



11262
9
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MEDICAS

HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI

**INDUCCION DE RESISTENCIA *IN VITRO* A
4 ANTIMICOTICOS EN CEPAS DE *Candida albicans*
Y ANALISIS DE SU GENOTIPO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A I
TERESA GUTIERREZ GUEVARA

COMITE TUTORIAL: DR. ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ

DR. HUMBERTO DIAZ PONCE

COLABORACION: DR. J. ANTONIO ENCISO MORENO

DR. FCO. JAVIER TORRES LOPEZ

MEXICO, D. F.

276503

2000



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.

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI

INDUCCION DE RESISTENCIA *IN VITRO* A 4 ANTIMICOTICOS EN
CEPAS DE *Candida albicans* Y ANALISIS DE SU GENOTIPO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A:
TERESA GUTIERREZ GUEVARA

COMITÉ TUTORIAL:

DR ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ *
DR HUMBERTO DIAZ PONCE **

COLABORACION:

DR J. ANTONIO ENCISO MORENO ***
DR FCO. JAVIER TORRES LOPEZ ****

* Coordinador Nacional de Investigación del IMSS.

** Jefe del Servicio de Lactantes del Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

*** Jefe de la Unidad de Biología Molecular de la UIMEIP, Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

**** Jefe de la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, CMN SXXI.

**“INDUCCION DE RESISTENCIA *IN VITRO* A 4 ANTIMICOTICOS EN
CEPAS DE *Candida albicans* Y ANÁLISIS DE SU GENOTIPO”.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MEDICAS
PRESENTA: TERESA GUTIÉRREZ GUEVARA**

**COMITÉ TUTORIAL:
DR. HUMBERTO DÍAZ PONCE
DR. ONOFRE MUÑOZ HERNANDEZ
DR. ANTONIO ENCISO MORENO**

**COLABORACIÓN:
DR. FCO. JAVIER TORRES LÓPEZ**

**UNIDAD INVESTIGACIÓN MÉDICA DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y PARASITARIAS
HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI**

A mi esposo:

A quien ha creído en mí y con quien comparto mi vida.

A Carlos y Tony:

Los cuales le han dado un rumbo diferente a mi vida y me han ayudado a culminar una meta más.

A mis padres:

Quienes han sido la parte primordial de mi existencia y a quienes les debo parte de lo que soy.

A mis hermanos:

Que aunque lejos, me han apoyado hasta el momento.

A todas las personas que de una u otra manera han contribuido a mi formación: GRACIAS.

A Dios por darme la oportunidad de estar viva y culminar este paso importante para mi futuro.

INDICE

	Página
RESUMEN	2
ANTECEDENTES	4
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPOTESIS GENERAL	18
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	30
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	41
ANEXOS:	
CUADRO 1. Determinación previa de CMI en cepas de <i>C. albicans</i> Estudiadas.	50
CUADRO 2. Determinación de CMI de los 4 antimicóticos después de cultivar <i>C. albicans</i> con concentraciones crecientes.	51
CUADRO 3. Determinación de CMI de <i>C. albicans</i> antes y después de la exposición a fármacos.	52
CUADRO 4. Determinación de CMI de <i>C. albicans</i> después de almacenar.	53
FIGURA 1. Morfología microscópica de <i>C. albicans</i> con y sin exposición <i>in vitro</i> .	54
FIGURA 2. Perfil de electroforesis de <i>C. albicans</i> sensible.	55
FIGURA 3. Perfil de electroforesis de <i>C. albicans</i> sensible y resistente.	56
AGRADECIMIENTOS:	

Este proyecto fue financiado parcialmente por el CONACYT. N° DE PROYECTO 26253-m.

RESUMEN

La candidosis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*, dentro de las cuales *Candida albicans* es la más frecuente. Tiene una distribución cosmopolita y es la micosis más frecuente en inmunocomprometidos: pacientes con cáncer y neutropenia, pacientes con trasplante de órganos y pacientes con SIDA. La prevalencia de candidosis ha incrementado así como la emergencia de cepas resistentes a antimicóticos

OBJETIVO: Seleccionar *in vitro* subpoblaciones resistentes a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B, a partir de cultivos sensibles de *C. albicans* mediante incubación de las cepas originales en concentraciones crecientes de estos fármacos, y determinar si existen cambios fenotípicos y genotípicos. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Cinco cepas de *C. albicans* catalogadas como sensibles a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B fueron cultivadas en medio RPMI 1640. Posteriormente, cada una de las cepas fue incubada en presencia de concentraciones de los antimicóticos progresivamente crecientes hasta rebasar concentraciones iguales o mayores a los valores de referencia para considerar resistencia. La susceptibilidad fue evaluada con el método propuesto por la NCCLS, antes y hasta lograr la selección de resistencia. Las cepas resistentes fueron almacenadas y probadas a diferentes tiempos de almacenamiento para evaluar la estabilidad de la resistencia.. Se extrajo DNA de las cepas sensibles y las subpoblaciones resistentes. Fueron analizados por el método de RAPD-PCR. **RESULTADOS:** Se logró la obtención de subpoblaciones resistentes a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B, a partir de

cinco cepas de *C. albicans* originalmente sensibles. Cuando las cepas de *C. albicans* fueron expuestas a los azoles se seleccionaron subpoblaciones con resistencia cruzada para azoles, pero no para anfotericina B. Las cepas expuestas a anfotericina B seleccionaron subpoblaciones con resistencia a anfotericina B y a los azoles. Las subpoblaciones resistentes sufrieron cambios en su morfología de levaduras a pseudomicelios. El perfil electroforético del DNA mostró diferencias en la cuenta de sus bandas entre las cepas inicialmente sensibles y las subpoblaciones resistentes para cada uno de los fármacos utilizados. **CONCLUSIONES:** La exposición de *C. albicans* a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B de manera secuencial y a dosis crecientes selecciona subpoblaciones resistentes a estos fármacos. Las subpoblaciones de *C. albicans* con resistencia a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B, mantuvieron dicha resistencia a un año de almacenamiento. La exposición de *C. albicans* a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B de manera secuencial y a dosis crecientes seleccionó subpoblaciones resistentes observando cambios en la morfología, de levaduras solas a levaduras con pseudomicelios. La posible diversidad entre cepas sensibles y las subpoblaciones resistentes fue determinada por medio de RAPD-PCR.

ANTECEDENTES

La candidosis es una micosis de distribución cosmopolita y es la más frecuente en inmunocomprometidos: pacientes con cáncer y neutropenia, pacientes sometidos a trasplante de órganos y pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Las formas clínicas de la candidosis son: localizada, invasiva y sistémica (1-3).

La etiología incluye diversas especies de levaduras del género *Candida*. *Candida albicans* ocupa el primer lugar como causa de esta micosis; sin embargo, se han descrito otras especies como: *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida stellatoidea*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida glabrata*, *Pichia guilliermondii* y *Candida dubliniensis* (4-15).

Los factores de riesgo identificados para sufrir formas invasivas o sistémicas de enfermedad, aún en pacientes sin previo inmunocompromiso son: el empleo de antibióticos de amplio espectro, catéteres intravenosos, cirugía mayor, estancia hospitalaria prolongada, uso de alimentación parenteral y tratamiento con esteroides (16-20).

En los últimos 15 años se ha registrado un incremento en la frecuencia de candidosis (3,5,10); fenómeno además descrito por los Sistemas Nacionales de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS) de los Centros para Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos de Norteamérica, cuyos resultados indican que levaduras del género *Candida* causaron el 7.7% de las infecciones nosocomiales (21). En un estudio retrospectivo de Pittet y Wenzel (22) se encontró que las diferentes especies de *Candida* fueron las que más contribuyeron en el incremento de infecciones micóticas con hemocultivo positivo, de 2.5% a 7.1% entre 1981-1983 y 1990 a 1992. Wey, et al (23) encontraron que las tasas de candidemia nosocomial, en los hospitales universitarios de Iowa eran de 5.1 pacientes infectados por 10,000 ingresos en 1983, 10.3 por 10,000 ingresos en 1985 y 7.7 por 10,000 ingresos en 1986.

En México, Pérez Miravete (24) en una revisión durante los años 1990 y 1991, encontró que *Candida* se situó en los primeros lugares de frecuencia entre los hemocultivos positivos, en el Hospital Infantil de México.

La candidosis sistémica ocurre principalmente en pacientes con neutropenia, entre un 20 a 49% de los pacientes con leucemia, y en 28% de los pacientes sujetos a trasplante de médula ósea.

En pacientes con SIDA, los cuadros clínicos más comunes ocasionados por *Candida sp*, son estomatitis y esofagitis con una frecuencia que oscila entre el 43 y 93% (25-27).

En pacientes con quemaduras severas se han encontrado cultivos positivos de *Candida sp*. en el 30-66% de ellos, y se diagnóstico con cultivo previamente positivo en algún otro sitio corporal aquellos que desarrollaron candidemia en 3-5% (28-30).

La mortalidad por candidosis ocurre principalmente en los casos de enfermedad diseminada. En Estados Unidos de Norteamérica se ha estimado una tasa de mortalidad de 7.9 muertes/10⁶. En un estudio realizado en la Universidad de Texas (1) la letalidad cruda fue del 60% en pacientes con candidosis nosocomial. La letalidad en niños y adultos con terapia antimicótica adecuada es del 20-50% (16,23,31).

Estos datos no han sido procesados en México.

Todos los pacientes con inmunocompromiso y candidosis, o con candidosis invasiva y sistémica deben recibir tratamiento. Los fármacos utilizados incluyen nistatina y clotrimazol para tratar candidosis

localizada (32). Para el tratamiento de candidosis invasiva se han utilizado azoles (ketoconazol) y triazoles (fluconazol e itraconazol) (32,33), sin embargo, a pesar de sus efectos colaterales la anfotericina B continúa siendo el medicamento de elección para el tratamiento de candidosis sistémica y algunos casos de candidosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos (34,35). En años recientes, se han realizado ensayos clínicos con nuevos antimicóticos para el tratamiento de candidosis invasiva (36).

El mecanismo de acción de los medicamentos antimicóticos de uso común son: daño oxidativo en la membrana celular e inhibición de las enzimas dependientes del citocromo P-450 (32-35), que ocasiona la formación de poros e inhibición de la síntesis de los esteroides de la membrana celular. La anfotericina B y la nistatina provocan daño oxidativo, mientras que el clotrimazol, ketoconazol, fluconazol, miconazol e itraconazol actúan a nivel del citocromo P-450.

Desde 1990, se han informado casos de candidosis refractarios al tratamiento con azoles y triazoles en grupos de pacientes con SIDA (37). La mala respuesta al tratamiento se ha debido a la emergencia de cepas de *C. albicans* resistentes a los grupos de drogas antimicóticas antes mencionadas, o a la sobreinfección por levaduras del género

Candida que corresponden a especies diferentes a *C. albicans* y que son naturalmente resistentes a algunos fármacos antimicóticos (3,5,38). El problema de cepas de *Candida sp.* resistentes ha sido estudiado ampliamente en pacientes con SIDA, pero este fenómeno también es posible encontrarlo en otros pacientes inmunocomprometidos. En un estudio previo de nuestro grupo se encontró en una muestra de 60 cepas de *C. albicans* que el 47% fue resistente a ketoconazol, el 17% a fluconazol y el 13% a itraconazol, no se encontraron cepas resistentes para anfotericina B. Las cepas incluidas en ese estudio fueron aisladas de pacientes pediátricos inmunocomprometidos, sin SIDA (39). En un segundo estudio de junio 1996 a enero 1997, en el cual se incluyeron 214 cepas de *Candida* aisladas de pacientes hospitalizados en instituciones de tercer nivel para atención de pacientes con cáncer, pacientes pediátricos y neonatos, 149 cepas fueron *C. albicans* y 65 no albicans.

Se encontró que la resistencia en *C. albicans* fue: 40% para itraconazol, 30% para fluconazol y 28% para ketoconazol. Entre las cepas de especies diferentes a *C. albicans*, la resistencia fue de 28%, con mayor frecuencia para itraconazol; las especies que mostraron resistencia fueron en orden decreciente, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y

C. glabrata. No se encontraron cepas resistentes para anfotericina B (40). Otro estudio realizado en México, con 204 cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes adultos con SIDA, empleando el sistema ATB FUNGUS (BioMérieux) para pruebas de sensibilidad, encontraron que el 46% mostraba resistencia a ketoconazol, 38% a econazol, 10% a fluconazol, 10% a fluorocitosina, 6% a anfotericina B, 5% a nistatina y 4% a miconazol (41).

Se han realizado estudios orientados a conocer factores de riesgo asociados al desarrollo de resistencia de fluconazol, encontrando como causas principal, la avanzada inmunosupresión y exposición previa a los fármacos antimicóticos (37,38).

La recurrencia o persistencia de candidosis oral y esofagitis causadas por *C. albicans* pueden relacionarse con el deterioro del sistema inmune, pero el fenómeno puede deberse a la resistencia antifúngica (42). El tratamiento primario prolongado o profilaxis a dosis bajas favorecen la emergencia de sobreinfección por otras especies de *Candida*, como son *C. krusei* y *C. glabrata*, las cuales se han reportado que son resistentes a la mayoría de antimicóticos de uso común (43,44).

El número creciente de individuos con SIDA y trasplantes de médula ósea u órganos sólidos ha favorecido el empleo de los azoles como agentes profilácticos y terapéuticos contra candidosis, esto ha coincidido con la emergencia de cepas resistentes a estos fármacos (26,37,38,45).

Los azoles muestran un “punto final móvil” cuando se valoran *in vitro*, es decir, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de casi todos los hongos comunes parecen denotar gran resistencia, pero a menudo se observa una respuesta clínica satisfactoria. El fluconazol es el azol más utilizado en pacientes con SIDA y en la profilaxis de micosis entre quienes han recibido trasplante de médula ósea; precisamente en estos dos grupos de pacientes se han detectado la mayor parte de cepas de *C. albicans* resistentes a los azoles (45).

Rogers y Galgiani (46) mencionan que en 35/37 muestras clínicas de *C. albicans* tuvieron una CMI para fluconazol igual o menor a 4.0 µg/ml. Tuvieron 2 cepas resistentes a ketoconazol con CMI de 16 µg/ml para fluconazol. Además, realizaron correlación entre la resistencia *in vitro* y la falta de respuesta clínica a fluconazol en un modelo de rata con candidiasis sistémica.

En el caso de *C. albicans*, la resistencia a fluconazol es un hecho corroborado, que al parecer ocurre de manera inherente en 2 a 5% de las muestras microbiológicas, y que puede surgir *in vivo*, especialmente en individuos que han recibido ciclos repetidos de antimicóticos del tipo de los azoles durante largo tiempo. De importancia crítica ha sido la observación de que la resistencia a un derivado azólico en levaduras del género *Candida* casi siempre denota resistencia cruzada con los demás antimicóticos de este grupo de fármacos (47).

Aunque el desarrollo de resistencia para anfotericina B es un evento raro, Dick et al. (48) en uno de los primeros estudios sobre resistencia a anfotericina B, en 1372 muestras de levaduras de pacientes oncológicos y no oncológicos, encontraron 8.6% de cepas con resistencia a anfotericina B, *C. albicans* 4.3%, *C. glabrata* 2.9% y *C. tropicalis* 1.4%. Los autores destacan que los pacientes con cepas resistentes habían tenido previamente aislamiento de cepas susceptibles, y argumentan que lo antes mencionado demuestra la naturaleza adquirida de la resistencia a anfotericina B *in vivo*. Aún más, debido a que todas las cepas resistentes provenían de pacientes oncológicos, plantean la hipótesis que la exposición prolongada a polienos, asociados a otros factores de riesgo pudieron contribuir a la

aparición de levaduras resistentes en dichos pacientes. Conly y Rennie (49), informaron de un paciente infectado con *C. albicans* resistente a anfotericina B, sin embargo sus resultados deben ser interpretados con reserva debido a que las pruebas de sensibilidad utilizadas no fueron las estandarizadas y aceptadas por el NCCLS. Para otras especies de *Candida*, hay informes de resistencia a anfotericina B, como son para *C. krusei*, *C. lusitaniae* y *Torulopsis glabrata* (43,44).

Powderly, et al. (50) analizaron la resistencia a anfotericina B en 29 levaduras aisladas de pacientes con trasplante de médula ósea, encontrando que todas las *Candidas* aisladas de los pacientes con infecciones mortales presentaron CMI superiores a 0.8 µg/ml, lo cual sugiere una correlación precisa entre los datos de pruebas *in vitro* y los resultados *in vivo*, en dicho estudio.

Los mecanismos intrínsecos descritos que intervienen en el desarrollo de resistencia son :

a) Sistema de transporte dependiente de energía, del cual han sido descritos dos genes el CDR1 y BEN^r. Este mecanismo provee a las levaduras resistentes de la capacidad para expulsar las drogas antimicóticas fuera de su citosol (51-57).

b) Cambios en el citocromo P-450_{14DM}. Cuando esto sucede, hay disminución en la afinidad de los azoles para este citocromo, y esto contribuye a las diferencias en resistencia (51-57).

c) Cambios en la permeabilidad. Se ha observado que en las cepas resistentes se incrementa el contenido de esterol en la membrana celular de las levaduras, lo cual disminuye la acumulación de los azoles dentro de ellas (51-57).

El espectro creciente de resistencia a antimicóticos nos obliga a la búsqueda intensiva de nuevos métodos de identificación de cepas resistentes, por lo que para determinar los mecanismos responsables de la resistencia se han realizado múltiples estudios a nivel de biología molecular entre los cuales el uso de DNA polimórfico en epidemiología ofrece varias ventajas.

Un método útil se describe por extracción de DNA de las levaduras seguido de digestión y electroforesis de los fragmentos de DNA obtenidos (58).

Varios estudios con base en la tipificación fenotípica y genotípica han sido aplicados a levaduras, entre ellos se incluyen: perfiles de isoenzimas, electroforesis de campos pulsados, polimorfismo de los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de

restricción, además de métodos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Southern blots.

La PCR asociada a métodos con base en la amplificación polimórfica al azar de DNA usando iniciadores pequeños ha sido adaptada para detectar diferencias entre cepas en microorganismos unicelulares eucariotes (59-62).

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar *in vitro* subpoblaciones resistentes a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B, a partir de cultivos sensibles de *C. albicans* mediante incubación con concentraciones crecientes de estos fármacos; para analizar si existen cambios genotípicos y fenotípicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Seleccionar *in vitro* subpoblaciones de cepas de *C. albicans* resistentes a ketoconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B
2. Identificar diferencias en el fenotipo y genotipo de cepas de *C. albicans* sensibles y en subpoblaciones resistentes, seleccionadas a partir de los primeros.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La emergencia de Candidosis causada por cepas de *C. albicans* resistentes a fármacos antimicóticos es un fenómeno biológico detectado con mayor frecuencia en esta década. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la resistencia de las levaduras a los azoles y a la anfotericina B, pero no han sido demostrados. No se conoce si la emergencia de *C. albicans* resistentes es debido a un fenómeno de presión de selección o por mutaciones genéticas. Tomando en cuenta que *C. albicans* es un microorganismo eucariote y diploide, hace poco probable que el fenómeno de resistencia sea debido a mutación. En consecuencia planteamos la siguiente pregunta: ¿Es posible en condiciones *in vitro*, mediante exposición secuencial a dosis crecientes de los fármacos antimicóticos seleccionar subpoblaciones resistentes de *C. albicans* a partir de cultivos de cepas previamente sensibles?

HIPÓTESIS ESPECÍFICA

La incubación *in vitro* a concentraciones crecientes de antimicóticos (anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol) permite seleccionar subpoblaciones resistentes de *C. albicans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas

El estudio fue realizado con cinco cepas de *C. albicans*, aisladas durante el año de 1993, las cuales fueron aisladas de pacientes hospitalizados que tuvieron diagnóstico de inmunocompromiso y candidosis sistémica. Las cepas tenían sensibilidad para anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol. Se mantuvieron en cultivos de agar dextrosa Sabouraud con aceite mineral, almacenados en el cepario de levaduras del Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital de Pediatría, CMN SXXI; y se incluyó una cepa control (ATCC 10231).

Las cepas fueron identificadas con números progresivos del 1-5 y el control con su identificación de la ATCC.

Preparación del inóculo

Cada una de las cepas se cultivó en agar dextrosa Sabouraud 48 h a 37°C, posteriormente para asegurar la pureza del cultivo se realizaron subcultivos de 24 h, de estos se eligieron 5 colonias con diámetro mayor de 1 mm para la preparación de la suspensión en solución salina estéril al 0.9%. La suspensión de cada una de las cepas se ajustó a una turbidez similar a la del tubo 0.5 de McFarland, de esta suspensión

se tomaron 2 ml y se diluyeron 1:10 con medio RPMI 1640 con L - glutamina sin bicarbonato de sodio 1X (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) ajustado a un pH de 7.0 con MOPS (ácido morfolinepropanesulfónico; 0.65 M).

Procedimiento de selección de resistencia

Los cultivos primarios de las cepas fueron en agar dextrosa Saboraud, incubados durante 24 h a 37°C. Posteriormente se cosecharon y se sembraron en caldo dextrosa Saboraud en tubos Falcon de 15 ml, se incubaron 24 h a 37°C. Para cosechar las levaduras, los tubos fueron sometidos a centrifugación (1500 rpm durante 5 min), el sobrenadante se eliminó por decantación, la pastilla de levaduras se reconstituyó con solución fisiológica estéril y se ajustó a una turbidez de 0.5 de Mc Farland. Dos ml de la suspensión previa se inocularon en 18 ml de medio RPMI 1640; esto se incubó a 37°C en agitación continua a 100 rpm, durante una hora. Posteriormente los cultivos fueron expuestos de manera secuencial a concentraciones crecientes de los fármacos. El primer paso consistió en cultivo en medio RPMI 1640 a 37°C y en agitación continua a 100 rpm durante 2 h, enseguida se añadió la concentración del antimicótico a la que fue sensible incubándolo durante 2 h a 37°C. Posterior a esto, se centrifugó a las condiciones

antes mencionadas, y se tiró el sobrenadante; se volvió a reconstituir la suspensión con nuevo medio RPMI 1640 y a una concentración mayor del fármaco utilizado dejándolo incubar durante 12 h en agitación continua a 100 rpm. Entre cada etapa, los cultivos se centrifugaban a 100 rpm durante 5 min, desechando el sobrenadante y agregando medio RPMI 1640 nuevo sin antimicótico. Para cada fármaco se inició de una dosis basal que se fue incrementando al doble en las etapas subsecuentes. Para anfotericina B se inició en 0.06 µg/ml y se llegó hasta 2 µg/ml. Para fluconazol se inició en 1 µg/ml y se llegó hasta 32 µg/ml. Para ketoconazol e itraconazol se inició en 0.5 µg/ml y se llegó a 16 µg/ml. El tiempo aproximado transcurrido en la obtención de subpoblaciones resistentes para cada antimicótico fue de 6 días.

Pruebas de sensibilidad por macrodilución

Se utilizó la prueba de macrodilución descrita previamente (63,64). El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 con L-glutamina sin bicarbonato de sodio, pH de 7 (ajustado con MOPS). Se emplearon sales de anfotericina B (Bristol), fluconazol (Roerig-Pfizer, Inc. New York), itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, N.J.) y ketoconazol (Janssen). La anfotericina B, ketoconazol e itraconazol se diluyeron en dimetilsulfóxido al 100%, el fluconazol se diluyó en agua

bidestilada. De cada uno de los fármacos se preparó una solución "madre".

Las concentraciones de cada una de las soluciones madre fueron de: 16 000 µg/ml para anfotericina B y fluconazol, y de 5 000 µg/ml para ketoconazol e itraconazol.

Las soluciones "madre" y el medio de cultivo se esterilizaron por filtración (Costar; filtro II 0.45 µm).

De las diluciones de los fármacos se prepararon soluciones 2X para cada una de las concentraciones a probar, las cuales variaron de 0.06 µg/ml a 2 µg/ml para anfotericina B, 0.5 µg/ml a 32 µg/ml para itraconazol y ketoconazol; y de 2 µg/ml a 64 µg/ml para fluconazol. La dilución de los fármacos se realizó con RPMI 1640 y se ajustó a pH de 7.0 con amortiguador MOPS. Se realizó control de medio sólo, medio con los fármacos y medio con dimetilsulfóxido.

Para el propósito del estudio se consideró CMI a la concentración más baja de cada droga capaz de inhibir el crecimiento visible del agente, en comparación con el tubo control. Para anfotericina B la CMI se consideró a la concentración en la cual se alcanzó inhibición total de crecimiento de levaduras. En el caso de los imidazoles se

consideraron como CMI aquellas concentraciones en la que se alcanzó la menor turbidez en comparación con el tubo control.

Los valores de corte para considerar sensibles a cada una de las cepas fueron: ketoconazol e itraconazol $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, fluconazol $\leq 12.5 \mu\text{g/ml}$ y anfotericina B $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (63-64).

Cultivo de levaduras *Candida albicans* para los experimentos de RAPD

- 1) Se sembró un inóculo de 2×10^6 células en una placa de agar de dextrosa Sabouraud y se incubó a 37°C durante 48 h.
- 2) Se tomó una colonia aislada y se sembró en 5 ml de caldo de dextrosa Sabouraud para posteriormente incubarla a 37°C durante 24 h con agitación constante de 200 rpm.
- 3) Se obtuvo un cultivo celular por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min.
- 4) Posteriormente el cultivo se lavó con 5 ml de sorbitol 1M agitando vigorosamente y centrifugando bajo las mismas condiciones.
- 5) Se utilizaron pastillas de 2×10^8 células. Esto se realizó tomando en cuenta que 1 unidad de densidad óptica a 600 nm es equivalente a 3×10^7 células/ml.

6) El cultivo se usó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta iniciar la extracción de DNA.

Preparación de esferoplastos de *C. albicans*

- 1) Se utilizó una pastilla celular a la cual se le adicionó 0.5 ml de sorbitol 1M y se agitó vigorosamente hasta resuspender completamente.
- 2) Enseguida se adicionaron 50 μl de β -mercaptoetanol 0.28M y se homogenizaron vigorosamente durante 10 segundos.
- 3) A continuación se agregaron 50 μl de una solución de liticasa (1 mg/ml), se resuspendieron suavemente durante 5 segundos, y se incubaron a 37°C /1 h con agitación constante (200 rpm).
- 4) Posteriormente se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas.
- 5) Una vez obtenidos los esferoplastos se resuspendieron en 500 μl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM de EDTA, pH 8.0) con una micropipeta. La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Extracción de DNA de cepas de *C. albicans*

1. Para la lisis celular de los esferoplastos, se agregaron 50 μl de SDS al 10% y se incubaron 20 min a 65°C (la solución se observó viscosa).

2. Se adicionaron 200 μ l de acetato de potasio 5M, se invirtió varias veces el tubo para mezclar y se incubó por 30 min a 5°C (el tubo se invirtió a diferentes tiempos y al final de la incubación en el hielo, la solución se observó semisólida).
3. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a temperatura ambiente (T[°]A) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.
4. Para precipitar los ácidos nucleicos se utilizaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, el cual se adicionó gota a gota y se incubó por 15 min a -70°C.
5. Se centrifugó 10 min a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante.
6. Se realizaron dos lavados con 500 μ l de etanol al 70% el cual se adicionó por las paredes del tubo y se centrifugó a 14000 rpm 5 min.
7. Para eliminar el exceso de etanol de los ácidos nucleicos y dejar la pastilla seca, se utilizó un concentrador al vacío durante 5 min.
8. La pastilla de DNA se resuspendió en 300 μ l de amortiguador TE y se dejó reposar durante 15 min. Posteriormente se calentó a 65°C durante 5 min y una vez disuelto, se resuspendió.

9. El RNA se eliminó adicionando 5 μ l de RNAsa "A" a una concentración de 1mg/ml resuspendiendo la solución suavemente e incubando a 37°C por una hora.
10. Finalmente los ácidos nucleicos se precipitaron adicionando 500 μ l de isopropanol bajo las mismas condiciones (se incubó 15 minutos a -70°C).
11. Se centrifugó 10 min a 14 000 rpm para eliminar el isopropanol y nuevamente se lavó con etanol al 70% como se mencionó anteriormente.
12. Finalmente, el DNA se resuspendió en 125 μ l de amortiguador TE y se cuantificó.

CUANTIFICACION DE DNA DE CEPAS DE *C. albicans*

La lectura de la densidad óptica a 260nm permitió el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. El ratio entre las lecturas a 260 y 280 nm da una estimación de la pureza del DNA. Se consideraron preparaciones adecuadas aquellas que presentaron un ratio entre 1.7 y 1.9.

- 1) Para cuantificar el DNA obtenido, se tomaron 5 μ l de cada muestra y se realizó una dilución 1:200 con amortiguador TE.

2) Se tomó la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro con sistema de luz UV (7800, Singapore, Jasco Co Japón).

3) Para realizar el cálculo de la concentración de DNA se tomó en cuenta lo siguiente:

1 UDO 260 nm = 50 µg/ml DNA doble cadena

1 UDO 280nm = 40 µg/ml DNA cadena única

$$r = 260/280 = 1.8$$

$$\text{DNA} = (50 \mu\text{g/ml}) (\text{UDO } 260 \text{ nm}) (V_f \text{ en ml}) / 5 \mu\text{l}$$

$$\text{DNA} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4) Una vez cuantificadas las muestras de DNA, se almacenaron a menos 20°C debidamente etiquetadas hasta su uso.

Para verificar la pureza e integridad del DNA cromosomal, el material obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%.

AMPLIFICACION AL AZAR DE DNA POLIMORFICO (RAPD) DE CEPAS DE *C. albicans*

Los ensayos de RAPD se realizaron de acuerdo a la técnica de Lehmann con modificaciones (65,66). se utilizaron los siguientes iniciadores: 1) GTGCAATGAG, 2) CAATGCGTCT y 3) CGTCTAGAGC,

los cuales se estandarizaron previamente para decidir los de mejor resolución (39).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l el cual contiene lo siguiente: amortiguador PCR 1X, 4mM $MgCl_2$, 400 μ M de cada dNTPs, 1 pmol/ μ l de cada uno de los iniciadores, 500 ng de DNA de *Candida albicans* y 2.5 U de *Taq* polimerasa, adicionando cada uno en este orden para evitar la desnaturalización de la enzima.

Los ciclos de amplificación se regularon bajo el siguiente esquema:

- | | |
|-----------------------------|--------------------|
| a) 35 ciclos: Alineamiento: | 36°C/2 minutos |
| Extensión: | 72°C/1:30 segundos |
| Desnaturalización: | 95°C/1 minuto |
| b) Alineamiento: | 36°C/2 minutos |
| c) Extensión: | 72°C/10 minutos |
| | 4°C/ α |

Los patrones de amplificación obtenidos fueron sometidos a electroforesis de agarosa al 2%, con amortiguador TAE (Tris-HCl, EDTA, ac. acético glacial, pH 8) y teñidos con bromuro de etidio.

A cada una de las cepas por separado se les realizó electroforesis de DNA y el marcador utilizado fué lambda *Hind* III- ϕ X174/*Hae* III.

Se realizaron un patrón electroforético de las cepas sensibles y posteriormente uno por cada antimicótico utilizado para cada una de las cepas, siendo un total de 25.

RESULTADOS

Al inicio del estudio se procedió a identificar si las cepas incluidas en la investigación mantenían susceptibilidad a los cuatro antimicóticos utilizados, se obtuvieron y compararon las CMI de cada una de las cepas, las determinadas en 1994 y al inicio del estudio (cuadro 1).

De las cinco cepas de *C. albicans* incluidas en este estudio, después de ser expuestas a los diferentes fármacos antimicóticos fue posible seleccionar subpoblaciones resistentes en todas ellas. Las CMIs de los fármacos para las cepas de *C. albicans* fueron: 16-32 µg/ml para ketoconazol; 64 µg/ml para fluconazol; 16 a 32 µg/ml para itraconazol; y 2 µg/ml para anfotericina B. Todas las concentraciones de los antimicóticos antes citados superaron los valores de corte establecidos para diferenciar entre cepas sensibles y resistentes (cuadro 2).

Las CMI de cada fármaco, requeridas por todas las cepas, se incrementaron en relación a las CMI basales. Los incrementos observados variaron de 4 a 533 veces para ketoconazol, 64 a 128 veces para fluconazol, 32 a 266 veces para Itraconazol y de 2 a 66.7 veces para anfotericina B (cuadro 3).

Las subpoblaciones de *C. albicans* resistentes a ketoconazol, fluconazol e itraconazol, mostraron resistencia cruzada entre ellos pero no para anfotericina B. Las subpoblaciones resistentes a anfotericina B, además de presentar resistencia a este fármaco, mostraron resistencia para los otros antimicóticos probados.

Para conocer la estabilidad de la resistencia detectada, se escogió al azar una cepa, la cual se almacenó a -20°C , sin exposición a drogas antimicóticas, por un periodo aproximado de un año. Al cabo de este tiempo la cepa (cepa 1) fué descongelada y cultivada. Después de realizar los subcultivos en RPMI 1640 sin antimicóticos, la cepa 1 mostró resistencia con CMI similares a las previamente detectadas, aunque las CMI requeridas para fluconazol e itraconazol fueron menores y dentro de los valores de resistencia (cuadro 4).

Durante los ensayos con antimicóticos se observó que la morfología microscópica de las cepas se modificaba. Las cepas sensibles mantenían forma de levadura, mientras que en las subpoblaciones resistentes predominaban levaduras con pseudomicelios (figura 1: a y b).

El perfil electroforético del DNA obtenido de las cepas sensibles se muestra en la figura 2. Se observan nueve bandas que variaron de peso molecular de 181 a 1390, similares en todas las cepas sensibles.

En cambio, el perfil electroforético de las subpoblaciones resistentes fue diferente, como se muestra en la figura 3.

Comparando los perfiles electroforéticos de cada una de las cepas inicialmente sensibles contra las subpoblaciones resistentes para cada uno de los fármacos utilizados, observamos que las subpoblaciones resistentes a anfotericina B conservan dos bandas, que son las de menor peso molecular; esto se observó con todas las subpoblaciones de las cinco cepas empleadas. Las subpoblaciones resistentes a fluconazol tuvieron un perfil electroforético de seis bandas. Las subpoblaciones resistentes a ketoconazol tuvieron un perfil electroforético de ocho bandas y las subpoblaciones resistentes a itraconazol tuvieron un perfil electroforético de cinco. En ketoconazol e itraconazol pierden las bandas que van de peso molecular de 500 a 800 pares de bases (pb).

DISCUSIÓN

En la actualidad las enfermedades oportunistas por hongos se ha incrementado, principalmente en pacientes inmunocomprometidos; además de que estas enfermedades son más frecuentes, ha emergido el problema de resistencia a fármacos de primera línea empleados en el tratamiento de las mismas (67). Tomando en cuenta que *C. albicans* es un microorganismo diploide y que la generación de mutaciones inducidas es de 1 en 100 millones de generaciones, la probabilidad de encontrar mutantes es baja (78). Las investigaciones dirigidas a determinar resistencia en hongos se ha facilitado porque ahora se cuenta con una técnica estándar para evaluar susceptibilidad en levaduras (68) y por los avances en biología molecular (54,55).

Los mecanismos propuestos de resistencia en levaduras son los siguientes: proteínas que alteran las permeasas en la pared celular; proteínas que favorecen la expulsión de los fármacos del espacio intracelular al extracelular, el cual es un mecanismo de transporte activo dependiente de ATP; proteínas que alteran enzimas específicas y necesarias en la transformación de los fármacos a metabolitos

activos; y mutaciones que conducen a alteración en las enzimas blanco de los fármacos antimicóticos (51-53).

Los estudios que más se han descrito incluyen los relacionados con proteínas que favorecen la expulsión de los fármacos antimicóticos y proteínas facilitadoras, BEN^R y CDR1, respectivamente, con cepas de *C. albicans* aisladas de pacientes con SIDA y con falla al tratamiento con fluconazol (52,69). Se ha demostrado que el BEN^R media la resistencia para benomyl, methotrexate y fluconazol; y el CDR1 se encuentra involucrado en la resistencia a fluconazol y otros azoles (70,71).

En este estudio, los resultados sugieren que existen subpoblaciones de *C. albicans* resistentes a azoles y anfotericina B coexistiendo en una población de cepas predominantemente sensibles a fármacos antimicóticos. Las condiciones *in vitro* de exposición controlada y a concentraciones crecientes para cada uno de los fármacos antimicóticos condujeron a la selección de subpoblaciones resistentes; esto concuerda con lo descrito por López Ribott, et al (72) que a partir de cultivos de *C. albicans*, obtenidos de muestras tomadas de boca, en pacientes con SIDA, con exposición múltiple a fármacos antimicóticos se encontró este fenómeno biológico (72) . Esto podría explicar las

observaciones hechas en pacientes con candidosis orofaríngea y SIDA, en los que por la cronicidad y recurrencia de la enfermedad requieren de tratamiento prolongado o en varias ocasiones, posteriormente requieren de dosis mayores de fluconazol o itraconazol para curar de la enfermedad (73-76), además de lo observado previamente, que la respuesta al tratamiento con fluconazol es dosis dependiente (77) y por otra parte se ha encontrado que entre mayor tiempo de exposición han tenido los pacientes al fluconazol, se incrementan las CMI requeridas por el agente infeccioso(76). Cuando los pacientes han recibido tratamiento con fluconazol a 100 mg/día o dosis de 400-800 mg/día las CMI de las cepas aisladas variaron de 0.06 µg/ml a > 64 µg/ml; el éxito terapéutico encontrado en aquellos tratados con las dosis mayores ha sido del 79 al 100% cuando las cepas han tenido CMI ≤ 32 µg/ml; las fallas terapéuticas han sido de 46 a 73% cuando las CMI de las cepas aisladas han sido de igual o > 64 µg/ml (77). En cepas de *C. albicans* de pacientes tratados con itraconazol se ha observado un incremento de las CMI, de 0.05 µg/ml a 0.4 µg/ml o incluso hasta > de 64 µg/ml (76).

No hay estudios en que se hayan encontrado cepas de *C. albicans* resistentes a anfotericina B, utilizando el método de la NCCLS para

evaluar la susceptibilidad. En este estudio mostramos como las CMI requeridas por todas las cepas se incrementaron, si bien no fue posible para dos cepas conocer las máximas CMI requeridas ya que la concentración máxima de anfotericina B incluida en este experimento fue de 2 µg/ml.

La resistencia cruzada entre los azoles que se observó en las subpoblaciones resistentes podría explicarse porque estos fármacos actúan aumentando el contenido de esterol y/o contenido de lípidos en la membrana celular y disminuyendo así su concentración dentro de ella, además que tienen un transportador común, CDR1. Se ha encontrado hasta el momento un gen específico denominado DUMC136 *CYP51* que ha sido involucrado en resistencia para fluconazol (78,79).

Existe el informe de una cepa de *Cryptococcus neoformans* con resistencia cruzada entre azoles y anfotericina B. En este estudio se encontró que las cepas expuestas a anfotericina B desarrollaron resistencia para los azoles, y cuando las cepas fueron expuestas inicialmente a azoles no desarrollaron resistencia para anfotericina B, lo cual sugiere que los mecanismos de resistencia inducidos por

anfotericina B no son iguales a los inducidos por los azoles pero que incluye posiblemente mayor número de mecanismos de resistencia.

El cambio de morfología microscópica observado podría explicarse en función que la generación de pseudomicelios son el resultado de las subpoblaciones resistentes de *C. albicans* encontradas posterior a la exposición de concentraciones crecientes de los antimicóticos (80).

Asai et al en un estudio realizado en Japón refieren que el cambio de morfología se ha asociado a disminución de la afinidad de DUMC136 *CYP51* para fluconazol el cual contribuyen al cambio de fenotipo en cepas resistentes a fluconazol (81-83).

En cuanto a los resultados de RAPD-PCR se muestran claras diferencias en los perfiles de electrofóresis entre las cepas sensibles y las resistentes, lo cual ha sido descrito en pacientes con SIDA que después de tratamientos prolongados con antimicóticos se seleccionan cepas resistentes y por lo tanto con modificación de su patrón de DNA. Esto último es un reto para una investigación posterior ya que en un estudio previo no encontramos diferencias entre cepas inicialmente sensibles o resistentes (sin previa selección *in vitro*) (39).

En el futuro investigaremos si estos cambios en su susceptibilidad se han debido a algunos de los mecanismos de resistencia previamente

descritos; o por la selección de cepas naturalmente resistentes, o deberse a producción de enzimas que degradan los fármacos antimicóticos en el medio de cultivo. Las implicaciones clínicas de este trabajo derivan sobre la importancia de identificar tempranamente cepas resistentes para poder ofrecer a los pacientes una terapia antimicótica adecuada, además de contestar si lo observado *in vitro* sucede igualmente *in vivo*. Es probable que los cambios observados en el perfil electroforético que se encontraron en las subpoblaciones de *C. albicans* resistentes, como son, ausencia de fragmentos de peso molecular 500 pb a 840 pb para resistencia a los azoles, y de peso molecular de 400 pb a 1390 pb para anfotericina B implican que en estos fragmentos de DNA radica la información que interviene en el fenómeno de susceptibilidad y resistencia.

CONCLUSIONES

La exposición de *C. albicans* a ketoconazol, fluconazol, itraconazol o anfotericina B de manera secuencial y a concentraciones crecientes selecciona subpoblaciones resistentes a estos fármacos.

La selección de subpoblaciones resistentes de *C. albicans*, generada por azoles, favorece resistencia cruzada entre azoles pero no para anfotericina B.

La selección de subpoblaciones resistentes de *C. albicans*, generada por anfotericina B, favorece resistencia cruzada para azoles.

Las subpoblaciones de *C. albicans* con resistencia a ketoconazol, fluconazol, itraconazol o anfotericina B, mantuvieron dicha resistencia a un año de almacenamiento, lo que sugiere estabilidad de la resistencia.

La exposición de *C. albicans* a ketoconazol, fluconazol, itraconazol o anfotericina B de manera secuencial y a concentraciones crecientes

seleccionó subpoblaciones resistentes observando cambios en la morfología, de levaduras solas a levaduras con pseudomicelio, lo que sugiere que el cambio morfológico esté asociado a mayor capacidad para resistir a los fármacos con actividad antimicótica.

Se observaron cambios importantes en el patrón electroforético entre las cepas sensibles y las subpoblaciones resistentes, manifestados en la pérdida de bandas que posiblemente codifican para conferir susceptibilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, et al. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida species*. Clin Infect Dis 1997; 24:1122-1128.
2. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995; 20: 115-125.
3. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, et al. Rising Incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. Clin Infect Dis 1996; 23: 506-514.
4. Bodey GP. Fungal infection and fever of unknown origin in neutropenic patients. Am J Med 1986; 80 (suppl) 5C: 112-119.
5. Harvy RL, Myers IP. Nosocomial fungemia in a large community teaching hospital. Arch Intern Med 1987; 147: 2117-2120.
6. Horn R, Wong B, Kiehn TE, et al. Fungemia in a cancer hospital: Changing frequency, earlier onset, and results of therapy. Rev Infect Dis 1985; 7: 646-655.
7. Odds FC. *Candida* infections: An overview. CRC Critical Rev Microbiol 1987; 15: 1-5.
8. Pfaller M, Cabezudo I, Koonts F, et al. Predictive value of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida species*. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 628-633.
9. Wingard JR, Merz WG, Saral R. *Candida tropicalis*: A major pathogen in immunocompromised patients. Ann Intern Med 1979; 91: 539-543.
10. McCray E, Rampell N, Solomon SL, et al. Outbreak of *Candida parapsilosis* endophthalmitis after cataract extraction and intraocular lens implantation. J Clin Microbiol 1986; 24: 625-628.

11. Weems Jr JJ, Chamberland ME, Ward J, et al. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. J Clin Microbiol 1987; 25: 1029-1032.
12. Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, et al. Mycoses caused by *Candida lusitanae*. Rev Infect Dis 1987; 9: 1006-1012.
13. Collignon PJ, Sorrell TC. Disseminated candidiasis: evidence of a distinctive syndrome in heroin abusers. British Medical J 1983; 287: 861-862.
14. Dupont B, Drouhet E. Cutaneous, ocular, and osteoarticular candidiasis in heroin addict, new clinical and therapeutic aspects in 38 patients. J Infect Dis 1985; 152: 577-591.
15. Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 32-45.
16. Warnock DW. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. J Antimicrob Chemother 1998; 41 (Suppl D): 95-105.
17. González E, Venzon D, Lee S, et al. Risk factors for fungemia in children infected with Human Immunodeficiency Virus: A case-control study. Clin Infect Dis 1996; 23: 515-521.
18. Vázquez JA, Sánchez V, Dmuchowski C, et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiology study. J Infect Dis 1993; 168: 195-201.
19. Odds FC. *Candida* and candidosis, 1988, 2nd ed. Bailliere Tindall, London.
20. Karabinis A, Hull C, Leclercq B, et al. Risk factors for candidemia in cancer patients: A case control study. J Clin Microbiol 1988; 26: 429-432.

21. Horan T, Culver D, Jarvis W, et al. Pathogens causing nosocomial infections: Preliminary data from the National Nosocomial Infections Surveillance System. *Antimicrob Newsletter* 1988; 5: 65-67.
22. Pittet D, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections: Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1177-1184.
23. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, et al. Hospital-acquired candidemia: The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* 1988; 148: 2642-2645.
24. Pérez-Miravete. Hemocultivos: Experiencia del Hospital Infantil de México (1990-1991). *Enf Infec y Microbiol* 1992;12: 188-191.
25. Meunier F. Prevention of mycoses in immunocompromised patients. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 408-416.
26. Tony TC, Denning DW. Fluconazole resistance in *Candida* in patients with AIDS—a therapeutic approach. *J Infect* 1993; 26: 117-125.
27. Meunier F. Fluconazole treatment of fungal infection in the immunocompromised host. *Sem Oncol* 1990; 17: 19-23.
28. Prasad JK, Feller I, Thompson PD. A ten year review of candida sepsis and mortality in burn patients. *Surgery* 1987; 101: 213-216.
29. MacMillian BG, Law EJ, Holder IA. Experience with *Candida* infections in the burn patient. *Arch Surg* 1972; 104: 509-514.
30. Spebar MJ, Pruitt BA Jr. Candidiasis in the burned patients. *J Trauma* 1981; 21: 237-239.
31. Morrison AJ Jr, Freer CV, Searcy MA, et al. Nosocomial bloodstream infections: Secular trends in a statewide surveillance program in Virginia. *Infec Control* 1986; 7: 550-553.

32. Walsh TJ, Pizzo A. Treatment of systemic fungal infections: Recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 460-475.
33. Kauffman CA. Role of azoles in antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 1996; 22 (suppl 2): S148-153.
34. Starke JR, Mason Jr EO, Kramer WG, et al. Pharmacokinetics of amphotericin B in infants and children. *J Infect Dis* 1987; 155: 766-774.
35. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 308-329.
36. Hay RJ. Antifungal therapy and the new azole compounds. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28 (Suppl A): 35-46.
37. Maenza JR, Keruly JC, et al. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 173: 219-225.
38. De Muri GP, Hostetter MK. Resistance to antifungal. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 665-685.
39. Gutiérrez GT. Serotipificación y sensibilidad a cuatro antimicóticos de cepas de *Candida albicans* aisladas en pacientes pediátricos. Tesis de Especialidad en Infectología y Ecología Médica, UNAM, 1995
40. Espinoza CMR. Estudio multicéntrico de cepas de *Candida sp.*: sensibilidad antimicótica y serotipificación. Tesis de Especialidad en Infectología y Ecología Médica, UNAM, 1997.
41. Gaona FVA. Frecuencia, serotipo y susceptibilidad in vitro de *Candida albicans* en la bucoesofagitis de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Tesis de Maestría en Medicina, UNAM 1998.
42. Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus positive

patients: evidence for two patterns of recurrence. *J Infect Dis* 1993; 168: 463-468.

43. Vanden BH, Marichal P, Odds FC, et al. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2602-2610.

44. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, et al. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991; 325: 1274-1277.

45. Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 463-471.

46. Rogers T, Galgiani J. Activity of fluconazole (UK 49,858) and ketoconazole against *Candida albicans* in vitro in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 418-422.

47. De Muri GP, Hostetter MK. Resistencia a los antimicóticos. *Pediatr Clin North Am* 1995;3: 619-638.

48. Dick JD, Merz WG, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 158-163.

49. Conly J, Rennie R, Johnson R, et al. Disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1992; 165: 761-764.

50. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, et al. Amphotericin B resistant yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am J Med* 1988; 84: 826-832.

51. Parkinson T, Falconer DJ, Hitchcock CA. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1696-1699.

52. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2378-2386.
53. Sonino N. The use of ketoconazole as an inhibitor of steroid production. *N Engl J Med* 1987; 317: 812-818.
54. White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1482-1487.
55. Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Lee LN, et al. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2932-2937.
56. Graybill JR, Montalbo E, Kirkpatrick WR, et al. Fluconazole versus *Candida albicans*: A complex relationship. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2938-2942.
57. Kurtz MB, Abruzzo G, Flattery A, et al. Characterization of Echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. *Infect Immun* 1996; 64: 3244-3251.
58. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida species*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-679.
59. van Belkum A, Melchers W, Pauw BE, et al. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *J Infect Dis* 1994; 169: 1062-1070.
60. Magee PT, Bowdin L, Staudinger J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2674-2679.

61. van Belkum A, de Jonckheere J, Quint WGV. Genotyping *Naegleria species* and *Naegleria fowleri* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 2595-2598.
62. Niesters HGM, Goessens WHF, Meis JF, et al. Rapid polymerase chain reaction based identification assays for *Candida species*. J Clin Microbiol 1993; 31: 904-10.
63. Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, et al. Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' Proposed Standard. J Clin Microbiol 1994;32: 2494-2500.
64. Sheehan DJ, Espinel-Ingroff A, Steele ML, et al. Antifungal susceptibility testing of yeasts: A brief overview. Clin Infect Dis 1993;17 (Suppl 2): S494-S500.
65. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA. J Clin Microbiol 1992; 30: 3249-3254.
66. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.
67. Wingard JR. Infections due to resistant *Candida species* in patients with cancer who are receiving chemotherapy. Clin Infect Dis 1994; 19 (Suppl 1): S49-S53.
68. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Tentative standard M27-P A. Villanova, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.
69. Sanglard D, Ischer F, Monod M, et al. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and

other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2300-2305.

70. Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, et al. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2835-2841.

71. Ouellette M, Kündig C. Microbial multidrug resistance. *Int. J Antimicrob Agents* 1997; 8: 179-187.

72. López RJL, McAtee RK, Perea S, et al. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1621-1630.

73. Baily G, Perry F, Denning D, et al. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. *AIDS* 1994; 8: 787-792.

74. Cartledge J, Miggley J, Gazzard B. Itraconazole cyclodextrin solution: the role of in vitro susceptibility testing in predicting successful treatment of HIV-related fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible oral candidosis. *AIDS* 1997; 11: 163-168.

75. Guennec RL, Reynes J, Mallié M, et al. Fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2732-2737.

76. Xiaogang HE, Tiballi RN, Zarins LT, et al. Azole resistance in oropharyngeal *Candida albicans* strains isolated from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2495-2497.

77. Rex J, Pfaller M, Barry A, et al. Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 40-44.

78. Goffeau A, Park J, Paulsen IT, et al. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames within the major facilitator superfamily. *Yeast* 1997; 13: 43-54.
79. Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, et al. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-Demethylase P450. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1163-1169.
80. Vázquez JA, Arganoza MT, Vaishampayan JK, et al. *In vitro* interaction between amphotericin B and azoles in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2511-2516.
81. Ha KC and White TC. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 763-768.
82. Odds FC, Cockayne A, Hayward J, et al. Effects of imidazole- and triazole- derivative antifungal compounds on the growth and morphological development of *Candida albicans* hyphae. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 2581-2589.
83. Odds FC, Cheesman SL, Abbott AB. Antifungal effects of fluconazole (UK 49858), a new triazole antifungal, *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18: 473-478.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 2. Determinación de las CMI de los cuatro antimicóticos después de cultivar *C. albicans* en concentraciones crecientes.

CMI ($\mu\text{g/ml}$)

Antimicótico (valor de corte)	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Ketoconazol (8 $\mu\text{g/ml}$)	32	16	16	16	16
Fluconazol (12.5 $\mu\text{g/ml}$)	64	64	64	64	64
Itraconazol (8 $\mu\text{g/ml}$)	32	16	16	16	16
Anfotericina B (1 $\mu\text{g/ml}$)	2	2	2	2	2

Cuadro 3. Determinaciones de las CMI de cada una de las cepas de *C. albicans* antes y después de la exposición a concentraciones crecientes de cada una de los fármacos antimicóticos.

Cepas	Ketoconazol		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
	CMI ₁ µg/ml	CMI ₂ µg/ml						
1	0.25	32	2.00	64	0.12	32	0.25	2
2	0.12	16	1.00	64	0.25	16	0.50	2*
3	2.00	16	0.25	64	0.50	16	0.25	2
4	0.06	16	0.50	64	0.25	16	0.03	2
5	0.25	16	0.25	64	0.06	16	0.06	2*

1: preexposición

2: posexposición

- Hubo crecimiento de levaduras a una concentración de 2 µg/ml al menos.

Cuadro 4. Determinación de CMI de la cepa 1 de *C. albicans* después de un año de almacenamiento.

ANTIMICOTICOS	CMI1 ($\mu\text{g/ml}$)	CMI2 ($\mu\text{g/ml}$)
KETOCONAZOL	32	32
FLUCONAZOL	64	32
ITRACONAZOL	32	8
ANFOTERICINA	2	2

CMI₁ : valores de la subpoblación resistente.

CMI₂ : valores un año después de mantener a la misma cepa en almacenamiento.

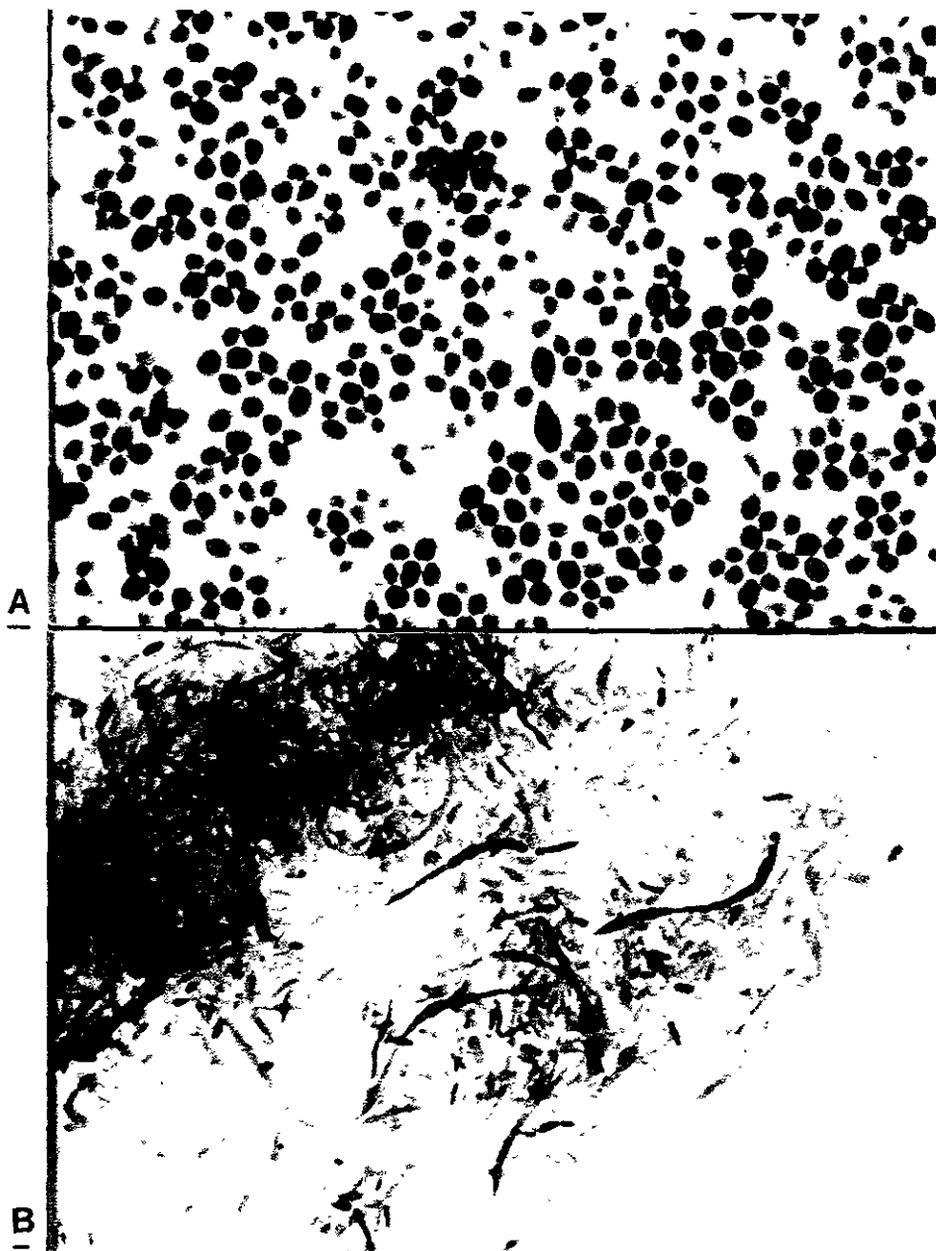


Figura 1. Morfología microscópica de *Candida albicans*. La descripción se realizó a partir de cultivos en agar dextrosa Sabouraud. (a) se observan levaduras sin exposición *in vitro* a fármacos antimicóticos. (b) se presenta la morfología de pseudomicelios de las cepas posterior a la exposición *in vitro* a antimicóticos.

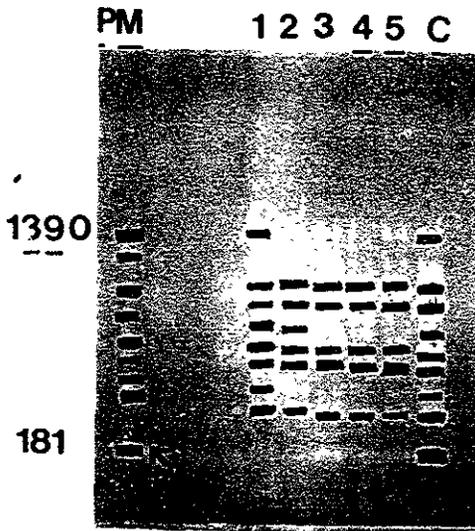


Figura 2. Perfil de electroforesis de los productos de amplificación mediante RAPD-PCR de las cepas sensibles de *Candida albicans*. La electroforesis se efectuó en condiciones previamente estandarizadas (39). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se utilizaron marcadores de peso molecular de 181 a 1390 pb. Los carriles del 1 al 5 corresponden a cada una de las cepas utilizadas.

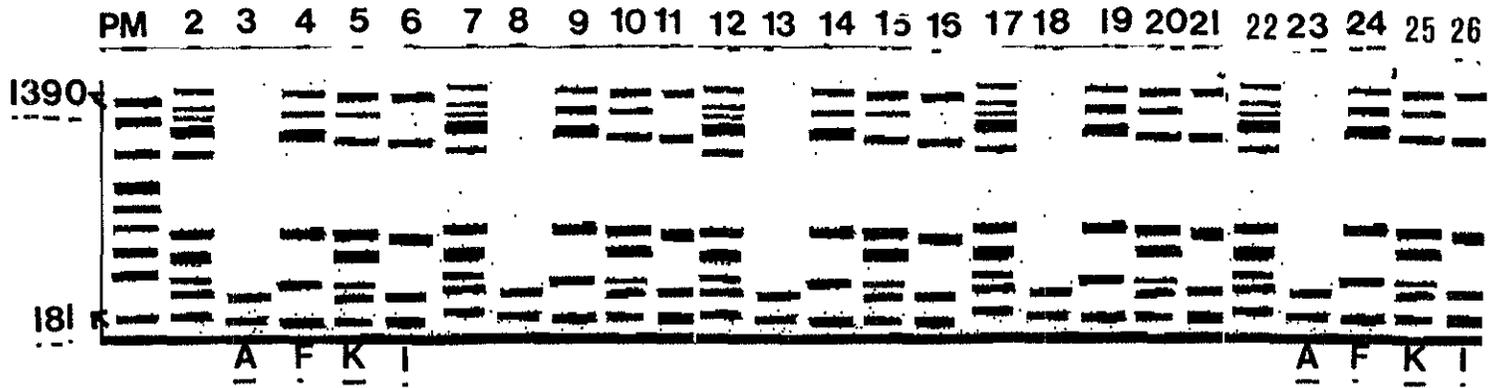


Figura 3. Perfil de electroforesis de los productos de amplificación mediante RAPD-PCR de los diferentes aislados de *Candida albicans*. El DNA total de cada una de las cepas se obtuvo por el método de Lehmann, modificado. Se amplificaron por el método de RAPD-PCR modificado y los fragmentos fueron separados en gel de agarosa al 2%, se tificaron con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular lambda *Hind* III- ϕ X174/*Haell*III. Los carriles 2, 7, 12, 17 corresponden a las cepas sin exposición a antimicóticos *in vitro*. Los carriles 3, 8, 13, 18 corresponden a las cepas expuestas *in vitro* a anfotericina B. Los carriles 4, 9, 14, 19 corresponden a las cepas expuestas a fluconazol, los carriles 5, 10, 15, 20 a la exposición de ketoconazol y los carriles 6, 11, 16, 21 corresponde a la exposición *in vitro* a itraconazol. Los carriles 2,7,12 y 17 corresponden a cada una de las cepas utilizadas.