



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CANDIDOSIS BUCALES MIXTAS EN PACIENTES CON VIH/SIDA;
IDENTIFICACIÓN Y ESPECTRO DE SENSIBILIDAD”**

TESIS

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

PRESENTA:

Sandra Denisse Contreras García

Ciudad de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL: Profesor: José Alejandro Bonifaz Trujillo
SECRETARIO: Profesor: Alejandro Camacho Cruz
1er. SUPLENTE: Profesor: Ruth Edith Martin Fuentes
2° SUPLENTE: Profesor: Norma Trejo Medina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

LABORATORIO DE MICOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ _____

SUSTENTANTE:

SANDRA DENISSE CONTRERAS GARCÍA _____

ÍNDICE	3
Índice de tablas, figuras, gráficas y anexo	4
Índice de abreviaturas	6
1. Resumen estructurado	7
2. Antecedentes	8
2.1 Definición	
2.2 Características generales de los agentes etiológicos	
2.3 Principales especies de interés médico	
2.4 Patogenicidad. Factores de virulencia	
2.5 Epidemiología	
2.6 Cuadro clínico de candidosis bucal (CB)	
2.7 Candidosis bucal en pacientes con VIH/SIDA	
2.8 Diagnóstico	
2.9 Antifúngicos utilizados como tratamiento y factores causantes de resistencia.	
3. Planteamiento del problema	18
4. Justificación	19
5. Hipótesis del trabajo	19
6. Objetivos del estudio	19
6.1 Objetivo general	
6.2 Objetivos específicos	
7. Cronograma de actividades	20
8. Materiales y Métodos	20
8.1 Definición de población	
8.2. Tipo y diseño del estudio	
8.3 Población y tamaño de la muestra	
8.4 Criterios de selección	
8.4.1 Criterios de inclusión	
8.4.2 Criterios de exclusión	
8.5 Definición de las variables a evaluar y forma de medirlas	
8.6 Procedimiento para la toma de muestra y procesamiento de la misma.	
9. Análisis estadístico	28
10. Relevancia y expectativas	28
11. Resultados	29
12. Discusión	37
13. Conclusiones	42
14. Referencias	43
15. Anexo	48

TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del género <i>Candida</i>	8
Tabla 2. Antimicóticos utilizados para el tratamiento de candidosis bucal	16
Tabla 3. Espectro de actividad antifúngica frente a especies de <i>Candida</i>	17
Tabla 4. Mecanismos asociados a la resistencia a fármacos antifúngicos de <i>Candida spp.</i>	18
Tabla 5. Cronograma general de actividades (Julio de 2017 a abril de 2018)	20
Tabla 6. Características de las variables de estudio	22
Tabla 7. Características morfológicas de los diferentes medios de cultivo empleadas en la tipificación convencional de las cepas de <i>Candida</i> . Pigmentación de las colonias en medio CHROM-agar y observación microscópica del desarrollo en medio Harina de Maíz + <i>tween</i> 80 al 1% después de 48 horas de incubación a 28°C.	24
Tabla 8. Reactivos contenidos en la micro placa del AUXACOLOR™ 2 de BIO-RAD®. Guía de interpretación de las reacciones colorimétricas por el viraje de un indicador pH: púrpura de bromocresol.	26
Tabla 9. Antimicóticos y concentraciones contenidos en la micro placa del FUNGITEST™ de BIO-RAD®	27
Tabla 10. Prueba de Chi-cuadrado: Estatus VIH del paciente * Resultado del examen directo (tabulación cruzada).....	30
Tabla 11. Sensibilidad antifúngica del total de cepas en estudio a los fármacos utilizados como tratamiento de candidosis bucal.	34
Tabla 12. Cepas relacionadas con candidosis mixtas y número de casos encontrados..	35
Tabla 13. Sensibilidad antifúngica a los fármacos utilizados como tratamiento de candidosis bucal de las cepas correspondientes a las diferentes combinaciones de candidosis mixtas encontradas en el estudio	36

FIGURAS

Figura 1. Esquema general del procesamiento de las muestras de cavidad bucal. Se muestra las resiembras necesarias para el aislamiento de las cepas, los medios utilizados, así como las pruebas realizadas a cada una de ellas. Fotos: 1 colonia de <i>Candida</i> 40X Azul de algodón. 2 colonias de <i>Candida</i> en CHROMagar. 3 Pseudomicelio y clamidoconidios en agar harina de maíz + Tween 80 al 1% 40X.	25
Figura 2. Esquema de la metodología indicada para la inoculación de la microplaca. Modificado del original BIO-RAD®.....	26
Figura 3. Esquema de la metodología indicada para la inoculación de la microplaca. Modificado del original BIO-RAD®	27
Figura 4. Pacientes con candidosis variedad pseudomembranosa: Morfología característica placas blanquecinas y cremosas.....	31
Figura 5. Pseudohifa de <i>Candida sp</i> en examen directo con KOH (40X) de muestra bucal	32
Figura 6. Se observa parasitación de <i>Candida sp</i> . La imagen corresponde a cúmulos de blastoconidios.	32

GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución de pacientes en porcentaje por rango de edad y género.....	29
Gráfica 2. Tratamientos antimicóticos usados por los pacientes.....	29
Gráfica 3. Resultados obtenidos al examen directo entre pacientes sin TARV vs Abandono de tratamiento.....	30
Gráfica 4. Distribución de variedad clínica de candidosis.....	31
Gráfica 5. Representación de la distribución de pacientes en estudio con diagnóstico de candidosis y negativos para el mismo.....	32
Gráfica 6. Proporción de especies de <i>Candida sp</i> . presentes en las muestras.....	33
Gráfica 7. Proporción de candidosis mixtas identificadas en muestras bucales.....	35

ANEXO

Anexo 1. Hoja de datos con la información del paciente	48
--	-----------

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TARV	Tratamiento antirretroviral
SNC	Sistema nervioso central
MDR	Multidrug resistance
CDR	<i>Candida</i> drug resistance
PHR	pH regulator gene
Als	Agglutinin-like sequence
Hwp	Hyphal wall protein
Mnt	Mannosyltransferase
CB	Candidosis bucal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
KOH	Hidróxido de potasio.
CHS	Hidrofobicidad de superficie celular

1. Resumen estructurado.

Antecedentes: Los pacientes infectados con VIH y que han desarrollado SIDA, son fácilmente susceptibles a adquirir infecciones oportunistas por hongos levaduriformes de tipo *Candida*, este tipo de infecciones pueden ser localizadas o bien diseminarse y afectar órganos y sistemas que comprometen la vida del paciente.

Objetivo: Determinar la frecuencia de candidosis bucales mixtas en pacientes VIH/SIDA y las especies de *Candida* aisladas de la mucosa bucal; así como el patrón de susceptibilidad *in vitro* a diversos fármacos anti fúngicos.

Diseño: Estudio prospectivo, observacional, longitudinal, descriptivo y comparativo en pacientes con VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo; en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" diagnosticados por el laboratorio de Micología.

Procedimiento: Pacientes hospitalizados en el área de Infectología con datos clínicos de candidosis bucal, a los cuales se realizó toma de muestra de la cavidad bucal para realizar un examen directo y cultivo micológico. Una vez obtenido desarrollo en los medios de cultivo de procedió a la tipificación morfológica y bioquímica de la cepa, así como al respectivo ensayo de sensibilidad para 4 antimicóticos.

Resultados: De la población estudiada 91% eran masculinos y 9% femeninos. Los pacientes participantes se encontraban en el estadio C3 de la enfermedad, el porcentaje sin TARV fue de 68% mientras que el 32% restante dejó de tomar la terapia antirretroviral. La variedad aguda pseudomembranosa correspondió al 90% de los pacientes. Se encontraron un total de 58 cepas de las cuales 71% correspondían a *C. albicans* en el porcentaje restante se encontraron las especies *C. glabrata* 10%, *C. krusei* 9%, *C. dubliniensis* 9% y *C. kefyr* 1%. La proporción en la cual se presentaron candidosis mixtas fue de 17%. El fármaco con el cual el mayor porcentaje de cepas resultaron sensibles *in vitro* fue Anfotericina B y con el que se observó más resistencia fue Itraconazol

Conclusiones: La importancia de identificar si una candidosis involucra una o más especies está estrechamente relacionada con la elección de un esquema terapéutico adecuado; debido a que especies de *Candida no-albicans* presentan mayor resistencia a fármacos azólicos, los cuales son utilizados como de primera elección para el tratamiento de candidosis.

2. Antecedentes

2.1 Definición

La candidosis se define como una infección producida por hongos levaduriformes pertenecientes al género *Candida spp.*; en personas sanas forman parte de la microbiota habitual en un 40% a 60%. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos son agentes causales de infecciones de tipo oportunista llegando a causar enfermedad a nivel bucal, pulmonar, en vías urinarias y fungemias severas que representan un riesgo importante para la vida del paciente.^{1,2}

2.2 Características generales de los agentes etiológicos

Las levaduras pertenecientes al género *Candida spp.*, son parte de la microbiota habitual de humanos en mucosas y tracto respiratorio; su morfología característica es redonda u ovoide con un tamaño aproximado de 3 a 7 μm de diámetro, su reproducción anamórfica es mediante blastoconidios.¹

Con base en la biología molecular se clasifican dentro de la familia *Saccharomycetaceae*, en la tabla 1 se muestra la taxonomía del género *Candida spp.* descrita por Muller, 2007.¹

Tabla 1. Taxonomía del género *Candida*

Clase:	Ascomycetes
Subclase:	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Familia:	<i>Saccharmycetes</i>
Género:	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma</i> (estados teleomórficos)
Especies:	Estados anamórficos, los ejemplos más importantes son: <i>C. albicans,</i> <i>C. glabrata,</i> <i>C. tropicalis,</i> <i>C. parapsilosis,</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. krusei</i>

La pared celular fúngica se compone básicamente de polisacáridos siendo la quitina el más destacado (seguido de glucanos y mananos) y proteínas que representan el 30-50% de peso seco en la pared de hongos levaduriformes. La membrana celular de los hongos contiene ergosterol, pieza fundamental en la integridad estructural y regulador de la fluidez.³

El crecimiento en medios de cultivo de *Candida spp.* son generalmente colonias cremosas, limitadas, planas y de color blanco-amarillento; el tiempo estimado de desarrollo va de 48 a 72 horas a una temperatura de 25-28°C.¹

La formación de pseudmicelio se puede ver en cultivos *in vitro* el medio utilizado para tal fin es aquel con bajo contenido de carbohidratos más tensoactivos (harina de maíz + Tween 80 al 1%). En este tipo de medios se da también la formación de clamidoconidios, sólo dos especies generan estas estructuras: *C. albicans* y *C. dubliniensis*.¹

Existen más de 150 especies del género *Candida spp.*, pero solo un número limitado de las mismas son patógenas a humanos; sobresale *C. albicans* que llega a aislarse de un 40-85% de las infecciones, otras especies que frecuentemente se encuentran son: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*.⁴

Las especies patógenas de *Candida spp.*, presentan la forma parasitaria de pseudohifas largas ramificadas con cúmulos de blastoconidios (a excepción de *C. glabrata*), es por esta razón que estos hongos se consideran dimorfos.^{1,4}

2.3 Principales especies de interés médico

- *C. albicans*. Principal agente causal de candidosis y el cuarto en importancia de infecciones sanguíneas, su aislamiento es común en catéteres intravasculares. Esta especie se relaciona en una gran variedad de cuadros clínicos debido a su politropismo. Se han identificado dos serotipos A y B, este último más frecuente en los pacientes con VIH/SIDA.⁵
- *C. tropicalis*. Se ha relacionado tropismo a nivel vaginal, broncopulmonar, SNC, intestinal y osteoarticular; causa afección a pacientes neutropénicos y presenta

capacidad invasiva en un 50-60% de los casos y se asocia con resistencia a fluconazol.^{1,5,6}

- *C. glabrata*. Patógeno emergente que no forma pseudohifas ni hifas, su relevancia clínica radica en su resistencia a fluconazol (78.3%). Se relaciona con pacientes inmunocomprometidos por el uso prolongado de: antibióticos, nutrición parenteral y estancias prolongadas en unidades de terapia intensiva. En adultos mayores y personas con cáncer que reciben radioterapia se observa alta incidencia de candidosis orofaríngea. Se asocia con altos índices de mortalidad; en América Latina representa de un 4 a 7% de especies relacionadas con candidemias.^{1, 6, 8}
- *C. parapsilosis*. Clínicamente se relaciona con onicomycosis, candidemias (neonatos), endocarditis, otitis y diarrea infantil, se considera un patógeno exógeno que se caracteriza por su capacidad de formar biopelículas y presenta baja tasa de mortalidad debido al tratamiento efectivo con antifúngicos azólicos.^{1,7}
- *C. krusei*. Presenta tropismo por: mucosas, infecciones sistémicas, endocarditis, etc. afectando principalmente a pacientes neutropénicos; se ha reportado resistencia intrínseca a fluconazol. En estudios *in vitro* de formación de biopelículas se presenta una interacción competitiva con *C. albicans*.^{1,5,8}
- *C. dubliniensis*. Especie que se aísla con frecuencia de la cavidad bucal de pacientes VIH/SIDA, fenotípicamente similar a *C. albicans*. Se han reportado cepas de esta especie con un alto grado de expresión genética de la superfamilia del transportador MDR responsable de la resistencia específica a fluconazol y de las bombas de eflujo CDR causante de la resistencia a los azóles en general.^{1,8}

- *C. kefyr*. Antes llamada *C. pseudotropicalis* causa infecciones oportunistas principalmente a nivel pulmonar.⁹

2.4 Patogenicidad. Factores de virulencia

La mayor parte de las infecciones por *Candida spp.* se origina de manera endógena, casi atribuible con procesos que influyen en la respuesta inmunológica, sobre todo a nivel celular. Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes inóculos de levaduras. Para el establecimiento de una candidosis normalmente convergen dos fenómenos: la conversión de la levadura comensal a patógena y la susceptibilidad en la inmunidad del hospedero al proceso infeccioso. De acuerdo al balance de ambos la presencia de *Candida sp.* implica biota o infección.¹

Las levaduras del género *Candida spp.* poseen diversos factores de virulencia que contribuyen con su capacidad para lesionar tejidos, así como a evadir los mecanismos de defensa del hospedero, a continuación, se hace mención de cada uno de ellos:

- **Morfogénesis:** Se refiere a la transición entre levaduras (unicelulares) y la forma parasitaria denominada pseudohifa, dicha conversión es esencial para la virulencia de ciertas especies del género *Candida spp.* ya que esta forma de invasión resulta idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares, debido a que en el extremo de la estructura se encuentra el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, con lo que puede facilitarse su infiltración en sustratos sólidos y tejidos.¹⁰
- **Enzimas:** Tienen la capacidad de romper polímeros lo que proporciona nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar moléculas de defensa del hospedero. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con los mecanismos de patogenicidad son proteasas, fosfolipasas y lipasas.^{1, 11}
- **Formación de biopelículas o biofilms:** El término se refiere a comunidades de microorganismos unidos y embebidos por una matriz extra polimérica que los protege del ambiente, la respuesta inmunológica del hospedero y de la acción

de fármacos antifúngicos. Los pasos para la formación de una biopelícula son la adhesión, la colonización, la cohesión, maduración y desinserción.

Factores que mejoran la adhesión se dan por la secreción de fosfolipasas y proteasas, manoproteínas de pared celular, pH y temperatura; el siguiente paso corresponde a la secreción de glucoproteínas (adhesinas) dando paso a la matriz polimérica donde inicia la reproducción de las levaduras y el inicio de la infección. La madurez de la biopelícula implica una mezcla de blastoconidios y pseudohifas unidos por material polimérico. La cohesión involucra a diferentes microorganismos (colonizadores primarios o secundarios), donde diversas especies de *Candida spp.* se unen a sus receptores de superficie. Se ha observado que *C. albicans* se une a especies de estreptococos inmovilizándolos.

La última fase del desarrollo de la biopelícula representa el desprendimiento de levaduras que en otras áreas pueden reiniciar el ciclo de formación de éstas. ^{7, 12, 13}

- **Expresión diferencial de genes en reacción al medio ambiente:** *C. albicans* es capaz de sobrevivir y proliferar en una amplia gama de tejidos. Durante los diferentes estados y tipos de infección las células del hongo necesitan amplia capacidad de adaptación al medio, dicha versatilidad puede sostenerse por la expresión de genes PHR1 y PHR2 que codifican para proteínas de membrana; las cuales contribuyen al desarrollo de la levadura cuando el pH del medio es mayor a 5.5 y cuyos niveles de concentración son indetectables a pH con valores menores a los antes mencionados.^{1, 11}
- **Adhesinas:** Se definen como biomoléculas que promueven la adherencia de diversas especies de *Candida spp.* a las células del hospedero mediante ligandos específicos. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a compuestos de matriz extracelular en células de mamífero tales como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno; existen diferentes tipos de adhesinas como Als, Hwp1p y Mnt1p. ¹¹

2.5 Epidemiología

La candidosis bucal (CB), es la infección oportunista más comúnmente encontrada en pacientes infectados con VIH/ SIDA se presenta hasta en un 90% de los casos en pacientes sin TARV.¹⁵ Es una de las manifestaciones iniciales de la enfermedad, en este grupo de pacientes, los cuales se encuentran expuestos a presentar episodios recurrentes de CB, los cuales incrementan en frecuencia y gravedad, de acuerdo a la progresión del SIDA.⁷

2.6 Cuadro clínico de candidosis bucal

Esta micosis se puede dividir en dos grandes categorías: infección mucocutánea y sistémica.

Dentro de la candidosis mucocutánea se encuentra la CB, la cual se divide en aguda y crónica.

En la CB aguda, existen dos variedades clínicas: pseudomembranosa y atrófica.

- ✓ Pseudomembranosa: Variedad más común es conocida como trush o algodoncillo, se presenta en lengua, pero llega a afectar encías, paladar o invadir toda la boca (estomatitis). La morfología es de placas cremosas y blanquecinas, con fondo eritematoso.¹⁶
- ✓ Atrófica: Se presenta más en paladar y es propia de pacientes bajo uso prolongado de antibioticoterapia, se manifiesta con zonas eritematosas, erosionadas con velo blanquecino.^{17, 18}

La CB crónica presenta tres variedades:

- ✓ Hiperplásica o “lengua vellosa”: Existe parasitación completa de la lengua; se manifiesta en los bordes laterales de la lengua y en la mucosa yugal, pueden presentarse fisuras y úlceras muy dolorosas. En ocasiones se presenta dando una parasitación negra.¹⁷
- ✓ Queilitis angular o “perleche” candidósico: Se presenta cuando la CB se extiende afectando labios a nivel de las comisuras y se constituye por placas eritemato-escamosas y erosionadas. Dichas lesiones pueden ser dolorosas y ocasionan

disminución en la ingesta de alimentos, situación que compromete aún más la recuperación de los pacientes.^{1,7}

- ✓ Atrófica o estomatitis subplaca. De características similares a la entidad aguda, pero con un nivel de daño en la superficie total bucal.¹⁸

A partir del foco bucal la candidosis puede continuar hacia la faringe, laringe, esófago y tráquea, lo cual es frecuente en pacientes inmunosuprimidos.¹⁸

2.7 Candidosis bucal en pacientes con VIH/SIDA

La CB tiene una importante asociación a diversos factores propios del VIH/SIDA; esta entidad clínica en estados avanzados de la enfermedad presenta una disminución de linfocitos T CD4⁺ por debajo de las 200 céls/ml, así como una carga viral elevada.¹⁹

En estudios recientes se ha demostrado que la implementación del TARV, genera una supresión de la replicación viral y los pacientes recobran parcialmente el conteo de linfocitos T CD4⁺. Aunque la incidencia y la prevalencia de las infecciones oportunistas han disminuido globalmente debido al uso del TARV, la CB continúa como la enfermedad más común asociada a pacientes con VIH/SIDA en la mayoría de los países en desarrollo.¹⁹

En pacientes con VIH/SIDA *C. albicans* es la especie que se aísla más comúnmente. En décadas recientes, especies emergentes de *Candida*, son aisladas de muestras clínicas, particularmente aquellas con sensibilidad reducida a los agentes antimicóticos de uso común (ya sea como tratamiento a la infección o como profilaxis). Por lo tanto, la identificación a nivel de especie es fundamental para la correcta intervención contra esta enfermedad.²⁰

La diferencia en la prevalencia de especies en pacientes con VIH/SIDA está relacionada con la ubicación geográfica. En algunos países *C. parapsilosis* es la segunda especie más común, mientras que en otros ocupa este lugar *C. glabrata*, con lo cual se demuestra la importancia de la epidemiología local a nivel país.^{7,19}

Clark-Ordoñez y colaboradores⁷, en 2017, reportaron una incidencia de *Candida spp.* de 57.4% en 297 pacientes con VIH/SIDA en Baja California México, de los

cuales se aísló *C. albicans* en un 72%, seguida de *C. tropicalis* con el 12% y en tercer lugar *C. glabrata* con el 8.8%. Así mismo se reporta la incidencia de candidosis mixtas con un 6.5%, encontrándose como asociación más frecuente *C. albicans* + *C. glabrata* en 3% de los casos.⁷

2.8 Diagnóstico

Un adecuado diagnóstico de CB requiere de la correlación de los aspectos clínicos y los estudios micológicos correspondientes. Ante la sospecha de esta infección se realiza una adecuada toma de muestra de acuerdo a la lesión sugerente de micosis, generalmente con un asa micológica mediante el raspado de la lesión.^{1,4}

El material obtenido se procesa de preferencia con hidróxido de potasio (KOH) de 10-20%. En el hallazgo de una candidosis al examen directo se observan pseudohifas cortas o largas y cúmulos de blastoconidios (en infecciones por *C. glabrata* solo se aprecian estos últimos). De manera simultánea se cultiva la muestra en medios de agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos por un periodo de 48 horas de 28-30°C.⁴

El desarrollo de colonias de levaduras obtenido se resiembra en medios cromogénicos para la búsqueda intencionada de más de una especie de *Candida*, mediante la diferenciación de colonias de diversos colores. La identificación de algunas especies puede confirmarse con la producción de clamidoconidios en agar extracto de maíz con Tween-80. Los métodos bioquímicos de uso comercial para la identificación de las levaduras van desde los que utilizan patrones de fermentación (zimogramas) y utilización de carbohidratos (auxonogramas).^{1,2,4}

2.9 Antifúngicos utilizados como tratamiento y factores causantes de resistencia.

El inicio de la terapia en pacientes con CB debe considerar como factores de importancia: la realización de un diagnóstico tanto certero como oportuno de la infección, las contribuciones a la recuperación inmunológica del paciente y el empleo del antimicótico adecuado.^{6,8}

Los agentes antimicóticos disponibles para el tratamiento de CB se presentan a continuación ²¹:

Tabla 2. Antimicóticos utilizados para el tratamiento de CB

Tratamientos de elección	Dosis
Fluconazol (Oral o intravenoso)	100-200 mg/ día
Clotrimazol (Bucal)	10 mg/ día
Nistatina (Oral)	400,000 unidades/ día
Tratamientos de segunda línea	
Itraconazol (Oral)	200 mg/ día
Voriconazol (Oral o intravenoso)	200 mg/ día
Posaconazol (Oral)	400 mg/ día
Tratamientos de casos recidivantes	
Caspofungina (intravenoso)	50 mg/ día
Micafungina (intravenoso)	100-150 mg/ día
Anidulafungina (intravenoso)	50 mg/ día
Anfotericina B (intravenoso)	0.3 mg/kg día

De acuerdo a las guías de la organización mundial de la salud (OMS) para el tratamiento de infecciones de piel y mucosas en pacientes VIH/SIDA, el fármaco de elección en CB en adultos es fluconazol 100-150 mg vía oral cada 24 horas en un periodo de 7 a 14 días.^{8, 21}

Cuando el fluconazol está contraindicado, las alternativas al tratamiento incluyen terapia tópica con nistatina en suspensión o clotrimazol pastillas; sin embargo, se ha observado que la reinfección es común utilizando este tipo de esquemas.²¹

En caso de resistencia a la terapia con fluconazol; la cual debe considerarse cuando no exista respuesta al tratamiento después de 14 días, el uso de itraconazol puede ser un régimen alternativo de tratamiento.²³

En años recientes se ha registrado un incremento en el aislamiento de cepas con observada resistencia a fármacos comúnmente utilizados para el tratamiento de CB, en especial los provenientes de pacientes que han recibido profilaxis antifúngica,

que requieren largos periodos de tratamiento y pacientes en unidades de cuidado intensivo.²⁴

Los patrones de sensibilidad se pueden predecir con base en la especie de *Candida* causante de la infección (tabla 3) y utilizarse de manera empírica como guía en la elección de la terapia antimicótica.²⁴

Tabla 3. Espectro de actividad antifúngica frente a especies de *Candida*.

<i>Candida spp</i>	AMB	FLU	ITR	POS	VOR	ANI	MIC	CAS	5FC
<i>C.albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>C.krusei</i>	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+/-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. lusitaniae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+

AMB, anfotericina B; FLU, fluconazol; ITR, itraconazol; POS, posaconazol; VOR, voriconazol; ANI, anidulafungina; MIC micafungina; CAS, caspofungina; 5FC, 5-fluorocitocina. (+) Implica actividad contra el aislamiento, (-) implica actividad nula o limitada contra el aislamiento, (+/-) implica actividad variable contra el aislamiento. ²¹

La mayoría de las cepas que presentan resistencia a antifúngicos está asociada a pacientes en estadios finales de la infección por VIH (etapa clínica C3), en los cuales se reportan conteos de T CD4⁺ menores a 200 cél/ μ L ¹⁹

En el caso específico de *C. albicans* la presencia de resistencia es más baja que en otras especies (por ejemplo *C. krusei* y *C. lusitaniae* con resistencia intrínseca a fluconazol y anfotericina B respectivamente); sin embargo, la caracterización de los aislamientos de *C. albicans* en muestras de pacientes con reincidencia de candidosis muestra la presencia de genotipos con diferentes espectros de sensibilidad variable a fármacos azólicos.¹⁹

Los mecanismos asociados a la resistencia antifúngica de *Candida spp.* se describen como alteraciones a nivel genético; las cuales involucran mutaciones puntuales en diversos genes que conducen a la sobreexpresión de productos tales como proteínas transportadoras, que expulsan al fármaco de la célula fúngica e incluso a la pérdida de afinidad del agente antimicótico por la diana terapéutica.²⁴

A continuación, se enlistan los genes involucrados en los cambios en el espectro de sensibilidad a fármacos, así como el respectivo mecanismo asociado a cada uno de ellos ²¹:

Tabla 4. Mecanismos asociados a la resistencia a fármacos antifúngicos de *Candida spp.*

Gen	Producto del gen	Mecanismo de resistencia	Tipo de antifúngico
ERG11	14- α -esterol desmetilasa: Enzima involucrada en la síntesis de ergosterol	Mutación puntual en el gen que resulta en una pérdida de afinidad del fármaco por la enzima o bien en la sobreexpresión de la misma.	Triazóles
CDR1 / CDR2	Transportador de tipo ABC: Proteína de membrana dependiente de ATP	Sobreexpresión que resulta en proteínas transportadoras de eflujo del fármaco.	Triazóles
MDR1	Transportador de tipo ABC: Proteína de membrana dependiente de ATP	Sobreexpresión que resulta en proteínas transportadoras de eflujo del fármaco.	Triazóles (Específico a Fluconazol)
FKS1 / FKS2	Glucano sintetasa	Mutaciones puntuales que alteran la afinidad con equinocandinas.	Equinocandinas.
TAC1	Proteína Tac 1 p: Factor de transcripción	Factor de transcripción responsable de inducir mutaciones puntuales en CDR1/CDR2	Triazóles
PDR1	Proteína Pdr 1 p: Factor de transcripción	Factor de transcripción responsable de inducir mutaciones puntuales en CDR1	Triazóles
MRR1	Proteína Mrr 1 p: Factor de transcripción	Factor de transcripción responsable de inducir mutaciones puntuales en MDR1	Triazóles

3. Planteamiento del problema.

Los pacientes infectados con VIH y que han desarrollado SIDA, son fácilmente susceptibles a adquirir infecciones oportunistas por hongos levaduriformes de tipo *Candida*, este tipo de infecciones pueden ser localizadas (como el caso de las CB) o bien diseminarse y afectar órganos y sistemas que comprometen la vida del paciente; es por esta situación que es importante diagnosticar de manera adecuada las infecciones por *Candida spp.*, localizadas en cavidad bucal en los pacientes con VIH/SIDA, así como determinar la susceptibilidad antimicótica específica.

4. Justificación.

En México, existe poco conocimiento, acerca de las candidosis bucales mixtas en pacientes con VIH/SIDA, así como el espectro de susceptibilidad actual de las especies involucradas.

5. Hipótesis del trabajo.

Las candidosis bucales mixtas son más frecuentes en la población con VIH/SIDA sin TARV con respecto a otros grupos de pacientes, a causa de la inmunosupresión ocasionada por la disminución de los linfocitos T CD4⁺, y a la elevada carga viral.

Debido al uso profiláctico frecuente de diversos antimicóticos se encontrarán una mayor cantidad de especies resistentes a los antimicóticos de uso común.

6. Objetivos del estudio.

6.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de candidosis bucales mixtas y la diversidad de especies de *Candida spp.*, aisladas de la mucosa bucal, de pacientes con VIH/SIDA sin TARV o casos de abandono del mismo (en estadio clínico C3 de la enfermedad); así como la susceptibilidad de las levaduras *in vitro* a diversos fármacos antifúngicos.

6.2 Objetivos específicos

1. Investigar la frecuencia de candidosis bucales mixtas en pacientes con VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo.
2. Determinar las variedades clínicas de candidosis bucal y los agentes etiológicos aislados en pacientes con VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo.
3. Determinar la susceptibilidad individual hacia diversos agentes antimicóticos, de las diferentes especies de *Candida* identificadas en el estudio.

7. Cronograma de actividades

Tabla 5. Cronograma general de actividades (Julio de 2017 a abril de 2018)

Nombre del proyecto		"Candidosis bucales mixtas en pacientes con VIH/SIDA; identificación y espectro de sensibilidad"									
Duración		Julio de 2017 a abril de 2018									
Mes		JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR
Actividad	Revisión de protocolo										
	Recolección de datos										
	Análisis estadístico										
	Elaboración del reporte										
	Difusión de resultados										
	Redacción del artículo.										

8. Materiales y Métodos

8.1 Definición de población:

Pacientes hospitalizados en el área de Infectología con VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo, clasificados clínicamente en el estadio C3 de la enfermedad en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", de agosto de 2017 a enero de 2018.

8.2 Tipo y diseño del estudio

Estudio prospectivo, observacional, longitudinal, descriptivo y comparativo en pacientes con VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo hospitalizados en el área de Infectología en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", diagnosticados por el laboratorio de Micología mediante examen directo y cultivo con CB.

8.3 Población y tamaño de la muestra

En cuanto al tamaño de muestra se empleó la ecuación para poblaciones infinitas sin reemplazamiento, con base a una proporción ²⁵.

La ecuación a utilizar:

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

Donde:

N: Número de sujetos necesarios para el estudio

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

P: Valor de la proporción que se supone existe en la población, en este caso se estima la frecuencia de candidosis mixtas en un 4.4%⁴ para diversos tipos de muestras biológicas.

i: Precisión con que se desea estimar el parámetro

Con un nivel de confianza del 95% y una precisión de 5% (i= 0.05) el tamaño de la muestra a evaluar es:

$$N = \frac{(1.96)^2 (0.044)(1 - 0.044)}{(0.05)^2}$$

$$N = 64.64$$

$$N = 65$$

8.4 Criterios de selección

8.4.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de VIH/SIDA que se encuentren internados en el servicio de Infectología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".
2. Pacientes sin TARV previo o casos de abandono del mismo.

3. Pacientes en etapa clínica C3 de la enfermedad.
4. Mayores de 18 años.
5. Pacientes que acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.
6. Pacientes con datos clínicos compatibles con candidosis bucal.
7. Pacientes de ambos géneros

8.4.2 Criterios de exclusión

1. Pacientes con datos clínicos de candidosis bucal y estudios micológicos, sin estructuras ni agentes identificados.
2. Pacientes que no deseen participar en el estudio.

8.5 Definición de las variables a evaluar y forma de medirlas

Tabla 6. Características de las variables de estudio.

NOMBRE DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDAD DE MEDICIÓN
Tipo de paciente VIH/SIDA	Estado con respecto al TARV	Cualitativa dicotómica	-Sin TARV - Abandono de tratamiento
Género	Fenotipo del paciente al momento del estudio	Cualitativa dicotómica	-Masculino -Femenino
Edad	Años cumplidos al momento del estudio	Cuantitativa discreta	Años
Candidosis bucal	Forma clínica	Cualitativa nominal	Variedad clínica de candidosis bucal: -Aguda pseudomembranosa (CBAS) -Aguda atrófica (CBAA) -Crónica hiperplásica (CBCH) -Crónica queilitis angular (CBCQA) -Crónica atrófica (CBCA)
Candidosis	Presencia de estructuras micóticas en las muestras bucales	Cualitativa dicotómica	-Positivo -Negativo
Examen directo	Hallazgos microscópicos en la muestra bucal	Cualitativa nominal	-Blastoconidios -Pseudohifas - Biopelícula
Agentes etiológicos de la CB			- <i>C. albicans</i> , - <i>C. glabrata</i> ,

	Identificación de los agentes causales de las CB	Cualitativa nominal	- <i>C. parapsilopsis</i> , - <i>C. tropicalis</i> , - <i>C. krusei</i> y - <i>C. dubliniensis</i>
Tratamiento antifúngico al momento del estudio	Medicamentos que son administrados al paciente como tratamiento.	Cualitativa nominal	-Fluconazol -Otros antimicóticos (especificar cuál)
Sensibilidad	Espectro de sensibilidad a antimicóticos de las diversas especies de <i>Candida</i> obtenidas en la muestra	Cualitativa ordinal	-Sensible -Intermedio -Resistente

8.6 Procedimiento para la toma de muestra y procesamiento de la misma.

Se revisó a los pacientes hospitalizados en el servicio de Infectología y se seleccionó a aquellos que cumplieron con los criterios para ser parte del estudio.

1. Se invitó a los pacientes a formar parte del estudio y se procedió a firmar el consentimiento informado.
2. Se llenaron las hojas de datos con la información del paciente correspondiente. (Anexo 1)
3. Se seleccionó a los pacientes que clínicamente presentaron datos de candidosis bucal
4. Se realizó un examen directo y cultivo en medio Sabouraud dextrosa agar mediante toma de muestra con asa micológica de la cavidad bucal, preparando la misma con una o dos gotas de KOH al 20% para su observación.
5. Se examinó directamente con el microscopio y se observó la muestra con diferentes aumentos para determinar la presencia de estructuras micóticas sugerentes de candidosis; pseudohifas y/o blastoconidios.
6. Se realizó un frotis de la colonia con azul de algodón para corroborar el desarrollo de *Candida* en el medio Sabouraud dextrosa agar mediante la observación de blastoconidios característicos de la especie.

7. El desarrollo obtenido se resembró en medios cromogénicos (CHROMagar™ *Candida*) para la búsqueda intencionada de más de una especie de *Candida*, por medio del crecimiento de colonias de diferentes colores.

8. Se resembraron las colonias diferenciadas por color en agar harina de maíz + Tween 80 al 1%. Posterior al desarrollo se observó si la cepa llevo a cabo la producción de pseudomicelio y clamidoconidios.

9. Se realizo la identificación de las cepas utilizando un sistema basado en asimilación de carbohidratos (AUXACOLOR™ 2 de BIO-RAD®)

10. Finalmente se realizó el espectro de sensibilidad de cada cepa identificada mediante un ensayo cualitativo en el que se estudió el crecimiento de las levaduras en presencia de 4 diferentes antimicóticos a 2 diferentes concentraciones, en un medio tamponado RPMI, en presencia de un indicador de óxido-reducción (FUNGITEST™ de BIO-RAD®)

Tabla 7. Características morfológicas de los diferentes medios de cultivo empleados en la tipificación convencional de las cepas de *Candida*. Pigmentación de las colonias en medio CHROM-agar y observación microscópica del desarrollo en medio Harina de Maíz + tween 80 al 1% después de 48 horas de incubación a 28°C.

Cepa 	CHROM-agar ^{1,26} 	Harina de Maíz + tween 80 al 1% ^{1,26} 
<i>C.albicans</i>	Verde -claro	Clamidoconidios intercalares o finales, unidos a una célula alargada de sostén, pseudohifas y cúmulos de blastoconidios
<i>C.dubliniensis</i>	Verde-oscuro	Blastoconidios en racimos y pseudohifas ramificadas con clamidoconidios finales que se agrupan en pares o en tripletes.
<i>C. glabrata</i>	Rosa pálido	Única especie que no forma pseudohifas. Abundantes blastoconidios
<i>C.krusei</i>	Rosa pálido con borde blanco y veloso	Pseudohifas ramificadas, gruesas y cúmulos de blastoconidios ovoides que parecen agruparse en forma de "palillos chinos"

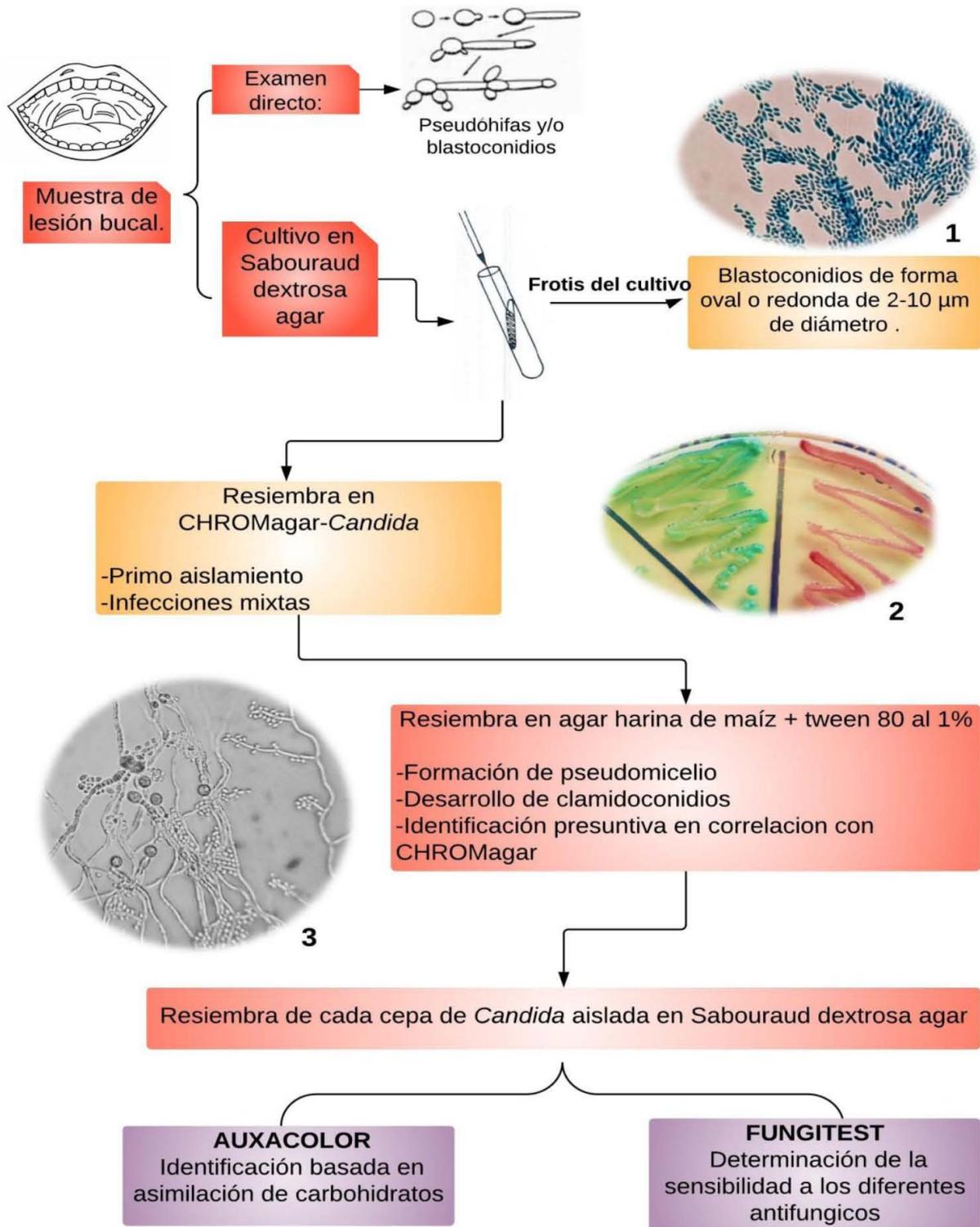


Figura 1. Esquema general del procesamiento de las muestras de cavidad bucal. Se muestra las resiembras necesarias para el aislamiento de las cepas, los medios utilizados, así como las pruebas realizadas a cada una de ellas. Fotos: 1 colonia de *Candida* 40X Azul de algodón. 2 colonias de *Candida* en CHROMagar. 3 Pseudomicelio y clamidoconidios en agar harina de maíz + Tween 80 al 1% 40X

AUXACOLOR: Inoculación de la microplaca

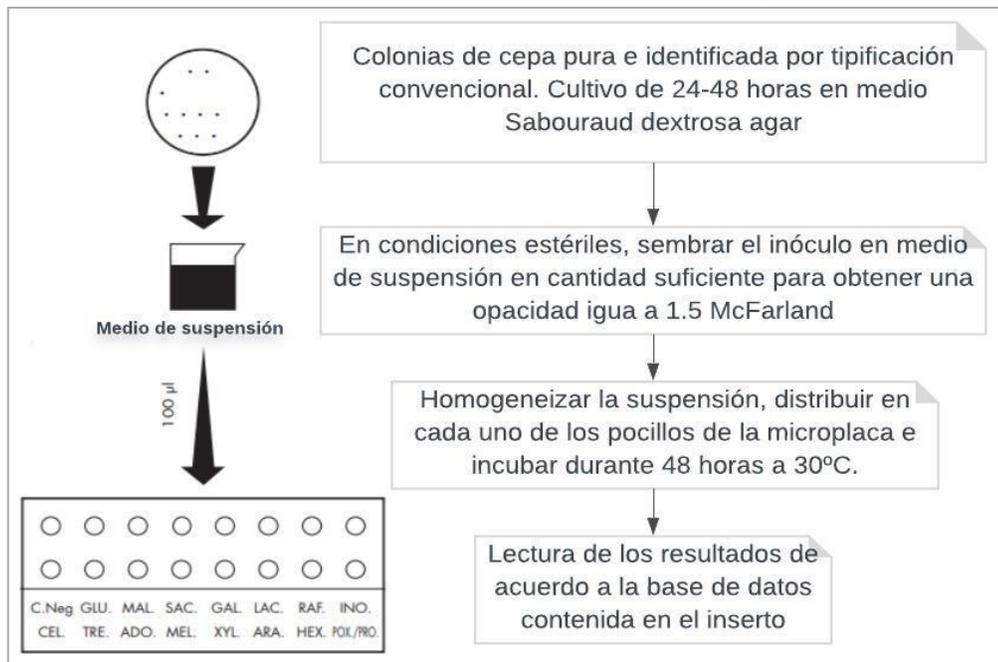


Figura 2. Esquema de la metodología indicada para la inoculación de la microplaca. Modificado del original BIO-RAD®⁶⁶

Tabla 8. Reactivos contenidos en la microplaca del AUXACOLOR™ 2 de BIO-RAD®. Guía de interpretación de las reacciones colorimétricas por el viraje de un indicador pH: púrpura de bromocresol.

	Pocillo	Prueba	Color	Interpretación
Control negativo	C. Neg	Control Negativo	Azul	
			Negativa	Positiva
Pruebas de asimilación de azúcares	GLU	Glucosa (control positivo)	Azul o Verde	Amarillo o Incoloro
	MAL	Maltosa		
	SAC	Sacarosa		
	GAL	Galactosa		
	LAC	Lactosa		
	RAF	Rafinosa		
	INO	Inositol		
	CEL	Cellobiosa		
	TRE	Trehalosa		
	ADO	Adonitol		
	MEL	Melezitosa		
XYL	Xylosa			
ARA	Arabinosa			
Pruebas enzimáticas	HEX	Determinación de la actividad N-acetilgalactosaminidasa (hexosaminidasa)	Incoloro	Amarillo
	POX	Detección de la actividad fenoxidasa (POX)	Incoloro o Gris	Marrón
	PRO	Detección de la actividad prolina-arilamidasa (PRO)		Amarillo

FUNGITEST: Inoculación de la microplaca

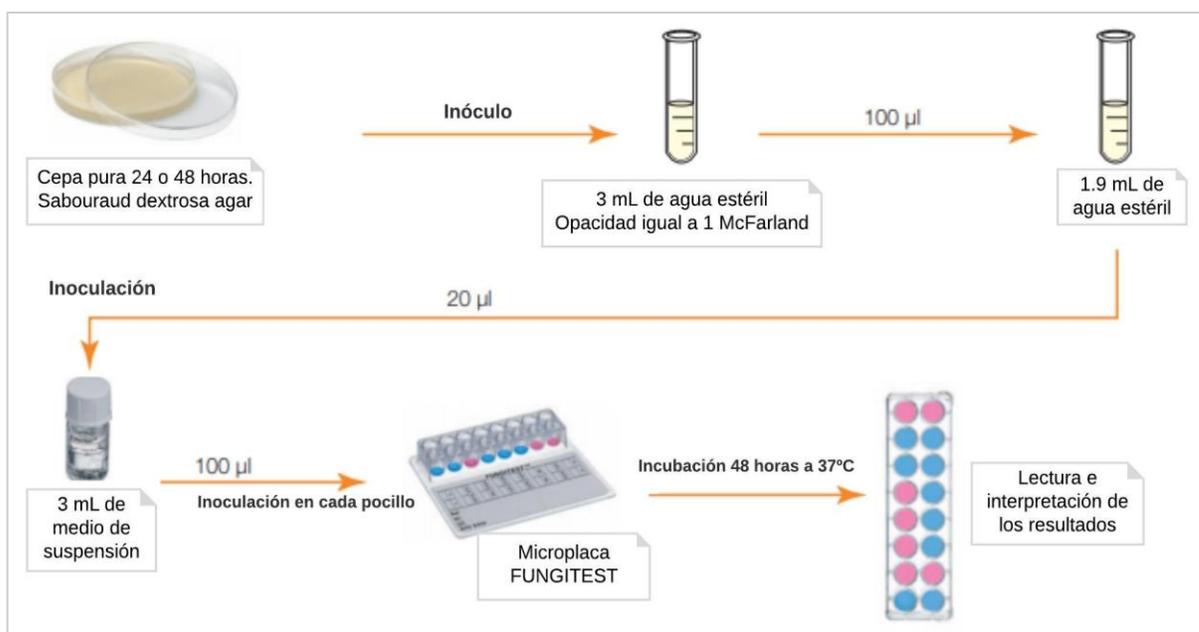


Figura 3. Esquema de la metodología indicada para la inoculación de la microplaca. Modificado del original BIO-RAD®⁶⁷

Tabla 9. Antimicóticos y concentraciones contenidos en la micro placa del FUNGITEST™ de BIO-RAD®.

Control positivo	
Anfotericina B (AB)	
2 µL	8 µL
Ketoconazol (KET)	
0.5 µL	4 µL
Itraconazol (ITR)	
0.5 µL	4 µL
Fluconazol (FLU)	
8 µL	64 µL
Control negativo	

Lectura e interpretación de los resultados:

-Solo se examinará la placa cuando los pocillos de control positivo (T+) sean color de rosa.

-Se observará cualquier cambio de color en los pocillos que contienen el agente antimicótico, en comparación con los pocillos negativos de control (color azul)

-Se interpretará de acuerdo con el color de los 2 pocillos de cada agente antimicótico:

- Azul- azul = Sin crecimiento. Cepa inhibida por el agente antimicótico *in vitro*: Sensible
- Rosa- azul = Crecimiento lento: Cepa intermedia
- Rosa- Rosa = Crecimiento. Cepa no inhibida por el agente antimicótico *in vitro*: Resistente

9. Análisis estadístico

Se realizará un análisis descriptivo para las variables: edad y tipo de paciente VIH/SIDA; consistente en obtener la media y los valores máximo y mínimo.

De las variables género, resultado del examen directo, tipo clínico de candidosis bucal, agentes etiológicos de la candidosis y tratamiento antifúngico, se obtendrá la distribución por frecuencia absoluta y relativa medida ésta como proporción.

El análisis gráfico consistirá en obtener la gráfica de barras y de sectores para las variables cualitativas y el histograma para las variables cuantitativas.

Con el objeto de detectar alguna asociación entre variables cualitativas se obtendrá su tabla de contingencia y el estadístico de prueba será la clásica Ji-cuadrada de Pearson

Para el procesamiento de la información se elaborará una base de datos en Excel, de Microsoft, y el análisis estadístico se realizará con el paquete computacional Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 22.

10. Relevancia y expectativas

Este estudio brindará información que amplíe el conocimiento de: la frecuencia de candidosis bucales mixtas en pacientes con VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo en la etapa clínica C3 de dicha enfermedad, las especies de *Candida* que conforman tales infecciones, los espectros de sensibilidad de cada especie presente en la muestra biológica, la relación de esta micosis oportunista con el estadio clínico específico de los pacientes a estudiar y la variedad clínica de candidosis en los mismos.

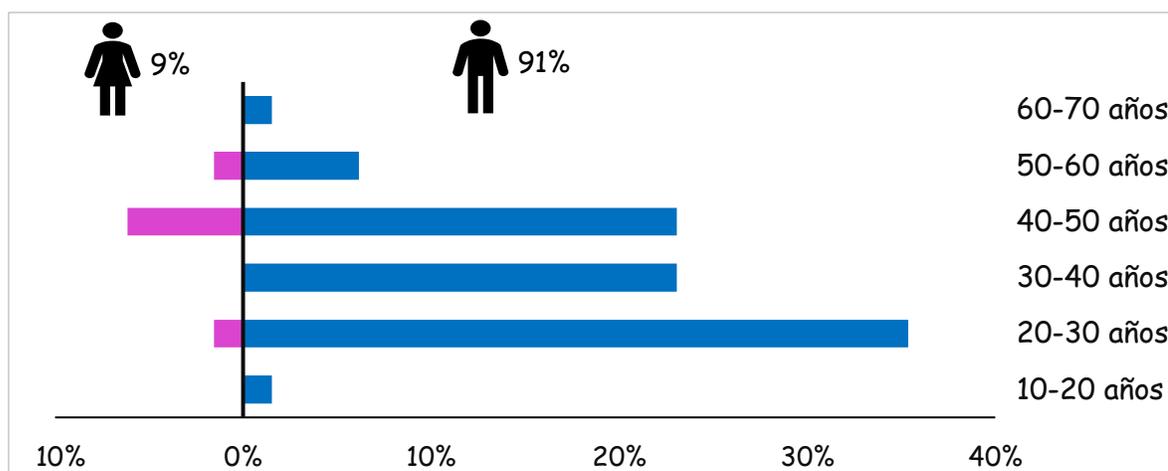
Conocer el patrón de sensibilidad a fármacos de cada especie de *Candida* en las muestras biológicas obtenidas de los pacientes, puede tener un efecto trascendental en la respuesta terapéutica a los diversos fármacos antimicóticos, así como en el tiempo de tratamiento y las complicaciones del cuadro clínico.

11. Resultados

El periodo de tiempo durante el cual se llevó a cabo el reclutamiento de pacientes fue de agosto de 2017 a marzo de 2018.

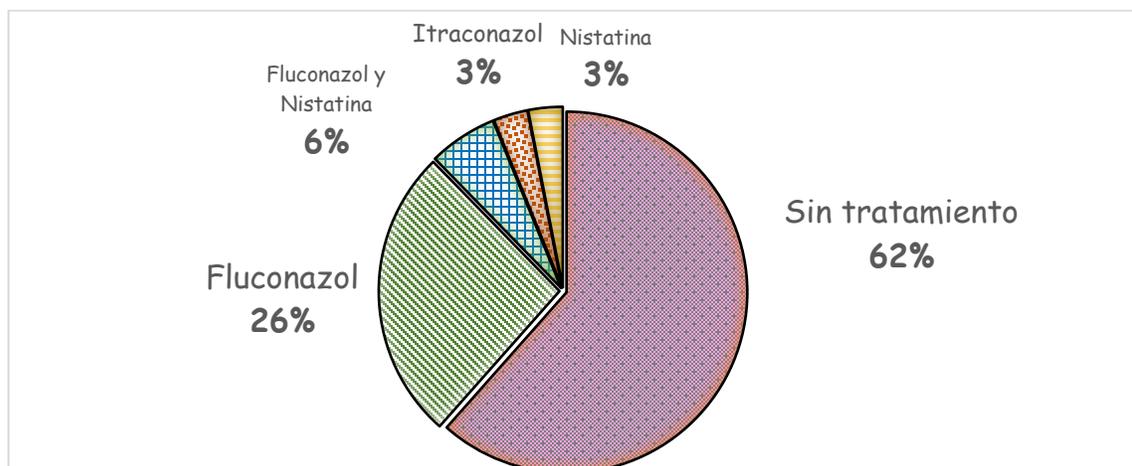
De los 65 pacientes participantes en el protocolo, 59 (91%) fueron del género masculino y 6 (9%) del género femenino. En cuanto a la edad se refiere, la media fue de 36 años con un valor máximo de 62 años y mínimo de 19 años cumplidos. La distribución por género y rango de edad se muestra en la gráfica 1.

Gráfica 1. Distribución de pacientes en porcentaje por rango de edad y género.



Con respecto a los fármacos antifúngicos en la gráfica 2 podemos observar que 40 (62%) pacientes no habían tomado terapia con antimicóticos, 17 (26%) habían tomado fluconazol, 4 (6%) fluconazol acompañado de nistatina, 2 (3%) itraconazol y los 2 (3%) restantes nistatina

Gráfica 2. Tratamientos antimicóticos usados por los pacientes.



Todos los pacientes participantes en el protocolo se encontraban en el estadio C3 de la enfermedad, el porcentaje sin TARV fue de 68% mientras que el 32% restante dejó de tomar la terapia antirretroviral.

Se realizó una comparación de grupos entre pacientes sin TARV y aquellos que abandonaron el tratamiento para determinar si existe relación entre estos diferentes estatus y el resultado al examen positivo de las muestras tomadas a cada paciente, la gráfica de esta comparación se presenta a continuación:

Gráfica 3. Resultados obtenidos al examen directo entre pacientes sin TARV vs Abandono de tratamiento
En azul se esquematiza el porcentaje de pacientes con candidosis confirmada al examen directo vs. los resultados de examen directo negativo (verde).

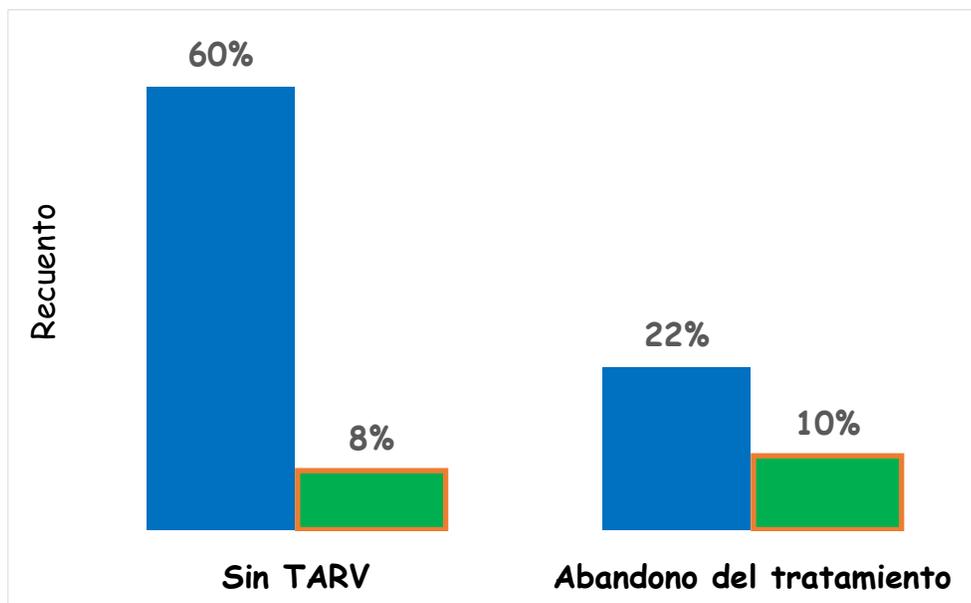


Tabla 10. Prueba de Chi-cuadrado: Estatus VIH del paciente * Resultado del examen directo (tabulación cruzada).

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	4,558 ^a	1	,033		
Corrección de continuidad ^b	3,215	1	,073		
Razón de verosimilitud	4,292	1	,038		
Prueba exacta de Fisher				,045	,039
Asociación lineal por lineal	4,488	1	,034		
N de casos válidos	65				

a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,88.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Dentro de la variedad clínica la que se presentó con mayor frecuencia fue la candidosis bucal pseudomembranosa (frecuencia 59), en menor proporción las variedades atrófica aguda y crónica hiperplásica con una frecuencia de 3 para cada una.

Gráfica 4. Distribución de variedad clínica de candidosis

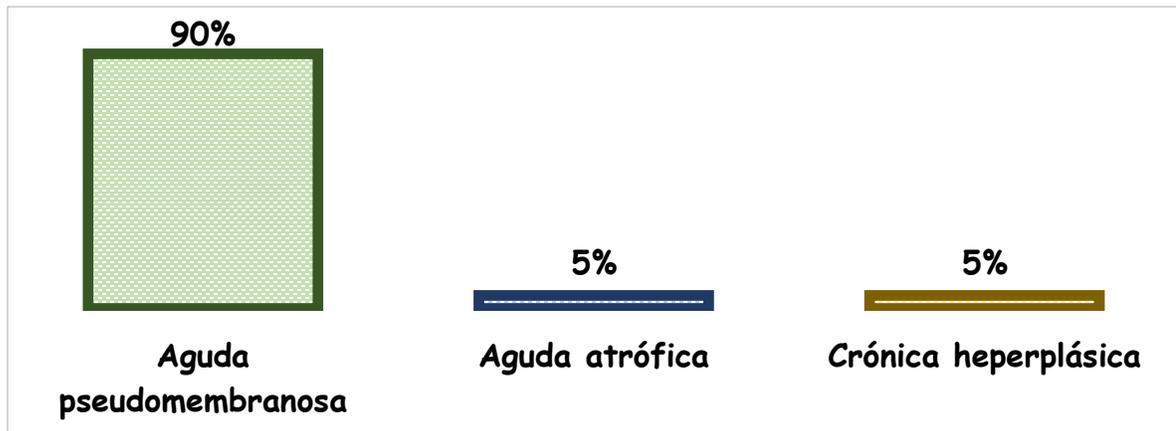


Figura 4. Pacientes con candidosis bucal, variedad pseudomembranosa: Morfología característica de placas blanquecinas y cremosas

De los 65 pacientes a los que se realizó toma de muestra se diagnosticó con candidosis a 53 mediante hallazgos clínicos y microscópicos al examen directo, los 12 restantes se consideraron como negativos. De los pacientes con candidosis confirmada se obtuvo desarrollo en medios de cultivo en 48 muestras.

Gráfica 5. Representación de la distribución de pacientes en estudio con diagnóstico de candidosis y negativos para el mismo. La barra con relleno sombreado representa el número de muestras en los cuales se obtuvo desarrollo de *Candida sp* en medios de cultivo.

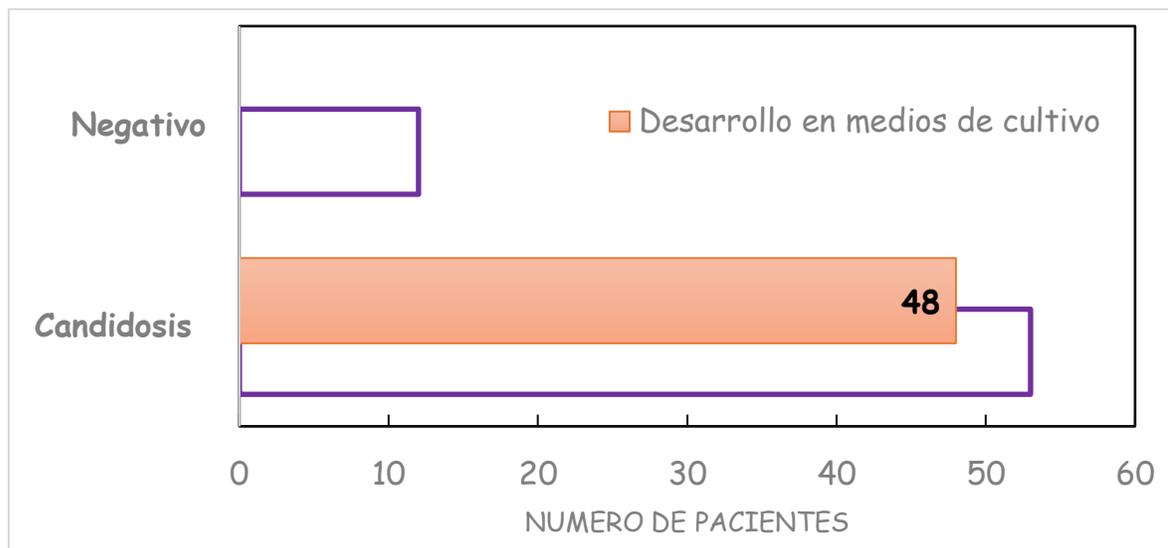


Figura 5. Pseudohifa de *Candida sp* en examen directo con KOH (40X) de muestra bucal

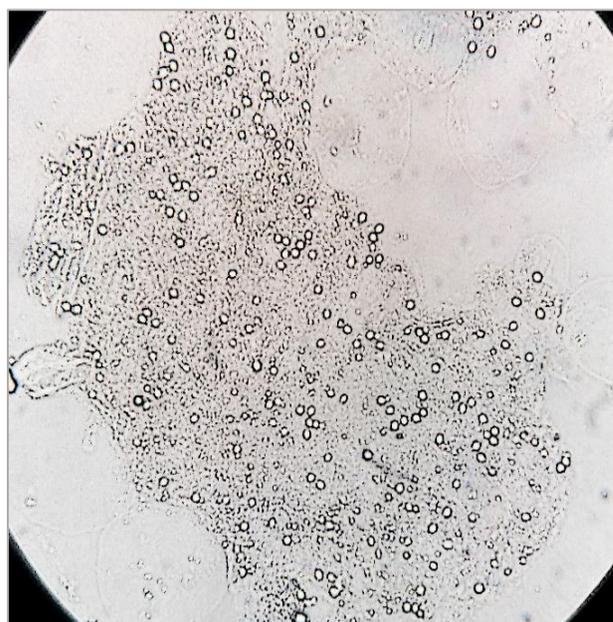
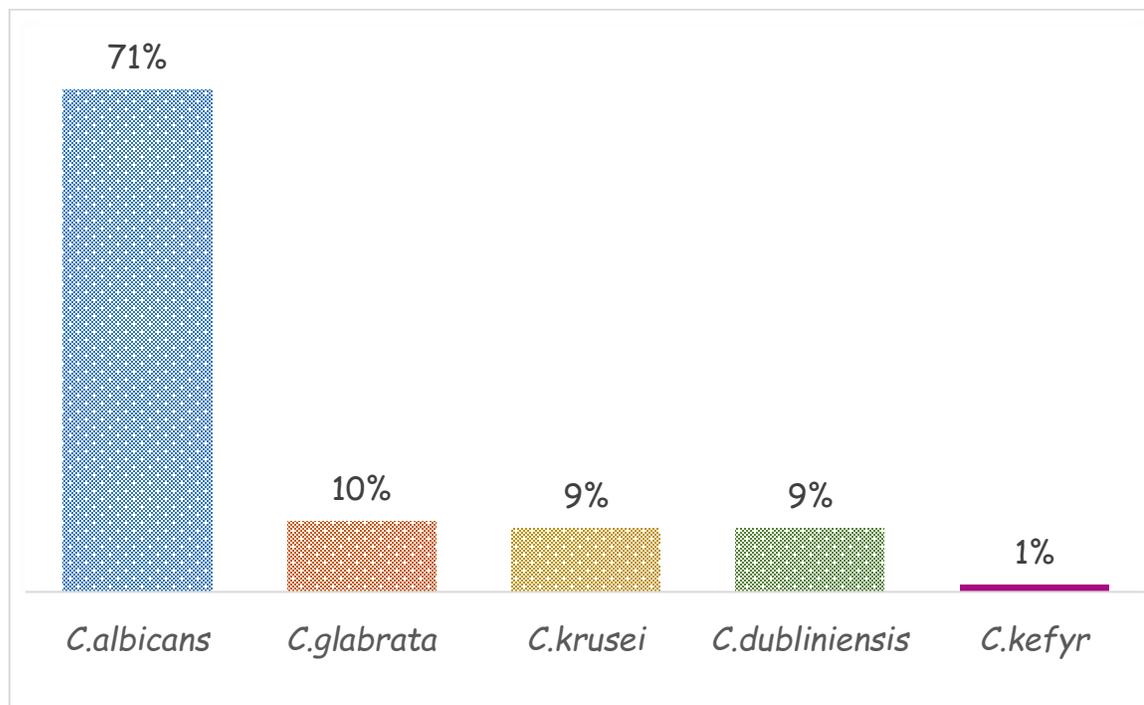


Figura 6. Se observa parasitación de *Candida sp*. La imagen corresponde a cúmulos de blastoconidios.

En la gráfica No. 6 se puede observar la especie y cantidades en las que se encontraron un total de 58 cepas de *Candida sp*; de las cuales 41 (71%) correspondían a la especie *C. albicans*, seguidas por *C. glabrata* con frecuencia de 6 (10%), *C. krusei* (9%) y *C. dubliniensis* (9%) con frecuencia de 5 cada una y finalmente *C. kefyr* (teleomorfo: *Kluveromyces marxianus*) con 1 cepa (1%).

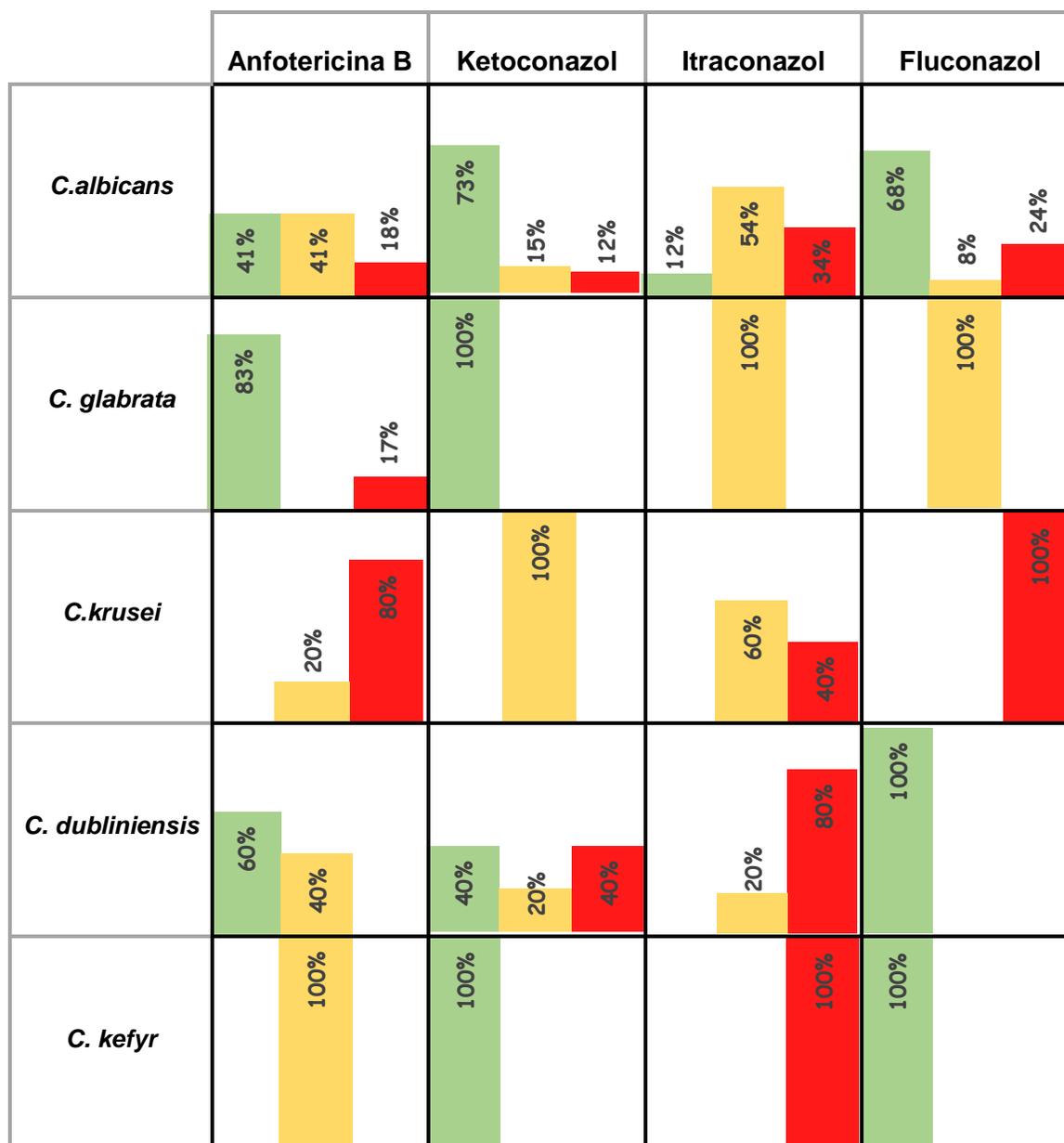
Gráfica 6. Proporción de especies de *Candida sp.* presentes en las muestras.



Para cada cepa se determinó la sensibilidad *in vitro* a diferentes fármacos antifúngicos: Anfotericina B, Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol, utilizando el kit comercial FUNGITEST™.

Esta prueba brinda resultados cualitativos con respecto al desarrollo del hongo frente a diferentes antimicóticos, clasificando a la cepa en estudio como sensible, intermedia o resistente según sea el caso. El resultado de las pruebas se presenta en la tabla 11.

Tabla 11. Sensibilidad antifúngica del total de cepas en estudio a los fármacos utilizados como tratamiento de candidosis bucal.



En el cuadro correspondiente de cada especie frente a un antimicótico específico se presenta con número el porcentaje de cepas **sensibles** ★ **intermedias** ★ **resistentes** ★

Con el total de cultivos en donde se obtuvo desarrollo de *Candida sp* se determinó por el desarrollo en medio cromogénico (CHROM-agar Candida™) la presencia de candidosis mixtas en 9 muestras. La relación de las especies encontradas se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Cepas relacionadas con candidosis mixtas y número de casos encontrados

Candidosis mixtas	Cepas de <i>Candida sp</i>
5	<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>
1	<i>C. albicans</i> + <i>C. kefyr</i>
3	<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>

La proporción en la cual se presentaron candidosis mixtas corresponde a un 17% (gráfica 7) en relación con las infecciones confirmadas con hallazgos microscópicos y cultivos con desarrollo de *Candida sp*.

Gráfica 7. Proporción de candidosis mixtas identificadas en muestras bucales.

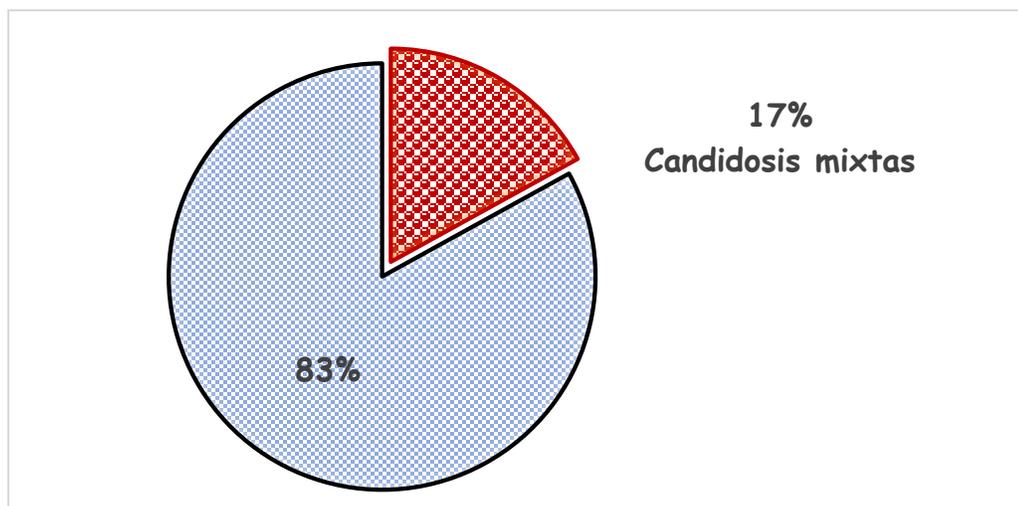
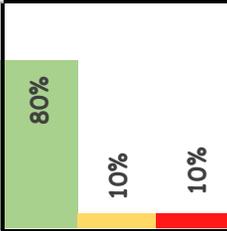
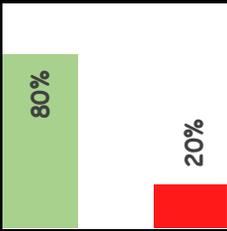
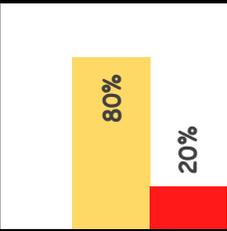
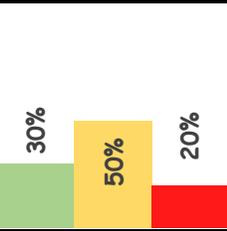
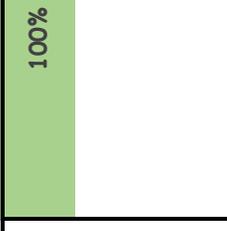
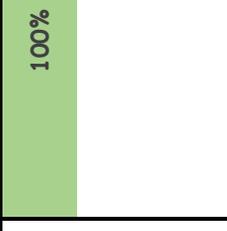
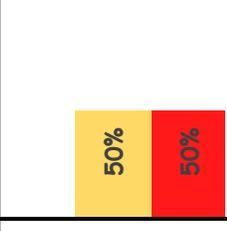
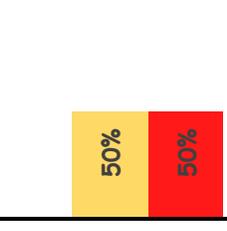
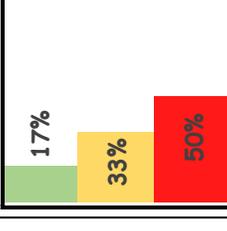
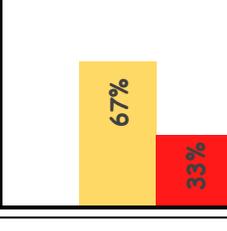
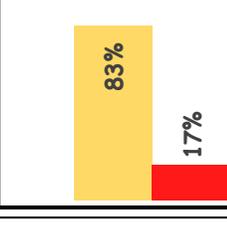
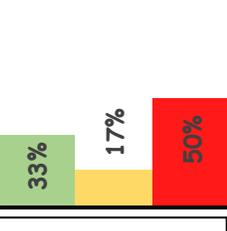


Tabla 13. Sensibilidad antifúngica a los fármacos utilizados como tratamiento de candidosis bucal de las cepas correspondientes a las diferentes combinaciones de candidosis mixtas encontradas en el estudio.

	Anfotericina B	Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazol
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>				
<i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i>				
<i>C. albicans</i> + <i>C. kefyr</i>				

En el cuadro correspondiente de cada candidosis mixta frente a un antimicótico específico se presenta con número el porcentaje de cepas **sensibles** ★ **intermedias** ★ **resistentes** ★

12. Discusión

En el presente estudio se investigó la parasitación de la cavidad bucal por especies del género *Candida* en pacientes VIH-SIDA en estadio C3 de la enfermedad hospitalizados en la unidad 405-Infectología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". Se observa que el promedio general de edad en los pacientes es de 35.98 ± 10.39 coincidiendo con lo reportado en países como Brasil (39.38 ± 12.34) y Tanzania (34) ^{27, 28}

Con respecto al género de los pacientes se encontró una considerable diferencia con lo reportado por los estudios antes mencionados donde la población femenina representa el 50% del total e incluso hasta un 75%. Lo observado en este trabajo muestra un predominio de pacientes masculinos alcanzando hasta un 90% de la población en estudio; lo cual tiene estrecha coincidencia con el reporte de casos de SIDA en México, el cual hasta 2017 fue de 24,916 hombres notificados frente a 3,010 casos de mujeres en la ciudad de México.²⁹

En cuanto a la variable asociada al uso de fármacos antifúngicos como profilácticos, no se observó correlación con la frecuencia de presentar resistencia en las cepas de los hospederos a causa principalmente del porcentaje de participantes en el estudio que no habían tomado ningún antimicótico (62%). Sin embargo, en estudios realizados en Francia²⁴ se observa un cambio en la sensibilidad de cepas de *Candida sp.* por el uso generalizado de fármacos azólicos empleados (como agentes profilácticos o terapéuticos); donde se reporta mayor frecuencia en la resistencia de cepas a fluconazol después de tratamientos recientes (≤ 30 días) con un riesgo relativo de 2.17 con un intervalo de confianza del 95%. ²⁴

Los pacientes incluidos en este estudio se encontraban clínicamente clasificados en la categoría C3 de la enfermedad, la cual incluye personas que tienen infección por VIH demostrada y agregada otra de tipo oportunista, dentro de los cuales la candidosis resulta ser marcadora de la enfermedad ya que llega a presentarse hasta en un 90% de los casos en individuos sin TARV ³⁰, el porcentaje de la población en estudio que no había recibido dicha terapia fue de 68% es decir eran pacientes de recién diagnóstico.

Con los datos obtenidos en este estudio se determinó que existe una asociación estadísticamente significativa entre los pacientes sin TARV y el diagnóstico de infección por *Candida sp.* en cavidad bucal con un valor de $p=0.03$ a un nivel de significancia de 5%. En un estudio similar al ser evaluada la candidosis bucal entre pacientes VIH con y sin TARV se encontró un valor de riesgo relativo de 2.6 a desarrollar la infección en los pacientes que no estaban bajo terapia. ³¹

Sin embargo, la vigilancia de pacientes que interrumpieron la TARV con respecto a infecciones oportunistas como candidosis, debe considerarse con igual importancia debido a que cuando dicha terapia se interrumpe ocurre un rápido rebote de la carga viral y una caída en el conteo absoluto de células T CD4⁺; la reducción ocurre de manera habitual a razón de 100 a 150 céls./mL en 3 ó 4 meses.³²

En diversos estudios se relaciona de forma importante los parámetros de carga viral y conteo de células T CD4⁺ con la prevalencia de infección por *Candida sp.* en pacientes VIH. En un estudio realizado en India se observó que el recuento de linfocitos T CD4⁺ de pacientes con lesiones bucales fue menor que en los pacientes sin lesiones, por lo que la candidosis bucal se correlacionó significativamente con un número de células de 200 céls/mm³ o inferior.³³ Otro estudio realizado en España indicó que la relación con la carga viral de más de 10, 000 copias/mL. se asocia a mayor frecuencia de la infección (independientemente del recuento de células T CD4⁺).³⁴ En ambos estudios se concluye que la presencia de candidosis bucal permanece como un marcador clínico útil para diagnosticar el inmunocompromiso en pacientes VIH.

La forma clínica de la que más se tuvo hallazgo corresponde a la aguda pseudomembranosa lo cual coincide con lo reportado en la mayoría de la literatura, en esta se observan placas bien definidas de borde blanco o amarillento. En otras publicaciones se reporta como segunda variedad clínica de importancia la aguda atrófica³⁵; nosotros la observamos en el 5% de los casos acompañada en porcentaje de la variedad hiperplásica crónica.

En diversos estudios se ha observado que la especie con mayor predominio en muestras bucales es *C. albicans* (60-80%) tanto en pacientes VIH y relativamente sanos⁷. En la población de estudio se comprobó tal frecuencia; se observó esta especie en un 71% de los aislamientos. Las especies de *Candida* no-*albicans* se encontraron en el 29% restante de los aislamientos, de los cuales *C. glabrata* se observó en segundo lugar (10%), seguida de *C. krusei* y *C. dubliniensis* (9% cada una) y finalmente *C. kefyr* (1%). No se obtuvo aislamiento de *C. tropicalis* en ninguna muestra, tal hecho contrasta con lo reportado en otros estudios de población con pacientes similares donde esta especie alcanza el segundo lugar de prevalencia con el 18.75%³⁶.

En relación con la prevalencia de *C. glabrata* cabe destacar que en la mayor parte de las muestras donde se obtuvo se encontraba acompañada de *C. albicans* (5 pacientes). Dicha asociación fue la más frecuente de pacientes portadores de dos especies, de igual forma que lo reportado en 2016 por Clark en Baja California.⁷ Esta especie era considerada relativamente no-patógena, pues es parte de la microbiota normal de humanos sanos. Sin embargo, dicha levadura puede diseminarse rápidamente por todo el cuerpo y la infección causada por esta especie se asocia con una alta tasa de mortalidad.⁵

C. krusei estuvo relacionada con candidosis mixta en 3 pacientes siempre en asociación con *C. albicans*. Estudios en Brasil reportaron que esta interacción puede llegar a ser antagónica (demostrado sólo en la formación de biopelículas) donde se observó que *C. krusei* inhibió el crecimiento de *C. albicans*.⁵

C. dubliniensis se reportó en 5 pacientes (9%), esta especie se ha aislado de sujetos con VIH/SIDA en otros países ³⁷; la mayor parte de las publicaciones menciona una frecuencia menor al 10%. La importancia del hallazgo de esta especie se encuentra en conocer su distribución geográfica, el perfil de sensibilidad (ya que ha demostrado ser capaz de desarrollar resistencia *in vitro* a fluconazol) ³⁸ y finalmente la tipificación de la especie como tal, debido a que por sus características fenotípicas similares a *C. albicans* pueden confundirse en la identificación.

C. kefyr se aisló de un solo paciente y en asociación con *C. albicans*. Se considera una especie que raras veces causa enfermedad, prospera en diversos hábitats, incluidos productos lácteos (como el yogurt y el kéfir, de donde proviene su nombre). Se ha demostrado que es menos virulento que *C. albicans* o *C. tropicalis*.³⁹ Sin embargo, un estudio retrospectivo en E.U.A concluyó que *C. kefyr* es un importante agente patógeno emergente en pacientes con neoplasias hematológicas malignas que sugieren puede adquirirse por exposición exógena.⁴⁰ De las cepas aisladas ésta es la única que tiene una forma ascosporada homotética, por lo que su nombre se puede asociar a *Kluveromyces marxianus*.

En este estudio se comprobaron 9 casos de candidosis mixtas de un total de 53, lo que corresponde a un 17%. En comparación con lo reportado en la literatura (3-6%)^{4,7} el número de hallazgos encontrados es mucho mayor; las principales diferencias en relación con estos estudios son el tipo de pacientes. En uno de ellos donde las muestras analizadas no correspondían a individuos con enfermedad por VIH/SIDA, los porcentajes observados son menores y la topografía clínica que reporto mayor frecuencia fue la pulmonar ⁴; por otro lado investigaciones con población que si estaba infectada con VIH no tenían criterios para estudiar a pacientes en alguna etapa específica del SIDA y la recolección de muestras no se guiaba de criterios clínicos para el diagnóstico de candidosis ya que sólo se deseaba estudiar la prevalencia de las levaduras en cavidad bucal.⁷

Sin embargo, en 2015 una investigación realizada en Tailandia reportó valores similares de candidosis mixtas (16%) en un estudio en el cual los pacientes no estaban infectados con VIH, pero si tenían signos clínicos para el diagnóstico de la infección por *Candida sp.*⁴¹

Para la comprensión de la candidosis en cavidad bucal se requiere de consideraciones desde el punto de vista micológico y de factores predisponentes en el estado inmunológico de pacientes con VIH/SIDA. Con respecto a los factores de virulencia de *Candida sp.* la mayor parte de las especies tiene la capacidad de generar cambio morfológico de blastoconidio a pseudohifa (forma de adaptación y penetración a epitelios y células endoteliales.)¹ aunado a la hidrofobicidad de

superficie celular (CSH) la cual se define como la fuerza que mantiene una distancia óptima entre las moléculas de adhesión y receptores del hospedero, que conducen a una unión fuerte y finalmente adherencia a mucosas u otros sustratos. Valores relativos altos de CHS fueron reportados para especies no-albicans (*C. glabrata* principalmente) y se relacionó como un factor importante en la formación de biopelículas para este tipo de cepas.⁴¹ En relación a la inmunidad del hospedero, el análisis de diversos datos sugiere que las células T CD4⁺ son críticas para la defensa del hospedero frente a la infección por *Candida sp.* de igual manera las células epiteliales, que se ha demostrado inhiben hasta un 80% del crecimiento de especies de levaduras a través del contacto celular como un mecanismo de protección innato que bajo actividad reducida contribuye al desarrollo de la infección.⁴²

En este trabajo se realizaron pruebas *in vitro* con la finalidad de determinar la resistencia microbiológica a 4 diferentes fármacos: Anfotericina B, Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol.

En este estudio observamos que la sensibilidad de las levaduras de *Candida* a Fluconazol tiene un espectro variable dependiendo de la especie: en el caso de *C. albicans* alrededor del 30% de las cepas presento resistencia *in vitro*, lo reportado es cercano al 3% o incluso hasta 22% en cepas de pacientes con SIDA.⁴³ En las cepas de *C. glabrata* se obtuvo un espectro de sensibilidad intermedio para todos los aislamientos, aunque en otros estudios se ha llegado a reportar que la cepa puede alcanzar una tasa de resistencia global del 15.7%.⁸ *C. krusei* es intrínsecamente resistente a fluconazol^{1,8}, cuyo patrón en las cepas observadas en este estudio no fue diferente. *C. dubliniensis* y *C. kefyr* mostraron sensibilidad en ambos puntos de corte.

En relación al espectro de sensibilidad a Itraconazol de *C. dubliniensis* y *C. kefyr* se observó un alto porcentaje de resistencia (mayor a 90% en cada caso). En las cepas de *C. albicans* y *C. krusei* se observó resistencia en alrededor del 30% y el porcentaje restante resultó ser dosis dependiente. A diferencia de los otros dos azóles utilizados para las pruebas, el Itraconazol obtuvo los mayores porcentajes de resistencia en este estudio.

Para el Ketoconazol la mayor parte de las cepas resultó ser susceptible, sólo se observó una resistencia de 12% de cepas de *C. albicans* y de 40% de *C. dubliniensis*.

La resistencia de las cepas de *Candida* a los diversos azóles es un riesgo potencial si se toma en consideración el uso de estos fármacos en el tratamiento de pacientes con inmunosupresión, su uso indiscriminado como profilácticos o durante episodios repetidos de candidosis bucal y los diferentes mecanismos de resistencia que puede llegar a desarrollar cada cepa.

En este estudio, la prevalencia de fenotipos de resistencia a Anfotericina B en las cepas de *Candida* aisladas fue generalmente baja, sin embargo, como dato relevante es importante considerar que el 80% de las cepas aisladas de *C. krusei* resultaron tener resistencia *in vitro*. La Anfotericina B es utilizada como monoterapia en casos severos de candidosis oral y la resistencia a este fármaco es poco común, en aislados clínicos oscila entre el 0.4 y 4%.⁴⁴ Los pacientes con cepas resistentes a polienos se encuentran en un estado de salud severamente comprometido (SIDA, leucemia, anemia, trasplante de medula ósea). Los estudios en relación con mecanismos de resistencia a polienos sugieren una asociación con el bloqueo en la vía de síntesis de los esteroides, provocando una acumulación de intermediarios que presentan menor afinidad a los polienos que al ergosterol.⁴⁵

13. Conclusiones

Se encontró una frecuencia general de candidosis mixtas bucales de 17% en pacientes VIH/SIDA sin TARV previo o casos de abandono del mismo.

La variedad clínica con mayor presencia resulto ser la aguda pseudomembranosa con el 90% de los casos, en menor proporción se observaron las variedades agudas atrófica y crónica hiperplásica con un 5% respectivamente.

El uso de fármacos antifúngicos no presentó relación alguna con el desarrollo de resistencia microbiológica por parte de las cepas aisladas en este estudio.

Existe una asociación estadísticamente significativa entre los pacientes sin TARV y el diagnóstico de infección por *Candida sp.* en cavidad bucal.

La proporción de especies de *Candida* en este estudio fue: *C. albicans* 71%, *C. glabrata* 10%, *C. dubliniensis* 9%, *C. krusei* 9% y *C. kefyr* 1%.

Los aislados de *Candida no-albicans* presentan mayor frecuencia de fenotipos de resistencia y respuesta dosis dependiente que los aislados de *C. albicans*.

El fármaco con el cual el mayor porcentaje de cepas resultaron sensible *in vitro* fue Anfotericina B.

El fármaco con el cual el mayor porcentaje de cepas resultaron resistente *in vitro* fue Itraconazol.

14. Referencias

1. Bonifaz A. Micología médica básica. 5a ed. México: McGraw-Hill, 2017; 321-347.
2. Odds F, Bornaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 1994; 32(8):1923–9.
3. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol. 2008; 25(2):78–82.
4. Romero G, Araiza J, Hernández M, Cerón M, Hernández V, Ponce R, et al. Candidosis mixtas en aislamientos clínicos de pacientes procedentes del hospital general de México Dr. Eduardo Liceaga; identificación e importancia. Dermatología Rev Mex. 2014; 58(3):239–246.
5. Santos J, Piva E, Vilela S, Jorge A, Junqueira J. Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. Braz Oral Res. 2016; 30(1):1–8.
6. Nucci M, Marr K. Emerging Fungal diseases. Emerging Infectious Disease Journal. 2005; 41(4), 521-526.
7. Clark-Ordoñez I. Epidemiología molecular y resistencia a antifúngicos de *Candida spp.* en pacientes con VIH/SIDA en el estado de Baja California México [dissertation]. México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada; 2016. 10 p
8. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. Mycoses. 2015; 58(2):1–13.
9. Hazen K. New and emerging yeast pathogens. Clinical Microbiology Reviews. 1995; 8(4): 462- 478.
10. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 2001; (147):1997- 2005.
11. Ramesh N, et al. Virulence Factors and Anti-Fungal Sensitivity Pattern of *Candida sp.* Isolated from HIV and TB Patients. Indian J Microbiol. 2011; 51(3):273-8.
12. Castrillón L, Palma A, Desgarennes C. Factores de virulencia en *Candida spp.* Dermatología Rev Mex 2005; 49:12-27.
13. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilms disease. Crit Rev Microbiol. 2011 Nov; 37(4):328-36.
14. Guidelines on the treatment of skin and oral HIV-associated conditions in children and adults, WHO; 2014.
15. Fernández J, Diz P, Otero X, Limeres J, De La Fuente J, Ocampo A. Valor predictivo de la candidiasis oral como marcador de evolución a SIDA. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005; 10(1):32–40.

16. Castro L, Álvarez M, Martínez E. Pseudomembranous Candidiasis in HIV/AIDS Patients in Cali, Colombia. *Mycopathologia*. 2013; 175(1-2):91-8.
17. Patton L, Phelan J, Ramos F, Nittayananta W, Shiboski C, Mbuguye T. Prevalence and classification of HIV-associated oral lesions. *Oral Dis*. 2002; 8(2):98-109.
18. Petruzzi M, Gonçalves F, Gonçalves K, Z. de Figueiredo M. Epidemiological characteristics and HIV-related oral lesions observed in patients from a Southern Brazilian city. *Rev Odonto Cienc* 2012; 27(2):115-120.
19. Rubaihayo J, et al. Frequency and distribution patterns of opportunistic infections associated with HIV/AIDS in Uganda. *BMC Res Notes*. 2016; 9(1):501
20. Sharma G, Oberoi S, Vohra P, Nagpal A. Oral manifestations of HIV/AIDS in Asia: Systematic review and future research guidelines. *J Clin Exp Dent*. 2015; 7(3): 419-27.
21. Thompson R, Patel K, Kirkpatrick R, Westbrook D, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010; 109(4):488–95.
22. Hoehamer C, Cummings E, Hilliard G, Morschhäuser J, Rogers P. Proteomic analysis of Mrr1p-and Tac1p-associated differential protein expression in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Proteomics Clin Appl*. 2009; 3(8):968–78.
23. Pagani L, Chave P, Casjka C, Galuser P, Bille J. Efficacy, Tolerability and development of resistance in HIV-positive patients treated with fluconazole for secondary prevention of oropharyngeal candidiasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 50:231–40.
24. Sanglard D, Odds F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002; 2(2): 73-85.
25. Argimon J, Jiménez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3° ed. España: Elviesier; 2004; 140-150.
26. Ellis D. Description of Medical Fungi. 2°ed. Australia: ISHAM; 2007.
27. Hamza O, Matee N, Moshi J, Simon E, Mugusi F, Mikx F, Helderma W, Rijs A, Verweij E. Species distribution and in Vitro antifungal susceptibility of oral yeasts isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BioMed Central Microbiology*. 2008; 8(6): 135-143.
28. Gasparin A, Ferreira F, Danesi C, Mendoza-Sssi R, Silveira J, Martínez B, Zhang L, Juraci A. Prevalence of oral lesions in persons with HIV and associated factors in a southern Brazilian city *Cad. Saúde Pública*. 2009; 25(6):1307-1315.
29. Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH y el SIDA. Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de VIH y SIDA, Actualización al 4to. trimestre del 2017

30. González A, Tobón A. Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. *Infectio*. 2006; 10(4): 279–288.
31. López S, Torrecilla A, Horta A, Andrade J, Bologna R. La candidosis bucal como marcador clínico de falla a la terapia antirretroviral altamente efectiva en pacientes infectados con VIH/SIDA. *Infectio*. 2014;18 (2):45-49
32. Noda A, Vidal L, Pérez J, Cañete R. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. *Revista Cubana de Medicina*. 2013; 52(2):118-127.
33. Bodhade A, Ganvir S, Hazarey V. Oral manifestations of HIV infection and their correlation with CD4 count. *Journal of Oral Science*. 2011; 53(2):203-2011
34. Campo J, Del Romero J, Castilla J, García S, Rodríguez C, Bascones A. Oral candidiasis as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med*. 2002; 31:5-10
35. Harris J, Herrera A. Candidiasis bucal en pacientes VIH/SIDA asociada a niveles de linfocitos T CD4 y terapia antirretroviral. *Rev Cubana Estomatol*.2016;52(1)
36. Garzón C, Gutierrez L, Salazar C, Barrientos S, Romero C. Especies de *Candida* en relación con el conteo de CD4 en pacientes con VIH-SIDA. *Univ Odontol*. 2008; 27(59):29-33.
37. Coleman D, Rinaldi M, Haynes K, Rex J, Summerbell R, Anaissie E, Sullivan D. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology*. 1998; 36(1):156-165
38. Dilek S, Gonca E, Zayre E. The antifungal susceptibilities of oral *Candida* spp. Isolates from HIV-infected patients. *Afr Journal Microbiol Research*. 2010;4(6):466-470
39. Arendrup M, Horn T, Frimodt-Moller N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection*. 2002; 30:286-291.
40. Dufresne S, Marr K, Sydnor E, Staab J, Karp J, Lu K, Zhang S, Lavallée C, Perl T, Neofytos D. Epidemiology of *Candida kefyr* in Patients with Hematologic Malignancies. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):1830-1837.
41. Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives Oral Biology* 2014;59(3):894-901
42. Fidel P. *Candida*-Host Interactions in HIV Disease: Relationships in Oropharyngeal Candidiasis. *Adv Dent Res*. 2006; 19:80-84
43. Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*. 2010; 4 (2):172-180
44. Dick, J, Merz, W, Saral R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980; 18(1):158-163.

45. Borecká M, Moran G, Sullivan D, Kucharíkova S, Chorvát D, Bujdáková M. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. *Mycoses*, 2008; 52(2): 118-128.
46. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78:455-459
47. Mohammed A, Fattani A, Douglas J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role drug resistance *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55:999-1008
48. Carré N, Boufassa F, Hubert JB, Chavance M, Rouzioux C, Goujard C, Laurian Y, Meyer. Predictive value of viral load and other markers for progression to clinical AIDS after CD4+ cell count falls below 200/ μ L. *International Journal of Epidemiology*. 1998; 27: 897-903.
49. Coogan M, Greenspan J, Challacombe S. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005; 83 (9):700-706
50. Darouiche R. Oropharyngeal and Esophageal Candidiasis in Immunocompromised Patients Treatment Issues. *Clinical Infectious Diseases*. 1998; 26: 259-74
51. Delgado W, Aguirre J. Las micosis orales en la era del sida. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 14-22
52. Dronda F, Saenz M, Laguna F, Chaves F, Martínez J, Rodríguez J, González A, Valencia E. Mixed Oropharyngeal Candidiasis due to *Candida albicans* and Non-*albicans Candida* Strains in HIV-Infected Patients. *Eur.J.Clin Microbiol. Infect Dis*. 1996; 15: 446-452.
53. García C, Sarrion M, Bagán J. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal section: Oral Medicine and Pathology*. 2014; 6(5):576-582
54. Glick M, Muzyka B, Lurie D, Salkin M. Oral manifestations associated with HIV-related disease as markers for immune suppression and AIDS. *Oral Medicine*. 1994; 77(4):344-349
55. Kumar S, Shankare G, Basavarajaiah D. Incidence of Oral candidiasis among HIV infected patients-Cohort prospective study. *Int J of Scientific and Research Publications*. 2013; 3(12):1-6
56. Lamotte J. Infección por VIH/SIDA en el mundo actual. *MEDISAN*. 2014;18(7):117-136
57. Martínez M, López J, Kirkpatrick W, Bachmann S, Perea S, Ruesga M, Patterson T. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49: 515-524.
58. Oxman D, Chow J, Frendl G, Hadley S, Hershkovitz S, Ireland L, Tsai K, Marty F, Golan Y. Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65:1460-1465.

59. Posteraro B, Tumbarello M, La Sorda M, Spanu T, Trecarichi E, Bernardis F, Scoppettuolo M, Sanguinetti M, Fadda G. Azole Resistance of *Candida glabrata* in a Case of Recurrent Fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(8):3046-3047
60. Costa C, Cohen A, Fernandez F, Miranda K, Passos X, Souza L, Silva M. Asymptomatic oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era. *Rev.Inst Med tro*. 2006;48(5):257-261
61. Konstantyner T, Silva A, Tanaka L, Marques H, Latorre M. Factores asociados al tiempo libre y la candidiasis oral en niños que viven con VIH/SIDA, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2013; 29 (11):2197-2207
62. Redding S, Kirkpatrick W, Saville S, Coco B, White W, Fothergill A, Rinaldi M, Eng T, Patterson T, Lopez J. Multiple Patterns of Resistance to Fluconazole in *Candida glabrata* Isolates from a Patient with Oropharyngeal Candidiasis Receiving Head and Neck Radiation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(2):619-622
63. Thanyasrisung P, Kesamol P, Pipattanagovit P, Youngnak P, Waranuch P, Matangkasombut O. Oral *Candida* and immune status in Thai human immunodeficiency virus-infected individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;63(2):753-759
64. Tobón J, Toro A. Estudio del paciente con infección por VIH. *Medicina y Laboratorio*. 2008;14(2):11-42
65. Kanafani Z, Perfect J. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Antimicrobial Resistance*. 2008;120(1):120-128.
66. BIO-RAD Laboratories. (2013). AUXACOLOR™ 2 56513 colorimetric sugar assimilation test for identification of the main yeasts of medical interest Francia. Recuperado de: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/56513_880050_EN.pdf
67. BIO-RAD Laboratories. (2013). Fungitest™ Micromethod for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Francia. Recuperado de: <http://www.diagnostics-bio-rad.com/wp-content/uploads/2017/01/Fungitest.pdf>

ANEXO 1

Hoja de recolección de datos.

Iniciales del paciente:	Edad:	Sexo:	F	M	Fecha: / /
Nº asignado:					

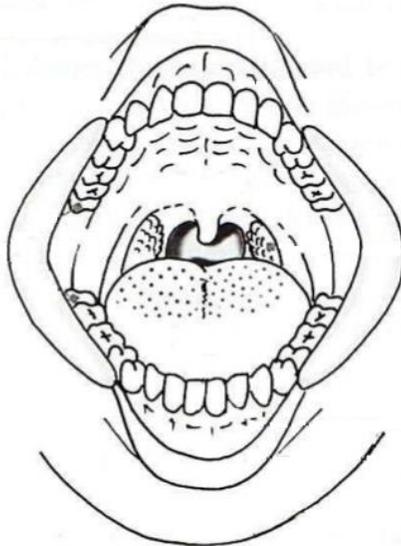
Antecedentes médicos

Tipo de paciente VIH/SIDA:

Sin TARV	Abandono de TARV
----------	------------------

Tratamientos antifúngicos:

--



Variedad clínica presente en el paciente.	
Seudomembranosa (CBAS)	
Atrófica (CBAA)	
Hiperplásica (CBCH)	
Queilitis angular (CBCQA)	
Estomatitis subplaca (CBCA)	

Observaciones:

Examen directo:	
Tipificación de especies de <i>Candida spp.</i>	
Espectro de sensibilidad:	