



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de la combinación de antifúngicos en aislados  
clínicos resistentes de *Candida* y *Trichosporon*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDUARDO ISRAEL AGUILAR CORTÉS



DIRECTORA DE TESIS:  
M. en C. MARÍA DE LOS ANGELES PATRICIA  
MANZANO GAYOSSO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

(2017)



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

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

Instituciones participantes: Hospital General Dr. Dario Fernández y el Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

#### Agradecimientos

A la Facultad de Medicina por el apoyo a través del presupuesto 2016, asignado a la Dra. Patricia Manzano Gayosso, del Departamento de Microbiología y Parasitología.

A PAPIIT IN211115 por el apoyo económico de la beca otorgada de enero a diciembre de 2015.

## Índice

I.	Antecedentes	
I.1	Género <i>Candida</i> .....	1
I.1.1.	Historia.....	1
I.1.2.	Taxonomía.....	2
I.1.3.	Hábitat.....	2
I.1.4.	Características morfológicas .....	3
I.1.5.	Factores de virulencia.....	6
I.1.6.	Epidemiología de las candidosis.....	7
I.1.7.	Factores de riesgo y formas clínicas de las candidosis.....	9
I.1.8.	Candidosis en México.....	10
I.2.	Género <i>Trichosporon</i> .....	12
I.2.1.	Historia.....	12
I.2.2.	Taxonomía.....	13
I.2.3.	Hábitat.....	14
I.2.4.	Características morfológicas.....	15
I.2.5.	Factores de virulencia.....	17
I.2.6.	Epidemiología de las infecciones por <i>Trichosporon</i> .....	17
I.2.7.	Formas clínicas de las infecciones por <i>Trichosporon</i> .....	18
I.3.	Antifúngicos.....	20
I.3.1.	Características químicas y mecanismos de acción.....	21
I.4.	Resistencia a los antifúngicos.....	26
I.4.1.	Mecanismos de resistencia a los antifúngicos.....	26
I.5.	Combinación de antifúngicos.....	28
II.	Planteamiento del problema.....	31
III.	Hipótesis.....	32
IV.	Objetivos.....	33
V.	Material y método.....	34
VI.	Resultados.....	48
VII.	Discusión.....	61
VIII.	Conclusiones.....	67

IX. Abreviaturas.....	68
X. Anexos.....	70
XI. Referencias.....	73

## I. Antecedentes

### I.1. Género *Candida*

#### I.1.1. Historia

El género *Candida* Berkhout y la especie *C. albicans* (Robin) Berkhout 1923 ha recibido más de 100 sinónimos y ha pasado a través de 18 géneros<sup>34</sup>. Robin en 1853, describió por primera vez a esta levadura como *Oidium albicans*; otro de los géneros que tuvo gran relevancia en la historia de esta levadura fue *Monilia*, descrito por Plaut en 1885 como *Monillia candida* Saccardo (1886), nombre que fue modificado por Zopf en 1890. Este nombre binomial fue conservado por más de 30 años hasta el trabajo de Christine Marie Berkhout, quien en 1923 propuso el género *Candida* y la especie *C. albicans* Berkhout, el cual fue presentado y aceptado en el 3er Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939. Todas aquellas levaduras que no coincidieron con el género *Monillia* fueron incluidas en el género *Candida*<sup>30,63</sup>. En 1995, Sullivan y cols. describieron una nueva especie de este mismo género, a la que llamaron *Candida dubliniensis*, debido a que fue aislada de la cavidad bucal de un paciente de Dublín, Irlanda, infectado por VIH, mientras se realizaba un estudio epidemiológico sobre infecciones por *Candida*; estos autores notaron que las cepas aisladas no hibridaban con la sonda de DNA 27A, específica para *C. albicans*<sup>85</sup>. Entre 1910 y 1912, Aldo Castellani realizó las primeras aportaciones sobre una infección broncopulmonar por *Candida*, llamada “tos de los catadores de té”, estudios en los que él sospechaba de la existencia de otras especies; así hizo las primeras descripciones de *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* y *Candida tropicalis*<sup>81</sup>.

### I.1.2. Taxonomía

La ubicación taxonómica de las especies de *Candida* se basó en sus características ultraestructurales y fisiológicas<sup>19</sup>. En algunas de las especies se ha descrito la fase teleomorfa: *Candida famata* (*Debaromyces hansenii*), *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron et Guerra, 1938 (var. *guilliermondii*) (*Pichia guilliermondii*), *Candida guilliermondii* (var. *membranaefaciens*) (*Pichia ohmeri*), *Candida kefyr* (Beijerinck) van Uden et Buckley 1970 (*Kluyveromyces marxianus*), *Candida krusei* (Castellani) Berkhout, 1923 (*Issatchenkia orientalis*), *Candida lusitaniae* van Uden et Carmo-Sousa, 1959 (*Clavispora lusitaniae*) y *Candida norvegensis* (Dietrichson) van Uden et Farinha ex van Uden et Buckley (*Pichia norvegensis*). En la actualidad por los estudios de biología molecular se han construido árboles filogenéticos para aclarar la relación entre las especies de este género<sup>20</sup>.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Ascomycotina

Clase Ascomycetes

Orden Saccharomycetales

Familia Saccharomycetaceae

Género *Candida*

Especie: *C. albicans*, *C. tropicalis*,  
*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C.*  
*guilliermondii*, *C. krusei*,...

### I.1.3. Hábitat

Algunas de las especies de *Candida* se encuentran como comensales en el humano, principalmente en la boca, intestino, tracto genito-urinario y sobre la piel, más comúnmente en los pliegues que son sitios de mayor humedad. Existen reportes del aislamiento de *C. albicans* de otras fuentes como agua potable y de

plantas (*Ulex europeaux*, *Myrtus communis*); en ocasiones se ha aislado de leche bovina. *Candida tropicalis* se ha obtenido de animales marinos como *Dendrobranchiata* sp. (langostino); *C. guilliermondii* también se aísla de piel normal, agua de mar, heces de animales, manteca, cuero, avispas de higueras, pescado y cerveza; los aislados de *C. parapsilosis* han sido obtenidos de aguas residuales y oceánicas, carnes curadas y aceitunas<sup>30,69</sup>. Mock y cols.<sup>59</sup> en 1984 reportaron el aislamiento de diversas especies de *Candida*, del suelo de la región del Amazonas, Brasil, principalmente *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*. En el cuadro 1 se muestran algunos reportes de aislamiento de *Candida* spp. de diversas fuentes (cuadro 1).

Aislamientos de *Candida* spp. de diversas fuentes.

Espece	Fuente de aislamiento	País	Autores
<i>C. parapsilosis</i>	Agua de mar	Portugal	Gadanho y cols. <sup>25</sup>
<i>C. krusei</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. parapsilosis</i>	Agua de río	Brasil	Madeiros y cols. <sup>51</sup>
<i>C. glabrata</i>	Agua de lagos artificiales	Colombia	Silva-Bedoya LM <sup>87</sup>
<i>C. krusei</i>	Aguas residuales	Estados Unidos de América	Meyers y cols. <sup>54</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	Delfines y Agua de acuarios	Japón	Takahashi y cols. <sup>91</sup>

#### I.1.4 Características morfológicas

En el cuadro 2 se muestra las características morfológicas de algunas de las especies de *Candida*. En términos generales la morfología se estudia macroscópicamente y microscópicamente.

**Macroscópica:** *Candida* spp. crecen en agar dextrosa Sabouraud formando colonias opacas, de color blanco a amarillento, de aspecto cremoso y superficie lisa, margen bien definido; con el paso del tiempo algunas especies desarrollan colonias rugosas<sup>3</sup>.

**Microscópica:** Las células son de forma globosa, ovoide, cilíndrica o alargada; con un tamaño de 2 a 4  $\mu\text{m}$ .

Cuadro 2. Características morfológicas de las especies de *Candida*

<b>Especie</b>	<b>Morfología macroscópica</b>	<b>Morfología microscópica</b>	<b>Descripción de hifas, pseudohifas</b>
<i>C. albicans</i>	Colonias blancas, planas, de aspecto cremoso, margen bien definido	Células esféricas a ovaladas, tamaño de 2.0-7.0 x 3.0-8.5 $\mu\text{m}$	Hifas septadas, pseudohifas alargadas de 7 a 10 $\mu\text{m}$ , ramificadas con cúmulos de blastoconidios en las constricciones
<i>C. tropicalis</i>	Colonias blancas, blanco grisáceo mate, cremosas, de superficie lisa o plegada, margen filamentoso bien definido	Células esféricas y ovaladas, tamaño de 3.0-5.5 x 4.0-9.0 $\mu\text{m}$	Las pseudohifas portan blastoconidios simples o dispuestos en cadenas cortas o en racimos
<i>C. parapsilosis</i>	Colonias blancas y opacas, cremosas, de superficie lisa	Células pequeñas en forma oval, elíptica y elongada, tamaño de 2.0-3.5 x 3.0-4.5 $\mu\text{m}$	Pseudohifas en cadenas de células elongadas, racimos de blastoconidios redondos u ovals distribuidos en intervalos sobre las pseudohifas
<i>C. glabrata</i>	Colonias blancas, cremosas de superficie lisa	Células ovoides, tamaño de 2.0-4.0 x 3.0-5.5 $\mu\text{m}$	No presenta pseudohifas
<i>C. krusei</i>	Colonia blancas, opacas, de superficie rugosa, margen irregular y filamentoso	Células ovoides, elongadas y cilíndricas, tamaño de 2.2-5.6 x 4.3-5.2 $\mu\text{m}$	Pseudohifas en cadenas de células elongadas, ramificadas. Blastoconidios en racimo y cadenas sobre las pseudohifas
<i>C. famata</i>	Colonias cremosas, de color blanco, lisas y planas	Células ovoides, tamaño de 2-3.5 x 3.5-5 $\mu\text{m}$	Pseudohifas rudimentarias

Los clamidoconidios son otras de las estructuras observadas en *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Estas células se caracterizan por presentar forma esférica, de pared gruesa (400 nm), con tres capas: la más interna es de naturaleza proteica formando una matriz compleja, la capa media y la capa externa son una estructura granular densa, continua de la pared celular del cuerpo suspensor. La membrana citoplasmática es irregular, en las células de aproximadamente 16 horas de desarrollo; en cambio, en los clamidoconidios de 24 horas es lisa y ocasionalmente con invaginaciones. Los clamidoconidios presentan en el citoplasma organelos celulares como mitocondrias y ribosomas, éstos son abundantes y se distribuyen en la periferia de la célula, mientras que en el centro se concentran estructuras lipídicas<sup>56</sup>. Diversos autores han reportado que la función de los clamidoconidios es de resistencia, es decir soportan condiciones desfavorables para el desarrollo de los hongos. En la figura 1 se observa la estructura ultramicroscópica de un clamidoconidio<sup>56</sup>.

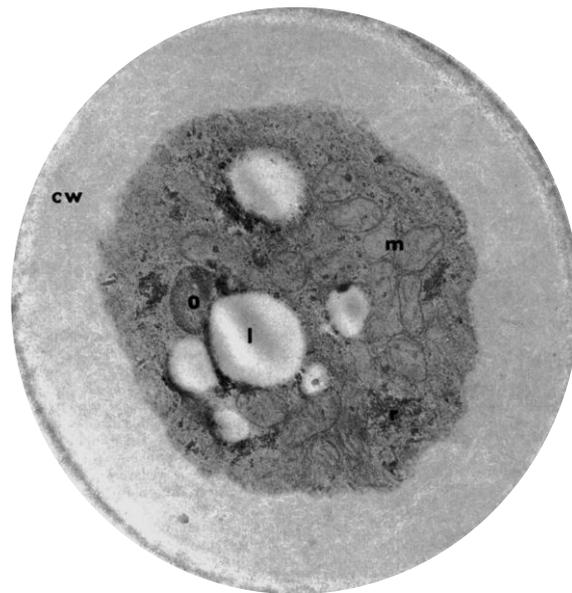


Figura 1. Clamidoconidio observado por microscopia electrónica. Pared celular (cw), mitocondria (m), ribosoma (r), organelo ligado a la membrana (o), inclusión lipídica (l). Tomada de Miller y cols, 1974<sup>56</sup>.

La pared celular de las levaduras de *Candida* spp. tiene un espesor de 125-300 nm, compuesta por varias capas: a) capa externa (proteínas, lípidos y mananos); b) capa intermedia ( $\beta$  1-3 glucano y quitina); c) capa interna (manano y proteínas) (Figura 2)<sup>8,60</sup>.

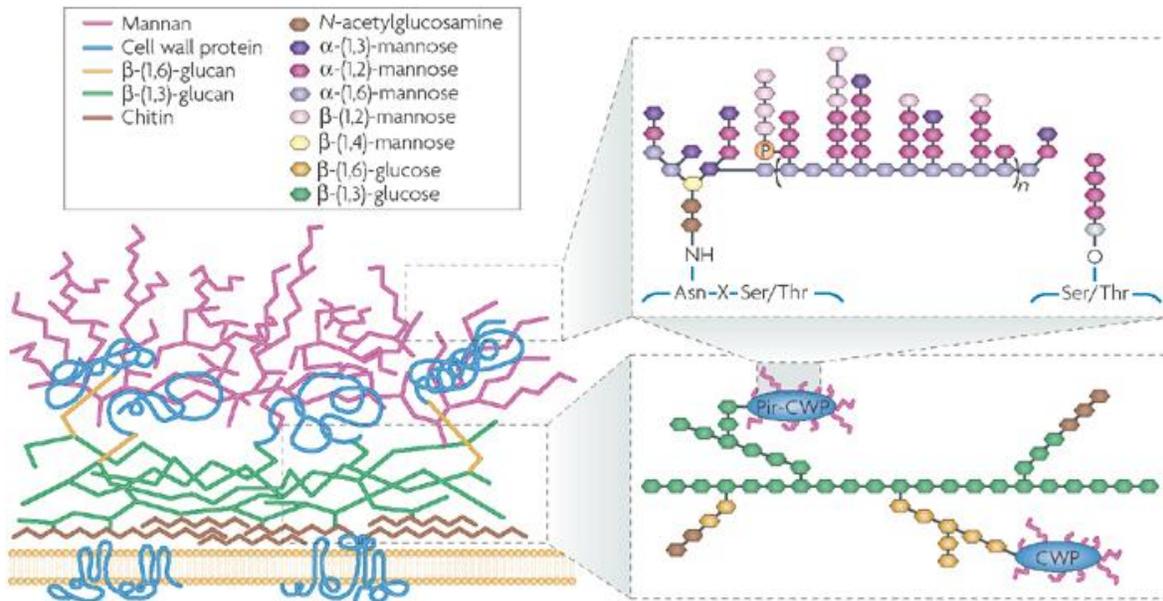


Figura 2. Distribución de los componentes en la pared celular de *Candida*. Tomada de Netea y cols.<sup>60</sup>.

### I.1.5 Factores de virulencia

En las especies de *Candida* se han detectado diversos factores que están involucrados en el proceso de colonización y/o infección.

**1. Adaptación al pH:** esta propiedad está relacionada con dos genes: PHR1 y PHR2, ambos se activan o inactivan en diferentes condiciones; el primero se activa a pH neutro o ligeramente básico (cuando está en sangre o piel menos ácida) y se inactiva en medio ácido. El segundo gen se activa a pH ácido como en la vagina<sup>64</sup>.

**2. Adhesinas:** las manoproteínas y las mananas son las más importantes (Figura 2). Las células receptoras del hospedero son las manoproteínas de superficie de tipo lectina. Estas moléculas se han detectado en *C. albicans* y *C. glabrata*<sup>64</sup>.

**3. Enzimas:** las proteasas son las enzimas más importantes como la aspartil proteinasa, fosfolipasas y lipasas. Otras enzimas que también han sido descritas

en algunas especies son queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas y hialuronidasas<sup>64</sup>.

**4. Cambio morfológico:** algunas de las especies de *Candida* tienen la capacidad de cambiar morfológicamente de blastoconidio a pseudohifa y/o hifa. *Candida glabrata* es la única que no sufre este proceso, ya que es una levadura monomórfica<sup>18</sup>.

**5. Variabilidad fenotípica:** algunas especies de *Candida* tienen la capacidad de modificar su morfología macroscópica de colonias lisas, translúcidas a opacas y rugosas; esto cambia la antigenicidad, ya sea por un aumento o disminución en la producción de enzimas y toxinas<sup>27</sup>.

**6. Formación de biopelículas:** la biopelícula es una comunidad microbiana embebida en una matriz extracelular de polisacáridos. Esta estructura se une de modo irreversible a un sustrato y las células sésiles que la componen muestran características fenotípicas diferentes a sus correspondientes células de vida libre o planctónicas<sup>18</sup>. La función de éstas es ayudarle a *Candida* a sobrevivir en el hospedero y a resistir a los diversos antifúngicos. La resistencia de las biopelículas de *Candida* a estos fármacos es un fenómeno multifactorial en el que intervienen diferentes mecanismos como: 1) la barrera física formada por la matriz polimérica extracelular; 2) la presencia de células persistentes, tolerantes, con menor actividad metabólica; 3) los distintos fenotipos celulares dentro de la biopelícula; 4) la sobreexpresión de diferentes genes asociados con los mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos, y 5) un microambiente pericelular poco propicio para la actividad de los antifúngicos<sup>71,72</sup>.

### **I.1.6 Epidemiología de las candidosis**

Las especies de *Candida* representan un problema de salud en hospitales generales, principalmente en las unidades de cuidados intensivos. En la última década se ha descrito que causan del 8% al 10% de todas las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo. En Estados Unidos, la incidencia ha sido calculada en 23.6 infecciones por cada 100,000 personas al año. Otros autores consideran que de 5 a 10 de cada 1000 pacientes de alto riesgo, contraerán

infecciones por especies de *Candida*<sup>69,74</sup>; la tasa será de 47 por cada 10,000 habitantes, con una incidencia de 4.3/ 100 000 habitantes. Mundialmente, desde hace tres décadas se ha observado un incremento en las infecciones causadas por *Candida* spp. en los pacientes atendidos en hospitales generales<sup>79</sup>. De las 200 especies de *Candida* que se han identificado, sólo 12 especies han sido comúnmente asociadas a las diversas formas clínicas<sup>38,43</sup>. La candidosis vaginal es una de las infecciones más comunes del tracto genital femenino y *C. albicans* es la especie aislada con más frecuencia, generalmente es responsable del 90% -100% de las infecciones de las mucosas y del 50% -70% de los episodios de candidemia. En cambio la frecuencia de las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* causantes de infección, depende del país, de la forma clínica, del factor predisponente y del grupo de edad<sup>69,74</sup>. En América del Norte y en los países del centro y norte de Europa (Alemania, Francia, Reino Unido y los países escandinavos), *C. glabrata* es un patógeno cada vez más frecuente causando candidosis invasiva en el 4-6% de los casos. En América Latina el 44% y en Europa el 62% de los casos de infección por *Candida* están asociados a *C. albicans*, principalmente son infecciones superficiales cutáneas, bucales y genitales<sup>69</sup>. *Candida parapsilosis* es la segunda especie aislada de sangre, asociada a infecciones invasivas en neonatos en Europa (12%) y la región Asia-Pacífico (17%); en América Latina ha aumentado del 14% al 20%. El 60 a 80% de los pacientes con neutropenia y colonizados por *C. tropicalis* desarrollan infección invasiva. Este agente ocupa el cuarto lugar en América del Norte y el segundo lugar en América Latina (20%). *Candida glabrata* es más común en la región Asia-Pacífico. Por otro lado, en Japón y EUA, *Candida auris* se ha reportado como agente emergente causante de infecciones invasivas<sup>27,64,69,94</sup>.

### **I.1.7. Factores de riesgo y formas clínicas de las candidosis**

En el cuadro 3 se resume los factores de riesgo y manifestaciones clínicas más comunes presentadas por los pacientes con infecciones por *Candida*. Cualquier tejido es potencialmente colonizado por las especies de *Candida*; por tanto, las manifestaciones clínicas van a depender del órgano afectado. Otro parámetro que está directamente relacionado a estas infecciones es el estado inmunológico del paciente. Para que este hongo en su estado comensal pase a ser un patógeno, se necesita la pérdida del equilibrio entre el hospedero, la biota bacteriana y la levadura comensal. Los factores relacionados más comúnmente en las candidosis son leucemia, neutropenia, quemaduras, enfermedad gastrointestinal y prematurez. Las formas clínicas más frecuentes son las candidosis superficiales de mucosas y piel. Las infecciones sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente son graves; se asocian el uso prolongado de antimicrobianos de amplio espectro, uso de catéteres, cirugía gastrointestinal, prematurez y en personas de edad avanzada quienes usan prótesis dental<sup>69,74,76,82,88</sup>.

Cuadro 3. Principales formas clínicas y factores de riesgo en las infecciones por *Candida* <sup>3,17,64,74,82,93</sup>.

Formas clínicas	Factores de riesgo
Mucocutáneas: Bucal Cutánea Vaginal  Ungueal Esofágica	Protesis dental Humedad localizada, Obesidad Embarazo, diabetes mellitus  Traumatismo Síndrome de inmunodeficiencia adquirida Tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro
Pulmonar	Aspiración, intubación endotraqueal prolongada (en neonatos)
Urogenital	Sonda urinaria, Diabetes mellitus
Gastrointestinal	Cirugía gastrointestinal, uso de catéter venoso central, neoplasias
Meningoencefálica	Cirugía de sistema nervioso central
Endocárdica	Drogadicción (por vía venosa)
Septicemia	Neutropenia, uso de antibióticos de amplio espectro

### I.1.8. Candidosis en México

En el cuadro 4 se muestra una revisión de los últimos 10 años sobre las diversas formas clínicas de candidosis y las especies causales en México. De acuerdo con las descripciones de estos autores es evidente que de las infecciones sistémicas por *Candida*, la que ocupa el primer lugar en frecuencia es la vulvovaginitis, seguido de infección de vías urinarias por *Candida*. Las especies más

comúnmente identificadas corresponden a *C. albicans* (39.0%), *C. glabrata* (35.9 %) y *C. tropicalis* (16.2%)<sup>76</sup>.

En otros trabajos reportaron que de 1000 egresados se encontraron 45 eventos infecciosos causados por *Candida* spp. La mortalidad observada fue del 35.5%, *C. albicans* fue la principal especie identificada en 16 eventos; mientras que en otras especies diferentes a *C. albicans*, la mortalidad fue del 24%<sup>74</sup>.

Cuadro 4. Agentes causales y formas clínicas de candidosis en México.

<b>Especies</b>	<b>Tipo y frecuencia de infección</b>	<b>Factor de riesgo</b>	<b>Autores</b>
<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	Peritonitis	Diálisis peritoneal continua ambulatoria	Manzano-Gayosso y cols. <sup>44</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i>	Infecciones vaginales: 15-19 %	No descrito	Rivera-Sánchez y cols. <sup>76</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. lusitaniae</i>	Fungemias: 30-35%	Neoplasias, cardiopatías congénitas, insuficiencia renal y MTD	Reséndiz-Sánchez y cols. <sup>74</sup>
<i>C. glabrata</i> <i>C. albicans</i>	Infecciones diseminadas: 30.7%	Diabetes mellitus tipo 2	Manzano-Gayosso y cols. <sup>45</sup>
<i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. famata</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. humicola</i>	Fungemia, candidosis bucal, onicomicosis, intertrigos, artritis e IVRB	No descrito	Manzano-Gayosso y cols. <sup>46</sup>
<i>C. albicans</i>	Infecciones vaginales: 28%	No descrito	Sánchez-Hernández y cols. <sup>82</sup>

IVRB: infección de vías respiratorias bajas.

Continuación

Especies	Tipo y frecuencia de infección	Factor de riesgo	Autores
<i>C. guilliermodii</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. orthopsilosis</i> <i>C. matapsilosis</i>	Fungemias: 98.32%	Antimicrobianos como profilaxis y uso de catéteres	González y cols. <sup>28</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. humicola</i> <i>C. famata</i>	Infección pulmonar y peritoneal: 63%	Aplasia medular, leucemia y trasplante de médula ósea	Méndez-Tovar y cols. <sup>52</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. zeylanoides</i>	Pulmonar, orofaríngea, IVU, onicomycosis y ótica	Inmunosupresión	Romero-Luévano y cols. <sup>76</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i>	Infección vaginal	No descrito	Buitron-García y cols. <sup>5</sup>
<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i>	Candidosis bucal	Diabetes mellitus tipo 2 Uso de prótesis	Martínez RF y cols 2013. <sup>49</sup>

MTD: malformaciones del tubo digestivo; IVU: infección de vías urinarias

## I.2. Género *Trichosporon*

### I.2.1. Historia

La palabra “*Trichosporon*” deriva del griego, compuesta por dos raíces *Trichos* (pelo) y *Sporon* (esporas)<sup>7</sup>. El nombre del género *Trichosporon* fue acuñado por Beigel en 1865. Este autor observó que esta levadura causaba una parasitación benigna del pelo, la cual estaba relacionada con la presencia de estructuras nodulares en la punta y a lo largo del pelo, descrita como “piedra blanca”. Una

clasificación errónea de este agente fue considerarla como un alga, *Pleurococcus beigelii*. Posteriormente Behrend 1890, describió a *Trichosporon ovoides*, como el agente causante de “piedra blanca” en la barba de un hombre<sup>16</sup>. En 1902, Vuillemin designó a todos los aislados de *Trichosporon* cuyas estructuras de conidiación estuvieran conformadas por artroconidios como *Trichosporon beigelii*. Cuatro décadas después, Diddens y Lodder en 1942 consideraron que *T. beigelii* y *T. cutaneum* eran la misma especie. Esto propició que el mismo hongo fuera conocido con dos nombres: *T. beigelii* preferido por los médicos y *T. cutaneum* por los micólogos<sup>16</sup>. Posteriormente, de acuerdo con la descripción de Guého y cols., las especies de este género fueron reclasificadas por técnicas moleculares. Estos estudios contribuyeron a la descripción de *T. cutaneum*, 19 taxones y especies previamente descritas como *T. beigelii* fueron consideradas sinónimos de *T. cutaneum*<sup>31</sup>.

### **I.2.2. Taxonomía**

La taxonomía tradicional fue basada en las características fenotípicas, lo cual generó inconsistencias, ya que, dentro del mismo taxón, algunos aislados poseen un comportamiento genético muy heterogéneo.

A partir de 1991 se iniciaron los trabajos que ayudaron a la diferenciación entre las especies del género *Trichosporon*. Kemker y cols.<sup>36</sup> realizaron estudios isoenzimáticos y perfiles genéticos en 15 aislados de *Trichosporon* utilizando el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), análisis de ADN ribosomal (rDNA) de las regiones ITS1 e ITS2 y de 5.8S. Los resultados obtenidos fueron comparados con las características fenotípicas y con el perfil de asimilación de diversas fuentes de carbono y de ácido úrico. Guého y cols en 1992 ampliaron sus estudios haciendo una correlación de los hallazgos moleculares, las características fisiológicas, morfológicas; como la ultraestructura del poro septal, características bioquímicas, los sistemas de coenzimas Q-10 y Q-9, la secuencia de la región 28S rDNA<sup>16,30</sup>. De esta manera en 1994, el género *Trichosporon* estuvo conformado por las siguientes especies: *T. cutaneum*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. mucoides*, *T. inkin* y *T. ovoides*. Otros autores en 1994 y 1995

propusieron 17 especies y 5 variedades<sup>90</sup>. Por otro lado, Middlehoven y cols en 2004, separaron el orden Trichosporonales en cuatro clados: Gracile, Porosum, Cutaneum y Ovoides. En Brasil en el 2010, Colombo y cols. describieron 6 nuevas especies: *T. dohaense*, *T. vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* y *T. gamsii*, las cuales fueron incluidas en los diferentes clados<sup>16</sup>.

De las clasificaciones del género *Trichosporon* la más utilizada es la siguiente, tomada de Colombo y cols.<sup>16</sup>:

Reino: Fungi

Phyllum: Basidiomycota

Subphyllum: Basidiomycotina

Orden: Trichosporonales

Familia: Sporidiobolaceae

Género: *Trichosporon*

Especie: *T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*,  
*T. ovoides*, *T. mucoides*, *T. asteroides*, ...

### **I.2.3. Hábitat**

Las especies del género *Trichosporon* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en ambientes tropicales y templados. Estos organismos se pueden encontrar en diversos sustratos como se muestra en el cuadro 5. En humanos, pueden ser parte de la microbiota gastrointestinal, de la cavidad bucal y ocasionalmente puede colonizar las vías respiratorias altas y la piel<sup>96</sup>. En el humano se han realizado algunos estudios acerca de la distribución anatómica de las especies de *Trichosporon* como comensal. De éstos las principales localizaciones son los pliegues interdigitales de los pies e ingles, donde se ha aislado *T. cutaneum*, *T. inkin* y *T. capitatum*<sup>21</sup>.

Cuadro 5. Aislamientos de *Trichosporon* spp. de diversas fuentes ambientales.

Espece	Aislamiento	País	Autores
<i>T. cutaneum</i>	Ríos	Brasil	Hagler AN <sup>32</sup>
<i>T. inkin</i>	Suelo	Brasil	Mok y cols. <sup>59</sup>
<i>Trichosporon</i> spp.	Lagos	Estados Unidos de América	Meyers y cols. <sup>54</sup>
<i>T. jirovecii</i>	Lagos artificiales	Colombia	Silva-Bedoya y cols. <sup>87</sup>
<i>T. asahii</i>	Muestras ambientales	Estados Unidos de América	Sugita y cols. <sup>90</sup>
<i>T. dermatis</i>	Aguas hidrotermales	Portugal	Gadanhó y cols. <sup>25</sup>
<i>T. mucoides</i>	Crestas de pollo	Alemania	Gründer y cols. <sup>29</sup>

#### I.2.4. Características morfológicas

**Macroscópica.** Las colonias son de color blanco a beige, de aspecto seco o céreo, de superficie plegada o cerebriforme (cuadro 6)<sup>96</sup>.

**Microscópica.** Las especies incluidas en el género *Trichosporon* se caracterizan por la formación de blastoconidios, artroconidios, pseudohifas e hifas. Los artroconidios al desarrollarse forman hifas de paredes multiestratificadas y doliporos con o sin parentosomas. Algunas especies se diferencian entre ellas por presentar estructuras morfológicas particulares como los apresorios. Las especies de este género son capaces de utilizar distintas fuentes de carbono e hidrolizar la urea (cuadro 6)<sup>97</sup>.

Cuadro 6. Características morfológicas de *Trichosporon* spp.<sup>97</sup>.

Especie	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Descripción de hifas, pseudohifas
<i>T. asahii</i>	Colonias secas, céreas, de superficie lisa, plegada en el centro y un margen filamentosos, color crema	Células globosas y ovoides, tamaño de 2-5 x 2.5-9 $\mu\text{m}$	Hifas septadas con artroconidios
<i>T. cutaneum</i>	Colonias de superficie cerebriforme elevadas, con un margen filamentosos, color blanquecino	Células globosas, cilíndricas y/o alargadas, tamaño de 2-4.5 x 2.5-12 $\mu\text{m}$	Hifas septadas con artroconidios
<i>T. dermatis</i>	Colonias opacas, de superficie rugosa, margen bien delimitado, de color blanco-amarillento	Células ovoides elípticas y/o elongadas, tamaño de 2-8 x 2-12 $\mu\text{m}$	Hifas septadas, desarticuladas en artroconidios
<i>T. jirovecii</i>	Colonias opacas, con centro elevado de aspecto cerebriforme y margen liso	Células oviodes, elípticas o alargadas, tamaño de 2-8 x 3-12 $\mu\text{m}$	Hifas septadas con artroconidios. conidios laterales globosos sobre las hifas
<i>T. mucoides</i>	Colonias lisas brillantes, de aspecto mucoides, margen filamentosos, de bordes irregulares, de color crema	Células ovoides, elípticas o elongadas, tamaño de 3.5-6.5 x 3-12 $\mu\text{m}$	Hifas septadas, artroconidios

### **I.2.5. Factores de virulencia**

**1. Componentes celulares de la pared:** las levaduras expresan glucuronoxylomananas (GXM) en su pared celular; la GXM es una cadena de 1,3 mananos unidos a cadenas cortas de 1,4 manosa y 1,2 xilosa. Estos polisacáridos pueden atenuar la capacidad fagocítica de los neutrófilos y monocitos *in vivo*. También estas moléculas pueden estar implicadas en los cambios morfológicos del hongo, cuando se encuentra en su fase parasitaria o en su fase infectante<sup>16,96</sup>.

**2. Enzimas:** las especies de *Trichosporon* tienen la capacidad de producir y secretar enzimas de tipo lipasa y fosfolipasa I y II. Diversos estudios han demostrado que estas enzimas tienen una actividad óptima, a temperatura de 35°C y un pH de 5.5. Estas enzimas presentan estabilidad en un rango de pH de 4.0 a 8.0, a 30°C durante 24 h. Recientemente se demostró una enzima alcalina en *T. asahii* llamada MSR 54; ésta tiene actividad a temperatura ambiente, aunque la máxima actividad se ha demostrado a 40°C y a un pH de 8.0 a 10.0. Otros autores reportaron que *T. asahii* es capaz de secretar beta-N-acetilhexosaminidasa, enzima que favorece los cambios fenotípicos en el aspecto de la colonia<sup>16</sup>.

**3. Biopelículas:** algunas especies como *T. asahii* tienen la capacidad de formar conglomerados de hifas y levaduras embebidas dentro de una matriz extracelular de polisacáridos, sobre la superficie de los catéteres<sup>1</sup>.

### **I.2.6. Epidemiología de las infecciones por *Trichosporon***

El aislamiento de diversas especies de *Trichosporon* está relacionado con episodios de colonización superficial. En general, *Trichosporon* ha sido considerado como un hongo oportunista emergente que causa infecciones invasivas en las unidades de cuidados intensivos de algunos hospitales en el mundo.

La infección invasiva es adquirida principalmente por los pacientes que desarrollan enfermedades hematológicas malignas. La evolución de la infección puede llegar a ser fatal. Esta infección puede diseminarse a otros órganos produciéndose una fungemia por *Trichosporon*. La principal causa asociada a fungemia por este

hongo es el cateterismo en alrededor del 58.8% al 74.7% de las infecciones<sup>41</sup>. En las últimas 4 décadas (1975 a 2014) en Europa, Asia, Norte y Sur de América, se ha observado un aumento en el número de casos asociados a infecciones por *Trichosporon*<sup>16</sup>. Yong y cols. en el 2015, realizaron un estudio sobre los datos demográficos y factores de riesgo asociados a una infección invasiva por las especies de este género; reportaron que la edad promedio de 184 pacientes fue de 47 años (0 a 84 años), la mayoría de los casos fueron hombres (66.12%) y la relación hombre / mujer fue de 1.95:1. Las 4 enfermedades asociadas fueron leucemia aguda (57.30%), neutropenia (77.36%), parto prematuro (7.57%), diabetes mellitus (4.86%) y tumor sólido (4.32%)<sup>41</sup>. Otros factores que se asocian a infecciones por *Trichosporon* son la administración de antimicrobianos por tiempo prolongado, quimioterapia, corticosteroides, uso de catéter venoso central (CVC) y per se el ingreso a las unidades de cuidados intensivos<sup>41</sup>.

La especie de *Trichosporon* más comúnmente aislada fue *T. asahii* (75%); seguida de *T. mucoides* (6.58%), *T. inkin* (5,26%), *T. asteroides* (5.26%) y *T. loubieri* (2.63%).

De acuerdo con algunos autores, alrededor del 58.92% de los pacientes con infecciones invasivas tienen un mal pronóstico, que los puede llevar a la muerte. Las formas superficiales generalmente tienen buen pronóstico<sup>41</sup>.

### **I.2.7. Formas clínicas de las infecciones por *Trichosporon***

Las manifestaciones clínicas dependen del área afectada y del estado inmunológico del paciente. Esta levadura cuando se comporta como un patógeno puede causar infecciones superficiales en mucosas, en personas inmunocompetentes. Las formas invasivas son más graves y están documentadas en pacientes con neoplasias hematológicas y otras condiciones médicas relacionadas con inmunosupresión. En el cuadro 7 se muestra las diversas formas clínicas y los factores de riesgo más comunes<sup>16,41</sup>.

Cuadro 7. Relación entre las formas clínicas y los agentes causantes de infección por *Trichosporon* spp.<sup>16,41,96</sup>.

Forma clínica	Manifestación Clínica	Factores de riesgo	Agentes etiológicos
Superficial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Piedra blanca</li> <li>• Intertrigo</li> <li>• Onicomycosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mujeres jóvenes</li> <li>• Pelo largo</li> <li>• Mala higiene</li> <li>• Humedad intensa</li> <li>• Uso de bandas para el pelo</li> <li>• Humedad intensa</li> <li>• Diabetes mellitus</li> </ul>	<p><i>T. inkin</i></p> <p><i>T. cutaneum</i></p> <p><i>T. ovoides</i></p> <p><i>T. loubieri</i></p> <p><i>T. asahii</i></p> <p><i>T. mucoides</i></p>
Neumonía alérgica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipersensibilidad de verano</li> <li>• Neumonitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clima cálido y húmedo</li> <li>• Contaminación del medio ambiente</li> </ul>	<p><i>T. cutaneum</i></p>
Invasiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fungemia</li> <li>• Infección en tracto urinario</li> <li>• Peritonitis</li> <li>• Endocarditis</li> <li>• Esofagitis</li> <li>• Abscesos cerebrales</li> <li>• Infecciones uterinas</li> <li>• Artritis</li> <li>• Meningitis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer</li> <li>• Catéter urinario y vasculares</li> <li>• Catéter venoso central</li> <li>• Transplante de órganos</li> <li>• Profilaxis con antibióticos de amplio espectro</li> </ul>	<p><i>T. asahii</i></p> <p><i>T. mucoides</i></p> <p><i>T. asteroides</i></p>

El incremento de las infecciones causadas por especies del género *Candida* y *Trichosporon* en los hospitales generales y de alta especialidad, en parte es debido a la introducción de nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento como los procedimientos quirúrgicos invasivos, la quimioterapia y el uso de antimicrobianos de amplio espectro. Estos hechos llevan a mayor inmunosupresión del paciente. Por otro lado, también se ha reportado aumento en la frecuencia en las fallas terapéuticas, fenómeno que se puede explicar por las condiciones propias del paciente, el uso de terapias profilácticas, interacciones medicamentosas y por la resistencia de los hongos frente a los fármacos que se administran para el control de las infecciones<sup>47</sup>. Estos cambios observados han llevado a la administración de antifúngicos con diversas dianas de acción.

Para los fines de este trabajo solo se describirán algunos de los aspectos relacionados con los antifúngicos valorados *in vitro* frente a las especies de *Candida* y *Trichosporon*.

### **I.3. Antifúngicos**

Los antifúngicos son sustancias con la capacidad de producir daño en las estructuras fúngicas, como consecuencia inhibir el desarrollo del hongo.

La clasificación de los antifúngicos se realiza de acuerdo a la estructura de la molécula. En la figura 3 se muestra los años de introducción de los antifúngicos incluidos en este estudio. En 1964 apareció la 5-fluorocitosina con buena actividad frente a las levaduras, fármaco con el cual se observó pronto el desarrollo de resistencia<sup>6</sup>. Los antifúngicos azólicos fueron desarrollados en la década de 1960 y se emplearon en la práctica clínica hasta 1969.

En 1980 el uso de ketoconazol fue extenso, por los efectos secundarios y el espectro limitado fue sustituido por los triazoles de primera generación como el fluconazol, primer fármaco de uso sistémico con penetración al sistema nervioso central; por otro lado, itraconazol fue introducido en 1992<sup>6</sup>. En la década de 1970-1980, como resultado de los programas de investigación se inició el uso de las alilaminas en la práctica clínica. En el 2000 se desarrollaron los triazoles de segunda generación de uso sistémico como voriconazol y posaconazol.

Finalmente, la síntesis de nuevas moléculas con la capacidad de interactuar con la pared celular del hongo, tal es el caso de las equinocandinas como la caspofungina<sup>18</sup>.

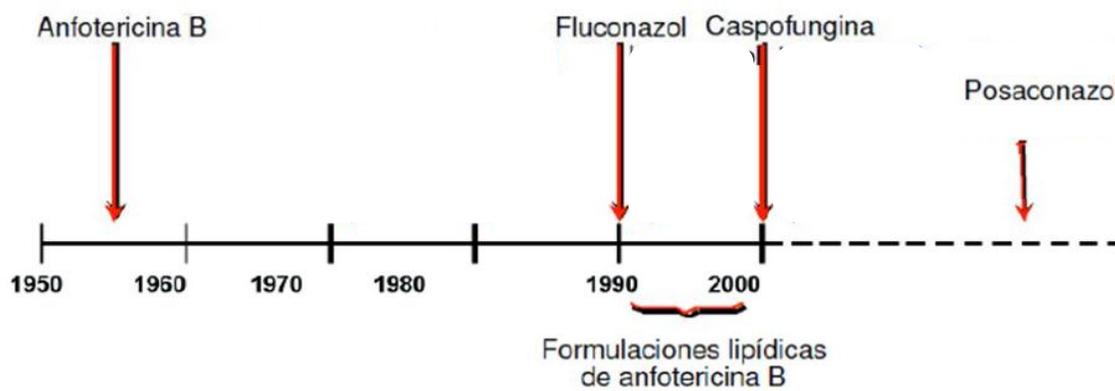


Figura 3. Línea del tiempo. Las flechas señalan el año en el que se sintetizaron los diversos antifúngicos<sup>2</sup>.

En la última década se ha continuado con los avances en la síntesis de nuevos fármacos con estructuras más complejas, con la finalidad de reducir la toxicidad y mejorar su eficacia de las ya existentes.

### I.3.1. Características químicas y mecanismos de acción

#### Polienos

Los derivados poliénicos son sustancias sintetizadas por diversas especies de *Streptomyces* (*S. nodosus*), poseen una estructura constituida por un anillo macrólido de 26 a 38 átomos de carbono poliinsaturado y cerrado mediante un enlace éster o lactona interna (figura 4). En un lado de la cadena se sitúan los grupos hidroxilo que confieren a la molécula un carácter anfipático, característico de estos antifúngicos. Las sustancias más representativas son la nistatina y la anfotericina B<sup>6</sup>.

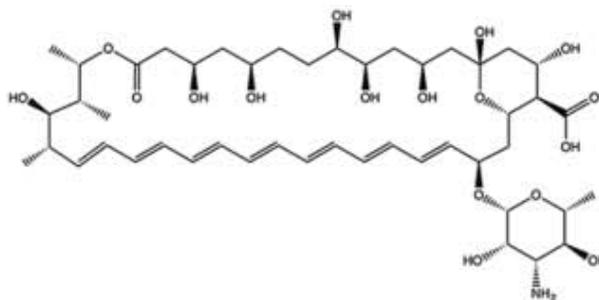


Figura 4. Estructura general de los polienos. Tomada de Carrillo-Muñoz y cols. 2009<sup>6</sup>.

El mecanismo de acción de la anfotericina B implica la unión irreversible al ergosterol presente en la membrana plasmática de la célula fúngica, dando lugar a la formación de poros en la membrana celular, alterando la permeabilidad, con salida de iones  $K^+$  y entrada de iones  $Na^+$ , lo que conduce a la muerte celular por alteración del equilibrio osmótico<sup>27</sup>.

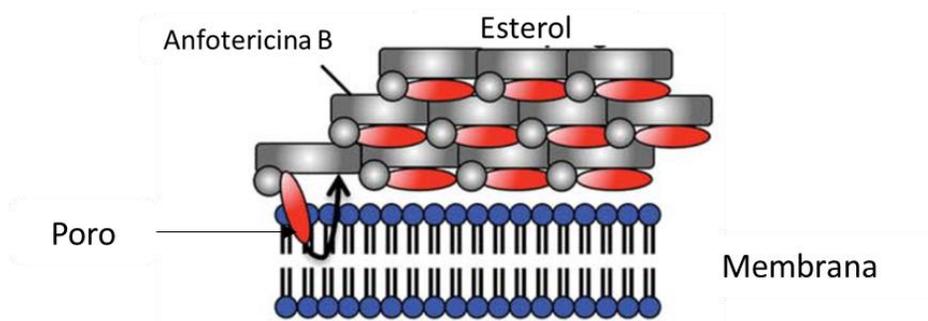


Figura 5. Mecanismo de acción de anfotericina B. La molécula se une de manera irreversible al ergosterol de la membrana celular, formando poros que inducen la pérdida de contenido citoplasmático. Tomada de Spitzer y cols.<sup>89</sup>

## Azoles

Los azoles constituyen una de las familias de antifúngicos con mayor número de derivados y una gran diversidad de espectros de actividad. Éstas son moléculas sintéticas cuya estructura química está conformada por anillos heteropentacíclicos,

con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno, unidos por átomos de carbono a otros anillos aromáticos (figura 6).

El mecanismo de acción es sobre la célula fúngica inhibiendo la síntesis del ergosterol, a través de la inhibición de la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P-450<sup>18,68</sup>. Los precursores del ergosterol son esteroides metilados y la acumulación de estos compuestos provocan inestabilidad en la membrana e impiden el crecimiento de la célula<sup>27</sup>.

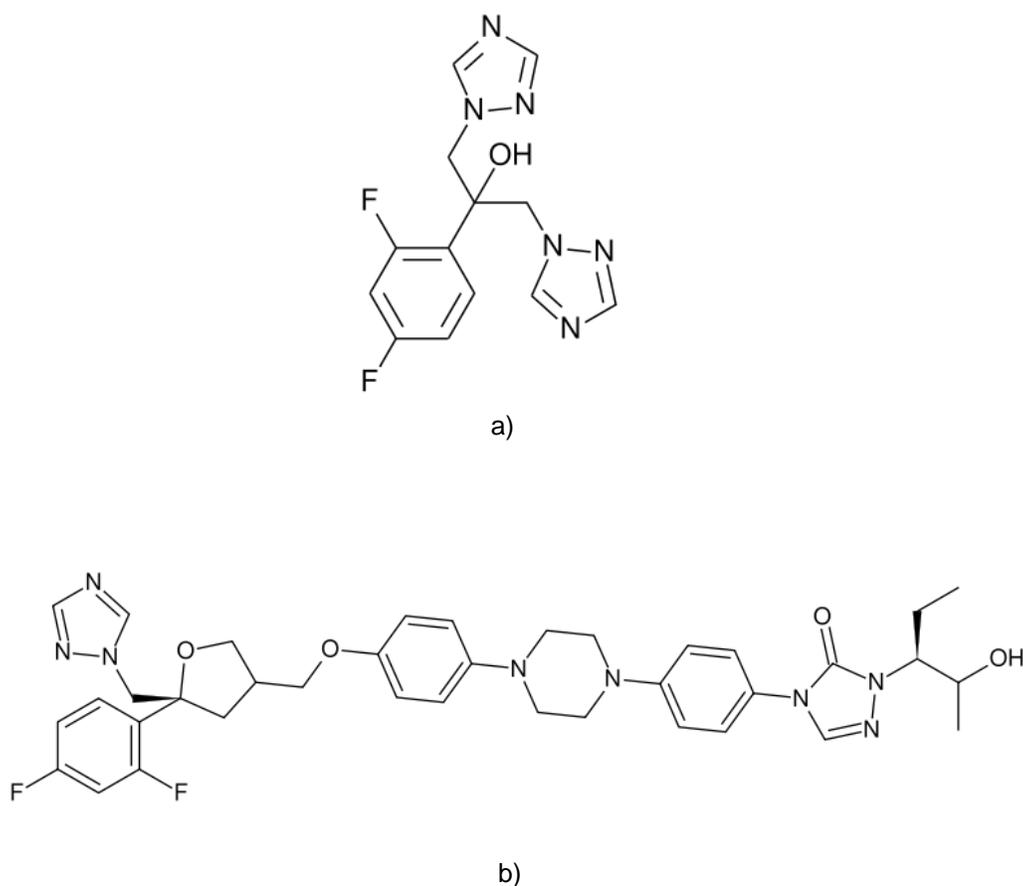


Figura 6. Estructura química de dos triazoles, a) fluconazol, b) posaconazol. Tomada de Carrillo-Muñoz y cols.<sup>6</sup>.

La diferencia entre los diferentes azoles radica en la farmacocinética y en la afinidad que tienen por la enzima del hongo. Los triazoles se dividen en primera y

segunda generación; dentro de la primera generación se encuentran el fluconazol e itraconazol; los de la segunda generación son voriconazol y posaconazol<sup>27</sup>, estos dos últimos son derivados triazólicos fluorados, lo que les confiere una mayor capacidad inhibitoria de la 14  $\alpha$ -demetilasa de lanosterol.

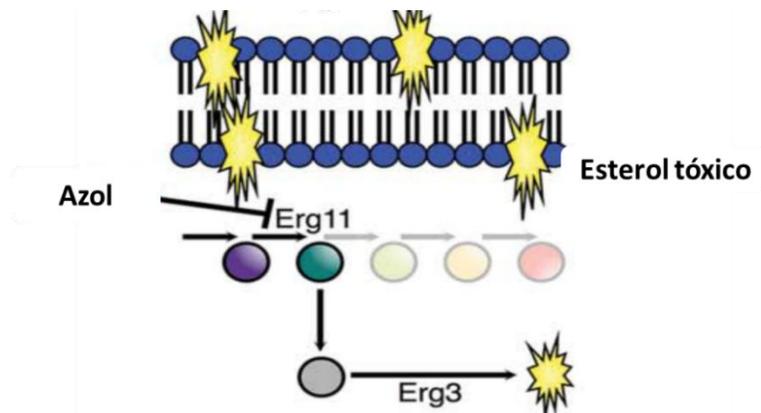


Figura 7. Mecanismo de acción de azoles inhibiendo la síntesis de ergosterol. Tomada de Spitzer y cols.<sup>89</sup>.

### Lipopéptidos

Las tres familias de compuestos inhibidores de la síntesis de glucanos que han sido estudiados son: papulacandinas, equinocandinas y triterpenos glicosilados. Las equinocandinas son moléculas derivadas de la fermentación producida por algunos hongos. Las principales equinocandinas sintetizadas son la caspofungina (*Glarea lozoyensis*), la anidulafungina (*Aspergillus nidulans*) y la micafungina (*Coleophoma empetri*). La caspofungina fue la primera de estas moléculas en ser aprobada por la FDA (2001). Este grupo lipídico consiste en un ácido graso en disposición lineal o ramificada, insaturado o no. La parte apolar está constituida por un hexapéptido cíclico de aminoácidos con uno o más grupos alcoholícos, y el radical ácido graso es variable (figura 8).

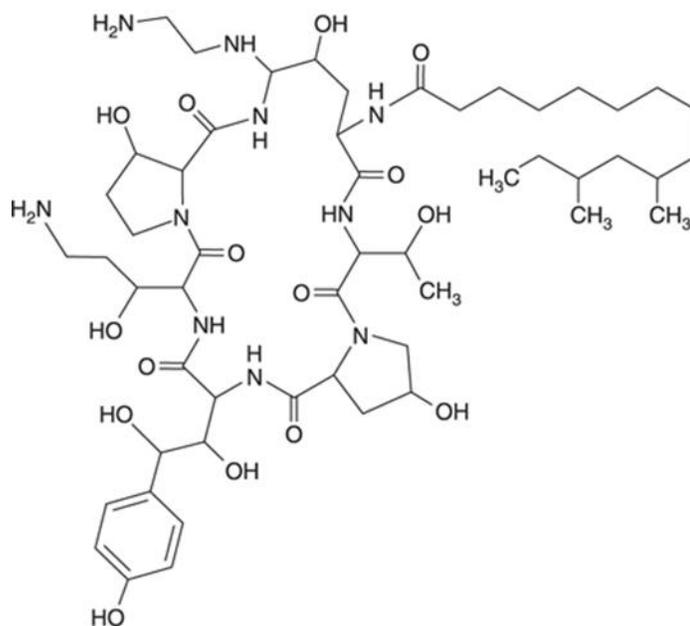


Figura 8. Estructura química de la caspofungina. Tomada de Carrillo-Muñoz y cols.<sup>6</sup>.

El mecanismo de acción de las equinocandinas consiste en la inhibición de la síntesis de 1,3-β-D-glucano, mediante la inhibición de la enzima 1,3-β-glucano sintetasa, encargada de sintetizar este componente, el cual es esencial en la pared celular de los hongos (figura 9)<sup>18</sup>.

En hongos del phylum Ascomycota los genes FSK1, FSK2 y FSK3 son responsables de la expresión de la 1,3-β-glucano sintetasa y se ha observado que hay una sobreexpresión de FSK2 en condiciones adversas<sup>27</sup>; la pared está compuesta en su mayoría de glucano y quitina, los cuales le dan rigidez y organización. La quitina es un homopolisacárido compuesto por residuos de N-acetilglucosamina unidos por un enlace β 1-4, este es un componente sintetizado por la enzima que se inactiva en presencia de caspofungina.

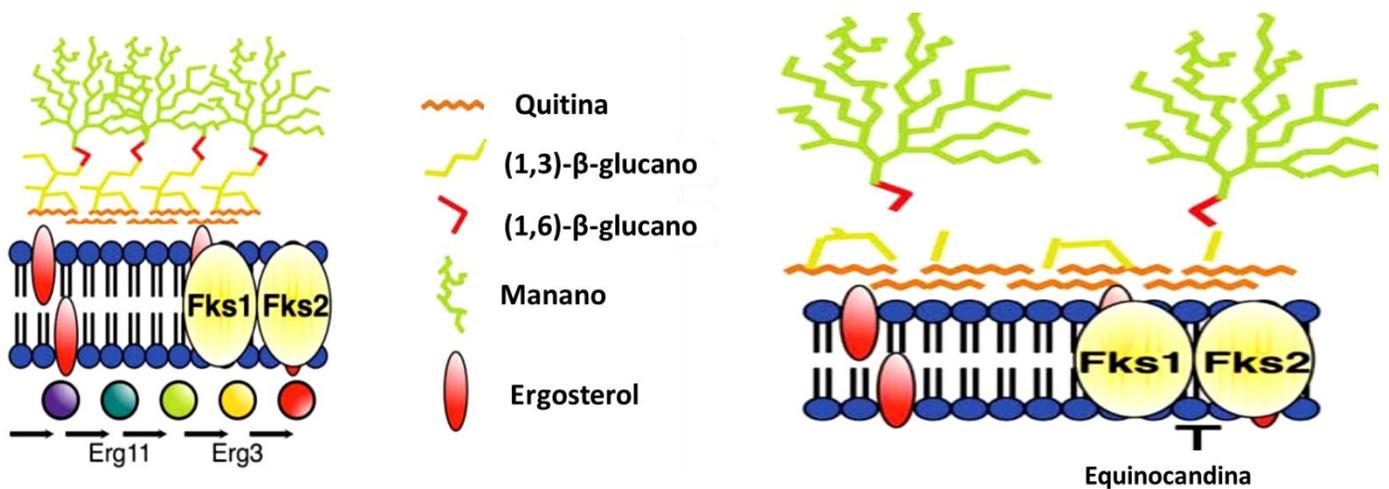


Figura 9. Mecanismo de acción de equinocandinas. Inhibición de componentes de pared celular. Tomada de Spitzer y cols<sup>89</sup>.

#### I.4. Resistencia a los antifúngicos

La resistencia a los antifúngicos se divide en: A) Resistencia clínica y B) Resistencia microbiológica. La resistencia clínica puede definirse como la persistencia de signos y síntomas de la infección y falla al tratamiento antifúngico establecido, a pesar de los niveles adecuados o altos del fármaco<sup>68,86</sup>. Por otro lado, la resistencia microbiológica ocurre cuando el crecimiento del hongo patógeno es inhibido por una concentración más alta del fármaco, comparada con la usada en las cepas silvestres<sup>68</sup>. Este tipo de resistencia puede ser primaria o innata (presente sin exposición previa al antifúngico) y secundaria o adquirida, es decir la resistencia que se desarrolla en un organismo previamente sensible después de un período de exposición al fármaco<sup>27</sup>.

##### I.4.I. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos

Las especies del género *Candida* y *Trichosporon* han desarrollado algunas estrategias para hacer frente a los diferentes antifúngicos. En las especies de *Candida* se han reportado tres principales mecanismos moleculares de resistencia<sup>18</sup>. 1) Disminución en la concentración del fármaco dentro de la célula a través de las bombas de flujo. La expulsión de los fármacos se ha asociado a dos

sistemas de proteínas: a) El “ATP-binding cassette” (ABC), el cual pertenece a una superfamilia de proteínas transportadoras, descritas alrededor de 28 tipos. En *C. albicans* se han caracterizado los genes CDR1 y CDR2, los cuales codifican para las proteínas transportadoras. En otras especies de *Candida* se han reportado proteínas con una función homóloga como es el caso de CgCDR1, CgCDR2 y CgSNQ2 en *C. glabrata*; CdCDR1 y CdCDR2 en *C. dubliniensis*; ABC1 en *C. krusei* y CtCDR1 en *C. tropicalis*<sup>68</sup>. b) La superfamilia de proteínas facilitadoras de transporte (MFS), las cuales funcionan a partir de un gradiente diferencial de protones originado en la membrana plasmática; 95 transportadores se han descrito en *C. albicans*, solo un gen ha sido asociado a la resistencia a múltiples fármacos (MDR1). Algunos autores han reportado genes con una función homóloga en otras especies de *Candida*<sup>27</sup>. 2) Cambios en el sitio de acción del fármaco, donde las mutaciones en genes como ERG11 podrían cambiar la estructura tridimensional de la enzima (lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilasa) y el resultado es la disminución en la afinidad de esta molécula<sup>27</sup>. Otro evento observado es la sobreexpresión de los genes involucrados en la resistencia, dada por mutaciones puntuales en regiones específicas de los genes promotores. 3) Aumento o sobreexpresión de otros genes encargados de sintetizar los componentes de la diana de acción. En 2011, Silva y cols<sup>86</sup> demostraron que en la resistencia a los azoles hay mutaciones en el gen ERG11; en la caspofungina hay mutaciones en el gen FSK1 y el aumento en la síntesis de quitina en *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.

Algunos autores reportaron que estos mecanismos están relacionados directamente con el incremento de resistencia a los distintos antifúngicos en las diversas especies de *Candida* y *Trichosporon* (cuadro 8). Recientemente se demostró que la mayoría de los aislados de *C. tropicalis* que no son sensibles a fluconazol mostraron sobreexpresión de los genes CDR1, MDR1 y ERG11 y el desarrollo de fungemia en pacientes inmunosuprimidos se presentó posterior al tratamiento con el triazol<sup>13</sup>.

Cuadro 8. Especies de *Candida* y *Trichosporon* resistentes a diversos antifúngicos.

Especies de <i>Candida</i> y <i>Trichosporon</i>	Resistencia antifúngicos	Autores
<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. guilliermondii</i>	Itraconazol	Manzano-Gayosso y cols. <sup>44</sup>
<i>C. albicans</i>	Ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y posaconazol	Hernández Galván y cols. <sup>33</sup>
<i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>	Anfotericina B, fluconazol (77.7%), itraconazol (20%), caspofungina, anidulafungina y micafungina	González y cols. <sup>28</sup>
<i>C. glabrata</i>	Fluconazol (10.3%)	Won y cols. <sup>99</sup>
<i>C. tropicalis</i>	Fluconazol (40.0%)	Xiao y cols. <sup>100</sup>
<i>Trichosporon</i> spp.	Anfotericina B	Walsh y cols. <sup>96</sup>
<i>T. asahii</i>	5-Fluorocitosina	Lo Paso y cols. <sup>42</sup>
<i>T. asahii</i>	Anfotericina B (17.7%)	Mendoza-Aranda y cols. <sup>53</sup>

El retraso en el diagnóstico y la falta de estrategias para un tratamiento adecuado, ha resultado en un aumento en la mortalidad (53% -76%) de las infecciones invasivas por *Trichosporon* y por *Candida* spp.<sup>1,41</sup>.

### I.5. Combinación de antifúngicos

Ante la evidencia de los fracasos en el tratamiento antifúngico observado en pacientes con diversas micosis causadas por hongos levaduriformes, los médicos clínicos iniciaron el tratamiento con la combinación de antifúngicos como una estrategia para mejorar la eficacia del tratamiento antifúngico y eliminar a los hongos resistentes a estos fármacos. Las ventajas sobre la monoterapia son: 1)

Retardar o inhibir el desarrollo de resistencia; 2) Reducir la probabilidad de que se expresen genes involucrados en la resistencia, ya que de manera general se requiere de acumulación de más de una mutación para conferir resistencia a dos fármacos; 3) Interacción de fármacos puede cambiar en respuesta a mutaciones y las combinaciones pueden convertirse en sinérgicas en cepas mutantes resistentes; 4) Las combinaciones sinérgicas favorecen la reducción de la dosis de cada fármaco, la duración del tratamiento y la toxicidad en el hospedero; 5) Propiciar que se desencadene la sensibilidad colateral, es decir, la resistencia a un fármaco puede conferir sensibilidad al segundo fármaco<sup>77,89</sup>.

En la última década se han realizado estudios clínicos *in vitro* de diversas combinaciones de antifúngicos con diferentes sitios de acción, con la finalidad de encontrar la mejor combinación con actividad sinérgica (cuadro 9). Algunos autores han reportado que la caspofungina presenta un efecto sinérgico al combinarla con AMB y con azoles<sup>11</sup>. Otro de los ensayos realizados fueron las combinaciones de terpenos (eugenol, mentol y timol) con fluconazol sobre biopelículas formadas por *C. albicans*. El efecto obtenido fue de sinergia con las diferentes combinaciones<sup>65</sup>.

De los tratamientos clínicos y que han reportado respuesta favorable fue en una infección por *Trichosporon asahii*, en un paciente con leucemia aguda, al combinar anfotericina B liposomal y caspofungina; así, redujeron la dosis de anfotericina B liposomal y disminuyeron los efectos tóxicos en el paciente<sup>10</sup>. Schilling y cols<sup>84</sup> reportaron un caso de osteomielitis vertebral causada por *C. krusei*; ellos utilizaron la administración combinada de caspofungina con posaconazol obteniendo un resultado favorable. Finalmente, el tratamiento combinado con cirugía (cambio de prótesis) y antifúngicos (fluconazol con anfotericina B), en casos de infección osteoarticular por *Candida*, evitó el proceso infeccioso de los pacientes y sin desarrollo microbiológico post-tratamiento<sup>55</sup>.

Cuadro 9. Combinación de antifúngicos *in vitro* sobre especies resistentes de *Candida* y *Trichosporon*.

Combinación	Especie	Efecto	Autores
Anfotericina B + 5 flourocitocina	<i>Candida</i> spp.	Antagónico	Petrou y cols. <sup>66</sup>
5 flourocitocina + azoles	<i>Candida</i> spp.	Sin consenso	Marchetti y cols. <sup>48</sup>
Anfotericina B + 5 flourocitocina	<i>Candida</i> spp.	Sinérgico Indiferente	Lewis y cols. <sup>39</sup>
Caspofungina + posaconazol	<i>C. glabrata</i>	Sinérgico Indiferente	Oliveira y cols. <sup>62</sup>
Anfotericina B + nistatina	<i>Candida</i> spp.	Indiferente	Brajtburg y cols. <sup>4</sup>
Caspofungina + voriconazol Caspofungina + itraconazol Caspofungina + fluconazol	<i>C. glabrata</i>	Sinérgico Indiferente Antagónico	Kiraz y cols. <sup>37</sup>
Terpenos + fluconazol	<i>C. albicans</i> biopeliculas	Sinérgico	Pemmaraju y cols. <sup>65</sup>
Anfotericina B + voriconazol Anfotericina B + caspofungina Caspofungina + voriconazol	<i>T. asahii</i>	Sinérgico Indiferente	Li y cols. <sup>40</sup>

## II. Planteamiento del problema

Las especies de *Candida* y *Trichosporon* son levaduras que en las últimas dos décadas se han incrementado como agentes causales de micosis oportunistas, con mayor número de fracasos en el tratamiento y aumento en la resistencia a los antifúngicos, principalmente en las formas invasivas.

Otra de las características observadas en pacientes con infecciones por especies de *Candida* y *Trichosporon* es la alta tasa de mortalidad del 10% al 49% y del 59% al 75%, respectivamente.

El mal pronóstico y la tasa de mortalidad presentada en los pacientes con estas infecciones pueden asociarse a las fallas en el tratamiento antifúngico. Estos hallazgos pueden ser explicados por factores intrínsecos del paciente y por la resistencia microbiana de los agentes causales. Algunas especies de *Candida* y *Trichosporon* han mostrado menor sensibilidad a los compuestos azólicos con evidencia de resistencia variable dependiente de la especie.

Por lo anterior, es necesario realizar estudios en el que se evalúe la actividad combinada de compuestos azólicos, polienos y equinocandinas; con la finalidad de encontrar la actividad sinérgica entre las diferentes combinaciones de antifúngicos frente a los aislados levaduriformes resistentes.

### **III. HIPÓTESIS**

Los diferentes antifúngicos utilizados contra las especies del género *Candida* y *Trichosporon* con diversas dianas han mostrado variabilidad en la actividad sobre estas levaduras, algunas con resistencia. Si se combinan dos antifúngicos con diferente mecanismo de acción se obtendrá una actividad sinérgica y por lo tanto, se inhibirá con mayor eficacia el crecimiento de los hongos resistentes a un solo antifúngico.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Evaluar la actividad combinada de cuatro antifúngicos para inhibir el crecimiento de las especies resistentes de *Candida* y *Trichosporon*.

##### **Objetivos particulares**

Identificar aislados levaduriformes causantes de infecciones superficiales y sistémicas.

Conocer el perfil de sensibilidad de las especies de *Candida* y *Trichosporon* frente a fluconazol, posaconazol, anfotericina B y caspofungina, por el método de microdilución en caldo.

Determinar el índice de la concentración inhibitoria fraccionada en cada una de las combinaciones.

Evaluar la actividad sinérgica, o antagónica en las cinco combinaciones de los cuatro antifúngicos.

## **V. Material y método**

Estudio observacional, transversal, realizado en aislados levaduriformes obtenidos de diversos especímenes de los pacientes atendidos en el Hospital General Dr. Darío Fernández del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado; y del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Aislados**

De cada cultivo problema se tomó una pequeña porción del crecimiento colonial de 24 h, para hacer una suspensión en 1 mL de solución salina al 0.85% estéril; de ésta se tomaron 5 µL y se inocularon por estría cruzada en la superficie de las placas de agar dextrosa Sabouraud (ADS) sin antibióticos y adicionadas con cloranfenicol y cicloheximida (ADS-A); las placas fueron incubadas a 28°C durante 48 h. De las colonias crecidas se realizaron frotis teñidos con Gram para observación microscópica, y así corroborar la presencia de levaduras y su pureza. Por otro lado, las colonias fueron resembradas en medios cromógenos (CHROMagar Candida®) para la identificación presuntiva por el desarrollo de diferentes tonalidades de color.

### **Pruebas morfológicas**

#### **Cultivo en agar dextrosa Sabouraud con antibióticos**

Los aislados levaduriformes desarrollados en ADS fueron resembrados por estría de aislamiento en placas de ADS-A, incubados a 28°C durante 48 h, para valorar la sensibilidad y/o resistencia a la cicloheximida.

#### **Cultivo en CHROMagar Candida®**

Los aislados purificados y crecidos en ADS se resembraron por estría de aislamiento en placas con agar cromógeno, se incubaron a 37°C durante 48 h; de las colonias se examinó la tonalidad del color y su morfología. Cuando se observó asociación de colores se seleccionaron las colonias y se hizo un subcultivo en agar cromógeno, para la separación de las diferentes colonias. El procedimiento

se basa en la detección de la actividad enzimática especie-específica de las levaduras, por la hidrólisis específica del sustrato artificial cromógeno, el cual detecta actividad de  $\beta$ -glucosidasa. Después de la reacción enzimática, queda un cromóforo libre, el cual se oxida y el resultado es el desarrollo de colonias de diferente color (figura 10)<sup>61,98</sup>. Este medio ayuda a la diferenciación e identificación presuntiva de *C. albicans* y/o *C. dubliniensis* (verde); *C. tropicalis* (azul metálico) y *C. krusei* (rosa con un margen blanco, colonia seca).

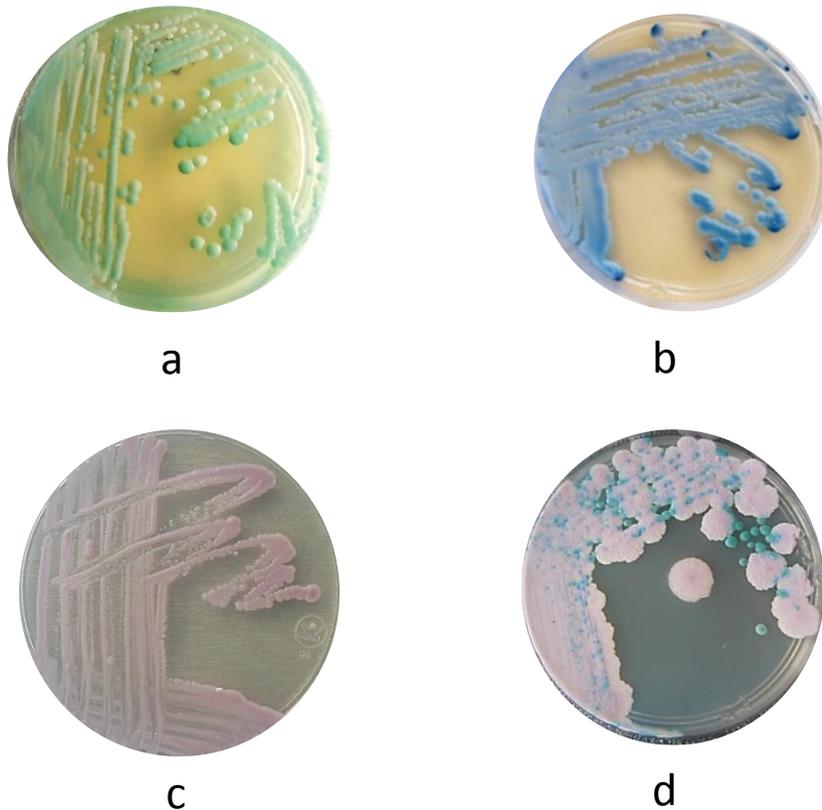


Figura 10. Cultivo de diferentes especies de *Candida* en agar cromógeno. a) *Candida albicans*; b) *Candida tropicalis*; c) *Candida krusei*; d) Especies asociadas.

### Filamentación en suero

De cada uno de los aislados crecidos por 24 h en ADS, se tomó una pequeña porción de la colonia y se inoculó por estría abierta en el centro de la superficie del agar Mueller-Hinton; después se colocó un cubreobjetos. Las placas se incubaron a 37°C durante 2 h. La presencia o ausencia del tubo germinativo se visualizó directamente al microscópico a un aumento de 10x y 40x (figura 11)<sup>75</sup>.

Esta prueba es útil para la diferenciación de *C. albicans*/*C. dubliniensis* de otras especies del mismo género. La prueba se basa en el desarrollo de un tubo germinativo cilíndrico a partir de la célula madre, sin la presencia de una constricción en el sitio de unión con la célula.



Figura 11. Desarrollo de tubo germinativo en agar Mueller-Hinton.

#### **Agar harina de maíz con Tween 80 (AHM)**

La inoculación se realizó por la técnica de Dalmau, la cual consiste en tomar una pequeña porción de la colonia de 24 h de crecimiento en ADS, e inocular el centro del agar formando dos líneas paralelas a 1 cm de distancia entre ellas; posteriormente se colocó un cubreobjetos estéril sobre la superficie cubriendo las dos líneas (figura 12a)<sup>50</sup>. Las placas se incubaron a 30°C durante 72 h. La lectura se realizó directamente al microscópico a un aumento de 10x y 40x, buscando la presencia de clamidoconidios (figura 12b) y la disposición de los blastoconidios y pseudohifas de las diferentes especies de *Candida*. En especies de *Trichosporon* la observación de artroconidios y blasto-artroconidios.



Figura 12. Placa de AHM inoculada con la técnica de Dalmau (a). Clamidoconidios (b).

### Pruebas bioquímicas

#### Prueba de ureasa

A todos los aislados con características morfológicas de *Trichosporon* y con crecimiento de 24 h se realizó una inoculación por estría abierta en tubos de AU; los tubos se incubaron a 28°C durante 48 h.

Algunos hongos producen y excretan ureasa, catalizando la hidrólisis de urea, produciendo CO<sub>2</sub> y amonio que alcaliniza el medio (pH por arriba de 8), este cambio se pone de manifiesto por el viraje en el color del medio de cultivo, de amarillo (prueba negativa) a rosado (prueba positiva). Esta prueba es útil para diferenciar entre las especies del género *Candida* (negativa) y *Trichosporon* (positiva) (figura 13).



Figura 13. Colonia plegada, seca, crecida en CHROMagar y prueba de ureasa positiva que correspondieron al aislado 121AC de *T. asahii* obtenido de orina.

## Pruebas de asimilación de carbono y compuestos nitrogenados

Esta prueba puede realizarse a través de sistemas automatizados o manuales utilizados para la identificación de especies de levaduras. El principio se basa en la capacidad de asimilar diversas fuentes de carbono por cada una de las especies de levaduras en estudio.

### API 20C Aux System. Método manual

La prueba se hizo a partir de un cultivo de 24 h en ADS; el inóculo se preparó en 2 mL de solución salina ajustando a  $6 \times 10^8$  UFC/mL; de esta suspensión se tomaron 100  $\mu$ L y se transfirieron a una ampolleta API médium; la suspensión se homogenizó y de ésta fueron tomados 150  $\mu$ L para depositar en los pozos placa hasta formar una cúpula. Las galerías se incubaron a 30°C durante 48 h. La lectura e interpretación se realizó observando la turbidez en comparación con el pozo control; el pozo más turbio que el control indicó crecimiento y por lo tanto asimilación, cuya lectura se anotó en la hoja de resultados registrando el valor numérico asignado para cada uno (1,2,4). Al sumar los números, por grupo de tres, se obtuvo el perfil numérico de siete cifras y la identificación se hizo mediante el apiweb, software proporcionado por el fabricante (figura 14).



Figura 14. Galería de api 20C aux, código numérico 6552371, correspondiente a *C. lusitaniae* (aislado 13AC).

## **Vitek 2. Método automatizado**

El sistema Vitek 2 se compone de tarjetas analíticas con 63 pozos y una serie de módulos, en la cual se procesa la información del aislado en estudio. A partir de un cultivo de 24 h, se preparó el inóculo en 2 mL de solución salina estéril al 0.85%, ajustando a una concentración de  $6 \times 10^8$  UFC/mL. La inoculación de las tarjetas, el sellado y la incubación se realizó de forma automatizada por el equipo, después de 18 a 24 h, el equipo dió la identificación de los aislados. La base de datos reportan la identificación de 51 especies diferentes.

## **Métodos moleculares**

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)**

Las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* y de *Trichosporon* que no fueron identificadas por las pruebas fenotípicas y por los sistemas de asimilación fueron sometidas a identificación molecular por la técnica de PCR para la amplificación de la región ITS1 e ITS4; posteriormente el amplicon fue digerido con enzimas de restricción (*MspI*) y para el complejo *C. parapsilosis* (*BanI*) de acuerdo con diversos autores<sup>57,58,92</sup>.

La extracción de ADN se realizó con el kit GENE ALL® siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante; la presencia de ADN genómico se corroboró por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con SYBR® Green. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz UV y la concentración fue determinada por el espectrofotometría. La mezcla de reacción y las condiciones para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4 y la técnica de enzimas de restricción se resumen en el cuadro 10 y 11. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), SADHF (5'-GTT GAT GCT GTT GGA TTGT-3') y SADHR (5'-CAA TGC CAA ATC TCC CAA-3'). Los resultados obtenidos fueron comparados con los reportes de Mirhendi y cols.<sup>57</sup> y Mohammadi y cols.<sup>58</sup> Las especies de *Trichosporon*, *Saccharomyces* y algunas otras de *Candida*, se identificaron por secuenciación.

Cuadro 10. Mezcla de reacción para PCR, regiones ITS1-ITS4.

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	2mM
dNTP's	0.5mM
Oligonucleótido ITS1	1μM
Oligonucleótido ITS4	1μM
Taq ADN polimerasa	2.5U
ADN	100ng

Cuadro 11. Mezcla para la reacción de PCR para el complejo *C. parapsilosis*.

Reactivo	Concentración final
H <sub>2</sub> O	
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
dNTP's	0.2mM
Albúmina	0.02μg/mL
Oligonucleótido SADHF	0.25μM
Oligonucleótido SADHR	0.25μM
Taq ADN polimerasa	2.5U
ADN	100ng

### Pruebas de sensibilidad

La segunda etapa del presente estudio consistió en la realización de las pruebas del perfil de sensibilidad, por el método de microdilución en caldo descrita en el documento M27-A3 del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI)<sup>14,15</sup>, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cuatro antifúngicos: fluconazol (FLZ), posaconazol (PSZ), anfotericina B (AMB) y caspofungina (CSF) sobre todos los aislados levaduriformes.

## **Preparación de la solución madre de los antifúngicos**

### **Antifúngicos solubles en agua**

Solución madre de fluconazol (FLZ) y caspofungina (CSF) se preparó una solución 100 veces mayor que la concentración más alta del rango establecido. La cantidad en mg necesaria de cada antifúngico se disolvió en 10 mL de agua Mili Q; se dejó reposar por 20 minutos y se esterilizó con unidades filtro de 0.22 $\mu$ m. Cada una de las soluciones madre se distribuyeron en alícuotas de 500  $\mu$ L y se conservaron a -20°C.

### **Antifúngicos insolubles en agua**

Solución madre. Para la anfotericina B (AMB) y el posaconazol (PSZ) se preparó una solución 100 veces mayor que la concentración más alta del rango establecido. La cantidad de cada antifúngico se disolvió en 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se dejaron reposar por 20 minutos y se esterilizaron con unidades filtro de 0.22 $\mu$ m. La solución madre de cada uno se distribuyó en alícuotas de 500  $\mu$ L y se conservaron a -20°C.

## **Diluciones del antifúngico para la preparación de las microplacas**

De acuerdo a los lineamientos del documento M27-A3, para los antifúngicos solubles en agua (Cuadro 12) se partió de la solución madre con la cual se hizo una dilución 1:50 mL en RPMI para el llenado de las placas. Para los antifúngicos insolubles en agua (Cuadro 13) se utilizó DMSO, partiendo de la solución madre, con la que se hizo una dilución 1:100 mL en RPMI para el llenado de las placas. Los rangos de las concentraciones fueron para FLZ de 0.125 a 64  $\mu$ g/mL; PSZ, AMB y CSF de 0.03 a 16  $\mu$ g/mL, para cada uno.

## **Preparación de las microplacas con los antifúngicos**

Las microplacas utilizadas fueron de poliestireno, de 96 pozos de fondo redondo, estériles. El llenado de las microplacas se realizó de la columna 1 (mayor concentración) a la columna 10 (menor concentración), colocando 100  $\mu$ L de las distintas concentraciones decrecientes, de cada uno de los antifúngicos. Los

pozos de la columna 11 correspondieron al control de crecimiento (CC) y la columna 12 al control de esterilidad (CE). Las microplacas se etiquetaron y se almacenaron a -20°C.

### **Preparación del inóculo**

El inóculo de cada aislado levaduriforme fue preparado a partir del crecimiento de 24 h en ADS. Se hizo una suspensión de levaduras en 1 mL de solución salina estéril al 0.85%, ajustando a una turbidez de 0.5 en la escala Mc Farland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL), la suspensión se diluyó (1:1000 mL) en RPMI 1640 para obtener una concentración de  $1-5 \times 10^3$  UFC/mL.

### **Inoculación de placas con la suspensión de levaduras**

El llenado de las microplacas se realizó por filas, con 100 µL del inóculo de cada uno de los aislados problemas de la C a la H. En las filas A y B se inocularon las cepas control de calidad del método (*Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* 6258). Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h.

Cuadro 12. Preparación de diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

No. Tubo	Concentración (µg/mL)	Solución madre	Volumen (mL)	Medio (mL)	Concentración intermedia	Concentración final 1:10 (µg/mL)	Log <sub>2</sub>
1	5120	reserva	1 mL	7	640 µg/mL	64	6
2	640	dilución 1	1.0	1.0	320	32	5
3	640	dilución 1	1.0	3.0	160	16	4
4	160	dilución 3	1.0	1.0	80	8	3
5	160	dilución 3	0.5	1.5	40	4	2
6	160	dilución 3	0.5	3.5	20	2	1
7	20	dilución 6	1.0	1.0	10	1	0
8	20	dilución 6	0.5	1.5	5	0.5	-1
9	20	dilución 6	0.5	3.5	2.5	0.25	-2
10	2.5	dilución 9	1.0	1.0	1.25	0.125	-3
11	2.5	dilución 9	0.5	1.5	0.625	0.0625	-4
12	2.5	dilución 9	0.5	3.5	0.3125	0.03125	-5

Cuadro 13. Preparación de las diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.

No. Tubo	Concentración (µg/mL)	Solución madre	Volumen (mL)	Solvente (mL) DMSO	Concentración intermedia	Concentración final 1:10 (µg/mL)	Log <sub>2</sub>
1	1600	reserva	1 mL		640 µg/mL	16	4
2	1600	reserva	0.5	0.5	800	8.0	3
3	1600	reserva	0.5	1.5	400	4.0	2
4	1600	reserva	0.5	3.5	200	2.0	1
5	200	dilución 4	0.5	0.5	100	1.0	0
6	200	dilución 4	0.5	1.5	50	0.5	-1
7	200	dilución 4	0.5	3.5	25	0.25	-2
8	25	dilución 7	0.5	0.5	12.5	0.125	-3
9	25	dilución 7	0.5	1.5	6.25	0.0625	-4
10	25	dilución 7	0.5	3.5	3.13	0.0313	-5

## Lectura de microplacas y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

La CMI es la menor concentración del antifúngico en la que se observa la inhibición del 80% del crecimiento de cada uno de los aislados frente a FLZ y PSZ y del 100% para AMB y CSF. La lectura de la CMI se realizó a las 24 h y las 48 h, de manera visual con un espejo invertido, evaluando el crecimiento con respecto a los controles de crecimiento (columna 11) y esterilidad (columna 12). La CMI se determinó de acuerdo a los puntos de corte establecidos por CLSI<sup>15,70</sup> (Cuadro 14).

Cuadro 14. Interpretación de los puntos de corte de acuerdo a la CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los documentos M27-A3<sup>14</sup> y M27-S4<sup>15</sup>, para los antifúngicos utilizados sobre algunas especies de *Candida*.

Especies de <i>Candida</i>	Antifúngicos	M27-A3			M27-S4		
		S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C. albicans</i>	FLZ	$\leq 8.0$	16-32	$\geq 64$	$\leq 2.0$	4.0	$\geq 8.0$
	VOR	$\leq 0.1$	2.0	$\geq 4$	$\leq 0.12$	0.25-0.5	$\geq 1.0$
	CSF	$\leq 2.0$	---	---	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1.0$
<i>C. glabrata</i>	FLZ	$\leq 8.0$	16-32	$\geq 64$	---	$\leq 32$	$\geq 64$
	VOR	$\leq 1.0$	2.0	$\geq 4$	---	---	---
	CSF	$\leq 2.0$	---	---	$\leq 0.12$	0.25	$\geq 0.5$
<i>C. krusei</i>	FLZ	$\leq 8.0$	16-32	$\geq 64$	---	---	---
	VOR	$\leq 1.0$	2	$\geq 4.0$	$\leq 0.5$	1.0	$\geq 2.0$
	CSF	$\leq 2.0$	---	---	$\leq 0.25$	0.5	$\geq 1.0$
<i>C. parapsilosis</i>	FLZ	$\leq 8.0$	16-32	$\geq 64$	$\leq 2.0$	4.0	$\geq 8.0$
	VOR	$\leq 1.0$	2.0	$\geq 4.0$	$\leq 0.12$	0.25-0.5	$\geq 1.0$
	CSF	$\leq 2.0$	---	---	$\leq 2.0$	4.0	$\geq 8.0$
<i>C. tropicalis</i>	FLZ	$\leq 8.0$	16-32	$\geq 64$	$\leq 2.0$	4.0	8.0
	VOR	$\leq 1.0$	2.0	$\geq 4.0$	$\leq 0.12$	0.25-0.5	1.0
	CSF	$\leq 2.0$	---	$> 2.0$	$\leq 0.25$	0.5	1.0
<i>C. guilliermondi</i>	CSF	$\leq 2.0$	---	$> 2.0$	$\leq 2.0$	4.0	$\geq 8.0$

FLZ: fluconazol; VOR: voriconazol; CSF: caspufungina; (---) puntos de corte no establecidos

### Combinación de antifúngicos

Todos los aislados que presentaron valores de CMI de resistencia frente a los cuatro antifúngicos fueron seleccionados para incluirlos en la prueba de combinación de antifúngicos. Las cinco combinaciones diseñadas en base a su mecanismo de acción fueron: FLZ+AMB (18 aislados), FLZ+CSF (18 aislados), PSZ+AMB (22 aislados), PSZ+CSF (27 aislados). La combinación AMB+CSF en 10 aislados de *Trichosporon*. La interacción de cada combinación fue valorada por microdilución en caldo, siguiendo la técnica de “tablero de ajedrez”<sup>14</sup>.

### Preparación de placas combinadas

Para la preparación de las microplacas se utilizaron las diluciones decrecientes de los fármacos A (2 a 0.03 µg/mL) y B (16 a 0.03 µg/mL). La distribución de 50 µL del fármaco A, de las filas A-G y 50 µL de las diluciones del fármaco B, de la columna 2 a la 11. Los pozos de la columna 12 (A12-G12) correspondieron al control de crecimiento, por lo que no contienen antifúngico. Los pozos control de esterilidad fueron la columna 1, fila H y columna 12, fila H. Antifúngico A solo, 100 µL en los pozos de la columna 1. Antifúngico B sólo, 100 µL en los pozos de la fila H (figura 15)<sup>14</sup>. Las placas se almacenaron a -20°C.

µg/mL		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A n t i f ú n g i c o A	2												CC	A	
	1												CC	B	
	0.5												CC	C	
	0.25												CC	D	
	0.125												CC	E	
	0.06												CC	F	
	0.03												CC	G	
	CE												CE	H	
		0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	µg/mL			
Antifúngico B															

Figura 15. Distribución en “tablero de ajedrez” de la combinación de dos antifúngicos en una microplaca de 96 pozos. El antifúngico A en las filas A-G; antifúngico B en las columnas 2 a 11. CE: control de esterilidad, pozos H1 y H12. CC: control de crecimiento.

### **Preparación del inóculo**

El inóculo de cada aislado fue preparado a partir de un cultivo en ADS de 24 h de crecimiento. Se hizo una suspensión de levaduras en 1 mL de solución salina al 0.85%, ajustando a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión y se diluyeron en 10 mL de caldo RPMI 1640 para obtener una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC/mL.

### **Inoculación de placas con la suspensión de levaduras**

La inoculación de la microplaca se realizó con 100  $\mu$ L de la suspensión de levaduras, de la columna 2 a la 11. En los pozos de la columna 1, filas A-G y de la columna 2 a 11, fila H se depositaron 100  $\mu$ L de la suspensión del inóculo de cada uno de los aislados problema. Las placas se incubaron a 35°C durante 48 h.

### **Lectura de placas y cálculo del índice de la concentración inhibitoria fraccionada (FICI)**

La lectura de la CMI de la microplaca se realizó a las 24 y 48 h, de manera visual con ayuda de un espejo invertido y por densidad óptica con un espectrofotómetro (Dinex), a 492 nm. Valorando el 80% de inhibición del crecimiento, en las combinaciones de FLZ+AMB, FLZ+CSF, PSZ+CSF, PSZ+AMB y del 100% en AMB+CSF. Ausencia de crecimiento en los pozos CE y crecimiento en los pozos CC. La interacción de la combinación fue analizada por la FICI (siglas en inglés), la cual se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática  $FICI = \frac{CMI \text{ de A combinado}}{CMI \text{ de A solo}} + \frac{CMI \text{ de B combinado}}{CMI \text{ de B solo}}$ . Los valores fueron interpretados como sinérgico ( $FICI \leq 0.5$ ), indiferencia ( $FICI \geq 1$ ) y antagónico ( $FICI > 4$ )<sup>35</sup>.

### **Actividad fungicida de las combinaciones de antifúngicos**

Los aislados que mostraron resistencia antifúngica fueron incluidos en el ensayo de la actividad fungicida de la combinación de los fármacos. Diez microlitros fueron tomados de los pozos de la CMI, dos veces y cuatro veces la CMI. La alícuota fue sembrada en la superficie de las placas de ADS por estría cerrada en tres direcciones, con la finalidad de obtener colonias aisladas. Las placas se

incubaron a 35°C por 48 h. El efecto fungicida fue definido como la disminución en las unidades formadoras de colonias, el punto de corte considerado fue  $\geq 99.9\%$  al comparar con el inóculo inicial.

### **Análisis estadístico**

Para el número de especies identificadas y los valores de CMI del perfil de sensibilidad, se calcularon frecuencia, media, mediana y porcentaje. Para evaluar las diferencias entre la actividad promedio de los antifúngicos se realizó por la prueba de ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc de dos vías mediante el programa estadístico GraphPad Prism. El valor de significancia de 95% fue  $p < 0.05$ .

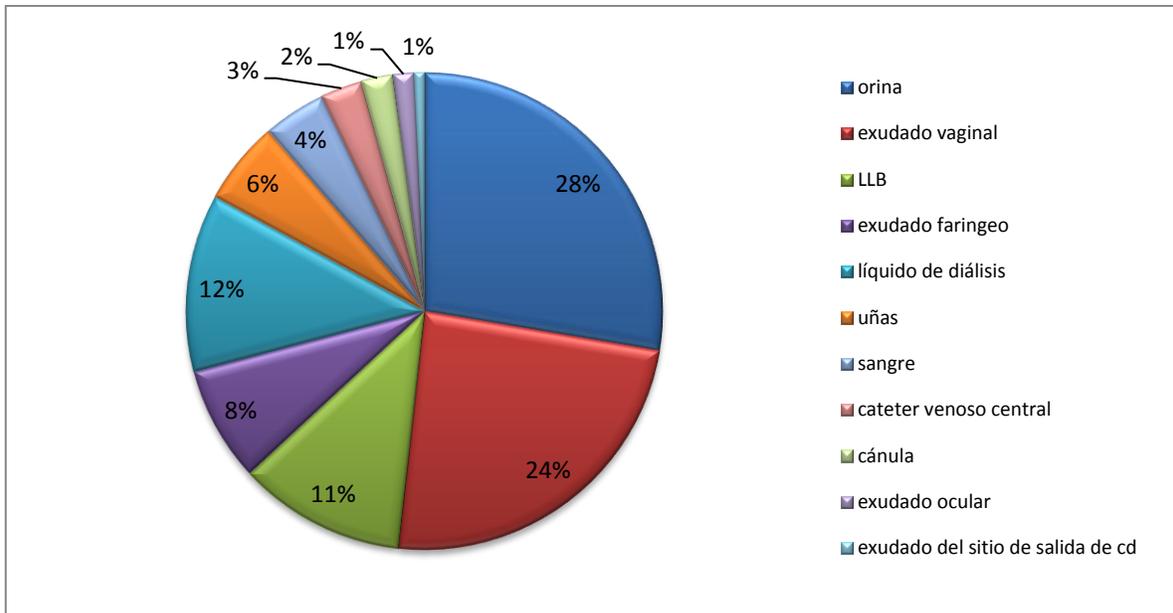
## VI. Resultados

De 118 pacientes incluidos en este estudio, 38 correspondieron a hombres (32%) y 80 a mujeres (68%); la edad osciló entre 16 y 90 años, con un promedio de 57.5 años. Las diferentes formas clínicas observadas fueron vulvovaginitis (30 casos), IVU (26 casos) y septicemia (23 casos). Los principales factores asociados fueron tratamiento con antimicrobianos, seguido de aplicación de catéteres y las dos comorbilidades más comunes fueron diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (30 casos) e insuficiencia renal crónica (IRC) (15 casos) (cuadro 15). Treinta y ocho de los pacientes presentaron más de dos factores de riesgo. De los pacientes fueron procesados 140 especímenes, principalmente de orina (28%), exudado vaginal (24%) y líquido de lavado bronquial (LLB) (11%) (figura 16).

Cuadro 15. Formas clínicas y factores de riesgo asociados en 118 pacientes con infecciones por *Candida* spp.

Formas clínicas	Número de pacientes	Enfermedades y factores asociados	Número de pacientes
Vulvovaginitis	30	DM2	30
IVU	26	IRC	15
Septicemia	23	DPCA	10
Neumonía	17	EVC	5
IVR	10	Tratamiento con antimicrobianos	81
Peritonitis	6	Catéteres	33
Otras	6	DPCA	10

DM2: diabetes mellitus 2; IVU: infección de vías urinarias; IRC: insuficiencia renal crónica; DPCA: diálisis peritoneal continua ambulatoria; IVR: infección de vías respiratorias; EVC: enfermedad vascular cerebral; otras: onicomicosis y queratitis.



cd: catéter de diálisis; LLB: líquido de lavado bronquial

Figura 16. Porcentaje de muestras clínicas procesadas de 118 pacientes.

El porcentaje de especies identificadas es mostrado en la figura 17; la más frecuente correspondió a *C. albicans* (74 aislados, 53%); seguida por *C. tropicalis* (31 aislados, 22%). Las especies de *Trichosporon* (11 aislados, 8%) fueron *T. asahii* (8) *T. dermatis* (1); *T. mucoides* (1) y *T. jirovecii* (1) (figura 18). Los otros aislados levaduriformes identificados fueron *Saccharomyces cerevisiae* (1), *C. lusitaniae* (2), *C. sphaerica* (1), *Cryptococcus laurentii* (1), *Stephanoascus ciferrii* (1) y *Rodothorula rubra* (2). Siete (5%) asociaciones de dos especies de *Candida* fueron detectadas, tres de ellas correspondieron a *C. albicans* y *C. glabrata* (cuadro 16) (figura 19).

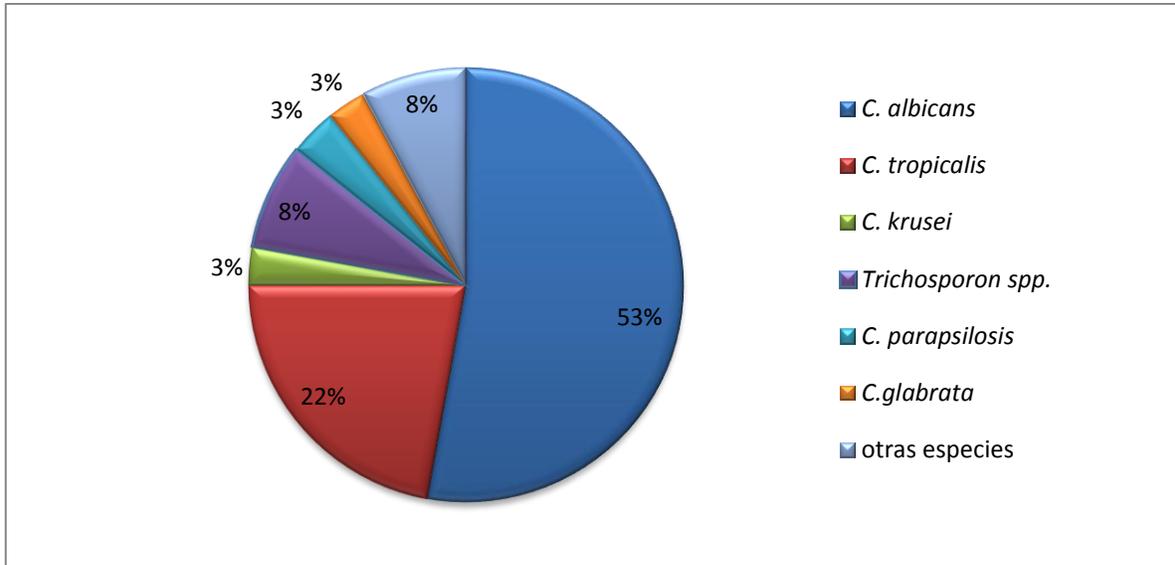


Figura 17. Porcentaje de especies identificadas del género *Candida* y *Trichosporon* aisladas de 12 especímenes.

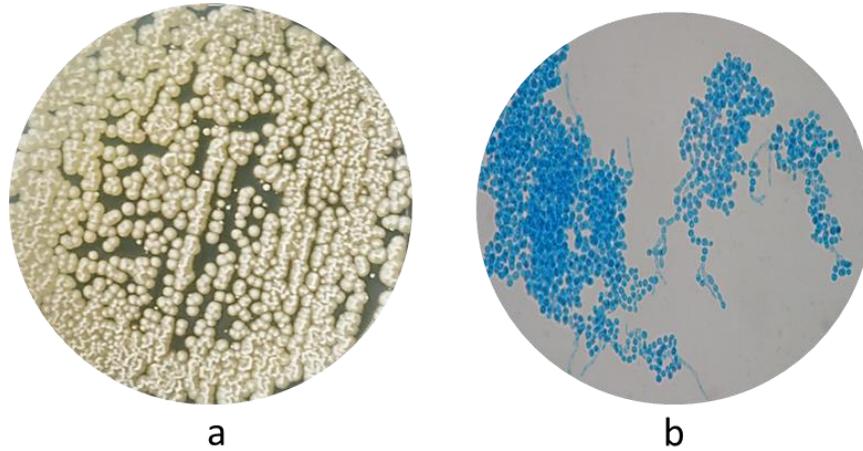


Figura 18. Aspecto macro y microscópico de *T. asahii*, a) Colonias plegadas, secas crecidas en ADS (aislado 92 AC). b) Arthroconidios de forma rectangular, con un tamaño de 3-4  $\mu\text{m}$ .

Cuadro 16. Asociación de especies detectadas en los aislados levaduriformes.

Clave del aislado	Muestra clínica	Especie
5AC	Orina	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>
17AC	Exudado faríngeo	<i>C. tropicalis</i> + <i>C. krusei</i>
22AC	Orina	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>
27AC	Líquido de hemodiálisis	<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>
47AC	Exudado faríngeo	<i>C. krusei</i> + <i>C. parapsilosis</i>
135AC	Exudado vaginal	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>
150AC	Exudado ocular	<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>

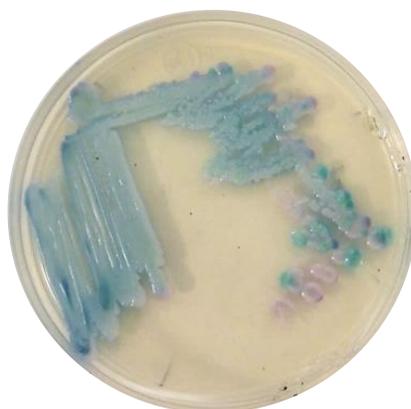


Figura 19. Aislado 22AC crecido en CHROMagar Candida®, que correspondió a la asociación *C. albicans* y *C. glabrata*.

### Pruebas de sensibilidad a antifúngicos

De los 140 aislados levaduriformes, en 88 se les determinó la CMI a FLZ, PSZ, AMB y CSF. El rango de CMI para los cuatro antifúngicos fue el siguiente: FLZ de 0.125 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ; PSZ de 0.03 a 16  $\mu\text{g/mL}$ ; AMB de 0.06 a 16  $\mu\text{g/mL}$  y para CSF de 0.125 a 8  $\mu\text{g/mL}$ . En la figura 20 se presenta la actividad promedio de los tres antifúngicos frente a los 88 aislados levaduriformes. Los dos antifúngicos que mostraron la mejor actividad fueron AMB (0.58  $\mu\text{g/mL}$ ) y CSF (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ), sin diferencia significativa entre ellos. Al comparar la actividad entre PSZ con AMB y

CSF, se observa la mejor actividad de AMB y CSF con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). La actividad promedio de FLZ fue de  $9.02 \mu\text{g/mL}$ ; aunque es un valor mayor que el obtenido con los otros tres antifúngicos; no se realizó la prueba estadística comparativa debido a la diferencia en la escala de concentraciones.

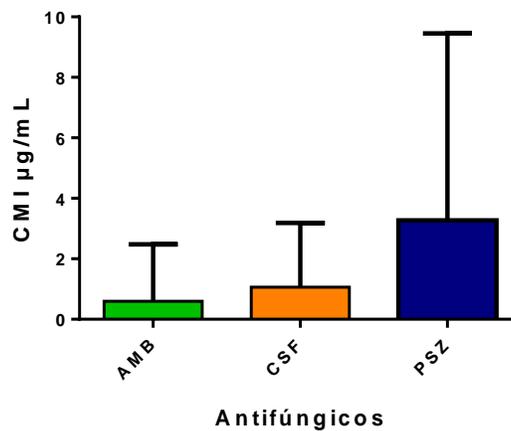


Figura 20. Actividad promedio de AMB, CSF y PSZ frente a los 88 aislados levaduriformes.

En el cuadro 17 se muestra el número de aislados resistentes frente a los cuatro antifúngicos probados. En base a la CMI se observó resistencia en 24 (27.27%) de los 88 aislados frente a los distintos fármacos utilizados. La resistencia a más de un fármaco se presentó en 17 (19.31%) aislados, principalmente de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *T. asahii*. En la figura 21 se presenta el porcentaje de resistencia mostrado por los aislados levaduriformes frente a los cuatro antifúngicos; los dos antifúngicos, principalmente a CSF y PSZ (13 aislados).

Cuadro 17. Patrón de sensibilidad/resistencia antifúngica en los 88 aislados levaduriformes a cuatro antifúngicos.

Especie	Número	AMB		CSF		FLZ		PSZ		Resistencia a más de un fármaco
		S	R	S	R	S	R	S	R	
<i>C. albicans</i>	45	45	0	44	1	40	5	40	5	5/5
<i>C. tropicalis</i>	19	19	0	17	2	14	5	14	5	5/8
<i>C. parapsilosis</i>	4	4	0	4	0	4	0	4	0	0
<i>C. glabrata</i>	2	2	0	2	0	2	0	2	0	0
<i>C. krusei</i>	3	3	0	3	0	3	0	2	1	1/1
<i>C. inconspicua</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>C. laurentii</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>C. kefyr</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>T. asahii</i>	7	4	3	0	7	7	0	7	0	3/7
<i>T. dermatis</i>	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1/1
<i>T. mucoides</i>	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1/1
<i>T. jirovecii</i>	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1/1
<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>83</b>	<b>5</b>	<b>75</b>	<b>13</b>	<b>78</b>	<b>10</b>	<b>75</b>	<b>13</b>	<b>17/24</b>

S: sensibles; R: resistentes

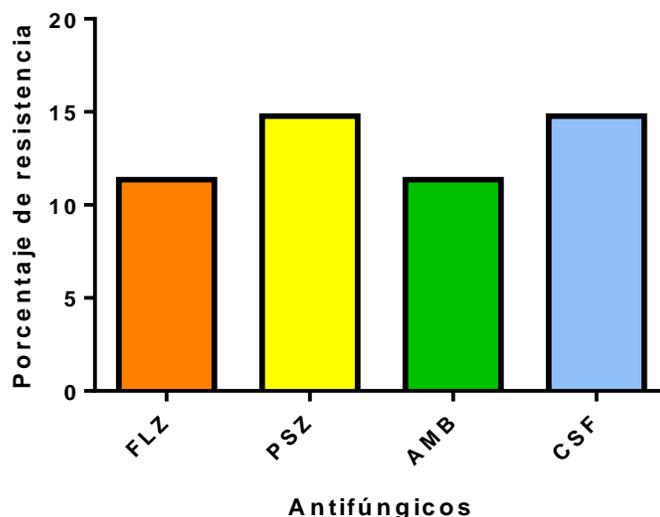


Figura 21. Porcentaje de resistencia observada en los 88 aislados frente a FLZ, PSZ, AMB y CSF.

### Combinación de antifúngicos

El efecto sinérgico en la actividad combinada de los cuatro antifúngicos contra los 24 aislados resistentes fue de 26.2%. Este efecto se observó en las combinaciones de CSF+FLZ, con valores de FICI de 0.1 a 0.3  $\mu\text{g/mL}$ ; CSF+PSZ de 0.3  $\mu\text{g/mL}$ ; AMB+PSZ de 0.1  $\mu\text{g/mL}$  y AMB+FLZ 0.1 a 0.3  $\mu\text{g/mL}$ . Este efecto sinérgico solo se observó en aislados de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (cuadros 18 y 19).

La combinación AMB+CSF sobre los aislados de *T. asahii*, *T. mucoides* y *T. jirovecii* mostró valores de sinergia con FICI de 0.2 a 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (cuadro 20); el porcentaje más alto (6.3%) de sinergia fue observado en la combinación CSF+PSZ y AMB+FLZ; mientras que con AMB+CSF y CSF+FLZ fue el más bajo (2.1%) (cuadro 21).

Cuadro 18. Efecto sinérgico de diferentes concentraciones de cuatro combinaciones de antifúngicos sobre aislados de *C. albicans*.

Clave del aislado	Especie	Combinación (A+B)	CMI de Ac	CMI de Bc	FICI	Interpretación
1AC	<i>C. albicans</i>	CSF+FLZ	0.06	8	0.3	S
19AC	<i>C. albicans</i>	CSF+FLZ	0.06	16	0.3	S
1AC	<i>C. albicans</i>	CSF+PSZ	0.03	4	0.3	S
			0.06	2	0.3	S
63AC	<i>C. albicans</i>	CSF+PSZ	0.06	2	0.3	S
44AC	<i>C. albicans</i>	CSF+PSZ	0.03	4	0.3	S
			0.06	1	0.3	S
44AC	<i>C. albicans</i>	AMB+PSZ	0.03	1	0.1	S
			0.06	1	0.3	S
76AC	<i>C. albicans</i>	AMB+PSZ	0.06	2	0.2	S
			0.125	1	0.3	S
19AC	<i>C. albicans</i>	AMB+FLZ	0.06	1	0.2	S
58AC	<i>C. albicans</i>	AMB+FLZ	0.06	16	0.3	S
			0.125	8	0.3	S
63AC	<i>C. albicans</i>	AMB+FLZ	0.06	8	0.2	S
			0.125	8	0.3	S

Ac: antifúngico A combinado; Bc: antifúngico B combinado

Cuadro 19. Efecto sinérgico a diferentes concentraciones de tres combinaciones de antifúngicos sobre aislados de *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Clave del aislado	Especie	Combinación (A+B)	CMI de Ac	CMI de Bc	FICI	Interpretación
81AC	<i>C. tropicalis</i>	CSF+PSZ	0.06	0.5	0.1	S
			0.125	0.5	0.2	S
86AC	<i>C. tropicalis</i>	CSF+PSZ	0.06	1	0.3	S
8AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+PSZ	0.5	1	0.3	S
17AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+PSZ	0.125	4	0.3	S
			0.25	4	0.3	S
			0.5	2	0.3	S
59AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+PSZ	0.125	2	0.3	S
34AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+PSZ	0.125	0.5	0.1	S
			0.25	0.5	0.2	S
86AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+PSZ	0.06	0.5	0.1	S
			0.125	1	0.3	S
3AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+FLZ	0.125	0.5	0.2	S
7AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+FLZ	0.125	0.5	0.1	S
			0.25	0.5	0.2	S
81AC	<i>C. tropicalis</i>	AMB+FLZ	0.06	8	0.1	S
			0.125	8	0.2	S
			0.25	8	0.3	S
30AC	<i>C. krusei</i>	CSF+PSZ	0.06	4	0.3	S
			0.125	1	0.3	S

Ac: antifúngico A combinado; Bc: antifúngico B combinado

Cuadro 20. Efecto sinérgico a diferentes concentraciones de dos combinaciones de antifúngicos sobre aislados de *Trichosporon* spp.

Clave del aislado	Especie	Combinación (A+B)	CMI de Ac	CMI de Bc	FICI	Interpretación
V35	<i>T. asahii</i>	AMB+CSF	0.03	8	0.5	S
			0.06	8	0.5	S
			0.125	8	0.5	S
92AC	<i>T. asahii</i>	AMB+CSF	0.03	2	0.2	S
			0.06	2	0.2	S
			0.125	4	0.5	S
			0.5	2	0.5	S
110AC	<i>T. asahii</i>	AMB+PSZ	0.06	0.25	0.5	S
			0.125	0.25	0.5	S
			0.25	0.125	0.3	S
			0.5	0.125	0.5	S
		AMB+CSF	0.03	8	0.5	S
			0.06	8	0.5	S
			0.125	8	0.5	S
140AC	<i>T. mucoides</i>	AMB+PSZ	0.03	1	0.5	S
			0.06	0.125	0.1	S
			0.125	0.25	0.2	S
			0.25	0.25	0.3	S
			0.5	0.125	0.5	S
34MO	<i>T. jirovecii</i>	AMB+CSF	0.125	4	0.3	S
			0.25	2	0.2	S
			0.5	1	0.3	S
			1	1	0.5	S

Ac: antifúngico A combinado; Bc: antifúngico B combinado

Cuadro 21. Porcentaje promedio del efecto sinérgico, indiferente o antagónico en las diversos aislados de *Candida* spp. y *Trichosporon* spp.

<b>Combinación</b>	<b>Aislado</b>	<b>Sinérgico (%)</b>	<b>Indiferente (%)</b>	<b>Antagónico (%)</b>
CSF+FLZ	<i>Candida</i> spp.	2.1	40.8	57.1
CSF+PSZ	<i>Candida</i> spp.	6.3	35.5	58.2
AMB+FLZ	<i>Candida</i> spp.	6.3	39.7	54.0
AMB+PSC	<i>Candida</i> spp.	9.5	53.5	37.0
AMB+CSF	<i>Trichosporon</i> spp.	2.1	70.9	27.0

En la figura 22 se presentan algunas placas del estudio de microdilución de sensibilidad y resistencia para los cuatro antifúngicos probados en 6 aislados problema. La fila H corresponde a uno de los aislados de *C. tropicalis* (7AC), donde se aprecia el valor de resistencia frente a FLZ y PSZ.

El efecto de la combinación CSF+FLZ sobre el mismo aislado se observa en la figura 23, en donde el valor de FICI fue de 1 (valor indiferente); la disminución en la concentración fue 4 veces únicamente frente a FLZ. Por otro lado, la combinación de AMB+CSF frente a un aislado de *T. asahii* (92AC) se observa inhibición en el crecimiento a distintas concentraciones con efecto sinérgico (figura24).

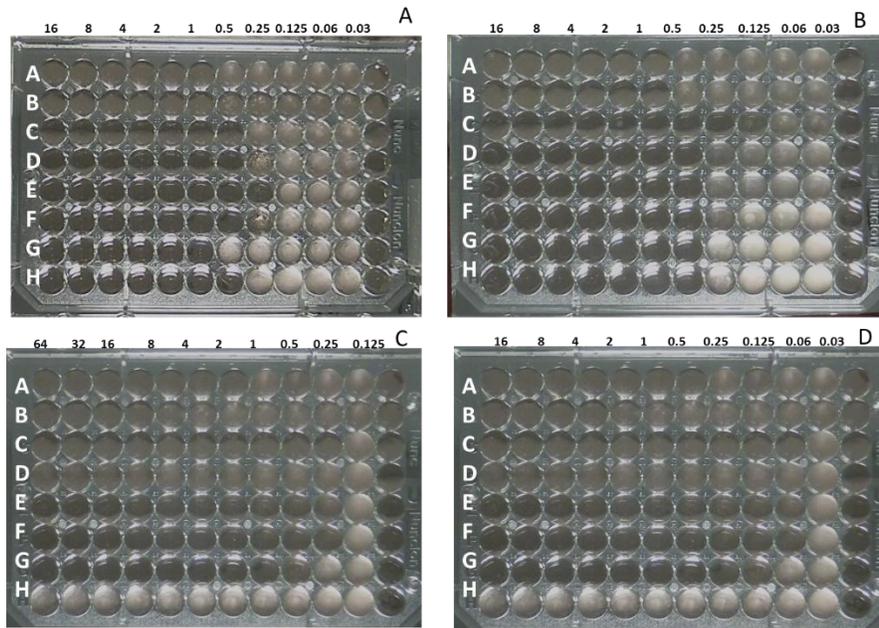
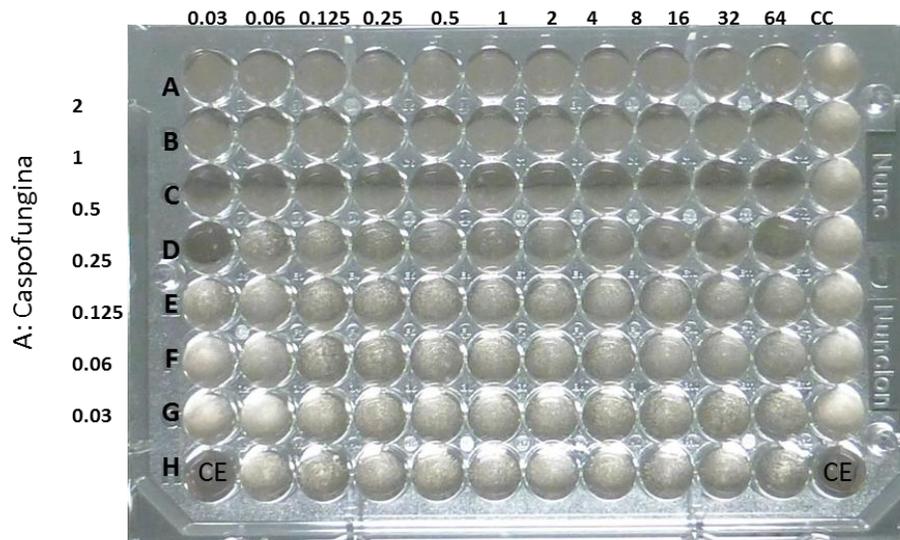


Figura 22. Placas de microdilución con diferentes antifúngicos y valor de CMI sobre *C. tropicalis* (7AC); en la fila H A) CSF: 0.25 µg/mL; B) AMB 0.25 µg/mL; C) FLZ ≥64 µg/mL y D) PSZ ≥16 µg/mL.



B: Fluconazol

Figura 23. Combinación de CSF+FLZ en *C. tropicalis* (7AC). Los valores de la CMI fueron Ac: 0.25 µg/mL y Bc: 1µg/mL. FICI de 1, de valor indiferente.

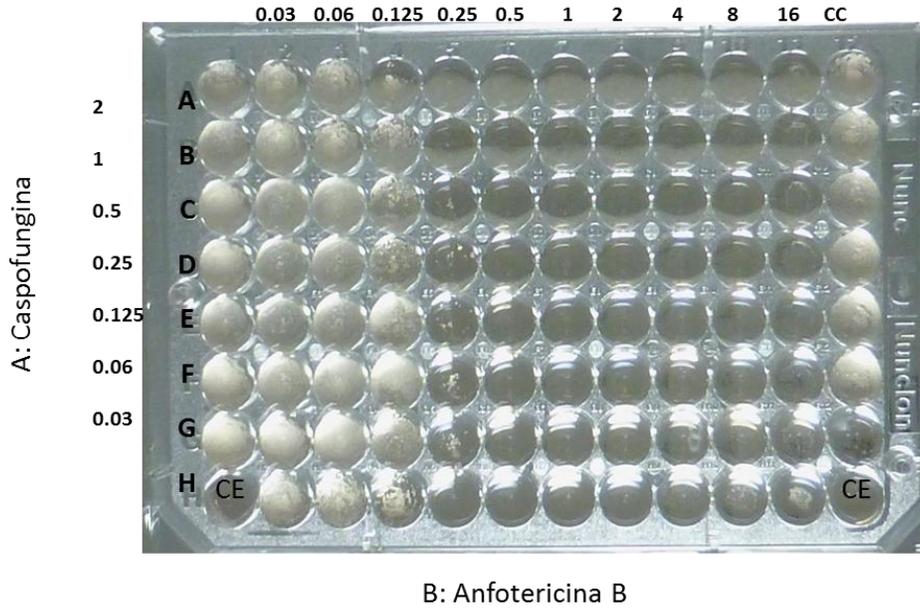


Figura 24. Combinación de AMB+CSF frente a *T. asahii* (92AC). Los valores de las concentraciones fueron, Ac: 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Bc: 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con valor de FICI de 0.5.

En la figura 25 se ejemplifica la actividad fungicida en la combinación CSF+AMB, en la cual se demostró la disminución de las UFC hasta en un 100%, sobre todo cuando la combinación presentó un efecto sinérgico.

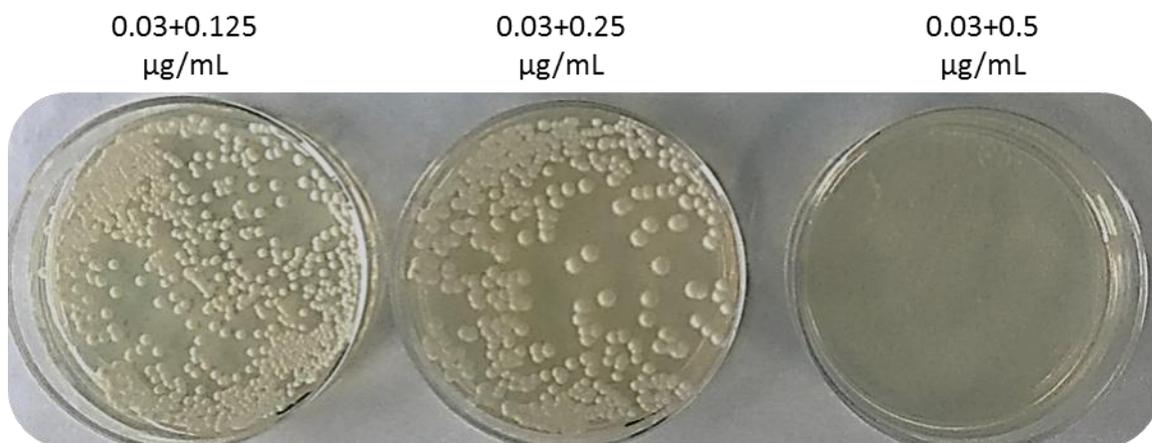


Figura 25. Actividad de la combinación CSF y AMB. Disminución de las UFC relacionada con la CMI y células sobrevivientes.

## VII. Discusión

En la última década *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* han aumentado en número y proporción causando infecciones superficiales e invasivas, principalmente en pacientes hospitalizados; diversos autores han relacionado este incremento con la asociación de múltiples factores de riesgo que comprometen el sistema inmune de los pacientes, como enfermedades hematológicas, aplicación de catéteres, DM2, uso prolongado de antimicrobianos<sup>17,67</sup>. Los pacientes que fueron incluidos en este trabajo presentaron múltiples factores similares a la descripción anterior, principalmente la administración prolongada de antimicrobianos, con excepción de ausencia de enfermedades hematológicas.

Cornistein y cols<sup>17</sup> reportaron mayor porcentaje de infecciones causadas por las especies de *Candida* y *Trichosporon*, en el género masculino (58.2%), a diferencia de las observaciones del presente estudio que fue del 32%; esta diferencia podría deberse a la población de nuestro estudio, de predominio en mujeres (68%) y a los especímenes procesados.

La muestra biológica de la que se obtuvo el mayor número de aislados levaduriformes fue orina (28%); este hallazgo cada vez es más común en pacientes con DM2 y complicaciones relacionadas como infección de vías urinarias altas y bajas<sup>45</sup>. En un estudio realizado por Tinoco y cols<sup>93</sup> describieron que la infección de vías urinarias es la principal causa de infección hospitalaria en la población adulta con múltiples factores de riesgo. En el presente trabajo los aislados levaduriformes fueron obtenidos de exudado vaginal, el cual ocupó el segundo lugar en frecuencia (24%), lo cual podría estar relacionado directamente con el número de mujeres incluidas en el estudio. Estos datos coinciden con lo descrito en la literatura, donde el 10 al 90% de las infecciones de la mucosa vaginal son ocasionadas por levaduras del género *Candida*<sup>24,69,79,101</sup>; además del 45 a 75 % de las mujeres experimentan candidosis vaginal sintomática<sup>76</sup>.

Otro de los hallazgos de interés fueron los aislados a partir de las muestras de LLB (11%), aun cuando algunos autores mencionan que se puede aislar *Candida*

spp. en muestras de origen pulmonar de pacientes sin afectación, el hecho de encontrar cultivos positivos, pueden estar indicando la colonización y una potencial infección invasiva al tejido pulmonar; mientras que en otros estudios se reportó la infección pulmonar como la principal topografía de infecciones invasivas por *Candida*<sup>52</sup>. El aislamiento de levaduras de puntas de catéter venoso central y sangre fue menor (3 y 4%, respectivamente), a pesar de ello es importante tomar en cuenta el aislamiento de estos agentes a partir de estas muestras, ya que son hallazgos de posible desarrollo de una septicemia por levaduras, causadas por las especies de *Candida* no *C. albicans*<sup>17</sup>. Falagas y cols.<sup>24</sup> reportaron que la frecuencia de especies diferentes a *C. albicans* tienen una variación geográfica significativa en todo el mundo. Incluso la frecuencia de especies es distinta entre los diferentes grupos de poblaciones estudiadas. Estos autores reportaron a *C. albicans* como la primera especie causante de infecciones en el norte y centro de Europa y Estados Unidos; mientras que las especies *Candida* no *C. albicans* predominan en Asia, Europa y América del Sur. En el presente trabajo las dos especies identificadas con mayor fueron *C. albicans* (53%) y *C. tropicalis* (22%); a diferencia del trabajo de Gonzáles y cols.<sup>28</sup> quienes aislaron a *C. parapsilosis* (56.5%) de pacientes pediátricos. En otros estudios en pacientes con DM2 demostraron que las infecciones de vías urinarias fueron causadas por *C. glabrata*<sup>45,79</sup>. La diferencia en las especies se explica por el grupo de edad de la población del presente estudio y de las formas clínicas como IVU y vulvovaginitis. Otra especie aislada con menor frecuencia fue *C. krusei*, clínicamente esta especie es de particular importancia debido a su resistencia a fluconazol y menor sensibilidad a la anfotericina B.

Un hallazgo clínico de interés fue la identificación de dos casos de vulvovaginitis por *Saccharomyces cerevisiae*, levadura que puede producir lesiones severas, como sangrado de las mucosas, dolor y ocasionalmente fungemias<sup>76</sup>. En el presente trabajo se identificaron siete casos (5%), de asociación de especies, tres de ellas de *C. albicans* con *C. glabrata*; frecuencia similar (4.4%) a la encontrada por Romero-Luevano y cols.<sup>79</sup>. Otros autores han descrito un porcentaje mayor de asociación (21.8 %) <sup>47</sup>. Este es un punto importante a tomar en cuenta, ya que las

especies de *Candida* tienen diferente perfil de sensibilidad y/o resistencia a los antifúngicos de uso común en la práctica clínica y el hecho de que se encuentre más de una especie en el hospedero podría tener implicaciones en el resultado de la terapia antifúngica.

Las especies del género *Trichosporon* son causa de infección humana con menor frecuencia. La principal especie identificada en este estudio fue *T. asahii*, lo cual corresponde a lo descrito en la literatura<sup>1,16,26</sup>. Una característica importante de esta especie es la resistencia intrínseca que presenta frente a anfotericina B, debido a ésto las infecciones invasivas causadas por esta especie son difíciles de tratar y generalmente la tasa de mortalidad es elevada por la falla al tratamiento.

Los estudios de sensibilidad *in vitro*, tienen relevancia clínica y son importantes para proponer una terapia inicial o alternativa. La resistencia a los antifúngicos es un problema emergente y se ha incrementado el número de casos por micosis con fracaso en el tratamiento antifúngico. Actualmente hay antifúngicos con amplio espectro de actividad, pero tienen un uso limitado, debido a los efectos tóxicos. Los antifúngicos de primera elección para las infecciones invasivas son FLZ, PSZ, AMB y CSF. Pfaller y cols.<sup>70</sup> reportaron un rango de actividad para FLZ de 0.25 a 64 µg/mL, un porcentaje de resistencia de 2.3% y de 5.6% para *C. albicans* y de 14.4% contra cada una de las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. A diferencia de los datos que obtuvimos en este estudio, los aislados de *C. glabrata* no se ubicaron en el rango de resistencia; sin embargo fueron sensibles dosis dependiente a FLZ, dato descrito por otros autores<sup>46</sup>. Pfaller y cols.<sup>68</sup> reportaron resistencia a PSZ contra aislados de *C. albicans* (4.4%) y *Candida krusei* (15.2%); en el presente trabajo se detectaron valores de resistencia en estas dos especies, además de *C. tropicalis* que mostró valores altos de CMI  $\geq 16$  µg/mL. El antifúngico que mostró la mejor actividad frente a las especies de *Candida* fue AMB (87.5%) con rangos que oscilaron de 0.06 a 0.5 µg/mL. Así mismo Gonzáles y cols.<sup>28</sup> reportaron rangos muy similares y 0% de resistencia. Diversos autores han encontrado variaciones en los rangos de CMI para CSF que va de 0.016 a 0.5 µg/mL frente a *C. albicans* y *C. tropicalis*; en *C. glabrata* de 0.031 a 0.5 µg/ml y en *C. krusei* de 0.063 a 1 µg/ml<sup>23,70</sup>. Los valores más altos de CMI de este

antifúngico se obtuvieron frente a los aislados de *T. asahii*, ésto explicaría la resistencia intrínseca de las especies frente al antifúngico. Estos autores coinciden en la baja proporción de 2 a 3% de resistencia a este fármaco; sin embargo en el presente estudio el porcentaje de resistencia fue de 14.4 % en los aislados de *Trichosporon*.

Ante la evidencia de resistencia mostrada en los aislados levaduriformes, la combinación de antifúngicos se ha llevado a cabo como una estrategia para resolver el problema de la falla terapéutica. En diversos estudios se ha probado la combinación de antifúngicos *in vitro* con diferentes dianas, obteniendo resultados variables<sup>22,83,95</sup>. En el presente estudio el efecto sinérgico obtenido en las combinación de antifúngicos fue de 26.2%; esta actividad se detectó en la combinación CSF+FLZ frente a *C. albicans*, al comparar este resultado con el de otros autores<sup>37</sup> donde detectaron el 66% de efecto sinérgico y el 14% en aislados de *C. glabrata*. Otros autores han reportado un efecto indiferente con la misma combinación<sup>78</sup>. La diferencia observada posiblemente sea por el método utilizado. De tal manera que es necesario realizar mayor número de estudios para evaluar una serie más amplia de concentraciones de los dos fármacos como ha sido descrito por otros autores<sup>78</sup>. En el presente trabajo se detectó un efecto sinérgico del 6.3% con la combinación de CSF+PSZ sobre los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis*, aunque también fue evidente el efecto antagónico (58.2%); en cambio Oliveira y cols.<sup>62</sup> con la misma combinación reportaron un efecto sinérgico en el 4% y ningún efecto antagónico sobre los aislados de *C. glabrata*. Es importante mencionar que esta combinación en la terapia clínica ha resultado efectiva<sup>12</sup>. Estos datos apoyan la hipótesis de que estos dos fármacos con diferentes sitios de acción son capaces de interaccionar sinérgicamente. Por otro lado, estudios anteriores han informado que pacientes con infecciones causadas por *C. albicans* resistentes a fluconazol pueden curarse con la administración de un triazol de segunda generación como posaconazol, lo cual indica una ventaja potencial de este triazol contra aislados resistentes a otros fármacos azólicos. En la mayoría de los estudios, se han descrito hallazgos que apoyan la teoría del efecto antagónico con la combinación azol-polieno sobre *C. albicans*, ya que se ha observado que

los aislamientos son sensibles inicialmente frente a AMB, con posterior desarrollo de resistencia durante la terapia con el polieno<sup>22,83,95</sup>. Para explicar el cambio sobre *C. albicans* al exponerse a FLZ, las cadenas laterales lipofílicas del antifúngico se insertan en la membrana celular, que eventualmente puede bloquear los sitios de unión de la membrana para AMB y podría ser la principal causa de este efecto antagónico. Sin embargo, en condiciones de inhibición, el ergosterol puede ser sintetizado de nuevo por la levadura o alternado con otros esteroides como el colesterol que puede sustituir al ergosterol<sup>80</sup>. A pesar de esto, en el presente trabajo con la combinación AMB+FLZ se detectó un efecto sinérgico en el 6.3%. La concentración a la que se observó este efecto fue de 0.06 µg/mL para AMB y 8 µg/mL para FLZ, estos valores se redujeron en cuatro veces comparado con la CMI de cada antifúngico actuando por separado. La FICI obtenida fue de 0.1 a 0.3 µg/mL frente a las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*. En una situación clínica hipotética de una infección invasiva en un paciente que no responde a la administración de fluconazol, el procedimiento habitual sería la aplicación combinada con anfotericina B. Por otro lado, algunos estudios reportaron la actividad sinérgica *in vivo*, de tal manera que la combinación AMB+FLZ puede considerarse una opción en el tratamiento de las infecciones causadas por *C. tropicalis*. Vishnu Chaturvedi y cols.<sup>9</sup> informaron que diversos laboratorios observaron una actividad sinérgica en el 85.7% en la combinación AMB+PSZ contra aislados de *C. glabrata*. Sin embargo, en el presente trabajo el efecto sinérgico de la combinación AMB+PSZ fue de 9.5% frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *T. asahii* y *T. mucoides*. Finalmente, AMB+CSF fue la combinación que tuvo la mejor actividad frente a los aislados de *T. asahii*, *T. mucoides* y *T. jirovecii*. El efecto sinérgico para ésta última combinación se presentó en cuatro de diez aislados (40%); mientras que Houmin y cols.<sup>40</sup> reportaron mayor porcentaje de sinergia (89%). Una de las posibles explicaciones por lo cual se atribuye este efecto sinérgico es que las equinocandinas podrían mejorar la penetración de anfotericina B en la membrana celular, causando un aumento en la actividad fungicida cuando se combinan los fármacos<sup>10</sup>. Raad y cols.<sup>73</sup> hicieron énfasis que aún cuando los resultados *in vitro* fueron prometedores en el efecto sinérgico y

aditivo, ésto no siempre se traducen a un buen resultado clínico. Por lo tanto, es importante realizar un mayor número de estudios clínicos e *in vitro* para establecer guías terapéuticas con la finalidad de eliminar la especie causante de infección en el humano.

## VIII. Conclusiones

*Candida albicans* fue la principal especie aislada de exudado vaginal y de orina; mientras que *T. asahii* fue aislado de escamas de uñas y de orina.

La asociación de especies detectada en las muestras clínicas procesadas fue del 5%; la principal asociación fue *C. albicans* con *C. glabrata*.

Los antifúngicos que mostraron la mejor actividad frente a los aislados levaduriformes fueron anfotericina B y caspofungina.

La resistencia mostrada por *Candida* spp. y *Trichosporon* spp. fue del 27.27%. Las especies con mayor resistencia fueron *C. albicans*, *C. tropicalis* y *T. asahii*.

El efecto sinérgico observado en las cinco combinaciones realizadas fue del 26.2%

En las especies resistentes de *Candida* la mejor combinación fue AMB con PSZ; mientras que, en *Trichsoporon* spp. el efecto sinérgico se obtuvo con AMB y CSF.

## IX. Abreviaturas

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Agar dextrosa Sabouraud	ADS
Agar harina de maíz	AHM
Agar Urea de Christensen	AU
Anfotericina B	AMB
Caspofungina	CSF
Catéter venoso central	CVC
Concentración mínima inhibitoria	CMI
Diabetes mellitus 2	DM2
Diálisis peritoneal continua ambulatoria	DPCA
Enfermedad vascular cerebral	EVC
Fluconazol	FLZ
Horas	h
Índice de la concentración inhibitoria fraccionada	FICI
Infección de vías respiratorias bajas	IVRB
Infección de vías respiratorias	IVR
Infección de vías urinarias	IVU
Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico	CLSI
Insuficiencia renal crónica	IRC
Líquido de lavado bronquial	LLB
Malformaciones del tubo digestivo	MTD
Microlitro	µL
Mililitro	mL
Milimolar	mM

Nanómetro	nm
Posaconazol	PSZ
Reacción en cadena de la Polimerasa de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	PCR-RFLP
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Roswell Park Memorial Institute	RPMI
Unidades formadoras de colonias	UFC
Voriconazol	VRZ

## **X. Anexos**

Preparación de medios de cultivo

### **RPMI 1640**

Componentes

RPMI 1640	10.40 g
Tampón MOPS	34.5 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver en 500 mL de agua destilada la cantidad pesada de MOPS en agitación constante hasta su completa disolución.

Ajustar pH a 7.0 con hidróxido de sodio (NaOH) 1M.

Disolver RPMI 1640 hasta su completa disolución.

Aforar a 1000 mL.

### **Agar Urea de Christensen (AU)**

Componentes

Solucion A	
Agua destilada	90 mL
Agar	1.5 g

Solucion B	
Base agar urea	2.9 g
Agua destilada	10 mL

Disolver la base de agar urea en 10 mL de agua destilada.

Esterilizar por filtración con unidades filtro de 0.45 µm.

Disolver el agar a 50°C.

Mezclar con la base de urea.

Distribuir en tubos de 2 mL estériles con tapón.

### **Agar dextrosa Sabouraud (ADS)**

#### Componentes

Agar	65 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver 65 g de agar en 1000 mL de agua destilada.

Calentar hasta completa disolución.

Esterilizar a 12°C durante 15 minutos.

Verter en cajas de Petri.

### **Agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol (ADS-A)**

#### Componentes

Agar	65 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver 65 g de agar en 1000 mL de agua destilada.

Calentar hasta llevar a punto de ebullición.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Verter en cajas de Petri.

### **Agar Harina de Maíz adicionado con Tween 80 (AHM)**

#### Componentes

Agar	17 g
Agua destilada	1000 mL
Tween 80	10 mL

Disolver 17 g de agar en 1000 mL de agua destilada.

Calentar hasta punto de ebullición.

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Agregar 15 mL de Tween 80.

Verter en cajas de Petri.

## **CHROMagar Candida®**

### Componentes

Agar	15 g
Peptona	10.2 g
Mezcla cromógena	22 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agua destilada	1000 mL

Pesar 47.7 g en 1000 mL de agua destilada.

Disolver los componentes con movimiento rotatorio.

Llevar a ebullición con agitación constante.

Calentar la mezcla hasta su completa disolución.

Esterilizar por ebullición durante dos min.

Verter en cajas de Petri.

## XI. Referencias

1. Almeida AA, Crispim B do A, Grisolia AB, Svidzinski TI, Ortolani LG, Oliveira KM. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of *Trichosporon asahii* isolated from the urine of hospitalized patients. *Rev Argent Microbiol.* 2016;48:62-66.
2. Bidart TH. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia fúngica. *Rev Chil Infectol.* 2004;21(spl1):S13-S19.
3. Bonifaz JA. *Micología Médica Básica.* 4a ed. México: MCGraw-Hill;2012. pp. 321-347.
4. Brajtburg J, Kobayashi D, Medoff G, Kobayashi GS. Antifungal action of amphotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics. *J Infect Dis.* 1982;146:138-146.
5. Buitrón-García R, Bonifaz A, Amancio-Chassin O, Basurto Kuba E, Araiza J, Romero Cabello R. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. *Ginecol Obstet Mex.* 2007;75:68-72.
6. Carrillo-Muñoz AJ, Finkelievich J, Tur-Tur C, Eraso E, Jauregizar N, Quindós G, Giusiano G. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. *Rev Esp Quimioter.* 2014;27:141-158.
7. Carter RL. *A dictionary of dermatologic terms.* 4ta ed. London: Williams and Wilkins,1992.
8. Chaffin LW. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72:495-544.
9. Chaturvedi V, Ramani R, Ghannoum MA, Killian SB, Holliday N, Knapp C, Ostrosky-Zeichner L, Messer SA, Pfaller MA, Iqbal NJ, Arthington-Skaggs BA, Vazquez JA, Sein T, Rex JH, Walsh TJ. Multilaboratory testing of antifungal combinations against a quality control isolate of *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1500–1502.

10. Chen J, Chen F, Wang Y, Yang LY, Miao M, Han Y, Wu DP. Use of combination therapy to successfully treat breakthrough *Trichosporon asahii* infection in an acute leukemia patient receiving voriconazole. *Med Mycol Case Rep.* 2014;6:55-57.
11. Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs.* 2017;71:11-41.
12. Chen YL, Lehman VN, Averette AF, Perfect JR, Heitman J. Posaconazole exhibits *in vitro* and *in vivo* synergistic antifungal activity with caspofungin or FK506 against *Candida albicans*. *PLoS One.* 2013;8:e57672.
13. Choi MJ, Won EJ, Shin JH, Kim SH, Lee WG, Kim MN, Lee K, Shin MG, Suh SP, Ryang DW, Im YJ. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:3653-3661.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3<sup>rd</sup> ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. (Approved standard. M27-A3).
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. (Document M27-S4).
16. Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:682-700.
17. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:380-384.
18. Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence.* 2015;6:362–371.

19. De Hoogs GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi, 2a ed. Guanabara, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelfcultures;2000. pp. 164-216.
20. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. Candida. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA. Medical Mycology. 1st. Filadelfia; Churchill Livingstone:2003. pp. 195-239.
21. Dynowska M, Biedunkiewicz A, Ejdys E, Sucharzewska E, Roslan M. Fungi of the genus *Trichosporon* isolated from the skin in hospitalized patients. Acta Mycologica. 2013;48:147–153.
22. Ernst EJ, Klepser ME, Pfaller MA. *In vitro* interaction of fluconazole and amphotericin B administered sequentially against *Candida albicans*: effect of concentration and exposure time. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998;32:205-210.
23. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton E, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A, Fuller J, Gaustad P, Gonzalez GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Meis JF, Moore CB, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pukinskas SR, St-Germain G, Szeszs MW, Turnidge J. Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent?. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:5836-5842.
24. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. Int J Infect Dis. 2010;14:e954-e966.
25. Gadanho M, Sampaio JP. Occurrence and diversity of yeasts in the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. Microb Ecol. 2005;50:408–417.
26. Girmenia C, Pagano L, Martino B, D'Antonio D, Fanci R, Specchia G, Melillo L, Buelli M, Pizzarelli G, Venditti M, Martino P, GIMEMA infection program. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum*

- capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1818-1828.
27. Gonçalves SS, Souza AC, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses.* 2016;59:198-219.
  28. González GM, Treviño-Rangel R J, Palma-Nicolás JP, Martínez C, González GJ, Ayala J, Caballero A, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Velarde F, Ascencio EP, Tinoco CJ, Vázquez JA, Cano MA, León-Sicairos N, Gonzáles R, Rincón J, Elías MA, Bonifaz A. Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: A nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2847–2851.
  29. Gründer S, Mayser P, Redmann T, Kaleta EF. Mycological examinations on the fungal flora of the chicken comb. *Mycoses.* 2005; 48:114–119.
  30. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30:33-39.
  31. Guého E, Smith M T, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-van der Vegte W H. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1992;61:289–316.
  32. Hagler AN. Yeast as indicators of environmental quality. In: Carlos AR, Gábor Péter. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.* Alemania: Springer-Verlag:2006. pp. 515-532.
  33. Hernández Galván MS. Infección por especies de *Candida* no *albicans* y su resistencia a diversos antifúngicos [tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química:2011.
  34. Homei A, Worboys M. Fungal diseases in Britain and the United States 1850-2000, United Kingdom; Algrave MacMillan: 2013. pp. 67-97.
  35. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:693-715.

36. Kemker BJ, Lehmann PF, Lee JW, Walsh TJ. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigelii* by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1677–1683.
37. Kiraz N, Dag I, Yamac M, Kiremitci A, Kasiofoglu N, Oz Y. Synergistic activities of three triazoles with caspofungin against *Candida glabrata* isolates determined by time-kill, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2244–2247.
38. Kwong-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology.* Philadelphia; London:1992. pp. 280-326.
39. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:345-351.
40. Li H, Lu Q, Wan Z, Zhang J. *In vitro* combined activity of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35:550–552.
41. Liao Y, Lu X, Yang S, Luo Y, Chen Q, Yang R. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: A review of 185 reported cases from 1975 to 2014. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2:ofb141. doi:10.1093/ofid/ofv141.eCollection 2015.
42. Lo Passo C, Pernice I, Celeste A, Perdichizzi G, Todaro-Luck F. Transmission of *Trichosporon asahii* oesophagitis by a contaminated endoscope. *Mycoses.* 2001;44:13-21.
43. Looder J. *The yeasts. A taxonomic study.* 2nd ed. Amsterdam:North Holland Publishing Company:1970.
44. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Méndez-Tovar LJ, González-Monroy J, López-Martínez R. Fungal peritonitis in 15 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Mycoses.* 2003;46:425–429.

45. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Zavala-Velásquez N, Méndez-Tovar LJ, Naquid-Narváez MJ, Torres-Rodríguez JM. Candiduria en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Sensibilidad antifúngica *in vitro* Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2008; 46:603-610.
46. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez JM, Cortés-Gonzales, Fernández R, López-Martínez R. Levaduras causantes de onicomycosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. Rev Iberoam Micol. 2011;28:32-35.
47. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. Gac Med Mex. 2008;144:23-26.
48. Marchetti O, Entenza JM, Sanglard D, Bille J, Glauser MP, Sanglard D, Morellion P. Fluconazole plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2932-2938.
49. Martínez RF, Jaimes-Avelañez A, Hernández-Pérez F, Arenas R, Miguel GF. Oral *Candida* spp. carriers: its prevalence in patients with type 2 diabetes mellitus. An Bras Dermatol. 2013;88:222–225.
50. McGinnis MR. Laboratory handbook of medical mycology. United Kingdom; Academic press inc:1980. pp. 337-357.
51. Medeiros AO, Missagia BS, Brandão LR, Callisto M, Barbosa FA, Rosa CA. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil. Braz J Microbiol. 2012;43:1582-1594.
52. Méndez-Tovar LJ, Mejía-Mercado JA, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Silva-González I. Frecuencia de micosis invasivas en un hospital mexicano de alta especialidad. experiencia de 21 años. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2016;54:581-587.
53. Mendoza-Aranda SG. Diversidad morfológica y sensibilidad antifúngica por el método de microdilución en caldo en aislamientos clínicos de

- Trichosporon* spp. [tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química:2008.
54. Meyers SP, Ahearn DG, Cook WL. Mycological studies of lake Champlain. *Mycologia*. 1970;62:504-515.
  55. Miller AO, Gamaletsou MN, Henry MW, Al-Hafez L, Hussain K, Sipsas NV, Kontoyiannis DP, Roilides E, Brause BD, Walsh TJ. Successful treatment of *Candida* osteoarticular infections with limited duration of antifungal therapy and orthopedic surgical intervention. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47:144-149.
  56. Miller SE, Spurlock BO, Michaels GE. Electron microscopy of young *Candida albicans* chlamydospores. *J Bacteriol*. 1974;119:992-999.
  57. Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen J D, Arendrup MC. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol*. 2010;59:414–420.
  58. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, Makimura K. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol*. 2013;51:657-663.
  59. Mok WY, Luizão RC, do Socorro Barreto da Silva M, Texeira MFS, Muniz EG. Ecology of pathogenic yeast in Amazonian soil. *Appl Environ Microbiol*. 1984;47:390-394.
  60. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6:67-78.
  61. Odds FC, Davidson A. “Room temperature” use of CHROMagar *Candida*™. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38:147–150.
  62. Oliveira ER, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Redding SW. *In vitro* interaction of posaconazole and caspofungin against clinical isolates of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:3544-3545.

63. Pardi G, Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontol Venez. 2002;40:9-17.
64. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. Rev Iberoam Micol. 2016;33:133–139.
65. Pemmaraju SC, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. *Candida albicans* biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. Indian J Exp Biol. 2013;51:1032-1037.
66. Petrou MA, Rogers TR. Interactions *in vitro* between polyenes and imidazoles against yeasts. J Antimicrob Chemother. 1991;27:491-506.
67. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004-2008. PLoS One. 2014;9:e101510. doi:10.1371/journal.pone.0101510.eCollection 2014.
68. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. J Clin Microbiol. 2012;50:2846-2856.
69. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. Clin Infect Dis. 2006;43:S3–S14.
70. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77:37-40.
71. Quindós G, Eraso E, Carrillo-Muñoz A, Cantón E, Pemán J. Actividad antifúngica *in vitro* de la micafungina. Rev Iberoam Micol. 2009;26:35-41.
72. Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. Actividad de la micafungina contra las biopelículas de *Candida*. Rev Iberoam Micol. 2009;26:49-55.

73. Raad II, El Zakhem AE, Helou GE, Jiang Y, Kontoyiannis DP, Hachem R. Clinical experience of the use of voriconazole, caspofungin or the combination in primary and salvage therapy of invasive aspergillosis in haematological malignancies. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45:283–288.
74. Reséndiz-Sánchez J, Morales-Aguirre JJ. Factores asociados a mortalidad por fungemias causadas por *Candida* sp. en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2007;64:91-98.
75. Rimek D, Fehse B, Göpel P. Evaluation on Mueller-Hinton agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 2008;51:205-208.
76. Rivera-Sánchez R, Flores-Paz R, Arriaga-Alba M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:634-636.
77. Robbins N, Wright GD, Cowen LE. Antifungal Drugs: The current armamentarium and development of new agents. *Microbiol Spectr*. 2016;4.doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016.
78. Roling EE, Klepser ME, Wasson A, Lewis RE, Ernst EJ, Pfaller MA. Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43:13-17.
79. Romero-Luévano AG, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Cerón-Araiza M, Hernández-Guzmán VA, Ponce RM, Bonifaz A. Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del hospital general de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. *Dermatología Rev Mex*. 2014;58:239–246.
80. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Yeung KW. Evaluation of polyene-azole antagonism in liquid cultures of *Candida albicans* using an automated turbidometric method. *Chemotherapy*. 2001;47:279-291.

81. Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. J Med Microbiol. 1994;41:295–310.
82. Sánchez-Hernández JA, Gómez-Linares C, Rivera-Tapia JA. Infección, erosión y úlceras cérvico-vaginales. Acta Científica Estudiantil. 2009;7:254-257.
83. Scheven M, Schwegler F. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39:1779-1783.
84. Schilling A, Seibold M, Mansmann V, Gleissner B. Successfully treated *Candida krusei* infection of the lumbar spine with combined caspofungin/posaconazole therapy. Med Mycol. 2008;46:79-83.
85. Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Leven M, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* from HIV-infected patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997; 16:296-300.
86. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36:288-305.
87. Silva-Bedoya LM, Ramírez-Castrillón M, Osorio-Cadavid E. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. Braz J Microbiol. 2014;45:135-142.
88. Singh N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal Infections: predisposing factors and the Impact of antimicrobial use practices. Clin Infect Dis. 2001;33:1692-1696.
89. Spitzer M, Robbins N, Wright GD. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. Virulence. 2017;8:169-185.
90. Sugita, T, Nishikawa A, Shinoda T, Kume H. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon*

- cutaneum* from trichosporonosis patients. J Clin Microbiol. 1995;33:1368–1370.
91. Takahashi H, Ueda Itano EN, Yanagisawa M, Murata Y, Murata M, Yaguchi T, Murakami M, Kamel K, Inomata T, Miyahara H, Sano A, Uchida S. *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in aquarium. Vet Med Int. 2010;2010:349364. doi:10.4061/2010/349364.
92. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43:284-292.
93. Tinoco JC, Hernández-Ruiz E, Salvador-Moysen J, Rivera-Morales I. Infecciones nosocomiales de vías urinarias en un hospital de segundo nivel. Salud Publica Mex 1994;36:17-21.
94. Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R, Kerins J, Kemble SK, Pacilli M, Black SR, Landon E, Ridgway J, Palmore TN, Zelzany A, Adams EH, Quinn M, Chaturvedi S, Greenko J, Fernandez R, Southwick K, Furuya EY, Calfee DP, Hamula C, Patel G, Barrett P, Lafaro P, Berkow EL, Moulton-Meissner H, Noble-Wang J, Fagan RP, Jackson BR, Lockhart SR, Litvintseva AP, Chiller TM. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus- United States, may 2013-august 2016. Am J Transplant. 2017;17:296-299.
95. van Etten EW, van de Rhee NE, van Kampen KM, Bakker-Woudenberg IA. Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and intracellular growth of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:2275-2281.
96. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect. 2004;1:48-66.
97. Walsh TJ, Melcher GP, Rinaldi MG, Lecciones J, McGough DA, Kelly P, Lee J, Callender D, Rubin M, Pizzo PA. *Trichosporon beigelii* an emerging pathogen resistant to amphotericin B. J Clin Microbiol. 1990;28:1616-1622.

98. Willinger B, Hillwoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagarCandida. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3793-3795.
99. Won EJ, Shin JH, Choi MJ, Lee WG, Park YJ, Uh Y, Kim SY, Lee MK, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Antifungal susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species from nine hospitals in Korea: application of new antifungal breakpoints and relationship to antifungal usage. *PLoS One.* 2015;10:e0118770. doi:10.1371/journal.pone.0118770.eCollection 2015.
100. Xiao M, Fan X, Chen SC, Wang H, Sun ZY, Liao K, Chen SL, Yan Y, Kang M, Hu ZD, Chu YZ, Hu TS, Ni YX, Zou GL, Kong F, Xu YC. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:802-810.
101. Zaragoza R, Pemán J. Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29:108-113.