clínico. El CLSI desarrolló y publicó métodos de referencia para pruebas de susceptibilidad de levaduras que culminaron con los métodos de microdilución M27-A3 y prueba de disco M44-A, así como puntos de interrupción de susceptibilidad interpretativa para triazoles y equinocandinas contra especies de *Candida*. En general, los métodos estandarizados y los criterios interpretativos proporcionan tasas similares de correlación clínica que se logran con la prueba de susceptibilidad antibacteriana. El tiempo medio para obtener los resultados de susceptibilidad fue significativamente menor cuando las pruebas se realizaron en el sitio de infección (3 días) versus

fuera del sitio de infección (7 a 10 días); además, inicialmente se requirieron de 3 a 4 días para la identificación de especies. En consecuencia, muchos médicos no reciben información sobre la prueba de susceptibilidad antifúngica hasta casi el final de un curso de tratamiento completo para la candidemia no complicada, lo que respalda el sentimiento de que la MIC antifúngica suele ser una abreviatura de "información sin sentido para los médicos". Los problemas asociados con el diagnóstico oportuno y la detección temprana de resistencia a los antifúngicos en las especies de *Candida* no han mejorado en las últimas dos décadas, ya que los enfoques actuales de pruebas aún se basan principalmente en hemocultivos, que pueden ser negativos hasta en un 50% de los pacientes. (Calderone, 2012)

Estas limitaciones han impulsado el interés en el uso de ensayos no basados en cultivo para la detección de antígenos de *Candida* en suero, así como técnicas moleculares que pueden distinguir más rápidamente a *C. albicans* de especies de CNCA. Aunque el ensayo PNA-FISH (Hibridación de ácido nucleico peptídico - fluorescencia in situ) proporciona información presuntiva sobre las especies más rápidamente que la prueba convencional de tubo germinativo en suero o medios de identificación especializados como CHROMagar, el ensayo es considerablemente más caro. Por lo tanto, la mayoría de los laboratorios aún confían en una batería de pruebas bioquímicas que se ofrecen en la tira API-20C para identificar *Candida* a nivel de especie. (Calderone, 2012)

Se han desarrollado varios ensayos que implican la detección y/o amplificación de ácidos nucleicos fúngicos usando un rango de formatos de detección de amplicones (secuencia basada, PCR en tiempo real y amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos) para mejorar la detección e identificación de patógenos del hemocultivo o directamente de muestras de sangre del paciente y muestras clínicas. Sin embargo, el potencial de diagnóstico de los ensayos de PCR realizados en hemocultivos positivos puede ser limitado, ya que la identificación molecular puede preceder al cultivo solo en unas pocas horas. Los ensayos de PCR específicos de *Candida* para cultivo positivo tendrían una mayor utilidad clínica si pudieran identificar simultáneamente los patógenos y los mecanismos incipientes de resistencia a los hongos. La nueva tecnología de sonda molecular ha abierto posibilidades en el diseño del ensayo que podrían detectar no solo los hongos patógenos sino también los mecanismos de resistencia antifúngica que resultan de los cambios genéticos en los genes del sitio diana del fármaco, aneuploidía cromosómica o elementos genéticos que controlan la expresión del flujo del medicamento. (Calderone, 2012)

Estos ensayos tendrían el mayor impacto clínico si pudieran realizarse directamente en sangre o muestras clínicas en lugar de esperar cultivos positivos. El enfoque óptimo para usar métodos moleculares, así como una serie de factores técnicos que requieren estandarización para la detección de mecanismos de resistencia en infecciones asociadas con baja carga microbiana, aún no se ha resuelto. Sin embargo, estos métodos podrían ser potencialmente rentables en un laboratorio de microbiología clínica de gran volumen que presta servicios a hospitales con grandes poblaciones en riesgo de infecciones fúngicas invasivas (Calderone, 2012).

## CONCLUSIONES.-

Aunque se ha observado que *C. albicans* presenta resistencia ante fluconazol en varios estudios, se recomienda aumentar la concentración de este antimicótico a lo recomendado por el CLSI, para comprobar esta resistencia, además de que el Fluconazol es el antimicótico que más se utiliza para el tratamiento de esta micosis, y tiene poca toxicidad para el ser humano.

Si en estudios posteriores se comprueba que *C. albicans* ha adquirido resistencia ante Fluconazol, debe proponerse la suspensión de este antimicótico como tratamiento para infecciones de candidemia, debido a que solo ocasionara falla terapéutica en pacientes de alto riesgo.

Se deben realizar pruebas de sensibilidad ante antimicóticos cuando se sospecha o diagnostica una infección por *C. albicans*, para no tratar a pacientes con un antimicótico al cual es resistente y fallar en su terapia.

Aun cuando el tratamiento con Anfotericina B es de los antimicóticos más tóxicos a emplear, sigue presentando una respuesta excelente ante *C. albicans*, se debe considerar su empleo, ahora favorecido a una disminución de toxicidad con las nuevas presentaciones lipídicas.

La realización de un antibiograma debe considerarse como una prueba a realizar durante el tratamiento de *C. albicans*, para favorecer un buen tratamiento, para modificar la dosis o incluso el antimicótico empleado, para no generar resistencia en *C. albicans*.

Deben realizarse pruebas a mayores concentraciones que las propuestas por el CLSI para el uso de terbinafina, debido a que si presento en algunas muestras inhibición pero muy cercana a las concentraciones más altas de este antimicótico.

Si bien ketokonazol y fluconazol son considerados fungiesaticos, se prueba en ketokonazol que una dosis elevada puede emplearse como fungicida.

Los mecanismos moleculares no siempre explican por completo la resistencia de alto nivel observada en muchos aislamientos clínicos, y esto resalta la importancia de la investigación continua empleando técnicas microbiológicas.

Finalmente, a medida que la candidemia se expande incluyendo nuevas especies, la detección de resistencia en estas especies será de suma importancia. Podría decirse que los mecanismos presentes en *C. albicans* ampliamente estudiados también serían posibles en estas especies. En el futuro, será esencial utilizar un enfoque con tecnologías de nueva generación y análisis más rápidos y confiables para identificar los determinantes de la resistencia al fluconazol en las especies emergentes.

## REFERENCIAS

Abi-Said, D., e. Raad, H. (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis* 24: 1122-1128

Agvald- Ohman, C., C. Edlund (2007). Invasive candidiasis in long term patients at a multidisciplinary intensive care unit: *Candida* colonization index, risk factors, treatment and outcome. *Scand. J. Infect. Dis* 40\_ 145-153.

Almirante, B., Rodriguez, B., Almeda, J., Gimenez, P., Morgan., (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *JA. Clin. Microbiol.* 43: 1829-1835.

Antoniadou, A. Torres, R. Lewis J., (2003) *Canidemia* in a tertiary care center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. *Medicine* 82:309-321

Arenas R. (2011) *Micología Medic Ilustrada*, México: Mc Graw Hill.

Baddley, J. Smith, S. Moser A., (2001) Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a university hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 39: 199-201

Baily, G. Wit, J. Burnie, P. (1997) *Candida inconspicua*, a fluconazole – resistant pathogen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 33:137-139.

Baran, J. Buckatira, B. Khatib, R., (2001). *Candidemia* before and during the fluconazole era: prevalence, types of species, and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *Scand. J. Infect. Dis.* 33: 137-139

Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist.* 2017 Jul 31;10:237-245. doi: 10.2147/IDR.S118892. eCollection 2017.

Bilgen, H., E. Ozek, V. Korten, B. Ener, D. Molbay. (1995). Treatment of systemic neonatal candidiasis with fluconazole. *Infection* 23: 394

Bonifaz A. (2015) *Micología Medica Basica*, Mexico: Mc Graw Hill. 5° Edición, pp 377-408

Brooks G., Carroll K., Morse S., Mietzner T., (2011) *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología Médica*, Mexico: Mc Graw Hill. 25° Edicion, pp 647 – 649, 655 – 660

Bruatto M, Marinuzzi G, Raiteri R, Sinicco A. Susceptibility to ketoconazole of *Candida albicans* strains from sequentially followed HIV-1 patients with recurrent oral candidosis. *Mycoses.* 1992 Jan-Feb;35(1-2):53-6.

Calderone R., Clancy C., (2012) *Candida and Candidiasis*, Segunda Edicion, ASM Press, Washington, DC, pp 345-469

Castañón Olivares L. (2012) Candidiasis ó Candidosis, Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Castrillon Rivera, L.E., Palma Ramos, A., y Padilla Desgarenes, M. (2005) Factores de virulencia de Candida sp. Revista Mexicana de Dermatología, 49 (1), pp 12-27

Coelho I., Claudino L., Chavasco J., Birman E., Gambale W., Aleva N., Dias A., Paula C., Chavasco J., Antifungal susceptibility evaluation of Candida albicans isolated from buccal lesions of hiv-positive and HIV-negative patients, 2012.

Douglas J, I., (2002) Medical importance of biofilms in Candida infections. Revista iberoamericana de Micología. 19: 139-143

Elke Peters, & Hans J Nelis, (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods. 72, 157-165

Fernández C., Echemendía Y., Cartaya T., Mendoza D., Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de Candida spp INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ" REV CUBANA MED TROP 2001;53(3):194-8

Franca E, Andrade C, Furantelo L, & Serpa R. (2011) Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic swithing of a clinical strain of Candida tropicalis and biofilm formation by variant phenotypes. Micron, 42, 726-732

Jagath L, Kadurugamuwa (2003) Direct Continuous Method for Monitoring Biofilm infection in a Mouse Model. Infection and Inmunity. 71 (2) 882-890

Lopez M. Ruben, & Mendez T. (2012) Micología medica procedimientos para el diagnostico del laboratorio. Mexico, Trillas. Pp 91-98

Pierce C., Vila T., Romo J., Montelongo-Jauregui D., Wall G., Ramasubramanian A., Lopez-Ribot J., The Candida albicans Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function, J Fungi (Basel). 2017 March; 3(1): doi: 10.3390/jof3010014

Pranab K. Mukherjee. (2004). Candida biofilm resistance. Drug Resistance Updates. 7, 301-309

Quindos G, & Villar M. (2009). Actividad de la micafungina contra las biopelículas de Candida. Revista iberoamericana de Micología, 26 (1), 49-95.

Ramage G, & Craig Williams. (2013) The clinical importance of fungal biofilms. Advances in applied microbiology 84, 27-83.

Ramage G., & Saville, S. (2005) Candida biofilms: an update. American Society for Microbiology. 4 (4), 633-638.

Romero H., Torres J. Actividad antifúngica in vitro del ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *Capsulatum*, *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(1):24–28

Ryder NS, Wagner S, Leitner I. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 May;42(5):1057-61.

Santa Anna LM, Díaz Suárez LA, Illnait Zaragoza MT, Perurena Lancha MR, Cantelar de Francisco N, Fernández Andreu CM, Martínez Machín G. [Susceptibility to nystatin of oral *Candida* isolates and its correlation with the response to treatment]. *Rev Cubana Med Trop.* 2010 Sep-Dec;62(3):237-44.

Zida A, Yacouba A, Bamba S, Sangare I, Sawadogo M, Guiguemde T, Kone S, Traore LK, Ouedraogo-Traore R, Guiguemde RT. In vitro susceptibility of *Candida albicans* clinical isolates to eight antifungal agents in Ouagadougou (Burkina Faso). *J Mycol Med.* 2017 Jul 25. pii: S1156-5233(16)30134-2. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.001



ANEXO

I. DISPOSICION DE RESIDUOS

Diagrama de origen	Residuo	Descripción del residuo	Manejo del residuo
Diagrama 1	R1	Antimicóticos con DMSO y medio SDC	Desinfectar los residuos antes de su disposición de acuerdo a la norma para su, esterilización o incineración. NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Los residuos de DMSO han de tratarse como residuos peligrosos. Colocar los residuos en vertedero controlado de acuerdo con las disposiciones de las autoridades locales en materia de residuos.
	R2	Antimicóticos con DMSO y medio SDC	
Diagrama 2	R3	Cajas Petri con medio SDA y levaduras de <i>C. albicans</i>	
	R4	Medio YPD, PBS y levaduras de <i>C. albicans</i>	
	R5	Tubos de ensaye con medio SDC y levaduras de <i>C. albicans</i>	
	R6	Tubos de ensaye con medio SDC y levaduras de <i>C. albicans</i>	
Diagrama 3	R7	Tubos con medio SDC y antimicóticos	
	R8	Medio SDC y levaduras de <i>C. albicans</i>	
	R9	Medio SDC	
Diagrama 4	R10	Placas de microtitulación con levaduras de <i>C. albicans</i> , antimicóticos	
	R11	Cajas Petri con medio SDA y levaduras de <i>C. albicans</i>	

II. PREPARACION DE REACTIVOS

Medio/Reactivo	
Medio Agar SDA (1L)	65g Sabouraud Dextrose Agar Difco™
	1L de agua
Medio YPD (1L) pH= 7.4	10g Yeast Extract Difco™
	20g Peptone Bacteriological Technical Difco™
	20g Dextrose BD Bioxon
PBS (200mL)	1 tableta
PBS 10X (500mL) pH= 7.4	80g NaCl
	2g KCl
	14.4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Medio SDC (1L) pH= 5.6	40g Dextrosa BD Bioxon
	5g Peptona de carne BD Bioxon
	5g Peptona de caseína BD Bioxon

III. IDENTIFICACION Y ORIGEN DE MUESTRA

Clave HRT	Clave L17	Genero	Lugar de origen de muestra
2	L17-1-15	Desconocido	Desconocido
3	L17-2-15	Desconocido	Desconocido
6	L17-3-15	Desconocido	Desconocido
11	L17-4-15	Desconocido	Desconocido
106	L17-5-15	Masculino	Faríngeo
147	L17-6-15	Femenino	Faríngeo
198	L17-7-15	Femenino	Vaginal
216	L17-8-15	Femenino	Vaginal
241	L17-9-15	Femenino	Vaginal
267	L17-10-15	Desconocido	Faríngeo
274	L17-11-15	Masculino	Faríngeo
298	L17-12-15	Femenino	Faríngeo
328	L17-13-15	Femenino	Vaginal
481	L17-14-15	Desconocido	Desconocido
498	L17-15-15	Femenino	Vaginal
524	L17-16-15	Femenino	Vaginal
534	L17-17-15	Femenino	Vaginal
543	L17-18-15	Femenino	Faríngeo
614	L17-19-15	Femenino	Vaginal
624	L17-20-15	Femenino	Vaginal
625	L17-21-15	Femenino	Faríngeo
650	L17-22-15	Femenino	Faríngeo
683	L17-23-15	Femenino	Faríngeo
704	L17-24-15	Femenino	Urocultivo
731	L17-25-15	Desconocido	Secreción
786	L17-26-15	Desconocido	Desconocido
796	L17-27-15	Femenino	Faríngeo
820	L17-28-15	Femenino	Faríngeo
929	L17-29-15	Femenino	Vaginal
939	L17-30-15	Femenino	Secreción
940	L17-31-15	Femenino	Secreción
941	L17-32-15	Femenino	Secreción
943	L17-33-15	Masculino	Faríngeo

947	L17-34-15	Masculino	Secreción
953	L17-35-15	Femenino	Vaginal
956.1	L17-36-15	Femenino	Vaginal
956.2	L17-37-15	Femenino	Vaginal
957	L17-38-15	Femenino	Vaginal
963	L17-39-15	Femenino	Vaginal
971	L17-40-15	Masculino	Faríngeo
982	L17-41-15	Masculino	Faríngeo
984	L17-42-15	Masculino	Faríngeo
988	L17-43-15	Femenino	Vaginal
1018	L17-44-15	Femenino	Secreción
1171	L17-45-15	Femenino	Urocultivo
1201	L17-46-15	Masculino	Faríngeo
1269	L17-47-15	Femenino	Faríngeo
1440	L17-48-15	Femenino	Faríngeo
1575.1	L17-49-15	Femenino	Vaginal
1575.2	L17-50-15	Femenino	Vaginal
1586	L17-51-15	Femenino	Faríngeo
1621	L17-52-15	Femenino	Faríngeo
2350	L17-53-15	Femenino	Urocultivo
2404	L17-54-15	Femenino	Faríngeo
2422	L17-55-15	Femenino	Vaginal
2465	L17-56-15	Femenino	Vaginal
2527	L17-57-15	Masculino	Faríngeo
2965	L17-58-15	Desconocido	Desconocido
3105	L17-59-15	Masculino	Faríngeo
3218.1	L17-60-15	Femenino	Secreción
3800	L17-61-15	Femenino	Vaginal
3812	L17-62-15	Masculino	Faríngeo
4034	L17-63-15	Femenino	Vaginal
4349	L17-64-15	Femenino	Vaginal
4459	L17-65-15	Masculino	Faríngeo
4533	L17-66-15	Femenino	Faríngeo
4537	L17-67-15	Femenino	Faríngeo
4730	L17-68-15	Masculino	Faríngeo
4812	L17-69-15	Femenino	Faríngeo
4814	L17-70-15	Desconocido	Desconocido
4853	L17-71-15	Femenino	Urocultivo
4853.1	L17-72-15	Desconocido	Urocultivo

5376	L17-73-15	Femenino	Vaginal
5507	L17-74-15	Desconocido	Secreción
5507.2	L17-75-15	Desconocido	Desconocido
5509	L17-76-15	Masculino	Secreción
5674	L17-77-15	Femenino	Faríngeo
6321	L17-78-15	Femenino	Vaginal
6920	L17-79-15	Femenino	Urocultivo
7120	L17-80-15	Desconocido	Desconocido
7661	L17-81-15	Femenino	Vaginal
7760	L17-82-15	Femenino	Urocultivo
8750.1	L17-83-15	Femenino	Urocultivo
8750.2	L17-84-15	Femenino	Urocultivo
8881	L17-85-15	Femenino	Faríngeo
9072	L17-86-15	Femenino	Faríngeo
9085	L17-87-15	Masculino	Faríngeo
9154	L17-88-15	Femenino	Vaginal
9289	L17-89-15	Femenino	Vaginal
9653	L17-90-15	Femenino	Vaginal
9655	L17-91-15	Desconocido	Desconocido
9676	L17-92-15	Desconocido	Desconocido
9676.1	L17-93-15	Desconocido	Secreción
9686	L17-94-15	Desconocido	Desconocido
9686.1	L17-95-15	Femenino	Vaginal
9708	L17-96-15	Desconocido	Faríngeo
9753	L17-97-15	Desconocido	Desconocido
9763	L17-98-15	Femenino	Desconocido
9895	L17-99-15	Femenino	Urocultivo
9895.1	L17-100-15	Desconocido	Desconocido
2509095.1	L17-101-15	Desconocido	Desconocido
2509095.2	L17-102-15	Femenino	Desconocido

IV. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) DE LAS MUESTRAS

Muestra	Anf B		Nistatina		Terb		Ket		Flu	
	Promedio MIC (µg/mL)	S/R	Promedio MIC (µg/mL)	S/R	Promedio MIC (µg/mL)	S/R	Promedio MIC (µg/mL)	S/R	Promedio MIC (µg/mL)	S/R
1	0.38	S	6	S	>16	R	>16	R	>64	R
2	0.38	S	6	S	>16	R	16	R	>64	R
3	0.38	S	8	S	>16	R	4	S	>64	R
4	0.50	S	8	S	>16	R	16	R	>64	R
5	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
6	0.50	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
7	0.38	S	12	R	16	R	>16	R	>64	R
8	0.38	S	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
9	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
10	1.00	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
11	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
12	0.50	S	8	S	>16	R	16	R	>64	R
13	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
14	0.50	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
15	0.75	R	12	R	>16	R	16	R	>64	R
16	0.75	R	12	R	6	S	4	S	>64	R
17	0.63	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
18	0.75	R	8	S	4	S	16	R	>64	R
19	0.75	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
20	0.38	S	8	S	>16	R	16	R	>64	R
21	0.50	S	6	S	2.5	S	8	S	>64	R
22	0.63	S	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
23	0.38	S	6	S	>16	R	>16	R	>64	R
24	0.50	S	6	S	>16	R	>16	R	>64	R
25	0.38	S	6	S	>16	R	16	R	>64	R
26	0.63	S	4	S	>16	R	>16	R	>64	R
27	0.75	R	4	S	>16	R	16	R	>64	R
28	0.75	R	4	S	>16	R	16	R	>64	R
29	1.00	R	4	S	>16	R	16	R	>64	R
30	0.75	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
31	1.00	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R

32	0.63	S	4	S	>16	R	>16	R	>64	R
33	1.13	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
34	0.63	S	8	S	>16	R	16	R	>64	R
35	0.63	S	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
36	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
37	0.75	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
38	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
39	0.75	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
40	0.38	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
41	0.75	R	16	R	>16	R	>16	R	>64	R
42	0.75	R	12	R	>16	R	16	R	>64	R
43	0.63	S	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
44	1.00	R	12	R	>16	R	16	R	>64	R
45	0.75	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
46	1.13	R	6	S	>16	R	>16	R	>64	R
47	0.50	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
48	0.50	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
49	1.00	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
50	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
51	0.50	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
52	0.50	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
53	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
54	0.63	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
55	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
56	0.75	R	16	R	>16	R	16	R	>64	R
57	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
58	0.75	R	16	R	>16	R	>16	R	>64	R
59	0.50	S	16	R	>16	R	>16	R	>64	R
60	0.75	R	16	R	>16	R	>16	R	>64	R
61	0.50	S	8	S	>16	R	16	R	>64	R
62	1.00	R	16	R	>16	R	16	R	>64	R
63	0.75	R	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
64	0.50	S	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
65	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
66	0.38	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
67	0.50	S	16	R	>16	R	16	R	>64	R
68	0.50	S	8	S	>16	R	>16	R	>64	R
69	0.38	S	8	S	16	R	16	R	>64	R
70	0.50	S	8	S	>16	R	8	S	>64	R

71	0.38	S	12	R	16	R	16	R	>64	R
72	0.38	S	12	R	16	R	>16	R	>64	R
73	0.38	S	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
74	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
75	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
76	1.00	R	16	R	>16	R	8	S	>64	R
77	0.50	S	16	R	>16	R	8	S	>64	R
78	0.50	S	16	R	16	R	1	S	>64	R
79	1.00	R	16	R	>16	R	16	R	>64	R
80	1.25	R	16	R	>16	R	8	S	>64	R
81	0.75	R	16	R	>16	R	16	R	>64	R
82	0.75	R	4	S	>16	R	12	S	>64	R
83	0.75	R	10	S	>16	R	12	S	>64	R
84	0.75	R	10	S	16	R	12	S	>64	R
85	0.75	R	12	R	>16	R	12	S	>64	R
86	0.63	S	10	S	>16	R	16	R	>64	R
87	0.63	S	10	S	>16	R	>16	R	>64	R
88	0.75	R	12	R	>16	R	16	R	>64	R
89	0.75	R	12	R	>16	R	>16	R	>64	R
90	0.75	R	16	R	16	R	12	S	>64	R
91	0.63	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
92	0.50	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
93	0.38	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
94	0.38	S	10	S	>16	R	>16	R	>64	R
95	0.75	R	10	S	>16	R	>16	R	>64	R
96	0.75	R	4	S	>16	R	16	R	>64	R
97	0.63	S	4	S	>16	R	16	R	>64	R
98	0.38	S	12	R	>16	R	16	R	>64	R
99	0.75	R	16	R	>16	R	16	R	>64	R
100	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
101	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
102	0.75	R	8	S	>16	R	16	R	>64	R
103R	0.50	S	8	S	>16	R	16	R	>64	R
<b>X</b>	<b>0.6581</b>		<b>10.1373</b>		<b>12.4500</b>		<b>14.2000</b>		<b>0.0000</b>	



V. CONCENTRACION MINIMA FUNGICIDA DE LAS MUESTRAS

Muestra	Anfotericina B CMF (µg/mL)	Nistatina CMF (µg/mL)	Terbinafina CMF (µg/mL)	Ketokonazol CMF (µg/mL)	Fluconazol CMF (µg/mL)
1		8			
3	0.5				
6	1				
7			>16		
10	2				
11				>16	
12				>16	
13				>16	
14				>16	
15		>16		>16	
16			16	8	>64
17				>16	
18			>16	>16	
20				>16	
21			2	>16	
25				>16	
27				>16	
28				>16	
29				>16	
31		16			
34				>16	
36				>16	
37	1				
38	1			>16	
40	1				
42				>16	
44				>16	
47				>16	
52	1				
56				>16	
59		>16			
61	2			>16	
62				>16	
63		16			
64		16			
65		16		>16	

67	1			>16
69			>16	>16
70				>16
71			>16	>16
72			>16	
75	2			
76		>16		>16
77	1			>16
78			>16	>16 >64
79				>16
80		>16		>16 >64
81				>16
82				>16
83	2			>16
84			>16	>16
85				>16
86				>16
90		>16	>16	>16 >64
92				>16
93	1			>16
96	2			>16
97				>16
98				>16
99	2	>16		>16
100				>16
101				>16
102				>16
103R	1			>16