



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA VALIDACIÓN DEL USO DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA (NAC) AL 3 % E HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH) AL 10% COMO MUCOLÍTICOS EN MUESTRAS DE PACIENTES CON MICOSIS PULMONARES EN EXÁMENES EN FRESCO Y RECUPERACIÓN DE AGENTES ETIOLÓGICOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JULIO CÉSAR CHÁVEZ RUIZ



CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE: **Profesor:** Gutiérrez Ramos Abel

VOCAL: **Profesor:** Bonifaz Trujillo José Alexandro

SECRETARIO: **Profesor:** Araiza Santibáñez Javier

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Genaro Jiménez Reyes

2° SUPLENTE: **Profesor:** Francisco Javier Díaz García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Hospital General De México “Dr. Eduardo Liceaga”

ASESOR DEL TEMA

José Alexandro Bonifaz Trujillo

SUSTENTANTE

Julio César Chávez Ruiz

ÍNDICE

1. Resumen del trabajo	3
2. Abreviaturas	4
3. Introducción	5
3.1 Planteamiento del problema.....	5
3.2 Justificación.....	5
3.3 Hipótesis.....	5
3.4 Objetivos	6
4. Antecedentes	7
4.1 Fisiología del pulmón	7
4.2 Vía, factores, estados, categoría de una micosis pulmonar	9
4.3 Agentes etiológicos y epidemiología	12
4.4 factores de defensa del tracto respiratorio	13
4.5 Principales micosis pulmonares por oportunistas	15
4.5.1 Aspergilosis.....	15
4.4.2 Candidosis	17
4.4.3 Criptococosis	19
4.4.4 Mucormicosis	20
4.4.5 Hialohifomicosis	21
4.6 Micosis por patógenos primarios.....	23
4.6.1 Coccidioidomicosis	23
4.6.2 Histoplasmosis	24
4.6.3 Paracoccidioidomicosis	26
4.7 N-acetil-L-cisteína (NAC).....	28
4.7.1 Propiedades químicas de la NAC	28
4.7.2 Síntesis de la NAC	28
4.7.3 Propiedades como mucolítico.....	28
4.7.4 Propiedades de la NAC	29
4.8 Procedimiento y características de la muestra	30
5. Procedimiento experimental	36
5.1 Metodología.....	36

5.2 Procedimiento.....	40
6. Resultados	45
6.1 Estadística descriptiva de los resultados	46
6.2 Kappa	55
6.3 Razón de momios	56
7. Discusión de resultados	60
8. Conclusiones	69
9. Anexo	70
9.1 Técnicas	70
9.1.1 Reactivos y materiales	72
9.1.2 Medos de cultivo	74
9.1.3 Hoja de recolección de datos	76
10. Bibliografía	77

1. RESUMEN DEL TRABAJO

Las micosis pulmonares aumentan en proporción a la cantidad de pacientes inmunocomprometidos en todo el mundo, para lograr una recuperación oportuna de los hongos a partir del material biológico de los pacientes, es importante el uso de un método eficaz que permita establecer su presencia en éste, así como su desarrollo *in vitro*, es por esto que se propone el uso y validación de un nuevo método con una solución de N-acetil-L-cisteína (NAC) al 3 %, debido a que contiene en su estructura un grupo tiol (SH) genera una acción mucolítica, esto permite la disolución y fluidificación de las muestras pulmonares viscosas, su carácter ácido favorece el desarrollo del hongo y su poder bacteriostático es una característica importante debido a que disminuye la microbiota habitual al igual que las bacterias patógenas que se encuentran en el tracto respiratorio superior, permitiendo el desarrollo y viabilidad del agente etiológico, mejorando su identificación para su diagnóstico y tratamiento. Las muestras pulmonares por lo general son muy viscosas, esto se debe a la gran cantidad de proteínas que contienen, principalmente mucina, para contrarrestar este inconveniente se utiliza KOH al 10 %, que por su característica fuertemente alcalina ayuda a degradar las proteínas dando como resultado una visión al microscopio de estructuras micóticas más clara, sin embargo, presenta el inconveniente de inhibir el desarrollo del agente etiológico, ya que esta sustancia cambia el pH óptimo del medio, lo que imposibilita el desarrollo *in vitro* del hongo y el diagnóstico correcto o bien genera información incompleta. Se realizará un estudio comparativo, experimental, descriptivo, analítico, transversal, a muestras pulmonares (esputo, lavado bronquial, líquido pleural, etc.) con los resultados comprobaremos si la solución de NAC al 3 % funciona de mejor manera en muestras con exceso de mucina o provenientes de muestras pulmonares tanto en examen en fresco como en el cultivo comparándolas contra el estándar de oro Hidróxido de potasio (KOH) al 10 %.

Palabras clave: *N-acetil-L-cisteína, hidróxido de potasio, mucolítico, micosis pulmonares.*

1. ABREVIATURAS

NAC: N-acetil-L-cisteína

ADS: Agar Dextrosa Sabouraud.

DP: Derrame Pleural.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

IRC: Insuficiencia Respiratoria Crónica.

KOH: Hidróxido de Potasio.

DMSO: Dimetilsulfóxido

LB: Lavado Bronquioalveolar.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SNC: Sistema Nervioso Central

TB: Tuberculosis.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

API: Aspergilosis pulmonar invasiva

TAC: Tomografía axial computarizada

IDR: Intradermorreacción

AR: Artritis reumatoide

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Planteamiento del problema

Las muestras pulmonares por lo general son muy viscosas, esto se debe a la gran cantidad de proteínas que contienen, principalmente mucina, este es un grave problema cuando se procesa la muestra, ya que los hongos se quedan atrapados en la red de proteínas y moco que existe en una muestra pulmonar lo que impide su visión y desarrollo, generando falsos negativos, las técnicas actuales como el hidróxido de potasio (KOH) al 10% impiden ofrecer resultados adecuados que permitan implementar un correcto diagnóstico y tratamiento ya que por su alcalinidad y efecto aclarante sólo permite observar estructuras micóticas en el estudio microscópico de forma aceptable, sin embargo no se puede adicionar al medio de cultivo puesto que inhibe el desarrollo de los microorganismos implicados.

3.2 Justificación

Se pretende utilizar y validar un nuevo método para mejorar la viabilidad y desarrollo de los hongos, con una solución de NAC al 3 %, que por sus características de tener un pH ácido y propiedades mucolíticas puede clarificar la muestra, es decir; disolver las proteínas de mucina, con esto; liberar las estructuras micóticas que impiden la visión y el desarrollo de los hongos, para su posterior identificación; además es bacteriostático, esto contribuye a disminuir la microbiota habitual junto con las bacterias patógenas que se encuentran en el tracto respiratorio superior, permitiendo un mejor desarrollo y viabilidad del hongo *in vitro* sin competencia de nutrientes en el medio de cultivo, ni contaminación bacteriana.

3.3 Hipótesis

Si el uso de NAC permite disolver las fibras de mucina, entonces será mejor la recuperación y sensibilidad que en muestras que no sean tratadas con agentes mucolíticos o en los que se utilice KOH al 10%.

3.4 Objetivo general

Validar el uso de NAC al 3% para disminuir la viscosidad de muestras con contenido excesivo de mucina, comprobar su efectividad mucolítica en exámenes en fresco y recuperación de agentes etiológicos, comparándolo con el uso de KOH al 10 %.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la efectividad del uso de NAC para estudios micológicos (exámenes en fresco y cultivos) en muestras pulmonares que se refleje en un diagnóstico más preciso.
- Implementar un nuevo método de procedimiento utilizando NAC para exámenes en fresco y cultivo en el diagnóstico micológico en muestras biológicas con alta viscosidad.
- Evaluar la viabilidad de los hongos, disminuyendo la contaminación bacteriana presente, al sembrar las muestras en medios rutinarios (agar dextrosa de Sabouraud (ADS) y ADS con antibióticos (Micosel ®) logrando así su reproducción para posterior identificación.

4. ANTECEDENTES

4.1 Aparato respiratorio

El aparato respiratorio consiste en las vías aéreas; nariz, faringe, laringe, tráquea, bronquios y pulmones. ⁽¹⁾

La laringe está constituida por cartílagos y ligamentos, la tráquea es un tubo fibromuscular flexible y dilatado de 10 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro reforzado por 16-20 cartílagos traqueales, los pulmones derecho e izquierdo son dos sacos aéreos cónicos semejantes a una esponja y están fijados por el pedículo del mediastino y sostenidos hacia abajo por el diafragma, están formados por muchas cavidades aéreas de pared delgada y pequeñas llamadas alveolos, en cuyas paredes se oxigena la sangre. Una membrana de revestimiento delgada y adherente llamada pleura ayuda a disminuir la fricción durante los movimientos respiratorios. ⁽²⁾

Cada pulmón tiene la forma de un semicono con vértice superior y una base inferior. Se pueden describir: tres caras: costal, mediastínica y diafragmática, Un vértice, dos bordes: anterior e inferior y una base o circunferencia, inferior. Cada pulmón está profundamente separado por las fisuras interlobares, que lo dividen en partes desiguales, los lóbulos pulmonares, tres en el pulmón derecho y dos en el izquierdo. ⁽³⁾

Las vías de aire del sistema respiratorio se dividen en dos zonas funcionales. La zona respiratoria es la región donde ocurre el intercambio de gases e incluye los bronquiolos respiratorios y los sacos alveolares terminales. La zona de conducción incluye todas las estructuras anatómicas a través de las cuales pasa el aire antes de llegar a la zona respiratoria. El aire entra en los bronquiolos respiratorios desde los bronquios terminales; estos reciben el aire proveniente de las vías respiratorias de mayor tamaño, que se forman a partir de ramificaciones sucesivas de los bronquios primarios derecho e izquierdo, estas vías son continuas con la tráquea, situada en el cuello enfrente del esófago, el aire entra en la tráquea desde la faringe, que es la cavidad detrás del paladar que recibe el contenido de las vías oral y nasal. Sin embargo, para que el aire salga o entre de la tráquea y los pulmones. Debe pasar por una abertura parecida a una válvula

llamada glotis entre los pliegues vocales. Los pliegues ventricular y vocal forman parte de la laringe, que controla la entrada de la tráquea. ⁽¹⁾.

El moco secretado por células de la estructura de la zona de conducción sirve para atrapar partículas pequeñas del aire que se inspira, desempeña una función de filtración por cilios que se mueven de una manera coordinada para mover el moco hacia la faringe donde puede ser expectorado. Como resultado hay una función de filtración, las partículas de más de 6 μm no entran a la zona respiratoria de los pulmones. ⁽¹⁾.

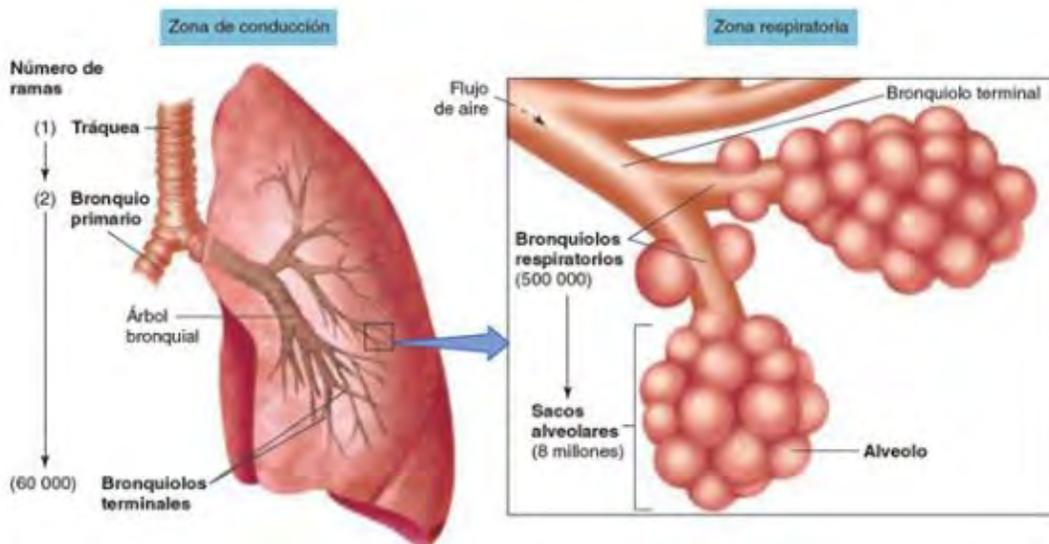


Figura 1.- Zonas de conducción y respiratoria del sistema respiratorio. Tomado de Stuart F. Fisiología humana. 12ª ed. México: McGraw-Hill; 2011.

El sistema respiratorio es el sitio de intercambio de gases entre el aire y la sangre, esto ocurre en las paredes de los alveolos respiratorios.

El termino respiración incluye tres funciones

1.- ventilación (respiración)

2.-intercambio de gases: entre el aire y la sangre en los pulmones y otros tejidos.

3.- utilización de oxígeno: por los tejidos de las reacciones liberadoras de energía de la respiración celular. ⁽¹⁾

4.2.1 –Vías de entrada de una infección micótica

La infección micótica pulmonar se produce de dos maneras, la más común es la inhalación de las esporas fúngicas y su posterior desarrollo en el parénquima pulmonar. Sólo aquellas esporas que sean capaces de llegar a los sacos alveolares se pueden implantar y atravesar para dar lugar a un proceso invasivo, siempre y cuando resistan los mecanismos de defensa del hospedero ⁽⁴⁾. Se le conoce como entrada exógena; sin embargo, en la microbiota normal del tracto respiratorio tenemos microorganismos como *Candida albicans* y *Geotrichum candidum* que en ciertas condiciones pueden actuar como oportunistas y generar una infección pulmonar, a este tipo de infección se les conoce como entrada endógena. ^(5,6).

4.2.2 Factores de riesgo asociados a micosis pulmonares

Las infecciones pulmonares por hongos levaduriformes y mohos son cada vez más comunes, Las micosis pulmonares son un grupo de enfermedades debidas de un modo primario o secundario a la infección por hongos. ⁽⁵⁾ Las formas primarias se caracterizan por la infección de los pulmones como primer punto de entrada, a través de la respiración. ⁽⁵⁾

Existen factores relacionados con el incremento en la frecuencia de las micosis pulmonares, en el caso de micosis oportunistas debe existir algún factor de riesgo que predisponga el desarrollo de estas patologías, estos factores son principalmente procesos debilitantes, inmunodeficiencias primarias o adquiridas que comprometen y debilitan la inmunidad celular. ^(4,5)

Clásicamente se han determinado dos categorías en las infecciones por hongos: una relacionada con la virulencia del microorganismo, por lo que se denominan patógenos primarios y otra relacionada con el estado de inmunidad del hospedero, que son los llamados hongos oportunistas. Cualquiera de estos puede infectar de manera oportunista a individuos afectados por alguna inmunosupresión. ^(7,8)

En la inmunodepresión debida a trasplantes de hígado, corazón y pulmón es frecuente el desarrollo de aspergilosis; en trasplantados renales, histoplasmosis e infección por mucorales (antes *Zygomycetes*) ahora *Glomeromycetes* ⁽⁵⁾, en enfermos con SIDA es más frecuente criptococosis, histoplasmosis, neumocistosis y paracoccidioidomicosis; pacientes con estados severos de neutropenia, candidosis. ^(7,9,10) Factores locales inherentes al propio pulmón, tales como ruptura de las barreras fisiológicas defensivas, los cuales favorecen las infecciones micóticas, por ejemplo, las cavidades residuales por tuberculosis (TB,) los quistes, la ventilación mecánica prolongada, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) severa, etc. ^(10,11)

ESTADOS RELACIONADOS CON MICOSIS PULMONARES

- Neutropenia severa.
- Tratamiento antineoplásico (citostáticos, radioterapia).
- Tratamiento esteroideo.
- Trasplantes de corazón, pulmón, hígado, riñón.
- Trasplantes de médula ósea.
- SIDA.
- Tratamiento antibiótico prolongado.
- Factores locales: cavidades, quistes, bulas, fístula, bronquiectasias, enfermedades fibroquísticas, EPOC, ventilados. ⁽¹⁰⁾

4.2.3- Categorías de las infecciones micóticas pulmonares

Las enfermedades causadas por hongos se clasifican dentro de dos categorías, que se basan en la interacción de dos factores: la virulencia inherente del hongo y la adecuación constitucional del hospedero. ⁽¹⁰⁾.

Los hongos patógenos primarios tienen la capacidad de vencer los mecanismos de defensa del hospedero, produciendo enfermedad en los individuos sanos (inmunocompetentes) y dando lugar a infecciones particularmente graves en los pacientes inmunodeprimidos.

Estos hongos se encuentran restringidos a áreas geográficas concretas y tienen la capacidad genética de modificar su morfología, metabolismo, estructura y forma de reproducción para adaptarse al ambiente hostil de los tejidos del hospedero, pasando de hongos filamentosos, (cuando crecen en su nicho ecológico natural), a levaduras (dimorfismo fúngico) o a otras estructuras no levaduriformes, como las esférulas de *Coccidioides posadasii* (dimorfo-bifásico), las esporas son inhaladas y penetran en el organismo. ^(4,5) Puesto que su implicación como agentes de micosis invasoras pulmonares es indudable, siempre que se aísle cualquiera de estos hongos en un enfermo con manifestaciones clínicas compatibles, el diagnóstico de infección fúngica se confirma. ⁽⁴⁾

Por el contrario, los hongos oportunistas tienen un poder patógeno escaso y sólo producen enfermedad en pacientes con alguna enfermedad de base que condicione un defecto del sistema inmunitario o de los mecanismos de defensa inespecíficos; son hongos ampliamente distribuidos por la naturaleza, siendo común el encontrar sus esporas en el aire o el suelo de cualquier lugar. La gran ubicuidad de estos hongos, dificulta el diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras oportunistas del tracto respiratorio inferior, siendo difícil diferenciar entre un verdadero proceso invasor, una colonización o una contaminación. Los criterios microbiológicos sólo proporcionan un diagnóstico de probabilidad o posibilidad de infección fúngica invasiva, requiriéndose para diagnóstico de seguridad la demostración histopatológica del hongo invadiendo el pulmón aunado con la patología clínica que represente alguna micosis invasiva. ⁽⁴⁾

4.3 Agentes etiológicos

La primera categoría incluye las infecciones causadas por hongos patógenos primarios: *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces* y *Paracoccidioides*, principalmente. El segundo grupo de infecciones se denomina oportunista debido a que los microorganismos que incluye tienen una virulencia inherente muy baja y que las defensas de los pacientes deben estar muy disminuidas antes de que se establezca la infección ⁽¹²⁾. El establecimiento de estas infecciones depende primero de que se haya alterado la resistencia del hospedero, más que del tamaño del inóculo ⁽¹²⁾.

La virulencia es una propiedad del patógeno, modulada por la susceptibilidad y resistencia del hospedero. El daño al hospedero puede resultar de la acción directa del patógeno o de la respuesta inmune del hospedero ⁽¹³⁾.

Principales agentes de micosis pulmonares invasivas. ⁽⁴⁾

Hongos patógenos primarios

- *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Coccidioides immitis* y *posadasii*
- *Paracoccidioides brasiliensis*
- *Talaromyces marneffe*
- *Sporothrix schenckii*

Hongos oportunistas

- *Aspergillus fumigatus*
- *Aspergillus flavus*
- *Pneumocystis jirovecii*
- *Lichtheimia corymbifera*
- *Rhizopus arrhizus*
- *Scedosporium apiospermum*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Fusarium solani*
- *Candida albicans* y *no albicans*
- *Geotrichum candidum* y *Saprochaete capitata* ^(4,5)

4.3.1 Epidemiología

La epidemiología de las infecciones fúngicas humanas ha evolucionado considerablemente en las últimas 4 décadas, debido a la creciente prevalencia de pacientes inmunocomprometidos en todo el mundo, como consecuencia de la propagación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como el aumento de la inmunosupresión debida a los tratamientos con quimioterapia para las neoplasias malignas, los trasplantes de órganos y células madre y el uso de agentes biológicos como el factor de necrosis tumoral (TNF).⁽⁴⁾

Estos factores han dado lugar a un riesgo de infecciones fúngicas oportunistas, incluyendo hongos que hasta ahora se consideraban poco virulentos, tanto hialinos como melanizados o dematiáceos.⁽⁶⁾

4.4 Factores de respuesta de tracto respiratorio

El tracto respiratorio funciona como una red para la distribución del aire que inspiramos, formada por tubos que se ramifican además de la disminución progresiva del diámetro hasta alcanzar los sacos alveolares, por lo que todo el tracto respiratorio actúa como una red que filtra esporas y las retiene, junto con la mayoría de las partículas que acompañan a los más de 8.000 litros de aire que diariamente se mueven por los pulmones. La anatomía del tracto respiratorio desempeña un papel muy importante en este mecanismo de defensa. En el tracto respiratorio superior se retienen las partículas de gran tamaño (de 10-20 μm), que impactan en la superficie mucosa nasofaríngea; a medida que el aire avanza por el tracto bronquial, se disminuye la velocidad, lo que junto a la reducción del diámetro de las vías aéreas y a las turbulencias que se producen en cada bifurcación bronquial, hace poco probable que las esporas puedan llegar a regiones distales sin mantener contacto con la pared de los bronquios y ser atrapadas en el sistema mucociliar. Existe una zona límite de penetración en función del diámetro que poseen las esporas,

de tal modo que sólo las esporas con un diámetro inferior a 3-4 μm pueden alcanzar los sacos alveolares y depositarse por sedimentación. ⁽⁴⁾.

Por otra parte, el moco protege la mucosa laríngea y traqueo bronquial frente a agresiones químicas, biológicas y físicas. Las células caliciformes de la mucosa y las glándulas submucosas segregan el moco para favorecer el drenaje, la actividad ciliar y la tos. Los expectorantes y mucolíticos favorecen la secreción de moco e incrementan el volumen de agua, lo que favorece su expulsión, ya que el contenido de esta es determinante en la visco-elasticidad del moco. El moco de las vías respiratorias es principalmente el producto de dos genes de mucina, el MUC5AC y el MUC5B1. ⁽¹⁴⁾ De estos genes se logran configurar las apoproteínas, que posteriormente son fuertemente glucosiladas y dan lugar a glucoproteínas maduras o mucinas con alto peso molecular, que confieren al moco sus características propiedades tipo gel o muy viscosas. ⁽¹²⁾. Estas mucinas se encuentran almacenadas en gránulos de células caliciformes que se pueden segregar rápidamente para proteger el epitelio de agresiones externas. En las enfermedades respiratorias crónicas, puede producirse una hipertrofia de las glándulas submucosas y una hiperplasia de células caliciformes, ^(14,15). Es por ello que en los últimos años la NAC se ha utilizado ampliamente en el campo de la medicina respiratoria como agente mucolítico. ⁽¹⁴⁾

4.5 Principales Micosis Pulmonares por oportunistas

4.5.1 Aspergilosis

Es la principal micosis pulmonar en pacientes críticos. ⁽¹⁶⁾ es un hongo distribuido en el suelo asociado a restos orgánicos en putrefacción, polvo y alimentos. También ha sido aislado en sistemas de ventilación de hospitales incluso en medios asépticos. Existen unas 200 especies, pero sólo algunas son patógenas para el hombre. Destacan las especies: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*. ^(17,18) Se adquieren por inhalación de conidios, pero la actividad de los macrófagos alveolares y neutrófilos es capaz de erradicarlas en situación de competencia inmune. La patología se desarrolla por deterioro de esa línea defensiva o, inhalación excesiva de conidios como ocurre en derrumbes, catástrofes graves o cercanías a zonas de construcción. ⁽¹⁾ Se describen diferentes formas clínicas pulmonares, entre las que destacan: aspergilosis pulmonar invasiva (API), aspergilosis crónica y aspergiloma. Las características del enfermo determinan el tipo y la gravedad de la enfermedad; estados de inmunosupresión grave y generalizada como la neutropenia prolongada, se asocian con cuadros invasivos agudos, mientras que estados de inmunosupresión moderados y localizados, como la presencia de cavernas, favorecen formas como el aspergiloma. ^(16,19)

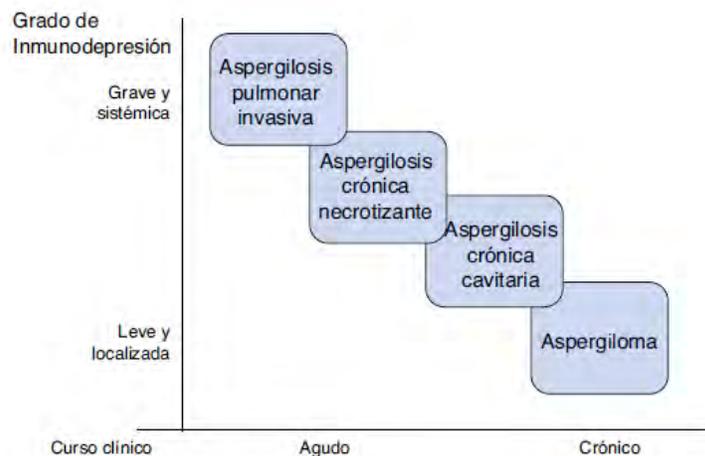


FIGURA 2. Relación entre el grado de deterioro inmunológico y el tipo de aspergilosis pulmonar. Tomado de Curbelo J, et al. Actualización sobre *Aspergillus*, *Pneumocystis* y otras micosis pulmonares oportunistas. Arch Bronconeumol. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2015.02.010>

- Aspergilosis pulmonar invasiva (API)

Entidad clínica poco frecuente y de mal pronóstico, cerca del 30% de los casos no se confirma y puede ser nosocomial, se asocia a pacientes inmunosuprimidos con neutropenia (menor a 500 neutrófilos/ mm^3).⁽⁵⁾ hay invasión vascular y tropismo vascular; ⁽¹⁶⁾ se invade el parénquima pulmonar con infiltrados basales y después se disemina. ⁽⁵⁾ Cursa con fiebre, tos, expectoración mucopurulenta, hemoptisis, disnea y dolor pleural. En las radiografías se observan lesiones nodulares periféricas múltiples o únicas, puede haber cavitación, áreas de vidrio despulido, se presenta el signo del halo que es un espacio de aire con zonas hemorrágicas alrededor de los nódulos. ^(5,16)

- Aspergiloma

Los aspergilomas son bolas fúngicas compuestas de hifas entrelazadas con el moco y rodeadas de fibrina, y detritus celular, estas se desarrollan en el interior de antiguas cavidades o espacios formados por tuberculosis, abscesos, carcinomas etc., clínicamente tiene un curso asintomático al principio y cuando se empieza a formar el aspergiloma los pacientes presentan tos; a veces mucopurulenta y hemoptisis recurrente; en la TAC (tomografía axial computarizada) y tomografías simples se observan opacidades en el lóbulo superior, a esta opacidad con un halo se le llama “signo de Monod” (media luna, espacio de aire creciente, bola fúngica), tiene un margen como si fuera un anillo o círculo de aire que rodea la masa fúngica. ^(5,16,17)

- Aspergilosis crónica

Es un proceso destructivo crónico e indolente habitualmente producido principalmente por *A. fumigatus*. En este caso existe invasión tisular del pulmón afectado y no precisamente de una cavidad preexistente. Se diferencia de la aspergilosis invasiva en su curso crónico, lenta evolución (meses o años) y en la ausencia de invasión vascular o diseminación hematogena a otros órganos. Afecta a personas de edad media o avanzada con patología respiratoria previa. ^(16,17)

También se ha descrito en pacientes moderadamente inmunodeprimidos (diabéticos, desnutridos, en tratamiento esteroideo, artritis reumatoide). La sintomatología es

inespecífica (fiebre, tos, expectoración, pérdida de peso), todo ello de larga evolución. La radiografía evidencia infiltrados fibrocavitarios en lóbulos superiores o segmentos apicales de lóbulos inferiores. ⁽¹⁷⁾

La clasificación más aceptada subdivide la aspergilosis pulmonar crónica en 3 formas: cavitaria, necrosante o necrotizante, y fibrosante. Las características del paciente y la eficacia de su sistema inmune determinan el subtipo clínico. ⁽¹⁶⁾

Los hongos principalmente aislados son *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. ^(16,17,19) El más frecuente es *A. fumigatus*, esto se debe a su virulencia y características ya que tiene conidios muy pequeños, con diámetros que se aproximan a 2-3 μm los cuales atraviesan alveolos pulmonares, además tiene factores de virulencia como adhesinas, hidrofobicidad, presencia de pigmentos de la pared celular con actividad antioxidante incluye defensas antioxidantes, como el manitol (captador de hidroxilo), catalasas (captador de H_2O_2) y superóxido dismutasas, así como enzimas, como fosfolipasas y proteasas que le ayudan a suprimir la función inmune y destruir tejidos. ⁽¹⁹⁾

4.5.2 Candidosis

Es producida por hongos levaduriformes endógenos, cosmopolitas, saprófitos de la piel y el tubo digestivo desde donde puede volverse invasivo en situaciones especiales (tratamiento antibiótico, corticoides e inmunosupresores). La especie más frecuente es *Candida albicans*, aunque otras también son encontradas frecuentemente y son potencialmente patógenas (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* o *Candida parapsilosis*). ^(5,18,20)

- Candidosis broncopulmonar

Es una enfermedad crónica y frecuente en pacientes inmunosuprimidos, se caracteriza por la presencia de tos constante con expectoración mucoide y gelatinosa, la parasitación se presenta en el árbol bronquial, la radiografía puede ser normal o en ocasiones se observa engrosamiento peribronquial, Radiológicamente se presenta como infiltrados bronconeumónicos y es propia de recién nacidos y prematuros. ^(5,17)

- Candidosis pulmonar

Es rara y menos frecuente, de un curso más agudo y grave, se caracteriza por un ataque al estado general del paciente y se presentan junto con padecimientos que abaten la respuesta inmune, el paciente presenta abundante tos con expectoración mucoide y sanguinolenta, disnea y fiebre nocturna, se llegan a afectar los lóbulos pulmonares y cursa con derrame pleural, la radiografía muestra opacidades en parche similares a las de una bronconeumonía y en casos graves se observan infiltrados que afectan todo el pulmón.

(5)

Es importante mencionar que *Candida spp.* es habitante normal del tracto respiratorio, llegan a encontrarse hasta en un 50% en pacientes con tuberculosis pulmonar, 25% en pacientes hospitalizados y 10% en individuos sanos. (4)

Por esto el diagnóstico de candidosis pulmonar es controvertido; aunque se aísla frecuentemente de las muestras de esputo y en la broncoscopia es difícil asegurar si un cultivo positivo es consistente con un patógeno responsable de neumonía o si ocurre como contaminante, incluso en unidades de pacientes críticos. No existe una prueba válida para el diagnóstico de infección por *Candida spp.*; por tanto, el diagnóstico definitivo se basa en su demostración histológica en tejido pulmonar normalmente estéril. Sin embargo, el uso de criterios estrictos para definir la infección fúngica podría infraestimar su prevalencia. Casi todos los pacientes con infección fúngica aguda son tratados inicialmente como una neumonía bacteriana, lo que conduce a una mala evolución clínica y a un tratamiento antifúngico tardío. (20)

Es importante contar con el aislamiento de el o los agentes etiológicos ya que se han encontrado en los últimos años pacientes con candidosis mixtas, la existencia de más de una especie de *Candida* en las muestras tiene efectos importantes en la respuesta terapéutica, tipo de antimicóticos administrados y en el tiempo del tratamiento, así como complicaciones en el cuadro clínico, (21) ya que cepas como *C. glabrata* y *C. krusei* son resistentes intrínsecamente al fluconazol además que *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* son resistentes a la anfotericina B. (18)

4.5.3 Criptococosis

La criptococosis es una infección micótica, producida principalmente por el complejo *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, *C. neoformans* afecta principalmente a personas inmunocomprometidas y *C. gattii* a pacientes inmunocompetentes expuestos a el nicho ecológico del hongo. ^(22,23) *C. neoformans* es una levadura capsulada, de distribución mundial (se encuentra en los suelos contaminados por excreta de aves, sobre todo palomas). ⁽¹⁷⁾ El principal factor de riesgo es la infección por VIH, especialmente con niveles de linfocitos CD4 por debajo de 100 células/mm³, dominando el cuadro clínico la afectación del SNC. En otros estados de inmunosupresión, como las enfermedades pulmonares crónicas, pacientes con corticoterapia prolongada o receptores de trasplante de órgano sólido, producen un cuadro de predominio respiratorio. En el caso de *C. gattii* se produce afectación pulmonar incluso en inmunocompetentes. ^(16,23)

La vía respiratoria es la entrada para producir un cuadro clínico: meningitis y meningoencefalitis. Sin embargo, su tránsito pulmonar puede ser bloqueado por una reacción inmune celular y desarrollo de granulomas, o en caso de inmunodepresión, producir invasión. ^(16,23)

- Criptococosis pulmonar

Es una entidad clínica que cursa de manera asintomática, se detecta por serología a través de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta, la criptococosis leve simula un cuadro gripal, acompañado de tos, fiebre y dolor pleural, cuando el proceso se intensifica, la fiebre es más constante; hay pérdida de peso, astenia, adinamia y hay tos con esputo mucoso y hemoptisis, La infección pulmonar puede conducir a variedades de imágenes tales como: Nódulos fibróticos subpleurales de alrededor de 1 cm (únicos o múltiples); lesiones granulomatosas de mayor tamaño de hasta 6 cm que pueden cavitarse (criptococomas), Diseminación miliar en ambos pulmones, Infiltrados intersticiales. La presencia de adenopatías o el derrame pleural son infrecuentes. Son fácilmente

identificables con tinciones especiales en los tejidos afectados (PAS, azulalción, mucicarmín).^(5,17,20)

La criptococosis no forma linfadenopatías hiliares y en general no afecta el mediastino.⁽⁵⁾

4.5.4 Mucormicosis

Enfermedad producida por hongos del orden de los mucorales. Los géneros más implicados son: *Rhizopus*, *Mucor* y *Rhizomucor*. Se adquiere por inhalación o a través de soluciones de continuidad en piel y mucosas. Producen rápida invasión vascular, trombosis y necrosis secundaria.^(16,24)

Se observa en pacientes neutropénicos, leucémicos, linfomatosos, con trasplantes de órganos, tratados con corticosteroides, tratamiento con deferoxamina, sobrecarga de hierro, SIDA y en el mayor de los casos con pacientes diabéticos descompensados más común en la variedad clínica (rino-orbito-cerebral).^(5,25,26)

- Mucormicosis pulmonar

Las personas susceptibles inhalan esporas de estos hongos en el aire, lo que resulta en mucormicosis pulmonar primaria y a veces secundaria a casos rinocerebrales. Se puede diseminar vía sanguínea o linfática. Las características clínicas de la mucormicosis pulmonar son neumonía no específica. El síntoma más común persiste fiebre alta (> 38 ° C), tos, hemoptisis y dolor en el pecho.^(5,25)

La forma rinocerebral destaca en pacientes diabéticos con cetoacidosis, en tanto que la forma pulmonar predomina en pacientes hematológicos con neutropenia. La afectación pulmonar se comporta como una neumopatía intersticial micro nodular muy grave y rápidamente invasiva. Tiene una mortalidad cercana al 80%, además presenta alta capacidad para producir cavitación e invasión que puede afectar al pericardio, la pleura, el mediastino y la pared torácica. Al igual que *Aspergillus*, también puede producir afectación endo bronquial y obstrucción de vías aéreas. Los hallazgos radiológicos son

muy variados: infiltrados, nódulos, cavitaciones, atelectasias, derrame pleural y linfadenopatías mediastínicas. Con las cavitaciones produce el fenómeno del halo producido también por *Aspergillus sp.* Pero este es diferente y se conoce como halo inverso, el cual se observa como una circunferencia en forma de vidrio despulido; algunos datos orientativos de mucormicosis son: mayor afectación rinosinusal, palatina o facial, o presencia de inflamación del tejido subcutáneo torácico. Respecto a los hallazgos radiológicos la presencia de más de 10 nódulos y el derrame pleural son factores asociados a mucormicosis que a API. Así mismo, el galactomanano y el 1,3-D-glucano son negativos en esta micosis. El diagnóstico lo aportan los cultivos respiratorios o biopsias. Dado que su presencia en muestras respiratorias es poco habitual, su aislamiento en un contexto clínico adecuado se considera de carácter diagnóstico. ^(5,16)

4.5.5 Hialohifomicosis

Es causada por hongos filamentosos, tabicados y hialinos (sin pigmento), son hongos patógenos excepcionales algunos de los más importante son: *Fusarium spp.*, *Scedosporium boydii.*, *Acremonium spp.*, *Sarocladium spp.*, *Paecilomyces variotii*, *Purpureocillium lilacinum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, entre otros. ⁽⁵⁾

La fusariomicosis es la más común y los principales agentes etiológicos son (*F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*) la primera se considera la más virulenta, su principal factor de predisposición es la neutropenia, las variedades clínicas que se reportan son: la neumonía en un 50 %, afección cutánea, fungemia, e infección diseminada. ^(5,26,27) Para los casos por *Scedosporium boydii* se considera que es un patógeno primario de baja virulencia, se asocia a neutropenia y su principal patología son el micetoma eumicético blanco, la neumonía, además de sinusitis y parasitación del tabique nasal, en pacientes muy inmunosuprimidos se disemina y genera cuadros de fungemia. Otros hongos que causan patologías fúngicas en el pulmón son *Acremonium*, *Sarocladium*, *Paecilomyces*, *Purpureocillium*, *Scopulariopsis* y algunas cepas de *Penicillium*, los primeros dos se asocian a neutropenia severa y los cuadros que generan son neumonía, meningitis,

peritonitis y fungemia, además *Paecilomyces variotii* y *Purpureocillium lilacinum* generan cuadros de celulitis, pielonefritis. *Scopulariopsis brevicaulis* es la especie más común y genera principalmente onicomiasis, tiñas de cuerpo, mano y pie en forma esporádica produce infecciones pulmonares parasitando antiguas cavernas, además de abscesos subcutáneos, infecciones peritoneales, sinusitis, otomicosis, etc. *Penicillium* a pesar de tener poca capacidad patógena y oportunista se pueden dar casos de otomicosis y peniciliosis broncopulmonar el aislamiento del hongo se debe de hacer de forma repetida mínimo tres veces para descartar una contaminación, aunado a la imagen parasitaria del hongo. Las especies reportadas son *Penicillium crustaceum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium commune* y *Penicillium chrysogenum*.⁽⁵⁾

Estos hongos generan una neumonía indistinguible clínicamente a una aspergilosis, hay una parasitación bronquial con infiltrados alveolares o intersticiales no específicos y nodulares o fungomas en espacios pulmonares.⁽⁵⁾

Establecer el diagnóstico clínico de estas patologías es complejo ya que a la histopatología, tinciones y exámenes directos se observan hifas, hialinas, macrosifonadas, septadas que miden de 3- 6 μm indistinguibles entre sí de (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, etc.), por esto es importante realizar cultivos repetidos de agar dextrosa Sabouraud, para descartar alguna contaminación, e identificar al hongo causante de la patología ya que ciertas especies de *Fusarium*, *S. boydii*, *P. lilacinum* son resistentes a Anfotericina B y algunas especies de *Fusarium* como *F. verticillioides* y *Scedosporium sp.* son resistentes a los azólicos como el itraconazol,^(5,18)

4.6 Micosis pulmonares por patógenos primarios

4.6.1 Coccidioidomicosis

Es una Micosis causada por dos especies *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*. Este hongo se encuentra en los estados del norte de México y sur de Estados Unidos de América. ⁽²⁸⁾ El organismo sobrevive en áreas con poca lluvia (12-50 cm por año), pocas heladas invernales y suelos alcalinos. La infección ocurre por inhalación de esporas aerosolizadas o artroconidos y en casos raros mediante inoculación cutánea directa. Después de la inhalación, los artroconidos sufren un cambio morfológico y se convierten en esférulas (estructuras grandes que contienen endosporas). ⁽²⁹⁾ Es un hongo dimorfo-Bifásico es decir pasa de una forma micelial a una no-levaduriforme (esférula). ⁽⁵⁾

- Coccidioidomicosis primaria

Se divide en asintomática y sintomática, la primera incluye al mayor número de pacientes quienes tuvieron un primo contacto sin manifestación clínica, solo se detecta por estudio de intradermorreacción positiva. La sintomática se presenta de 1 a 3 semanas después de haber inhalado los artroconidos, se presenta fiebre moderada, cefalea, tos seca, etc, se confunde fácilmente con una gripa banal. se forman nódulos, lesiones cavitarias, coccidioidomas, como una respuesta a la enfermedad, los síntomas más severos son fiebre constante, hemoptisis, ataque al estado general, dolor pleural y derrame, artralgias, como una respuesta de hipersensibilidad hay manifestaciones cutáneas las más comunes son el eritema nudoso y eritema multiforme o polimorfo exantema, adenopatías cervicales, axilares e inguinales, etc. En casos residuales no se presenta sintomatología y se diagnostican por tomografías o radiografías con lesiones cavitarias, la serología es negativa o débil. ^(5,26,29)

- Coccidioidomicosis pulmonar secundaria o progresiva

Se origina cuando hay diseminación del foco primario, el cuadro clínico es propio de pacientes con enfermedades o procesos debilitantes, la neumonía coccidioidea se divide en: aguda (es más extensa que la primaria forma cavidades y adenopatías hiliares), persistente (existe infiltrado pulmonar y adenopatías), progresiva (la infección persiste por décadas y evoluciona con lentitud, fibronodular (la sintomatología persiste por meses, hay hemoptisis intensa, lesiones cavitarias, que aumentan de volumen y se multiplican con lentitud), cavidades coccidioideas (son asintomáticas son únicas y de pared gruesa, forman fistulas broncopleurales se obtienen formas parasitarias mixtas), lesiones nodulares (son áreas limitadas de 2-4 cm; se encuentran a nivel de parénquima pulmonar de la parte media), adenopatías hiliares (se observan en casos graves con infiltrado parenquimatoso se confunden con tumores mediastínicos) y la coccidioidomicosis miliar (es grave consiste en fiebre alta y constante, se presenta hepato y esplenomegalia). ⁽⁵⁾

4.6.2 Histoplasmosis

Infección sistémica causada por la inhalación de conidios de *Histoplasma capsulatum* variedad *capsulatum*. Es un hongo dimorfo patógeno primario que afecta en primer lugar el pulmón, pasa de su fase filamentosa a una fase levaduriforme intracelular, se une a las integrinas CD11 y CD18 de las membranas de neutrófilos y macrófagos para penetrar al interior de estas células; los neutrófilos destruyen al hongo, pero en los macrófagos el hongo sobrevive y se transporta a diversos órganos y tejidos, invadiendo preferentemente médula ósea, ganglios linfáticos, hígado y bazo (reticuloendotelial). ^(5,28)

Histoplasma capsulatum se encuentra en detritus vegetal y sobre todo en guano de murciélago y aves, se desarrolla de mejor manera en fuentes de nitrógeno y fósforo. ^(5,28,30)

- Histoplasmosis pulmonar primaria

La histoplasmosis puede clasificarse como pulmonar primaria (leve, moderada y grave), residual de la fase primaria (histoplasmosomas) y diseminada (aguda y crónica), la forma

más común es la pulmonar primaria asintomática (60-95%) y sólo se diagnostica por la respuesta intradérmica (histoplasmina) o radiológicamente (focos de calcificación pulmonar) debido a que la infección es controlada por el sistema inmunológico, se ha descrito que algunas levaduras intracelulares persisten en células permisivas, debido a que el control del sistema inmune es fungistático más que fungicida, por lo que se origina una infección latente, la cual puede reactivarse cuando el sistema inmune se ve disminuido. (5,31)

El padecimiento leve presenta un cuadro con síntomas como fiebre intermitente, cefalea y dolores musculares que asemejan a una gripe banal. Los síntomas ocurren 15 días después de la exposición, la mayor parte de los individuos se recupera de manera espontánea durante la tercera semana. En la fase moderada los síntomas aumentan y se presenta una neumonía atípica con un cuadro respiratorio más marcado, hay disnea y estertores; la fase grave se asemeja a una tuberculosis, con tos severa, expectoraciones abundantes, hemoptisis, sibilancias y fiebres altas. En la tomografía se observan múltiples nódulos diseminados, adenopatías hiliares, lesiones cavitarias y derrame pleural. (5,31)

- Histoplasmosis

Su hallazgo es por radiología o intradermoreacción positiva a la histoplasmina, en la radiografía se observan lesiones cavitarias de aspecto tumoral, los histoplasmosas son nódulos solitarios de más de 3 cm, tienen un foco central necrótico y una circunferencia encapsulada rígida y fibrosa con lesiones satélites calcificadas. (5,30,31)

- Histoplasmosis diseminada aguda y crónica

La primera de ellas es rara en México y afecta a pacientes inmunosuprimidos o niños menores de 10 años, hay un cuadro respiratorio febril, con tos constante, diarrea, pérdida de peso, anemia, leucopenia y se originan adenopatías como hepato y esplenomegalia. (5,30)

La histoplasmosis diseminada crónica es la forma clínica más frecuente en Sudamérica, se caracteriza por síntomas leves, lesiones focales y respuesta inmune efectiva mediada por células. Puede aparecer meses o años después de que un paciente ha abandonado la zona endémica, y se presenta en adultos de 40- 60 años.⁽³²⁾ empieza con pérdida de peso, tos, expectoración, y sin hemoptisis. Hay fibrosis y cavitación en la radiografía. En casos graves o con inmunosupresión como VIH se presentan granulomas solitarios en piel, mucosas y ganglios linfáticos, afectando (laringe, faringe, boca, tabique nasal, y genitales). La morfología está constituida por úlceras eritematosas, con bordes, cubiertas por exudado blanco-amarillento, en mucosas se observan lesiones nódulo gomosas, con micropústulas y erosionadas.^(5,30,31,32)

Es importante observar las tinciones de los exámenes en fresco de material biológico, observando al microscopio las levaduras de 1 a 2 μm que se encuentran dentro de los polimorfonucleares con un halo parecido a una capsula que refringe con la luz, y saber diferenciarlo de otras micosis que son parecidas a las levaduras de *Histoplasma capsulatum*.^(5,30,32,33) en el cultivo también es importante aislarlo ya que algunos hongos son parecidos morfológicamente a *Histoplasma* como *Chrysosporium*, *Corynascus*, *Renispora* y *Sepedonium*, por lo que haciendo el dimorfismo con agar sangre y a una temperatura de 37°C se puede confirmar el agente etiológico.^(32,33)

4.6.3 Paracoccidioidomicosis

La paracoccidioidomicosis es una enfermedad sistémica, patógena primaria causada por los hongos dimorfos *Paracoccidioides brasiliensis* y *Paracoccidioides lutzii*. La micosis afecta a individuos de cualquier edad, raza y sexo, con predominio en hombres (relación de 9:1) de 30 a 50 años de edad, dedicados a labores del campo principalmente en áreas cafetaleras,^(5,34) la vía de entrada es respiratoria por inhalación de conidios o fragmentos de hifa, la primo infección se presenta de manera asintomática y dependiendo del estado inmunológico del paciente, se puede diseminar a piel, mucosas y ganglios linfáticos, vísceras, etc.^(5,35)

- Aspectos clínicos

Se dividen en dos la primera es la forma aguda o juvenil, afecta a niños y jóvenes menores de 30 años, de manifestación relativamente rápida (semanas a meses), hay fiebre, pérdida de peso y aumento de volumen de los ganglios linfáticos, afecta el sistema reticuloendotelial, en la radiografía podemos observar hipertrofia hiliar e infiltrados nódulo-basales. La forma crónica afecta a varones mayores de 30 años, su desarrollo es lento, afecta pulmones, mucosa de tracto respiratorio, piel, ganglios linfáticos y glándulas suprarrenales, en conjunto forman las diferentes manifestaciones clínicas como son la paracoccidioidomicosis ganglionar, visceral, pulmonar, mixta (dos o más manifestaciones clínicas) y la más común y representativa la variedad mucocutánea. (5,34,35)

- Paracoccidioidomicosis pulmonar

En los pacientes la primoinfección es asintomática y sólo se diagnostica por la respuesta a la intradermorreacción (paracoccidioidina) y la imagen radiológica que demuestre infiltrados en el pulmón. En el caso agudo cursa como una neumonía con tos, expectoración, en casos graves hepato y esplenomegalia, este cuadro es de mal pronóstico y se confunde con la histoplasmosis; la forma crónica es mucho más frecuente cursa con tos, expectoración mucopurulenta y fiebre, se suele confundir con tuberculosis, en la tomografía podemos observar infiltrados nodulares, fibrosis y cavitaciones, mayormente bilateral, especialmente en campos basales e hiliares. (5)

Es importante obtener los cultivos de esta patología ya que pueden confundirse con *Blastomyces dermatitidis* y el examen microscópico, con *C. immitis* y *Lacazia loboi*. (35)

Correlacionado la topografía y forma clínica, historia clínica, cultivo, y examen directo podemos dar un diagnóstico seguro de esta enfermedad para brindar un tratamiento oportuno.

4.7 N-acetil-L-cisteína (NAC)

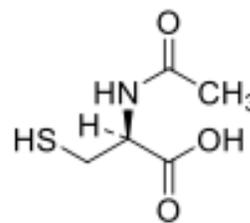
4.7.1 Propiedades químicas

FÓRMULA QUÍMICA: $C_5H_9NO_3S$

PESO MOLECULAR: 163.19 g

SOLUBILIDAD. Fácilmente soluble en agua y alcohol; casi insoluble en cloroformo, éter dietílico y cloruro de metileno

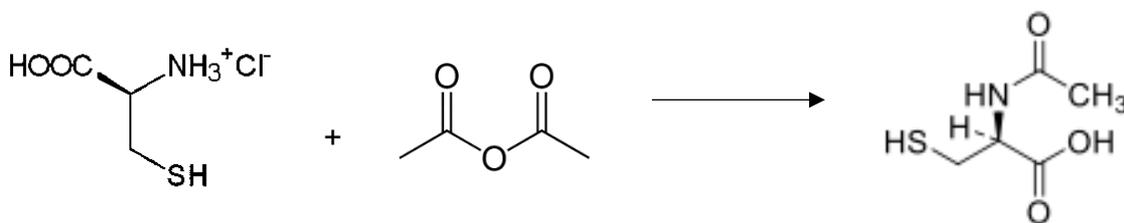
pH. MGA 0701. Entre 2.0 y 2.8. Determinar en una solución de la muestra (1:100).^(36,37)



Ácido L- α -acetamido- β -mercaptopropiónico

4.7.2 Síntesis de la NAC

La NAC es el derivado N-acetilado del aminoácido natural cisteína,^(38,39) La obtención de N-acetilcisteína se lleva a cabo acetilando el clorhidrato de L-cisteína con anhídrido acético en medio alcalino acuoso, Este compuesto se determina analíticamente por cromatografía líquida de alta resolución.⁽⁴⁰⁾



4.7.3 Propiedades como mucolítico

Se utiliza como agente mucolítico, ya que es capaz de romper los puentes disulfuro de las proteínas que componen las secreciones respiratorias.^(37,41) El factor decisivo para tal efecto es por su característica de ser un fármaco reductor de la viscosidad (acción fluidificante).⁽⁴²⁾ Esta acción farmacológica se debe a la presencia de un grupo sulfhidrilo (tiól) libre en la molécula NAC,⁽³⁸⁾ lo que hace que rompa o reduzca los puentes disulfuro de las proteínas, y conlleva a fragmentar las cadenas de mucinas, IgA y seroalbúmina de

la secreción. ⁽⁴⁰⁾ reduciendo la viscosidad del moco. ^(43,44) siendo mayor su eficacia mucolítica en medio alcalino (pH 7,5 - 9,0) y es utilizada en procesos que cursan con hipersecreción de moco en el área otorrinolaringológica: laringitis, traqueítis, rinofaringitis, sinusitis. ^(42,43) *In vitro* es muy clara la acción mucolítica y la reducción de la viscosidad del esputo, ⁽⁴³⁾ además posee propiedades antibacterianas (bacteriostáticas) aunque no pertenece al grupo de estos medicamentos. ^(45,46) Puede ejercer mayor acción sobre las bacterias Gram positivas que en las Gram negativas, esto se debe a la presencia de la segunda membrana celular que presentan las bacterias Gram negativas por lo que se inhibe el crecimiento de diversas bacterias patógenas para el pulmón y permite un mejor desarrollo de los hongos patógenos u oportunistas a estudiar *in vitro*. ⁽²⁶⁾ además la NAC por contener en su molécula un grupo tiól (SH) es capaz de donar electrones y participar en reacciones electrónicas permitiendo estabilidad electrónica e inactivando los radicales libres, recientemente se ha establecido su poder antioxidante. ^(43,47,48,49)

4.7.4 Propiedades de la N-acetil-L-cisteína

La NAC es un aminoácido sulfurado que despolimeriza los complejos mucoprotéicos de la secreción mucosa, se caracteriza por su acción fluidificante sobre las secreciones mucoides. Presenta actividad mucolítica y reduce el moco al reducir y romper los puentes disulfuro de proteínas, por lo que reduce la viscosidad de éste, ^(42,49,50) además disminuye la formación de biopelículas o *biofilms*, lo que hace se reduzcan las infecciones bacterianas, ⁽⁴⁶⁾ también activa el epitelio ciliado, favoreciendo la expectoración; es citoprotector del aparato respiratorio y por su carácter reductor ejerce una protección en el aparato respiratorio frente a la acción lesiva del estrés oxidativo por los radicales libres; esto mediante su grupo sulfhidrilo, ya que reacciona directamente con agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno a las que neutraliza. ⁽⁴⁹⁾ En vivo, la NAC ejerce su función antioxidante a través de su principal metabolito, la cisteína, el mayor precursor en la biosíntesis del glutatión. ⁽⁴⁹⁾ Está indicada también en procesos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística y como antídoto por sobredosis de paracetamol (generalmente por vía intravenosa) entre otros. ^(49,51)

4.8 Procedimiento y características de la muestra

Para solicitar una muestra biológica, es necesario considerar algunos factores importantes para que esta se procese en condiciones óptimas, por ejemplo: la toma de muestra se debe realizar antes que el paciente haya recibido tratamientos sistémicos o si ya lo recibió; la toma de muestra se debe realizar después de dos semanas esto con el fin de observar estructuras parasitarias al momento de hacer el examen en fresco y poder recuperar el agente sin disminuir su viabilidad, también reportar si el paciente tiene alguna inmunosupresión, o si viene de alguna región geográfica específica haciendo una relación clínica diagnóstica con alguna enfermedad causada por hongos patógenos primarios. ⁽⁵⁾

El transporte es muy importante; deben tener ciertos criterios como por ejemplo: el envase en donde se recolecta debe ser estéril y de preferencia envase de boca ancha con tapón de rosca, tubos para viales con tapón, además las muestras deben ser procesadas de preferencia dentro de las siguientes dos horas de obtención, ya que tiempos prolongados disminuyen la viabilidad de desarrollo en los medios de cultivo, es importante mencionar que si por algún motivo no se procesa la muestra durante las primeras dos horas es necesario refrigerarlo a 4°C, para evitar la proliferación de bacterias y otros contaminantes, esto es poco recomendable ya que algunos agentes como los causantes de mucormicosis e histoplasmosis pueden perder su viabilidad si se refrigeran. ⁽⁵⁾

En las micosis pulmonares, se puede solicitar esputo, ya sea de manera natural o bien mediante expectoración inducida con nebulizador de solución salina hipertónica; esta muestra puede ser útil para algunas micosis, en especial las patógenas primarias (coccidioidomicosis, histoplasmosis, etc.), que presentan gran cantidad de estructuras fúngicas; sin embargo, en las causadas por hongos oportunistas (*Candida*, *Aspergillus* y otros), pueden estar como microbiota habitual o pasajera, o bien en localizaciones extra pulmonares y observarse en la muestra una contaminación en el tránsito (faringe, laringe,

boca, etc.); en caso de que se procese esta muestra, los resultados emitidos deben ser cuidadosamente evaluados de acuerdo con la correlación clínico-micológica ⁽⁵⁾.

En algunas ocasiones las muestras de expectoración pueden contener una gran cantidad de mucina o ser demasiado espesas y viscosas para procesarse; la adición de KOH al 10% en una proporción de 1:10, permite fluidificar o clarificar adecuadamente la muestra para realizar exámenes directos y tinciones, ⁽⁵²⁾ no así para los cultivos; otra solución utilizada para este mismo fin y la cual si permite una recuperación viable en los cultivos es la solución de NAC al (3%). ⁽⁵⁾

El volumen de muestra requerido debe ser por lo menos de 0.5 ml, ya que esta cantidad es la mínima que se necesita para realizar exámenes en fresco, tinciones y cultivos, las soluciones degradantes son útiles para procesar muestras con un alto contenido de mucina (esputo, muestras hemoptoicas, etc.) se sugiere el uso de KOH al 10 %, DMSO al 20% y NAC al 3 %. ⁽⁵⁾

Es importante señalar que los hongos patógenos primarios vencen los mecanismos de defensa del paciente, produciendo enfermedad en los individuos sanos y dando lugar a infecciones particularmente graves en los pacientes inmunodeprimidos. Estos hongos se encuentran restringidos a unas áreas geográficas concretas. Su implicación como agentes de micosis invasoras pulmonares es indudable, siempre que se aíse cualquiera de estos hongos en un enfermo con manifestaciones clínicas probadas, el diagnóstico de una infección fúngica se considera probado. Por el contrario, los hongos oportunistas tienen un poder patógeno escaso y sólo producen enfermedad en pacientes con un defecto del sistema inmunitario o de los mecanismos de defensa inespecíficos, ⁽⁴⁾ estos son hongos ampliamente distribuidos por la naturaleza, siendo común el encontrar sus esporas en el aire o el suelo. La gran ubicuidad de estos hongos, dificulta el diagnóstico microbiológico ya que hay que observar si es un verdadero proceso invasor, una colonización o una simple contaminación. Los criterios microbiológicos sólo proporcionan un diagnóstico de probabilidad o posibilidad de infección fúngica invasora, requiriendo para el diagnóstico la demostración histopatológica del hongo invadiendo el parénquima

pulmonar o relacionar los criterios clínicos y microbiológicos. Este tipo de criterios se definen en la siguiente tabla. ⁽⁴⁾

<p>INFECCIÓN FÚNGICA PROBADA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Histo/citopatología mostrando hifas, esférulas o levaduras y/o pseudohifas en muestra de parénquima pulmonar obtenida por aspiración con aguja o biopsia, con evidencia de lesión tisular microscópica o inequívocamente por imagen, o cultivo positivo con evidencia clínica o radiológica de infección. • Cultivo de muestra respiratoria positivo para <i>Histoplasma</i>, <i>Blastomyces</i>, <i>Coccidioides</i> o <i>Paracoccidioides</i> en paciente sintomático u observación histopatológica de elementos morfológicamente compatibles con serología positiva. • Observación histopatológica de elementos morfológicamente compatibles con <i>P. carinii</i> en lavado broncoalveolar de paciente con sida y clínica compatible. <p>INFECCIÓN FÚNGICA PROBABLE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Debe presentar al menos un factor predisponente, acompañado de un hallazgo microbiológico y un criterio clínico mayor (o dos menores). <p>INFECCIÓN FÚNGICA POSIBLE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Debe presentar al menos un factor predisponente, acompañado de un hallazgo microbiológico o un criterio clínico mayor (o dos menores). <p>Factores predisponentes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Neutropenia <500/mm³ durante más de 10 días. 2. Fiebre persistente >96 h que no responde a antibióticos de amplio espectro. 3. Temperatura > 38 °C ó < 36 °C con alguna de las siguientes condiciones: <ul style="list-style-type: none"> - neutropenia > 10 días en los 30 días previos. - empleo de inmunosupresores en los últimos 30 días. - antecedentes de infección fúngica invasora. 4. Signos y síntomas de enfermedad de injerto contra huésped. 5. Uso de corticosteroides > 3 semanas. <p>Criterios microbiológicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cultivo positivo para <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., mucorales, <i>Scedosporium</i> spp. o <i>C. neoformans</i> en esputo o LBA. 2. Examen microscópico directo positivo para hongos filamentosos o criptococo en esputo o LBA. 3. Antígeno de <i>Aspergillus</i> positivo en 2 muestras de LBA o suero. 4. Lesión pulmonar con cultivos bacteriológicos de cualquier tipo de muestra (sangre, esputo, LBA,...) negativos para los posibles agentes de infección del tracto respiratorio inferior. <p>Criterios clínicos mayores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cualquier infiltrado nuevo con signo del halo, menisco aéreo o cavitación rodeada de un área de consolidación. <p>Criterios clínicos menores:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Síntomas del tracto respiratorio inferior (tos, hemoptisis, disnea,...). 2. Signos de derrame pleural. 3. Cualquier nuevo infiltrado que no cumpla el criterio mayor.
--

Tabla 1. Criterios diagnósticos de infección fúngica invasora tomado de Ferrán R. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. Rev Iberoam Micol 2001; 84(607): 3050-6.⁴

Es importante enfatizar la presencia y la forma de como se observan los hongos cuando parasitan, es decir; cuando se encuentran invadiendo a un paciente, la siguiente tabla

nos describe las principales micosis pulmonares y como se describen al microscopio, así como tinciones o exámenes directos que se pueden utilizar para su mejor procesamiento.

Hongo	Descripción
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Tinción de Wright: pequeñas levaduras ovaladas (1-4 µm), en el interior de los macrófagos, es característico observar un halo alrededor de la levadura o falsa capsula.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Levaduras ovales, polimorfas (5-60 µm), suelen presentar gemaciones múltiples de base estrecha, siendo característica la observación de células multigemantes similares a un timón de barco.
<i>Coccidioides immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	Grandes esférulas de 10-80 µm, de pared fina y con numerosas endosporas de 2-5 µm en su interior.
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Levaduras grandes de (8-15 µm) redondeadas de pared lisa y gruesa, con gemación única, de base ancha y tamaño similar al de la célula madre.
<i>Talaromyces marneffi</i> (antes <i>Penicillium</i>)	Pequeñas levaduras ovales o elípticas de (3-8 µm) en el interior de los histiocitos, es característico observar un septo central.
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Tinción (Giomori-Grocott), se observan los quistes o ascas, miden entre (5-8 µm) formación de la espuma alveolar.
<i>Aspergillus spp</i>	Hifas hialinas menores a 5 µm, con septos y dicotómicas con un ángulo de 45°, indistinguibles de otros hongos hialinos.
Mucorales	Hifas hialinas muy irregulares con un diámetro de 5-25 µm, no suelen presentar septos, presentan un ángulo recto.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Tinta china: evidencia la capsula de las levaduras únicas o con gemación su tamaño es de 5-7 µm, la capsula se observa bien definida de forma esférica y rodea la levadura.
<i>Candida spp</i>	Levaduras redondas u ovales de 4-6 µm de gemación multilateral o cadena de gemaciones y pseudohifas.

Tabla 2. Características de examen directo de las principales micosis pulmonares tomado de Ferrán R. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. Rev Iberoam Micol 2001; 84(607): 3050-6.⁴

Una porción de la muestra se utiliza para realizar el examen en fresco o directo en donde observamos si hay un proceso invasivo en las muestras de los pacientes, la otra porción

se utiliza para realizar el cultivo e incubación a 28°C, cuando hay sospecha de hongos patógenos primarios la incubación debe ser de 2 a 3 semanas y cuando son hongos oportunistas se aprecia el crecimiento de 2 días a una semana, de éstos desarrollos, cuando la colonia es única, cremosa, bacteriforme, convexa se cultiva nuevamente en medios de diferenciación y pruebas bioquímicas para conocer el agente etiológico aislado, mientras que cuando crece en forma micelial es necesario realizar un examen directo con azul de algodón lactofenol y análisis microscópico, el cual ayuda a diferenciar de mejor manera las estructuras del hongo (tamaño, color, forma de la hifa, septos, modalidades y estructuras de reproducción) correlacionando las características microscópicas y macroscópicas, todo esto permite identificar al hongo aislado para completar el diagnóstico.

Una vez identificado al hongo hay que seguir ciertos criterios microbiológicos que por sí solos no suelen ser suficientes para establecer el diagnóstico de infección fúngica invasora, por lo que es necesario asociarlos a un cuadro clínico determinado, la interpretación de los cultivos debe hacerse en función del hongo aislado y del tipo de muestra respiratoria evaluada, en el contexto de un paciente concreto con una clínica y factores predisponentes determinados. Algunos de estos criterios se describen en la siguiente tabla.

CRITERIOS PARA EVALUAR UN CULTIVO EN MUESTRAS RESPIRATORIAS
No todos los hongos tienen la capacidad de producir una micosis invasora en el tracto respiratorio inferior, hay que correlacionar lo que se obtiene en el cultivo con el cuadro clínico y descartar una contaminación del tracto respiratorio superior.
Se sugiere realizar al menos 3 cultivos repetidos de la misma muestra para descartar alguna contaminación.
El aislamiento de un hongo patógeno primario tiene alto valor predictivo ya que no son contaminantes y se correlacionan con micosis pulmonares.

Para dar un diagnóstico oportuno tenemos que tener prueba de invasión fúngica con una biopsia en donde se observe la parasitación o en una muestra estéril del paciente donde se observen las estructuras parasitarias del hongo.

El aislamiento de *A. fumigatus* o *A. flavus* en una muestra respiratoria de un paciente con leucemia o neutropenia tiene un alto valor predictivo positivo de una micosis pulmonar

La gravedad y agresividad de una mucormicosis pulmonar justifica informar la presencia de un mucoral en una muestra respiratoria procesada correctamente.

La corticoterapia prolongada es un factor importante para desarrollar una aspergilosis pulmonar.

EL aislamiento de *C. neoformans* es indicativo de una criptococosis pulmonar o sistémica.

Los Hialohifomicetos pueden originar micosis pulmonares clínicamente indistinguibles de la aspergilosis, por lo que es necesario identificar el agente etiológico.

La fusariosis pulmonar suele deberse a diseminación hematógena en cuadro sistémico, y en más del 50 % de los casos cursa con hemocultivos positivos.

Las especies del género *Candida* rara vez dan lugar a micosis invasoras, si no es en pacientes terminales, en las secreciones respiratorias del 20% de la población sana y en más del 50% de los pacientes que han recibido antibioterapia.

Tabla 3. Consejos para evaluar un cultivo para micosis pulmonares tomado y modificado de Ferrán R. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. Rev Iberoam Micol 2001; 84(607): 3050-6.^{4,5}

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Metodología

1.- DEFINICIÓN DE POBLACIÓN Y DURACIÓN

Muestras recibidas de probables micosis pulmonares (esputo, lavado bronquial, líquido pleural, derrame pleural, etc.) de pacientes del Hospital general de México “Dr. Eduardo Liceaga”, en un periodo de seis meses comprendido de marzo a agosto del 2017 aproximadamente o hasta integrar el número de muestras de pacientes necesarios de acuerdo al cálculo de n.

2.- TIPO Y ESTUDIO DE LA POBLACIÓN

Estudio comparativo, experimental, descriptivo, analítico, transversal, en muestras de origen pulmonar con alta viscosidad, provenientes de pacientes del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”, que sean enviadas al laboratorio de Micología

3. POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA:

En el presente estudio serán incluidas todas las muestras de origen pulmonar que provengan de diversos servicios del Hospital General de México, “Dr. Eduardo Liceaga”, para estudios micológicos, durante el período de seis meses (marzo a agosto 2017), o hasta integrar el número de muestras de pacientes de acuerdo a la n.

No se incluirán pacientes ni animales para la realización de este estudio.

Para estimar el tamaño de la muestra se empleó la ecuación para poblaciones infinitas sin remplazamiento, con base en una proporción. La ecuación a utilizar es:

$$N = \frac{Z\alpha^2 P (1 - P)}{i^2}$$

Donde:

N: Número de sujetos necesarios

$Z\alpha$: Estadístico de la distribución normal estándar correspondiente a la confianza deseada por el investigador.

P: Valor de la proporción que se supone existe en la población, en este caso se estima la frecuencia de micosis pulmonares en un 36% para diversos tipos de micosis pulmonares.

i: Precisión con que se desea estimar el parámetro ⁽⁵⁵⁾

Con un nivel de confianza del 90% y una precisión de 10% ($i= 0.1$) el tamaño de la muestra a evaluar es:

$$N = \frac{(1.96)^2 (0.36) (1 - 0.36)}{(0.05)^2}$$

$$N = 88.51$$

$$N = 89$$

CRITERIOS DE SELECCIÓN: INCLUSIÓN, NO INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1.-Todas las muestras pulmonares (esputo, lavado bronquial, líquido pleural, etc.) con al menos 2ml para su correcto procesamiento, Las cuales se envíen al servicio de micología por primera vez y/o de manera subsecuente, provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", sin tratamiento antimicótico al momento de la toma de muestra.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN.

1.-Muestras mal etiquetadas (no coincida el nombre de la solicitud con el de la muestra, ECU erróneo, etc.).

2.-Muestras que no se encuentren en condiciones óptimas para realizar el estudio (muestras que no vengan en envases estériles, muestras resguardadas bajo condiciones no adecuadas para su preservación, muestras con formol).

3.- Muestras provenientes de pacientes con manejo de mucolíticos por prescripción.

4.- Muestras con menos de 2ml de volumen para su correcta manipulación (son necesarios un mínimo de 1 ml para cada metodología).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1.-Pacientes que se encuentren en tratamiento con antifúngicos antes de recibir y procesar la muestra ya que esto impide el correcto desarrollo del agente etiológico en cuestión, además que en el examen en esto fresco puede dar origen a resultados falsos negativos.

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES A EVALUAR Y FORMA DE MEDIRLAS:

Nombre de la variable	Definición operacional	Tipo de variables y escala de medición	Unidad de medición
Examen directo (variable dependiente)	Hallazgos microscópicos en la muestra pulmonar	Cualitativa nominal Dicotómica	Positiva (presencia de estructuras) Negativa (ausencia de estructuras)
Cultivo (variable dependiente)	Desarrollo de los agentes etiológicos en los medios de cultivo	Cualitativa nominal dicotómica	Positivo (con desarrollo de hongos) Negativo (sin desarrollo de hongos)
Agentes etiológicos de las muestras pulmonares. (variable independiente)	Identificación de los agentes causales de las micosis pulmonares	Cualitativa nominal	<i>Aspergillus spp</i> <i>Candida spp</i> Otros: <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i> , etc.
Tiempo de almacenamiento de la muestra pulmonar (variable independiente)	Tiempo que lleva la muestra antes de ser procesada	Cuantitativa discreta	Horas

Factores de riesgo para el desarrollo de micosis pulmonares (variable independiente)	Antecedentes en la historia clínica del paciente que sugieran la causa del desarrollo de una micosis pulmonar.	Cualitativa nominal	Factores de inmunosupresión VIH Neutropenia Linfopenia Cáncer, etc
Tratamiento antimicrobiano (variable independiente)	Medicamentos que son o han sido administrados al paciente como profilaxis o como tratamiento ante infecciones bacterianas	Cualitativa nominal	Antibióticos (especificar cuál y dosis).
Tiempo de tratamiento antimicrobiano (variable independiente)	Tiempo durante el cual se le han administrado al paciente los distintos tratamientos antimicrobianos al momento de recibir la muestra para estudio micológico	Cuantitativa discreta	Días

Tabla 4. variables y formas de medirlas.

5.2 Procedimiento

Las muestras con sospecha de micosis pulmonares proporcionadas por diferentes servicios del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, fueron tratadas de la siguiente manera:

1.-Recibir las muestras en el laboratorio de micología y revisar que se encuentren correctamente etiquetadas para su identificación (nombre, ECU, tipo de muestra, fecha, servicio, etc.) imagen 1

2.-Las muestras recibidas fueron registradas y se asignó un número micológico por paciente para la documentación de los resultados obtenidos además de llenar el formato (anexo1) correspondiente al protocolo de investigación, el cual sólo se realizó si las muestras recibidas contenían al menos 2 ml de muestra pulmonar, ya que se utiliza el remante para validar este nuevo método. Imagen 2

3.- Se utilizaron al menos 2 ml de volumen de muestra pulmonar, esto para su correcta manipulación, de los cuales, 1 ml se trató con el método rutinario del laboratorio de micología, KOH al 10% (anexo2) y 1 ml se procesó con el nuevo método con NAC al 3% (anexo 3). Imagen 2

4.-De la muestra se tomó una gota y se colocó en 2 portaobjetos a uno se le agregó una gota de KOH al 10% y al otro una gota de NAC al 3 % se analizó mediante examen en fresco (observación al microscopio de campo claro en objetivos de 10X, 40X e inmersión en caso necesario) de las muestras tratadas tanto con KOH al 10% como con NAC al 3% (1:1 v/v sobre la muestra), para observar estructuras que confirmen la infección por hongos.

5.- Para el caso de la NAC, se tomaron 0.5 ml de muestra; se colocaron en tubos estériles con tapón de rosca se agregó 0.25 ml de NAC; se dejaron fluidificar por aproximadamente 20 minutos, si la muestra no es mucoide o espesa se procedió a centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos se sembró posterior a este tiempo en (ADS y Micosel ®); si la muestra era mucoide se dejó en reposo 20 minutos y se sembró en los mismos medios sin centrifugar la muestra.

6.-Si el examen en fresco resultó positivo (presencia de estructuras micóticas), se registraron los hallazgos en el formato correspondiente (anexo 1) indicando el tipo de estructuras observadas al microscopio. (Imagen 3 y 4)

7.- Se cultivó en los medios de rutina (ADS y Micosel ®) y se incubaron a 28°C por 3 días para hongos oportunistas (*Candida spp*, *Criptococcus spp*, entre otros) dos semanas para oportunistas

de lento desarrollo (*Aspergillus* spp.) y de 3 a 4 semanas para hongos patógenos primarios (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp, entre otros). (Imagen 5)

8.- La identificación de las especies micológicas que crecieron en el medio de cultivo se realizaron con análisis microscópico (estructuras de reproducción) y macroscópico (aspecto, color, forma y pigmento de la colonia) así como por pruebas bioquímicas para hongos levaduriformes (*Candida* spp, *Cryptococcus* spp, etc.) (Imagen 6)

9.- En el análisis estadístico se evaluó razón de Momios con lo que se calculó sensibilidad (S), la Especificidad (E), el valor de predicción positivo (VPP), el valor de predicción negativo (VPN), el valor de kappa para comparar el nuevo método NAC al 3% contra el estándar de oro KOH al 10% para exámenes en fresco, así como para los cultivos.

imágenes



Imagen 1. Viales y frascos estériles para el procedimiento experimental de las muestras pulmonares.

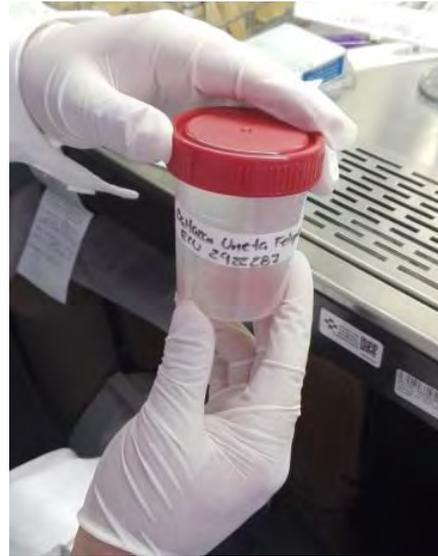


Imagen 2. Verificación y uso de material de protección para el correcto procesamiento de las muestras pulmonares.



Imagen 3. Examen directo con NAC al 3% visto a 40x en donde se observa una hifa macrosifonada, dicotómica, hialina con organelos visibles.



Imagen 4. Examen directo visto al microscopio de campo claro a 40 x, procesado con NAC al 3%, en donde se observan pseudohifas y clamidoconidios.



Imagen 5. Cultivos con desarrollo de un hongo moho; donde se observa el crecimiento en todo el agar, 1 utilizando NAC al 3 % y 2 con el método rutinario.

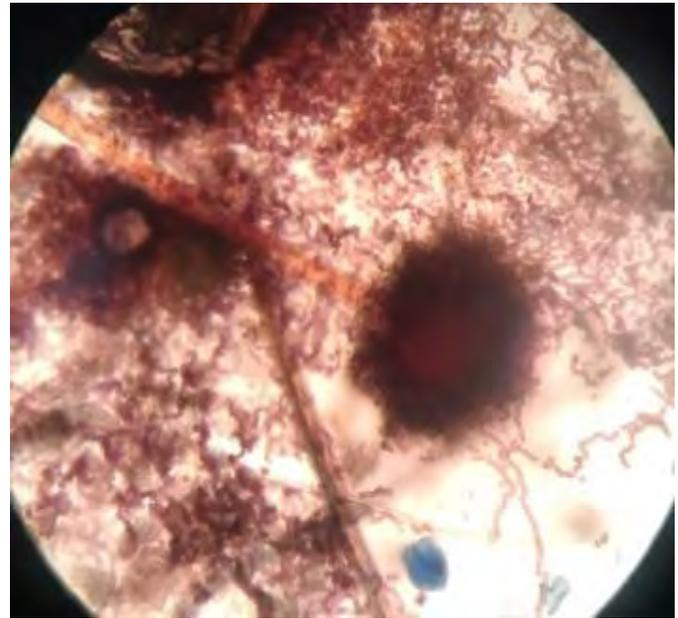


Imagen 6. Examen directo con azul de algodón lactofenol visto a 40x en donde se observa un conidióforo y una cabeza aspergilar grande dispuesta a 360° con los conidios sueltos de color marrón oscuro, (*Aspergillus niger*).

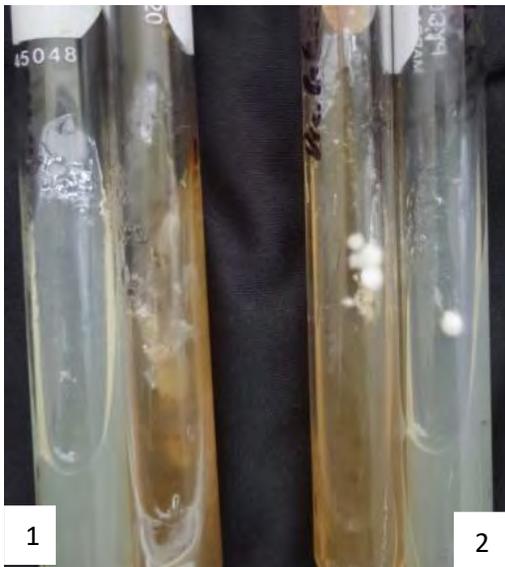


Imagen 7. cultivos procesados de forma habitual 1, cultivos procesados con NAC al 3 % en donde se observa desarrollo colonial.



Imagen 8. Se observan dos cultivos el tubo 2 con el método rutinario y el tubo 1 tratado con NAC al 3%, donde se observa el crecimiento del hongo sin contaminación bacteriana a diferencia del cultivo sin NAC.

ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD.

Se garantizará la confidencialidad de los datos obtenidos, quedando la información a resguardo del investigador principal. Este estudio se considera y clasifica como de riesgo menor. No se realizarán procedimientos invasivos en el proceso.

RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS.

Con el siguiente estudio los autores validarán el uso de la NAC al 3% como mucolítico para muestras pulmonares comparándolo con el estándar de oro KOH al 10%, validando un método con mayor sensibilidad para incrementar la precisión en el diagnóstico de micosis pulmonares o con muestras clínicas con alto índice de viscosidad.

RECURSOS A SOLICITAR.

Los recursos para el material de obtención de la muestra, examen directo, aditamentos extra, los medios de cultivo, papelería necesaria para la recolección de datos serán financiados por el servicio de micología, departamento de dermatología; unidad 109.

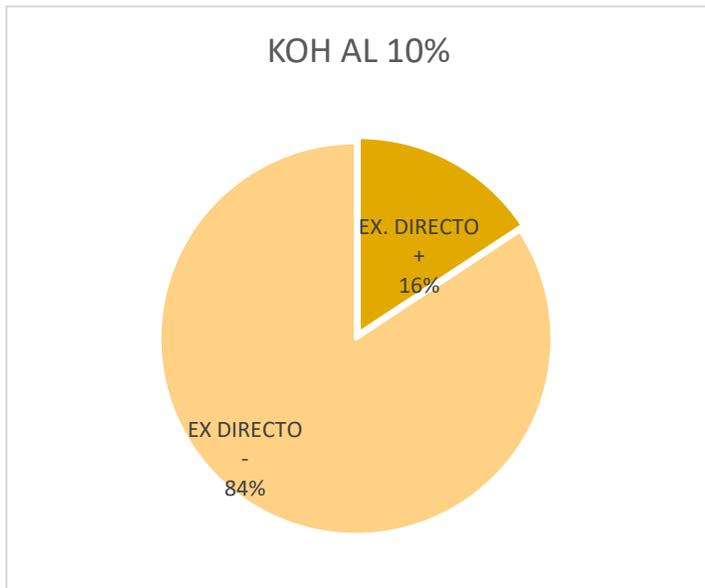
CONFLICTO DE INTERESES.

Los autores de este proyecto de investigación manifiestan no tener conflicto de intereses ni patrocinio alguno para el desarrollo del mismo.

6. RESULTADOS

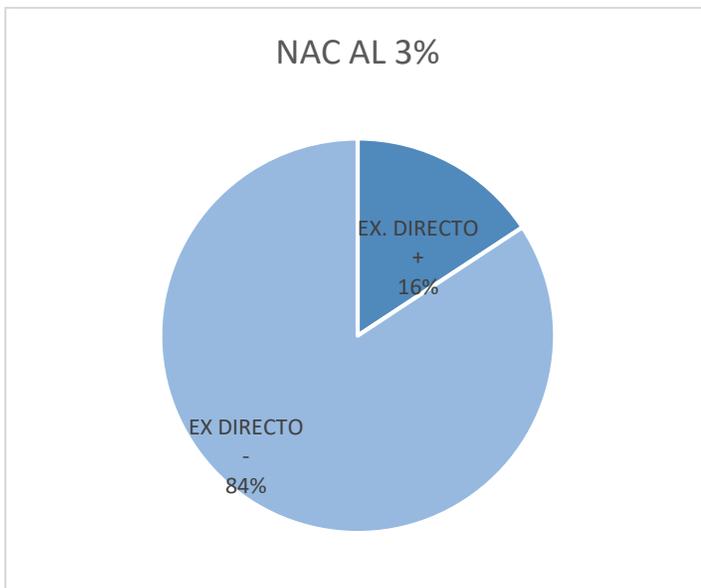
De las 89 muestras analizadas, sólo en 14 se observaron estructuras que indicaron la presencia de una infección por hongos en el examen directo procesado por las dos metodologías objeto del presente estudio (gráfica 1 y 2); con respecto a los cultivos, en 28 de ellos, procesados con la metodología de referencia se obtuvo el desarrollo de agentes etiológicos y 32 con el nuevo método con solución de NAC al 3 % (gráfica 3 y 4); 70% de las muestras obtenidas fueron de hombres y 30% de mujeres (gráfica 9), las edades de los pacientes se encontraron en un rango desde 17 años hasta 87 años; con una moda de 68 años (gráfica 10), de los cuales el 28%, presentaron alguna inmunosupresión, siendo la más frecuente el VIH (gráfica 12). En el caso de los cultivos con NAC al 3%, el principal agente etiológico fue *Candida albicans* con 59 % seguido de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*; el único agente etiológico diferente de una *Candida* spp fue *Aspergillus niger* encontrado en dos muestras (gráfica 7 y 8), se observa un porcentaje de cultivos positivos más alto en el nuevo método (13%), comparándolo con el método rutinario; es decir sin algún mucolítico (gráfica 18), de las muestras con desarrollo de hongos, el 75 % fue de lavado bronquial seguido de esputo con el 19 % (gráfica 14), el diagnóstico presuntivo más frecuente relacionado con los cultivos con desarrollo fue la tuberculosis (gráfica 15), con el método de kappa se observa una buena concordancia entre observadores; para el examen directo el valor obtenido fue de $K= 0.81$ y para los cultivos de $K= 0.79$, en el caso de la razón de Momios se observan los siguientes resultados; para el examen directo la sensibilidad (S) fue de un 100%, la especificidad (E) fue del 100 %, en cuanto al valor predictivo positivo (VPP) fue del 100 % y por último el valor predictivo negativo (VPN) fue de 100%, en cuanto a los resultados de los cultivos fue (S)= 100%, (E)=93 %, (VPP)= 87.5% y el (VPN)= 100% (Tabla 6). Estos resultados se discutirán con mayor detalle en el análisis de resultado.

Porcentaje comparativo de resultados de exámenes directos en los dos métodos.



Gráfica 1. Porcentaje de exámenes directos utilizando el método de referencia (KOH al 10%).

	EX. DIRECTO +	EX DIRECTO -	TOTAL MUESTRAS
KOH AL 10%	14	75	89
NAC AL 3%	14	75	89



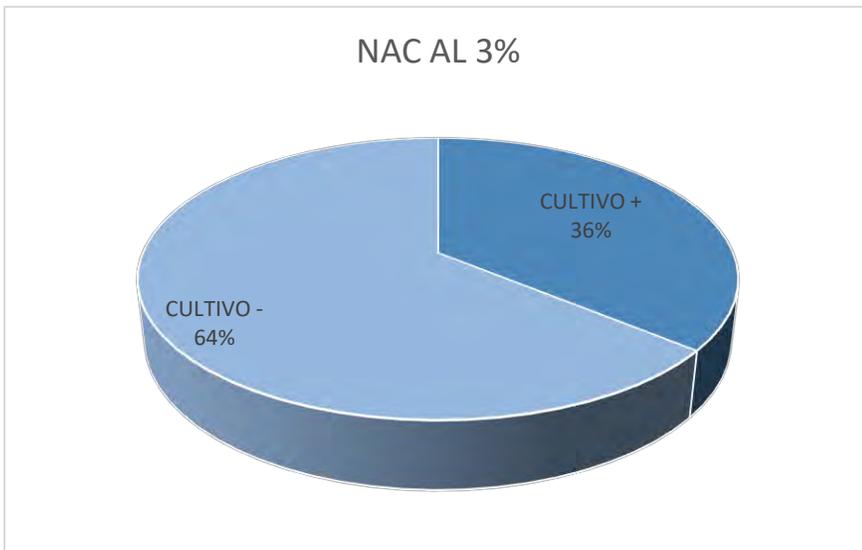
Gráfica 2. Porcentaje de exámenes directos utilizando el nuevo método (NAC al 3%).

Porcentaje comparativo de resultados de cultivos en los dos métodos



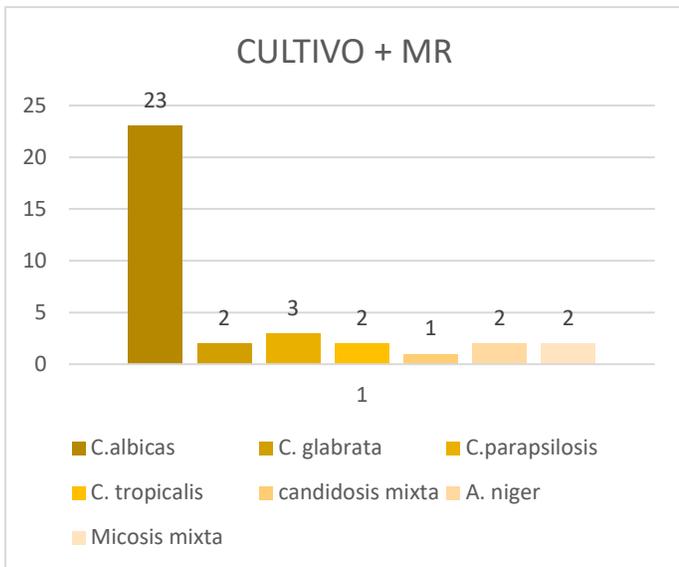
Gráfica 3. Porcentaje de cultivos utilizando el método rutinario.

	CULTIVO +	CULTIVO -
KOH AL 10%	28	61
NAC AL 3%	32	57



Gráfica 4. Porcentaje de cultivos utilizando el nuevo método (NAC al 3 %).

Agentes etiológicos encontrados en el método rutinario del laboratorio

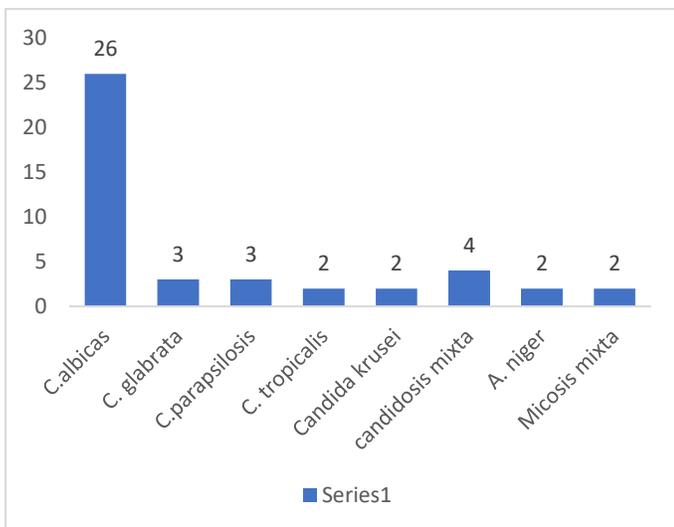


Gráfica 5. Número y nombre de los agentes etiológicos encontrados en los cultivos con desarrollo del método rutinario.

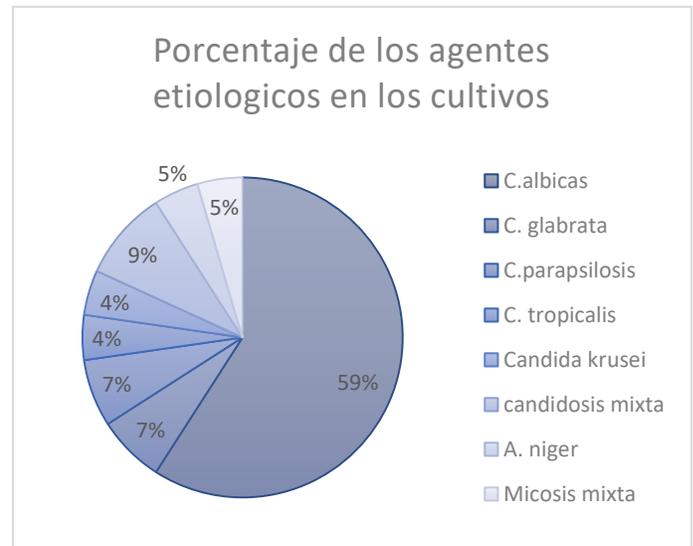


Gráfica 6. Porcentaje de los agentes etiológicos encontrados en los cultivos del método rutinario en el laboratorio de micología

Agentes etiológicos encontrados en los cultivos con el método de NAC al 3%

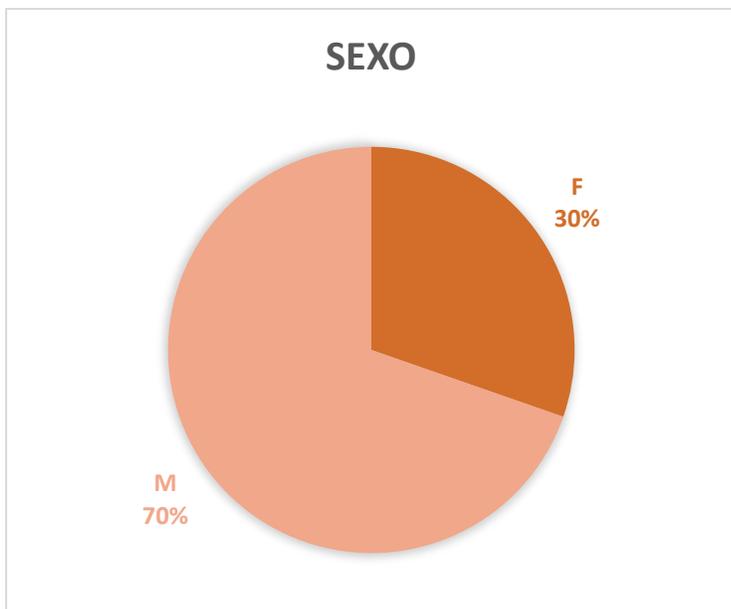


Gráfica 7. Número y nombre de los agentes etiológicos encontrados en los cultivos con desarrollo del método con NAC al 3%.



Gráfica 8. Porcentaje de los agentes etiológicos encontrados en los cultivos del método con NAC al 3%.

Estadística descriptiva de los datos relacionados con los pacientes de las muestras obtenidas



Gráfica 9. Porcentaje del sexo de pacientes de las muestras analizadas.

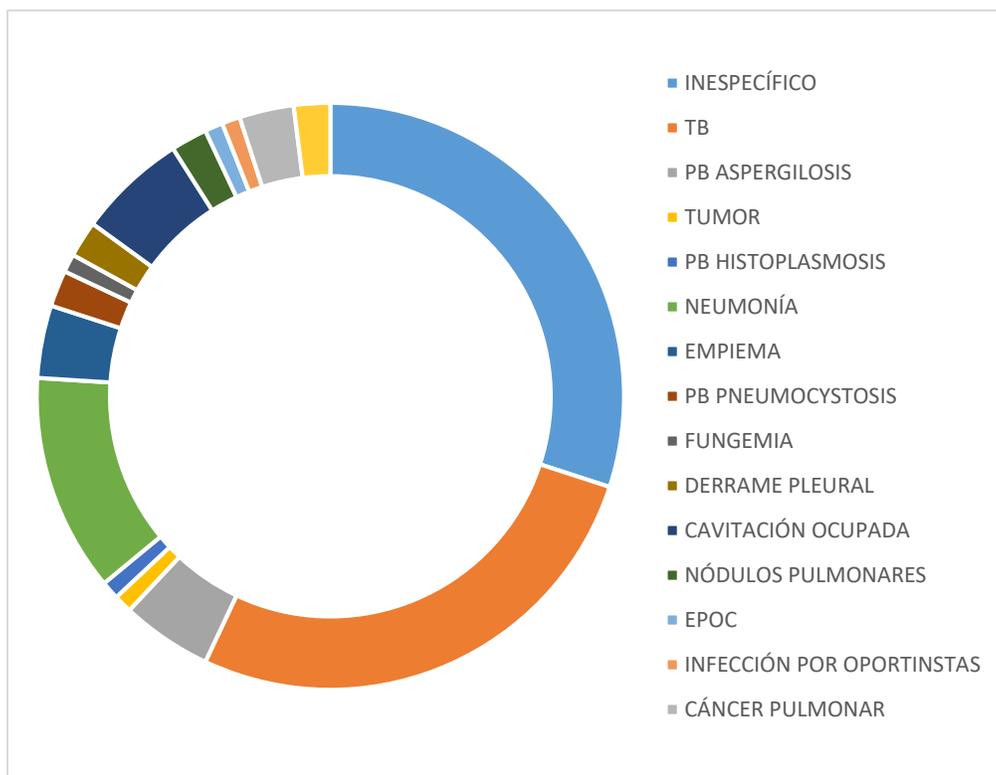
SEXO DE LOS PACIENTES	
FEMENINO	MASCULINO
27	62

media	48
Mediana	46,5
Moda	68

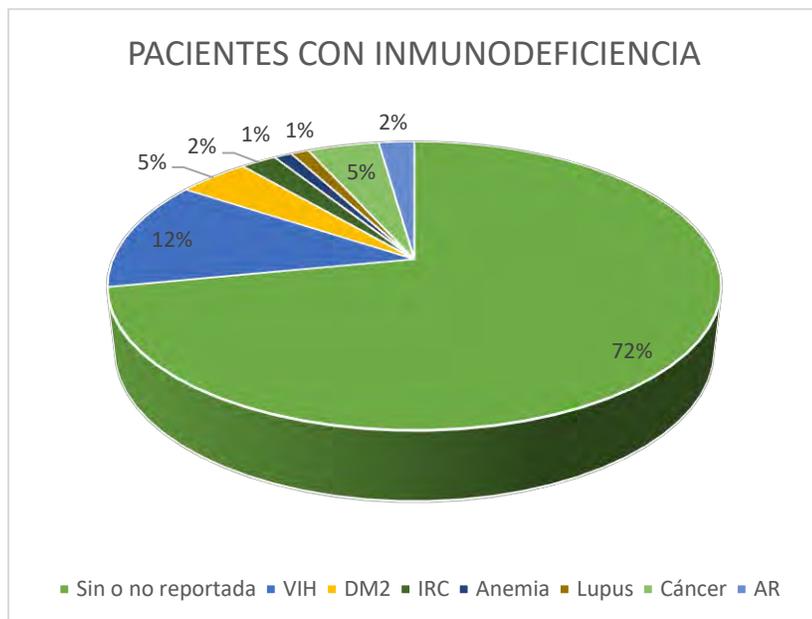


Gráfica 10. Rango de edades medida en años de los pacientes de las muestras analizadas.

DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LOS PACIENTES



Gráfica 11. Variedad de diagnósticos presuntivos y probables para una muestra pulmonar; relacionada a una micosis.

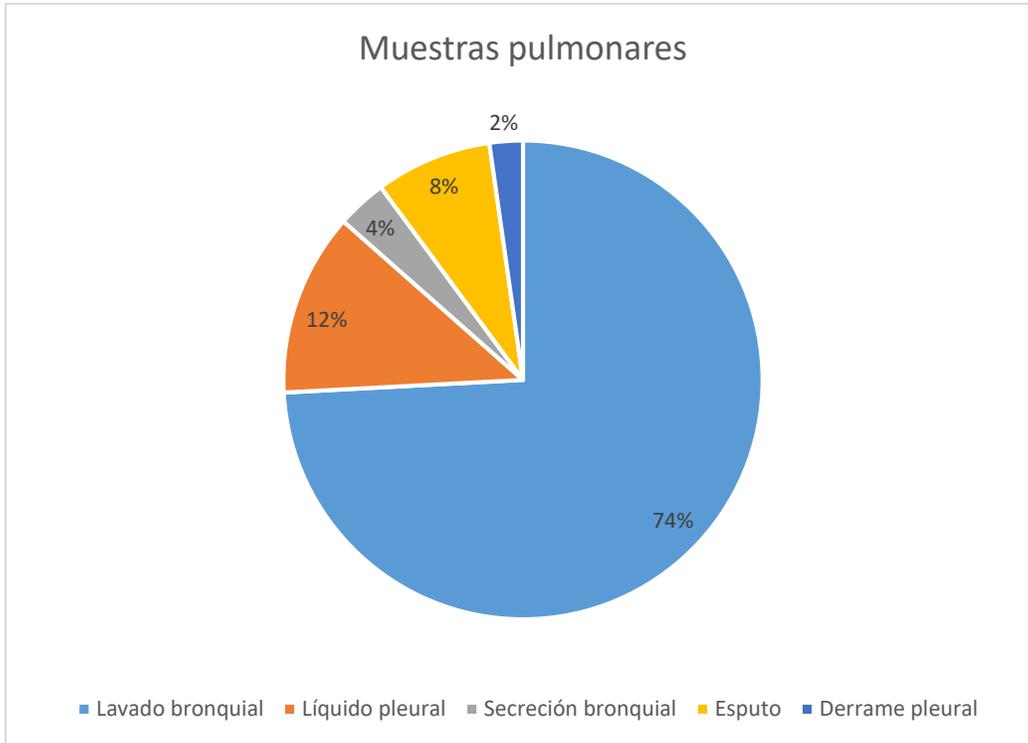


INMUNODEFICIENCIA

Sin o no reportada	64
VIH	11
DM2	4
IRC	2
Anemia	1
Lupus	1
Cáncer	4
AR	2
TOTAL	89

Gráfica 12. Inmunocompromiso asociado a los pacientes cuyas muestras se analizaron.

Tipo de muestras que se procesaron en el estudio

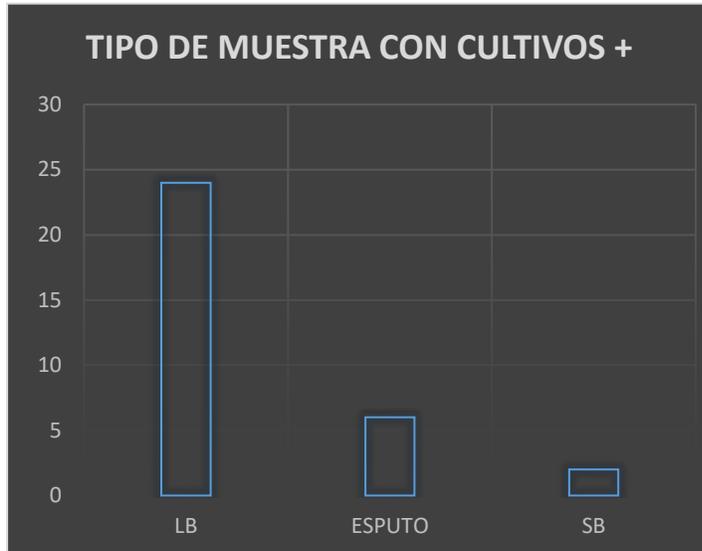


Gráfica 13. Porcentaje del tipo de muestras que se obtuvieron en el estudio.

MUESTRAS PULMONARES

<i>Lavado bronquial</i>	66
<i>Líquido pleural</i>	11
<i>Secreción bronquial</i>	3
<i>Esputo</i>	7
<i>Derrame pleural</i>	2
TOTAL	89

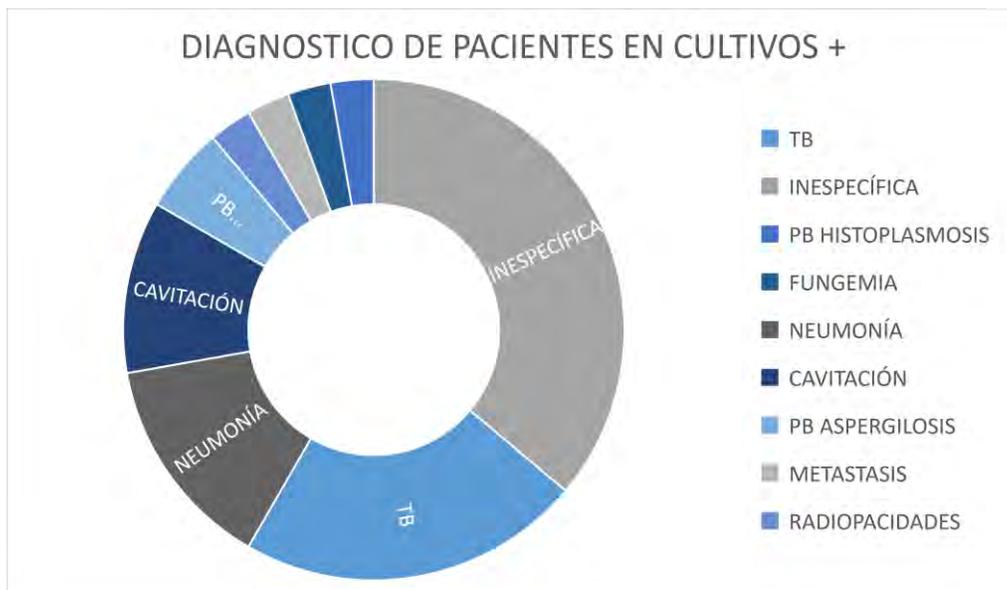
Cultivos con desarrollo de hongos en muestras tratadas con NAC al 3%



MUESTRA	#	%
LB	24	75
ESPUTO	6	18.75
SB	2	6.25

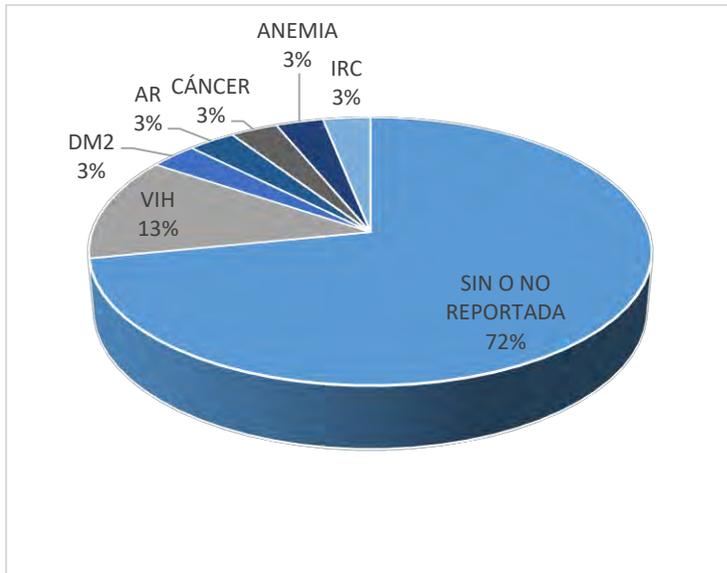
Gráfica 14. Cantidad, porcentaje y el tipo de muestra con cultivo positivo en muestras procesadas con NAC al 3%. *LB (Lavado bronquial), SB (Secreción bronquial)

Diagnóstico probable de los pacientes con micosis pulmonares que se trataron con NAC al 3%



Gráfica 15. Diagnóstico presuntivo de pacientes con desarrollo de hongos en muestras procesadas con NAC al 3%. *TB (tuberculosis), Pb (probable)

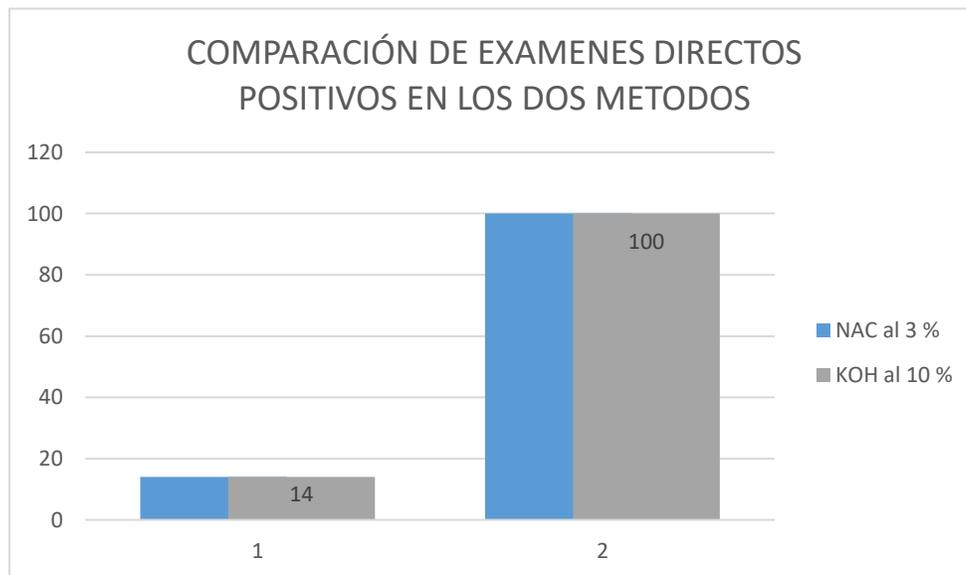
Inmunodeficiencia descrita en pacientes con muestras tratadas con NAC al 3 %



INMUNOSUPRESIÓN	
SIN O NO REPORTADA	23
VIH	4
DM2	1
AR	1
CÁNCER	1
ANEMIA	1
IRC	1

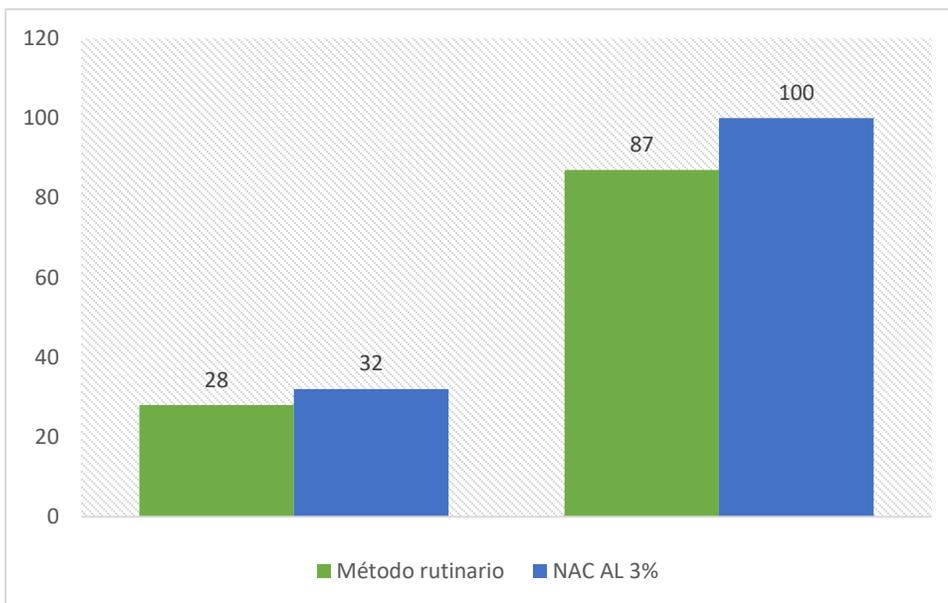
Gráfica 16. Inmunodeficiencia de pacientes con desarrollo de hongos en los cultivos con NAC al 3%. *IRC (Insuficiencia renal crónica), AR (Artritis reumatoide), DM2 (Diabetes mellitus tipo 2)

Datos de los resultados experimentales y porcentaje en los dos métodos en examen directo y cultivo



Gráfica 17. Número de exámenes directos positivos (1) y porcentaje de los dos métodos (KOH al 10% y NAC al 3%) (2).

COMPARACIÓN DE CULTIVOS CON DESARROLLO EN LOS DOS METODOS



Gráfica 18 Número de cultivos con desarrollo de hongos y porcentaje comparativo de los dos métodos (Sin mucolítico y NAC al 3%). *MRL (método rutinario del laboratorio)

6.1 Kappa

		Observador A	
		+	-
Observador B	+	a	b
	-	c	d

n

Donde:

a= concordancia positivos observados

b= no concordancia

c= no concordancia

d= concordancia de negativos entre observadores

n= total de observaciones ⁽⁵⁴⁾

Donde:

Po=proporción de concordancia observada

Pe= Proporción de concordancia esperada producida por el azar

K= valor Kappa

Examen directo

Observador A: 14 positivos y 75 negativos

Observador B: 15 positivos y 74 negativos

		Observador A		
		+	-	
Observador B	+	12	3	15
	-	2	72	74
		14	75	89

$$Po = \frac{12+72}{89} = 0.9438$$

$$Pe = \left[\frac{(12+3)}{89} \times \frac{(12+2)}{89} \right] + \left[\frac{(3+72)}{89} \times \frac{(2+72)}{89} \right] = 0.7007$$

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe} = \frac{0.9438 - 0.7007}{1 - 0.7007} = \frac{0.2431}{0.2993} = 0.8122$$

Cultivo

Observador A: 32 positivos y 57 negativos

Observador B: 28 positivos y 61 negativos

		Observador A		
		+	-	
Observador B	+	26	2	28
	-	6	55	61
		32	57	89

$$Po = \frac{26+55}{89} = 0.9101$$

$$Pe = \left[\frac{(26+2)}{89} \times \frac{(26+6)}{89} \right] + \left[\frac{(2+55)}{89} \times \frac{(6+55)}{89} \right] = 0.5518$$

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe} = \frac{0.9101 - 0.5518}{1 - 0.5518} = \frac{0.3583}{0.4482} = 0.7976$$

6.1 Razón de momios

		Estándar de oro		
		+	-	
Prueba o método diagnóstico	+	a	B	a + b
	-	c	D	c + d
		a + c	b + d	a + b + c + d

Donde:

a= verdaderos positivos

b= falsos positivos

c=falsos negativos

d= verdaderos negativos

Donde:

S= Sensibilidad

E= Especificidad

VPP= Valor predictivo positivo

VPN= Valor predictivo negativo (54)

$$S = \frac{a}{a+c}$$

$$E = \frac{d}{b+d}$$

$$VPP = \frac{a}{a+b}$$

$$VPN = \frac{d}{c+d}$$

Examen directo

		KOH al 10%		
		+	-	
NAC al 3%	+	14	0	14
	-	0	75	75
		14	75	89

$$S = \frac{14}{14+75} = 100 \%$$

$$E = \frac{75}{14+75} = 100 \%$$

$$VPP = \frac{14}{14+14} = 100 \%$$

$$VPN = \frac{75}{75+75} = 100 \%$$

Cultivo

		Sin mucolítico		
		+	-	
NAC al 3%	+	28	4	32
	-	0	57	57
		28	61	89

$$S = \frac{28}{28+61} = 100\%$$

$$E = \frac{57}{32+57} = 93\%$$

$$VPP = \frac{28}{28+32} = 87.5\%$$

$$VPN = \frac{57}{61+57} = 100\%$$

PRUEBA	KOH AL 10 % O MRL	NAC al 3 %
EX. DIRECTO +	14	14
CULTIVO CON DESARROLLO	28	32
% EX. DIRECTO +	16	16
% CULTIVO CON DESARROLLO	31	36
% EX. DIRECTO	100	100
% CULTIVO CON DESARROLLO	87	100

Tabla 5. Resultados de las muestras pulmonares.

PRUEBA	EXAMEN DIRECTO	CULTIVO
KAPPA	0.81	0.79
(S) SENSIBILIDAD	100%	100%
(E) ESPECIFICIDAD	100%	93%
(VPP) VALOR PREDICTIVO POSITIVO	100%	87.5%
(VPN) VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	100%	100%

Tabla 6. Resultados de las pruebas estadísticas Kappa y razón de momios de los cultivos y examen directo.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De las 89 muestras que se analizaron en el presente estudio, el 70% correspondieron a muestras de pacientes masculinos y 30% de pacientes femeninos, de estos pacientes 25 (28%) presentaban alguna inmunosupresión, en primer lugar el VIH con un 13 % seguido de cáncer (diversos tipos) y diabetes mellitus tipo 2 las cuales generan alteraciones de las líneas celulares (neutropenia y linfopenia) lo que conlleva que hongos oportunistas generen una micosis más fácilmente, o a hongos patógenos primarios invadir al hospedero de forma más agresiva, los diagnósticos presuntivos que más se reportaron fue tuberculosis y neumonía éstos pueden generar alteraciones pulmonares y favorecer procesos infecciosos diversos incluidos los causados por hongos. El rango de edades de este estudio fue de 17 a 87 años siendo la media 48 años, la mediana 46.5 años y la moda 68 años.

La mayor cantidad de muestras fueron lavado bronquioalveolar, seguido de líquido pleural, esputo, secreción bronquial y derrame pleural, ya que de manera habitual los porcentajes de los distintos tipos de muestras para análisis de infecciones pulmonares por hongos enviados al laboratorio de micología corresponden a estas proporciones, de estas muestras habitualmente las que presentan una mayor viscosidad debido a la presencia de moco suelen ser las muestras de esputo, este dato es importante porque en ellas podríamos apreciar mejor la efectividad de la actividad mucolítica de los compuestos comparados, es importante enfatizar en el tipo de muestra en cuanto a micosis pulmonares se refiere, en nuestro estudio el mayor número de muestras que se encontraron con desarrollo fue lavado bronquial, ya que se considera estéril (si hubo un buen proceso de obtención y de manejo), por lo que es la muestra más adecuada para diagnóstico de infecciones pulmonares, al contrario del esputo que se trata de una muestra expectorada, en nuestro estudio tuvimos un caso que refleja la importancia de esto y nos ayuda a entender de mejor manera las condiciones y tipo de muestras a solicitar e interpretar, de un mismo paciente procesamos dos muestras una fue LB y la otra esputo; en este último el resultado del examen en fresco y cultivo en los dos métodos fue positivo, en cambio; en el LB el examen directo y cultivo resultaron negativos esto para los dos métodos; esto se debe a que el esputo es una muestra que tiene la

probabilidad de arrastre de bacterias y microbiota normal del tracto respiratorio superior, como refiere Bonifaz A ⁽⁵⁾, en este caso como se observaron pseudohifas en el examen en fresco asumimos que existe una infección pero esta se encuentra en la mucosa orofaríngea no en el tracto respiratorio inferior o pulmones.

Este estudio se realizó con el fin de proporcionar y validar un método más para la identificación y diagnóstico de las micosis pulmonares, ya que los métodos actuales son en algunos casos ineficientes o invasivos; Curbelo J y colaboradores ⁽¹⁶⁾ comentan que las biopsias son el estándar de oro para diagnosticar una micosis pulmonar, pero son altamente invasivas porque el corte se debe hacer en parénquima o zona afectada del pulmón, para identificar las estructuras micóticas en los tejidos analizados por histopatología; esta es una prueba inequívoca de infección fúngica, otro inconveniente para realizar este procedimiento es el estado inmunológico además de las condiciones propias del paciente hospitalizado que hace que el procedimiento invasivo sea complicado de realizar, otra prueba son los antígenos inmunológicos de las micosis comunes invasoras del pulmón como las pruebas serológicas o intradermorreacciones que solo se utilizan con pacientes inmunocompetentes o para patologías que son asintomáticas las cuales generan una reacción en la piel (induración de más de 0.5 mm), las cuales son incompletas ya que nos dicen que hubo contacto con el hongo mas no una infección o parasitación de patologías por hongos. También las pruebas de galactomanano o 1- β -glucanos que se encuentran en la pared celular de algunos hongos y son utilizadas comúnmente para diagnosticar micosis pulmonares como es el caso de aspergilosis, aunque ofrecen resultados falsos positivos, ya que muchos hongos poseen estas estructuras (*Geotrichum*, *Fusarium*, etc.) además de algunos aditivos encontrados en alimentos procesados, como cereales y leche procesada como lo menciona C. pazos ⁽⁵⁵⁾

De acuerdo con los reportes de Flores J ⁽⁴²⁾ la NAC funciona como mucolítico o aclarante de muestras con exceso de proteínas en muestras pulmonares que contienen gran cantidad de glucoproteínas, de alto peso molecular las cuales le confieren su propiedad gelatinosa o mucoide, esta solución de NAC al 3 % funciona ya que contiene un grupo tiol (SH) libre en su estructura el cual ayuda a romper los puentes disulfuro de las

proteínas que se forman en la estructura terciaria, lo que ayuda en la fluidificación o disgregación estas glucoproteínas o moco. Liberando las estructuras parasitarias de los hongos lo que permite una mejor recuperación de los agentes en los cultivos de las muestras procesadas con este compuesto, en el examen directo es posible observar cómo se disgregan las proteínas, permite obtener una muestra sin interferencia de moco para su análisis en el microscopio con una visión aceptable de las estructuras micóticas presentes, además a diferencia de la solución de KOH al 10% las muestras cuando son tratadas con NAC al 3 % no se cristalizan y se observan las células de las muestras de manera más adecuada, ya que con KOH éstas se lisan o rompen. Esta prueba se utilizó como método de referencia o estándar de oro para este estudio ya que el hidróxido de potasio (KOH) al 10 % ayuda a aclarar las muestras con queratina o con exceso de proteínas como la mucina de las muestras pulmonares, como hace mención Bonifaz A, OShaughnessy E y colaboradores ^(5,52) hacen que el moco se disgregue y se separe de las estructuras parasitarias de los hongos, esta no rompe la pared o membrana y se observan las estructuras parasitarias de estos (mucorales, *Aspergillus*, *Candida* spp, hialohifomicetos, feohifomicetos, *Coccidioides* spp, *Paracoccidioides* spp, etc.), otros hongos necesitan tinciones especiales como (*Histoplasma capsulatum*, *Criptococcus neoformans* y *Pneumocystis jirovecii*), además, es necesario personal capacitado para distinguir y reconocer estas estructuras.

En este estudio se obtuvieron el mismo número de hallazgos para el examen en fresco o directo; 14 muestras positivas, tanto con KOH al 10% como con NAC al 3%, de las cuales en 12 se observaron pseudohifas con blastoconidios y dos de estos hallazgos se reportaron con hifas hialinas dicotómicas, septadas. El valor kappa en el examen directo fue de 0.81, este estudio se realiza cuando utilizamos un estudio nominal es decir cuando el resultado es positivo o negativo, y nos indica si el acuerdo entre observadores no fue por casualidad, según lo descrito por Mendoza V. ⁽⁵⁶⁾ En nuestro caso el resultado fue mayor a 0.75 esto se interpreta como muy buena concordancia no debida al azar, o por casualidad. En cuanto a razón de momios se utiliza cuando existe una escala nominal dicotómica y se desea validar o sustituir un método o procedimiento por el estándar de oro o patrón de referencia, los cuales arrojan utilidad diagnóstica del método determinando; en 4 parámetros, sensibilidad (S), Especificidad (E) y valor predictivo

positivo (VPP) y negativo VPN), en el caso de examen directo los resultados fueron los siguientes: una sensibilidad del 100%, esto nos indica la capacidad de la prueba para identificar la presencia de las estructuras micóticas es decir la probabilidad de que la prueba sea positiva cuando la muestra del paciente realmente contenga estas estructuras. Una especificidad del 100%, nos indica la capacidad de la prueba para identificar la ausencia de las estructuras, es decir; el porcentaje de que la prueba sea negativa cuando la muestra del paciente realmente no presente estructuras micóticas. El valor predictivo positivo fue del 100% y nos indica la probabilidad de que siendo la prueba positiva el sujeto tenga realmente la enfermedad, y el valor predictivo negativo nos indica la probabilidad de que siendo la prueba negativa el sujeto no presente el padecimiento, en este caso el VPN= 100% los porcentajes nos indican que no hay diferencia entre el estándar de oro y el nuevo método a validar, en cuanto al examen directo los dos funcionan de la misma forma y arrojan resultados iguales entre sí.

Para complementar el diagnóstico de visión directa o examen directo es necesario cultivar los hongos, colocarlos en medios idóneos para su desarrollo, los usados en forma rutinaria son agar dextrosa de Sabouraud y Micosel®, son medios de primoaislamiento y preservación de hongos, el colocar la muestra sin algún aclarante o mucolítico origina cultivos falsos negativos en 13 % de los casos, que colocando solución con NAC al 3% (Gráfica 18), esto es porque no se disgrega o rompe el moco y los hongos no llegan a hacer contacto con la superficie del agar lo que hace que no se desarrollen, otro inconveniente reportado por Ferrán R. y Bonifaz A, ^(4,5) es que en tracto respiratorio superior las muestras se contaminan por procesarlas en tiempos inadecuados (mayor a 4 horas después de toma de muestra) , o no se procesan correctamente (mal manejo de material estéril), se contaminan con bacterias las cuales compiten por los sustratos con los hongos, y por la gran capacidad bioquímica que poseen, origina el desarrollo de colonias en tiempos más cortos que los hongos, ello obliga a que el crecimiento bacteriano impida el crecimiento de hongos, con los consiguientes resultados falsos negativos, por lo tanto un diagnóstico erróneo o incompleto.

Es importante realizar cultivos consecutivos de la muestra y que al menos se cultive en 3 tubos de agar para descartar un mal procedimiento, contaminación o inhibición en el

desarrollo del hongo, el identificar a un hongo contaminante en cultivo como el Sabouraud no es una confirmación de infección fúngica, es necesario observar las estructuras parasitarias en el examen directo o biopsia, los cultivos se realizan para conocer el o los agentes etiológicos y solamente es posible efectuar un diagnóstico basado en el resultado del cultivo cuando se relacionan los datos clínicos con hongos patógenos primarios; ya que estos no se encuentran fácilmente en el aire, y no son contaminantes; provienen de regiones específicas con condiciones especiales para su desarrollo, si encontramos en un tubo de agar alguno de estos hongos se puede dar por hecho que es una infección causada por este, como lo indica Ferrán R. ⁽⁴⁾

En los cultivos se hallaron 28 positivos con el método rutinario del laboratorio (sin adición de mucolíticos) y 32 con tratamiento de las muestras con NAC al 3 %, de los cuales la mayoría de agentes etiológicos fueron *Candida albicans* en un 59 % seguido de candidosis mixtas (9%), *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Aspergillus niger* (gráfica 7 y 8). La diferencia entre el método rutinario y el cultivo tratado con NAC fue de un 13 %, comparándolos entre sí (tabla 18), aumentando el número de agentes etiológicos encontrados, en el método rutinario no se reportaron crecimientos de *C. krusei* y sólo hubo 2 casos de candidosis mixtas (gráfica 5 y 6). El valor kappa en el cultivo es de 0.79, muy buena concordancia no debida al azar, entre los observadores. Los valores de razón de momios fueron los siguientes (S)=100%, (E)= 93%, (VPP)= 87.5%, (VPN)= 100% (tabla 6), nos indican que la NAC al 3 % tiene un 100% de capacidad para identificar correctamente la presencia del agente, un 93 % de capacidad para identificar la ausencia del agente, un 87.5 % la probabilidad de que siendo la prueba positiva, la muestra del paciente contenga realmente el agente y un 100% de concordancia de que siendo la prueba negativa la muestra no contenga hongos, la sensibilidad y especificidad son propiedades estables, el VPN y VPP miden que tan bien predicen los resultados de la prueba al estándar de oro. Esto nos indica los falsos positivos y negativos, según lo descrito por Mendoza V ⁽⁵⁶⁾, en nuestro caso nos indica que hay 4 muestras falsas positivas esto es porque se compara con el método rutinario de laboratorio siendo esta la prueba de referencia o estándar de oro y como hubo 4 muestras en donde desarrollaron colonias sólo en el cultivo tratado con el nuevo método, la prueba estadística nos indica esta información aunque nosotros la podemos interpretar como que la NAC al 3 % permite

obtener una mayor cantidad de cultivos positivos que la prueba de referencia en un 13 %. Estos hallazgos son de importancia siempre y cuando conozcamos los criterios y cuidados para tomar un cultivo como prueba eficiente en casos de micosis pulmonares. Por otra parte, es importante poder descartar falsos positivos para conocer todos los agentes etiológicos que se pueden hallar en un cultivo esto es importante ya que como menciona Curbelo J y colaboradores⁽¹⁶⁾ se interpreta de manera rápida los datos clínicos y radiológicos lo que conlleva a un tratamiento precoz. En el caso de las micosis esto es de suma importancia ya que algunas enfermedades micóticas se desarrollan clínicamente indistinguibles en las radiografías o tomografías pulmonares como en el caso de la aspergilosis que puede ser indistinguible de otras hialohifomicosis.

La mayoría de los tratamientos que se administran a los pacientes funciona correctamente, sin embargo, algunos hongos como *Aspergillus terreus*, *Fusarium*, *S. boydii*, *P. lilacinum*, *C. guilliermondii* o *C. lusitaniae* presentan resistencia intrínseca a anfotericina B, debido a que es el tratamiento de elección de una micosis invasiva, la correcta identificación del agente etiológico permite establecer un tratamiento alternativo adecuado; también es importante reconocer y diferenciar ciertas micosis de importancia como aspergilosis de una mucormicosis, el análisis microscópico de las muestras permite observar que las hifas de estos hongos son muy similares cuando se encuentran invadiendo tejidos; son macrosifonadas, hialinas, dicotómicas, con la principal diferencia de que las especies de *Aspergillus* poseen septos de manera regular en la longitud de las hifas y los mucorales carecen o presentan muy pocas, esto resulta de suma importancia para identificar al agente etiológico en los cultivos, el tratamiento de elección en una aspergilosis es anfotericina B concomitante con voriconazol, debido a que este último es inductor de mucormicosis según lo reportado por Ramirez DS y colaboradores⁽²⁴⁾ y puede favorecer el desarrollo de casos fatales en la mayoría de las ocasiones.

En otros casos, como menciona Romero LA y colaboradores⁽²¹⁾ cuando se identifican infecciones por más de un agente (candidosis mixtas), al implementar un tratamiento el paciente puede no evolucionar de manera satisfactoria debido a este tipo de afección ya que no se reconocen todos los agentes etiológicos, esto tiene gran relevancia ya que el

tratamiento de base para un paciente inmunosuprimido con candidosis es el fluconazol, pero es indispensable saber que ciertas especies son resistentes intrínsecamente a este azol, como en el caso de *C. krusei* o *C. glabrata* por ejemplo; además de conocer ciertos criterios descritos por Ferrán R.⁽⁴⁾ en donde menciona que las especies del género *Candida* rara vez dan lugar a micosis invasoras, si no es en pacientes terminales, en las secreciones respiratorias se reportan en un 20% de la población sana y en más del 50% de los pacientes que han recibido antibioticoterapia.

Por esto es importante tener contacto con el médico tratante para correlacionar la microbiología, la morfología clínica, los criterios y pruebas inmunológicas, las radiografías o tomografías y la historia clínica del paciente (estado inmune, tiempo de evolución, zona endémica etc.), es decir si tenemos sospecha de una aspergilosis pulmonar conocer los diagnósticos presuntivos (cavitaciones, radiopacidades, nódulos, infiltrados hiliares, etc.) si posee alguna inmunosupresión (neutropenia), y observar en el examen directo o biopsia un proceso invasivo es decir las hifas hialinas, dicotómicas, septadas y cultivarlo al menos en tres tubos para descartar contaminación y reducir la posibilidad de un diagnóstico erróneo con todas estas medidas; todo esto para el beneficio y cura del paciente.

Se decidió realizar la solución de NAC al 3 % debido a que a mayor concentración (5 %) las especies de *Candida spp*, aunque crecían el desarrollo era mucho menor que con la solución al 3%, debido a que con concentraciones más altas el pH de la solución de NAC se acidificaba considerablemente, haciendo que las condiciones de desarrollo fueran desfavorables para las colonias, provocando crecimientos nulos o de una colonia cuando la muestra contenía pocas estructuras, También es importante la proporción que se utilizó en el cultivo que fue 1:2 (1 volumen de solución de NAC al 3 % sobre 2 volúmenes de muestra) debido que a concentraciones más altas la solución de NAC al 3% empezaba a inhibir el desarrollo de los hongos en especial del género *Candida spp*.

Por el tiempo y la poca frecuencia de algunos hongos invadiendo el sistema respiratorio no se pudo comprobar *in vivo* la función de la solución de NAC con otro tipo de hongos sin embargo se realizó un estudio *in vitro* de cepas de hongos invasores del sistema respiratorio, siguiendo el protocolo de este estudio.

Se tomaron dos tubos, se adicionó 0.5 ml de solución salina y se colocó *in vitro* el hongo, (se tomó un fragmento del desarrollo y se mezcló con la solución salina), se adicionaron 0.25 ml de solución NAC al 3 %, y en la otra agua estéril, se dejó reposar por 20 minutos, se sembraron en agar dextrosa de Sabouraud y Agar Micosel ®, se incubó durante 3 semanas a 28°C y se obtuvieron los siguientes datos.

HONGOS	SOLUCIÓN CON AGUA ESTÉRIL	SOLUCION NAC AL 3%
<i>Scopulariopsis sp.</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Aspergillus niger</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Aspergillus flavus</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Fusarium sp.</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Rhizopus sp.</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Mucor sp.</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Candida albicans</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Candida krusei</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Candida parapsilosis</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Candida glabrata</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Candida tropicalis</i>	Desarrolló	Desarrolló
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Desarrolló	No desarrolló
<i>Sporothrix schenckii</i>	Desarrolló	Desarrolló

Tabla 6. Resultados de crecimiento *in vitro* con solución de NAC al 3 % comparada con agua estéril.

Como se puede observar en la tabla la mayoría de los cultivos de hongos no tuvieron alguna inhibición al ser tratados con la solución de NAC al 3%, el crecimiento fue adecuado sin alterar sus estructuras de reproducción, pigmentos difusibles al medio ni morfología colonial, el único hongo que no creció fue *Paracoccidioides brasiliensis*, así que cuando tengamos sospecha de esta patología hay que utilizar en conjunto el método rutinario recordando que este hongo tiene condiciones especiales de humedad y desarrollo y es difícil de aislar aún con el método rutinario.

8. CONCLUSIONES

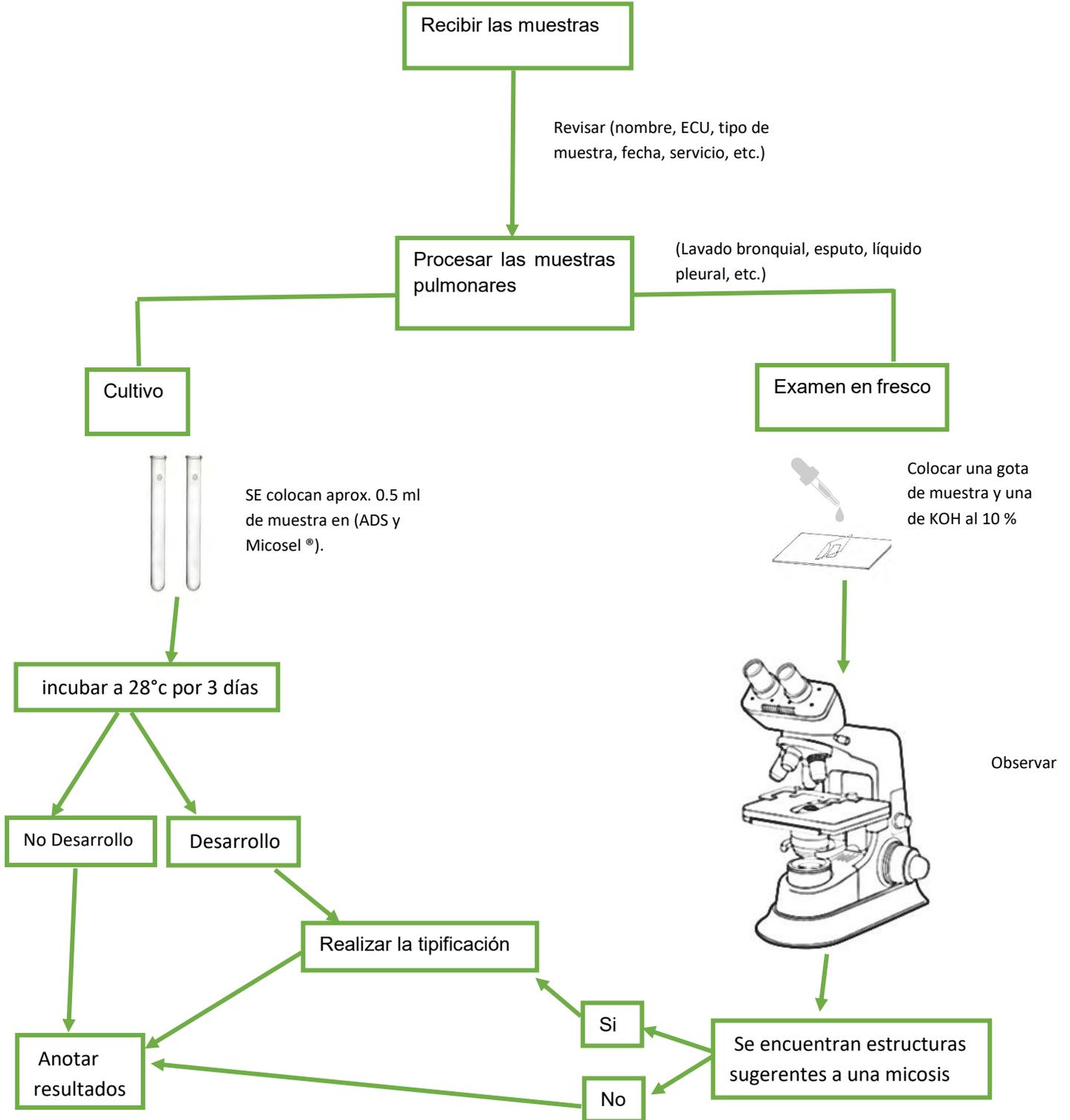
La solución de NAC al 3% funciona como mucolítico y conserva en forma correcta la viabilidad de los hongos, en el examen en fresco o directo se observan las estructuras de los hongos parasitando en la muestra sin alteración alguna, pero no genera un cambio significativo en cuanto a mejorar esta técnica, los resultados estadísticos nos arrojaron que la NAC al 3 % tiene la misma eficiencia que el KOH al 10 %.

En el cultivo tratado con la solución a validar, existe una recuperación mayor que en el método rutinario, esto se demuestra por los análisis estadísticos descritos en los resultados, en estos se demuestra una mayor viabilidad o desarrollo de los hongos, hasta un 13 % más desarrollo que el método rutinario, debido a las características que tiene la NAC al 3 %, como un pH óptimo para el crecimiento de los hongos, efectividad mucolítica y bacteriostática, es decir; hay menor contaminación bacteriana, por lo tanto menos competencia por los nutrientes y un mayor desarrollo fúngico.

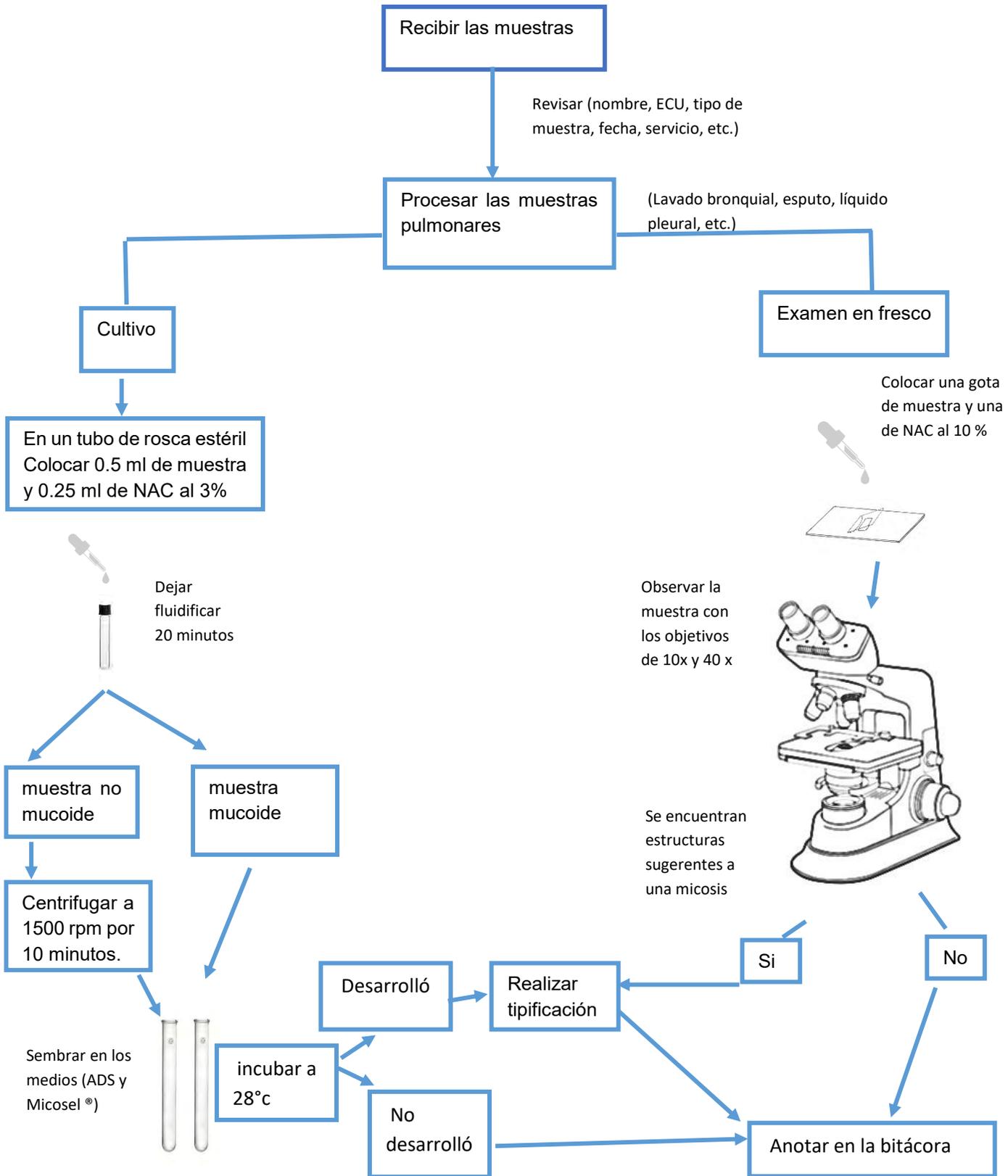
9. ANEXOS

9.1 Técnicas

METODO RUTINARIO PARA PROCESAR Y OBSERVAR PROBABLES MICOSIS PULMONARES



MÉTODO DE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) AL 3 % PARA PROCESAR Y OBSERVAR PROBABLES MICOSIS PULMONARES



9.1.1 Reactivos y Materiales

- Tubos de ensayo de 16X150 mm.
- Tubos con tapón de rosca
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Cajas Petri de 100X15 mm.
- Jeringas de 1mL.
- Asas bacteriológicas.
- Kit de AUXACOLOR®
- Asas micológicas
- Asas bacteriológicas
- Centrifuga
- Microscopio de campo claro

Reactivos

- ❖ Hidróxido de potasio al 10% (KOH)
- ❖ Azul de algodón lactofenol
- ❖ N-acetil-L-cisteína al 3%

HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 10%

Hidróxido de potasio (KOH) 10 g. Agua destilada 100 ml.

Uso: como solución aclarante para exámenes directos ⁽⁵⁶⁾

AZUL DE ALGODÓN

Azul de algodón (de anilina) 0.05 g. Glicerol 40 ml. Fenol (cristales) 20 g. Ácido láctico 20 ml.

Agua destilada 20 ml.

Preparación: disolver el fenol en ácido láctico, después agregar agua y glicerol, calentar ligeramente y, por último, adicionar el azul de algodón.

Uso: para exámenes directos de las cepas ⁽⁵⁾.

N-acetil-L-cisteína (NAC)

N-acetil-L-cisteína 3 g. agua destilada 100 ml.

Preparación: disolver la NAC en agua destilada estéril, agitar y mezclar hasta obtener una solución homogénea, transparente.

Uso: como mucolítico y aclarante de muestras pulmonares

9.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Dextrosa Sabouraud (ADS).
- ADS más antibióticos (Micosel®).
- Medios cromogénicos (CHROMagar-*Candida*®).
- Corn meal adicionado de Tween 80 al 1%.

HARINA DE MAÍZ + TWEEN 80 AL 1%.

Medio de harina de maíz 990 ml. Tween 80, 10 ml.

Preparación: esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Uso: se le conoce también como método Dalamau y sirve para formación de pseudomicelio y clamidoconidios del género *Candida* ⁽⁵⁾.

SABOURAUD DEXTROSA AGAR.

Dextrosa 20 g. Peptona 10 g. Agar bacteriológico 20 g. Agua destilada 1 000 ml. pH 6.5.

Preparación: se esteriliza en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

Uso: medio rutinario para el primoaislamiento y conservación de diversos hongos.

(5)

SABOURAUD MÁS ANTIBIÓTICOS AGAR (MICOSEL®).

Medio de Sabouraud 1 000 ml. Actidione (cicloheximida) 400 mg. Cloranfenicol 500 mg. pH de 6.5.

Preparación: los antibióticos se adicionan de la siguiente manera: el actidione en 1 ml de acetona y el cloranfenicol en 1 ml de alcohol etílico; ambos se agregan cuando el medio ha hervido por uno o dos minutos. Se esteriliza en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. ⁽⁵⁾

Uso: medio selectivo para hongos patógenos ⁽⁵⁾.

CHROMagar-*Candida*®.

Disolver 20 g de CHROMagar *Candida* en 250 mL de agua destilada estéril. Calentar la mezcla (< 100°) hasta disolución completa. El medio no requiere esterilización por autoclave, sin embargo, después de enfriado en baño de agua a 45°C, el agar debe ser vertido en placas. Luego de solidificadas, las placas deben almacenarse a 4°C hasta su uso.

Composición: Cromopeptona 10,00 g, Glucosa 20,0 g, Mezcla cromogénica 2,0 g, Cloranfenicol 0,5 g, Agar 15,0 g, Agua destilada para 1000 mL. pH final 7,4 ± 0,2.

Uso: CHROMagar™ *Candida* es un medio selectivo para el aislamiento e identificación presuntiva de levaduras y mohos filamentosos y diferenciación de especies de *Candida spp.* Debido a las diferencias en morfología y color de las colonias de levaduras, este medio facilita la detección de mezclas de cepas de levaduras en la muestra analizada y ayuda a identificar las candidosis mixtas. ⁽⁵⁷⁾

9.1.3 HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Iniciales del paciente: _____ . Edad: ____ . Sexo: ____ . Fecha: _____

Micológico _____ .

Antecedentes médicos

Diagnóstico: _____ .

Aspectos clínicos correlacionados a una micosis: Si ____ . No ____ . Probable

Cuales: _____ .

Muestra: _____

Tratamiento(s) actual(es) Si ____ . No

Cual/Cuales:

Resultados:

Examen en fresco	Se observan estructuras parasitarias		KOH al 10 %		N-acetilcisteína	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO
Examen en fresco	Características					
	Desarrollo del agente etiológico		SI	NO	SI	NO
Cultivo (ADS)	Características microscópicas	Tipo de micelio				
		Estructuras de reproducción				
	Características macroscópicas	Anverso				
		Reverso				
Cultivo (Micosel®)	Hubo desarrollo del agente etiológico	SI				
		NO				
		SI, diferente que en Sabouraud, (Características)				
Clínica	Existe correlación clíco-micológica					
Diagnóstico	Micosis pulmonar del paciente					

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fox, S. (2011). *Fisiología humana*. D.F., México: McGraw-Hill.
2. Lockhart, R. (1965). *Anatomía Humana*. D.F., México: Interamericana.
3. Latarjet, M., Ruiz, A., & Pró, E. (2007). *Anatomía Humana*. D.F., México: Médica Panamericana.
4. Ferrán R. (2001). Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior. *Rev Iberoam Micol*, 84(607), 3050-6.
5. Bonifaz, A. (2015). *Micología médica básica*. D.F., México: McGraw-Hill.
6. Yang, Y., Chu, W., Lin, C., Tsai, S., Chang, t., & Lo, H. (2014). An emerging issue of mixed yeast cultures. *J Microbiol Immunol Infect*, 47, 339-344.
7. Walsh, T., Hiemenz, J., & Anaissie E. (1996). Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect Dis Clin North Am*, 90(2), 365-400.
8. Litzky L. (1996). The pathology in fungal disease in the lung. *Semin Roentgenol*, 31(1), 4-13.
9. Richardson, M., Richardson, M. D., & Warnock, D. (2012). *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell Publishing.
10. Gassiot, C., Pino, P., Rodríguez, J., Ramos, M., Páez, I., & Gundián, J. (2000) A propósito de las micosis pulmonares. *Acta Med*, 9 (1-2), 59-66.
11. Silveira, F., & Paterson, D. (2005). Fungal pulmonary infections. *Curr Opin Pulm Med*, 11(3), 242-6.
12. Rippon, J. (1990). *Tratado de Micología Médica, Hongos y Actinomicetos patógenos*. Buenos Aires, Argentina: McGraw-Hill interamericana.
13. Méndez, L., López, R., & Hernández, F. (2008). *Actualidades en Micología Médica*. D.F., México: Editorial de la Facultad de Medicina UNAM.

14. Iniesta, J., Pérez, R., & Amorós, L. (2011). *Farmacología aplicada en otorrinolaringología*. Badalona, España: EUROMEDICE, Ediciones Médicas, S.L.
15. Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, I., & Loscalzo, J. (2012). *Harrison principios de medicina interna*. D.F., México: McGraw-Hill.
16. Curbelo, J., Galván, J., & Aspa, J. (2015). Actualización sobre Aspergillus, Pneumocystis y otras micosis pulmonares oportunistas. *Arch Bronconeumol*, 51(12), 647-653. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2015.02.010>
17. Soto, J. (2010). *Manual diagnóstico y terapéutica en neumología*. Madrid, España: ERGON.
18. Enoch, D., Ludlam, H., & Brown, N. (2006). Invasive fungal infections: A review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*, 55, 809–818.
19. Marr, K., Patterson, T., & Denning, D. (2002) Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am*, 16(4), 875-94.
20. Dosdá, R., Carrión, F., Pérez, V., & Mollá, M. (2007). Candidiasis pulmonar en un paciente no inmunodeprimido. *Radiología*, 49(6), 452-6.
21. Romero, A., Araiza, J., Hernández, M., Cerón, M., Hernández, V., Ponce, R., & Bonifaz, A. (2014). Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. *Dermatol Rev Mex*, 58, 239-246.
22. Tello, M., Gutierrez, E., Béjar, V., Galarza, C., Ramos, W., & Ortega, A. Criptococosis. *Rev Méd Risaralda*, 19(2), 147-153.
23. Maziarz, E., & Perfect, J. (2016). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 30(1), 179-206
24. Ramírez, S., Sierra, D., Contreras, D., Araiza, J., Ponce, R., Guarro, J., & Bonifaz, A. (2012). Mucormicosis rino-órbito-cerebral causada por *Rhizomucor pusillus* en paciente diabético descompensado. *Dermatol Rev Mex*, 56(1), 132-136.
25. Zhiming, L., & Zhang, L. (2017). Diagnosis and treatment of pulmonary mucormycosis: A case report. *Exp Ther Med*, 14(4), 3788–3791.
26. Yang, L., Shu-Ting, E., & Piu L. (2010). Common and Emerging Fungal Pulmonary Infections. *Infect Dis Clin North Am*, 24(3), 557–77.

27. Taj-Aldeen, S. (2017). Reduced Multidrug Susceptibility Profile Is a Common Feature of Opportunistic Fusarium Species: Fusarium Multi-Drug Resistant Pattern. *J Fungi*, (3)2, 18.
28. Méndez, L. (2008). Las micosis sistémicas en México. *Gac Med Mex*, 144 (2), 128-130.
29. Stockamp, N., & Thompson, G. (2016). Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am*, 30(1), 229-46.
30. Wheat, L., Azar, M., Bahr, N., Spec, A., Relich, R., & Hage, C. (2016). Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*, 30(1), 207–227.
31. Sánchez, M. (2009). Histoplasmosis, la micosis del viajero. *Enf Inf Microbiol*, 29(3), 111-6.
32. Sánchez, L., Galarza, C., & Cortéz, F. (2010). Infecciones micóticas sistémicas o profundas: histoplasmosis. *Dermatol Perú*, 20(1), 139-152.
33. Dantas, K., Freitas, R., Da Silva, M., Criado, P., Luiz, O., & Pardini, A. (2018). Comparison of diagnostic methods to detect *Histoplasma capsulatum* in serum and blood samples from AIDS patients. *PLoS ONE*, 13(1):1-12.
34. Fernández, R., & Arenas, R. (2009). Paracoccidioidomycosis. Actualización. *Dermatología Rev Mex*, 53(1), 12-21.
- 35 Morón, C., Ivanov, M., Vereá, M., & Pecotche, D. (2012). Paracoccidioidomycosis Presentación de la casuística de diez años y revisión de la literatura. *Arch Argent Dermatol*, 62, 92-97.
36. Secretaría de Salud. (2014). Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), México.
37. AECOSAN. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2012). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios-4. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, (22), 29-132.

38. Catálogo de medicamentos. Colección Consejo Plus 2017. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
39. Gillissen, A. (2011). Actualizan el Uso Terapéutico de la N-Acetilcisteína y los Mecanismos de Acción Involucrados. *Pneumologie*, 65(9), 549-557.
40. EFSA. European Food Safety Authority. (2003). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to N-acetyl-L-cysteine for use in foods for particular nutritional uses and in foods for special medical purposes. *The EFSA Journal*, (21), 1-8.
41. Martínez, J., Knecht, C., Ramírez, N., & Szerman, N. (2009). Sistemas de neurotransmisión glutamatérgica y adicción a la cocaína. Progresos en el tratamiento farmacológico. *Rev Psiquiatr Urug*, 73(1), 63-72.
42. Flóres J. (2014). *Farmacología humana*. Barcelona, España: Masson.
43. Bonanomi, L., & Gazzaniga, A. (1980). Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. *European Journal respiratory disease*, 61, 45-61.
44. Dodd, S., Dean, O., Copolov, D., Malhi, G., & Berk, M. (2008). N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol*, 8(12), 1955-62
45. Olofsson, A., Hermansson, M., & Elwing, H. (2003). N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solids surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 4814-22.
46. Cristóbal, R. (2007). "Influencia de la N-acetilcisteína en la prevención de la formación y remoción de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*". (Tesis Química farmacéutica pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de farmacia y bioquímica, Perú.
47. Huynh, H., Couper, R., Tran, C., Moore, L., Kelso, R., & Butler, R. (2004). N-acetylcysteine, a novel treatment for Helicobacter pylori infection. *Dig Dis Sci*, 49:1853-61.
48. Sierra, M., Gúzman, A., Olivares, I., Torres, Y., & Hicks, J. (2004). Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 17(2), 135-145.
49. Dekhuijzen, P. (2004). Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 23, 629-636.

50. Lorenzo, P., Moreno, A., Iizasoain, I., Leza, J., Moro, M., & Portolés, A. (2009). *Velázquez Farmacología básica y clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
51. Kelly GS. (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*, 3(2), 114–127.
52. OShaughnessy, E., Shea, Y., & Witebsky, F. (2003). Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infect Dis Clin North Am*, 17(1), 135–158.
53. Josep M. (2004). *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. Madrid, España: Elsevier España.
54. Mendoza V. (2001). *Análisis y difusión de resultados científicos*. D.F., México: Facultad de estudios superiores Zaragoza, UNAM.
55. Pazos, C. (2004). Diagnóstico de las micosis invasoras. Detección de antígeno de galactomanano. *Rev Esp Quimioter*, 17(1), 79-82.
56. Arango, M., & Castañeda, E. (2003) *Micosis humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos*. Medellín, Bogotá: Corporación para Investigaciones Biológicas, Instituto Nacional de Salud.
57. BBL™ CHROMagar™ Candida. Consultada el 17/diciembre/2017, 18:52. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/productCenter/254093.asp>