



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

*“Revisión bibliográfica de la técnica de MIC y la
implementación de una metodología para la práctica de
antimicóticos “*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

DIANA MAYTE RAMÍREZ LÓPEZ

ASESORA:

Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



**UNAM
CUAUTITLÁN**

**DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Revisión bibliográfica de la técnica de MIC y la implementación de una metodología para la práctica de antimicrobianos.

Que presenta la pasante: **Diana Mayte Ramírez López**
Con número de cuenta: **310303046** para obtener el título de: **Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Salas Téllez	
VOCAL	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
SECRETARIO	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Arianna Lezama Uc	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

Dedicatoria

Agradezco infinitamente a mi familia: Mi madre Lilia López, de quien he recibido amor y cuidado en cada uno de sus consejos que me han guiado durante toda la vida; mi padre Eleazar Ramírez, por enseñarme que soy lo suficientemente fuerte; mi hermano, Luis Ramírez, quien ha sido mi ejemplo y respaldo en todo momento; mi abue Eugenia García por su amor, paciencia y cariño; a Sergio Gómez, con quien he aprendido mucho, a mis amigos Mercedes Venegas, Saúl Echavarría y Jonatan Mendoza que me han acompañado, apoyado y motivado a siempre seguir adelante. Pero, sobre todo; a Dios por estar presente en todos los días de mi vida.

Quiero agradecer a quienes ya no están, pero siempre tendrán un lugar muy importante en mi corazón Gelacio López† y Argelia López†.

Mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los profesores que a lo largo de mi camino me brindaron su apoyo, así mismo quisiera mencionar en particular a la Q.F.B. Leticia Cubillo que como profesora y asesora de tesis me brindó todo el apoyo posible para culminar este trabajo.

Índice

1. Introducción
2. Marco teórico
 - 2.1 Evolución histórica de los antimicóticos
 - 2.2 Clasificación de antimicóticos
 - 2.3 Mecanismos de acción antimicóticos
 - i. Antifúngicos que actúan sobre la membrana del hongo
 - ii. Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo
 - iii. Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica
 - 2.4 Métodos de sensibilidad antifúngica
 - i. Métodos basados en la difusión en agar
 - a. Difusión en disco
 - b. Etest
 - ii. Métodos de dilución
 - a. Macrodilución
 - b. Microdilución
 - 2.5 Resistencia
 - 2.6 Mecanismos de resistencia a los antimicóticos
 - 2.7 Perfiles de susceptibilidad in vitro de los diferentes medicamentos antifúngicos
3. Propuesta de una metodología de microdilución para la práctica de antimicóticos
 - 3.1 Objetivos
 - 3.2 Propuesta de la metodología
4. Discusión
5. Conclusiones
6. Anexos
7. Bibliografía

Introducción

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia que sea capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, ya sea de manera directa o indirecta, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí, 2005).

Se han descubierto muy pocos antimicóticos en comparación con los antibacterianos, y pueden ser fungistáticos o fungicidas, según inhiban el crecimiento o produzcan lisis de los hongos (Arenas, 2014).

El mecanismo de acción de los antimicóticos es variado; la griseofulvina actúa sobre la síntesis de proteínas de microtúbulos e inhibe la reproducción celular específicamente en dermatofitos. La 5-fluorocitosina (5-FC) está limitado a la terapéutica combinada. Los polienos, como la anfotericina B y la nistatina, afectan la molécula de ergosterol de las membranas fúngicas. Los imidazoles y los triazoles tienen actividad primaria en el sistema enzimático de citocromo P450 involucrado en la síntesis de ergosterol de la membrana celular. La terbinafina actúa sobre la epoxidación de escualeno y es fungicida. Una limitante de los azoles en particular es su actividad fungistática, pero se han logrado avances especialmente en su espectro de acción y su seguridad. Los nuevos antimicóticos, como las neumocandinas y las nikkomicinas afectan la pared celular al inhibir la síntesis de glucanos y de quitina.

En los últimos años, se han producido cambios sobresalientes en cuanto a datos epidemiológicos, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las micosis, en especial de las invasivas. Los problemas actuales para el uso de antifúngicos son la presencia de un mayor número de infecciones sistémicas, el uso de inmunosupresores y citotóxicos, la infección por virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (HIV/ SIDA), las infecciones por hongos emergentes, la posible resistencia a azoles y la poca disponibilidad de

pruebas de sensibilidad. Un reto muy importante para la industria farmacéutica ha sido el mejor conocimiento de las propiedades biológicas de los hongos para tratar de diseñar antimicóticos que actúen en sitios específicos de las células eucarióticas de los hongos, que no estén presentes en las células humanas o ampliar y mejorar la eficacia y la tolerabilidad de los ya existentes (Arenas,2014).

En el presente trabajo se realiza la revisión bibliográfica de la técnica de MIC, además se implementa una metodología basada en los documentos estandarizados del CLSI y EUCAST para la práctica de antimicóticos en la asignatura de Micología.

Marco teórico

Evitar la proliferación de enfermedades fúngicas sigue siendo una tarea ardua para el siglo XXI, es por ello que continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos cada vez más potentes. En la síntesis de estos fármacos es muy importante tener en cuenta la relación de su estructura-función, pues sobre su base se garantiza la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedero.

La síntesis de estos fármacos comenzó en el siglo XX (figura 1) y desde entonces no se ha detenido el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasoras, las cuales han aumentado sustancialmente en las últimas 2 décadas en relación con la aparición de la epidemia del SIDA, uso de quimioterapia intensiva en pacientes oncohematológicos, uso de fármacos antirrechazo en pacientes receptores de trasplante y la mayor utilización de dispositivos intravasculares (Gregorí, 2005).

Evolución histórica

Los primeros antifúngicos datan de 1900 cuando se empleaba el yoduro potásico para el tratamiento de la esporotricosis. Si bien su mecanismo de acción es poco conocido, se sigue usando como alternativa terapéutica en solución saturada con 1g/mL.

Entre 1940 y 1950 surgieron los tratamientos tópicos con acción fundamentalmente exfoliante y queratolítica y un débil poder antifúngico. Entre ellos se mencionan el ungüento de Whitfield compuesto por ácido benzoico al 6% y ácido salicílico al 3%; la tintura de Castellani consistente en una solución de fucsina al 0,3%; el violeta de genciana al 0,5%, el ácido undecilénico al 5% y el sulfuro de selenio al 2%.

En los años siguientes se desarrollaron los antifúngicos de uso tópico y sistémico (tolnaftato, haloprogina, griseofulvina, imidazoles, inhibidores de la síntesis de pirimidinas y polienos).

En la década de los 90's se incorporaron los triazoles, siendo el itraconazol el primer antifúngico oral con actividad sobre un espectro amplio de hongos. También se desarrollaron nuevas formulaciones de poliénicos, las alilaminas (naftifina y terbinafina) y antifúngicos de exclusivo uso tópico como la ciclopiroxolamina y la amorolfina. En pleno siglo XXI las investigaciones continúan y periódicamente aparecen nuevos agentes como el voriconazol, la caspofungina, entre otros (figura1) (Allevato, Negroni y Galimberti, 2007).

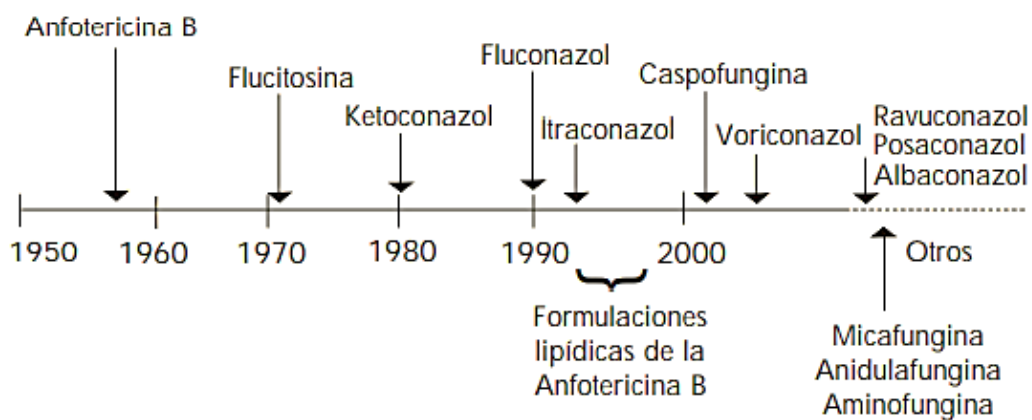


Figura 1: Antifúngicos, evolución histórica. (Nota: Adaptado de “Antifúngicos ayer, hoy y mañana” (p.2), por M. Allevato, R. Negroni y R. Galimberti, 2007, *Revista Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas*, 30(8)).

Clasificación de antimicóticos

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (cuadro 1); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (cuadro 2) (Gregorí, 2005).

También puede tenerse en cuenta como parte de la clasificación la forma de aplicación (figura 2). Hoy existen más de 115 presentaciones de preparados

antifúngicos de uso tópico (crema, gel, pomada, polvo, solución, loción, spray, tabletas vaginales, etc) (Allevato, Negroni, Galimberti, 2007).

Polienos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol, bifonazol, ketoconazol Triazoles: fluconazol, itraconazol Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas Triterpenos glicosilados Equinocandinas: caspofunginas, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

Cuadro 1. Clasificación de los antifúngicos por su estructura. (Nota: Adaptado de “Antifúngicos ayer, hoy y mañana” (p.2), por M. Allevato, R. Negroni y R. Galimberti, 2007, *Revista Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas*, 30(8)).

Antifúngicos interactuando en pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas, tiocarbamatos
Antifúngicos interactuando en núcleo	Pririmidinas fluoradas, misceláneos

Cuadro 2. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo. (Nota: Adaptado de “Antifúngicos ayer, hoy y mañana” (p.3), por M. Allevato, R. Negroni y R. Galimberti, 2007, *Revista Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas*, 30(8)).

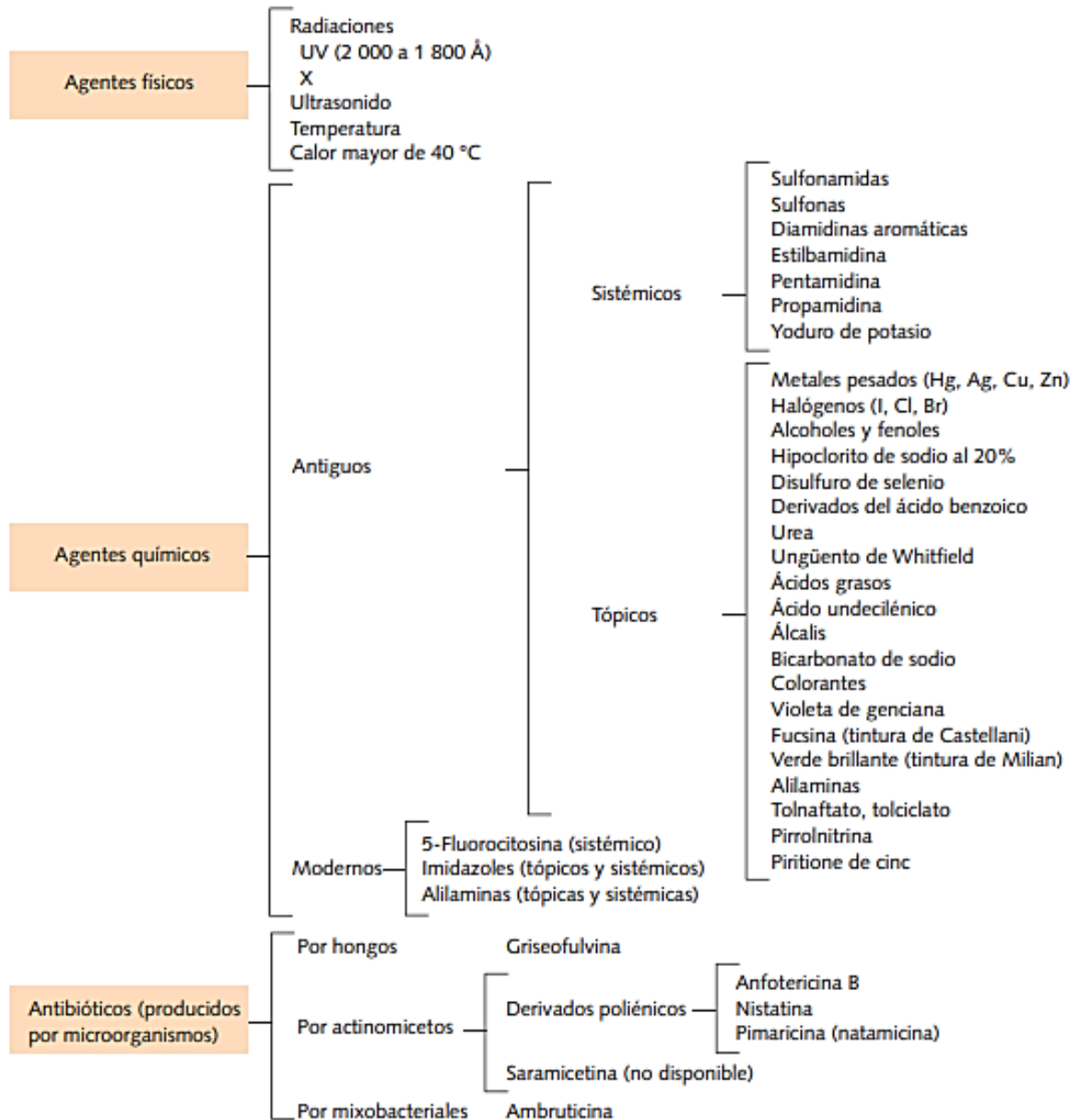


Figura 2. Clasificación de antimicóticos. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.408), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Mecanismo de acción de los antimicóticos

A la hora de diseñar la molécula antifúngica la gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro está

relacionada con hongos patógenos. El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico (Gregorí, 2005).

Antifúngicos que actúan sobre la membrana celular del hongo

La membrana celular de la célula humana, así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroides ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas.

Polienos.

Los macrólidos poliénicos fueron los primeros antimicóticos que se obtuvieron, a partir de la fermentación de especies de *Streptomyces*, entre mediados y finales de la década de 1950-1959. Están formados por un anillo lactona de 26 a 38 átomos de carbono, cerrado por dobles enlaces; se conocen más de 60 compuestos (Arenas, 2014).

Los medicamentos que se encuentran en este grupo se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular (Gregorí, 2005).

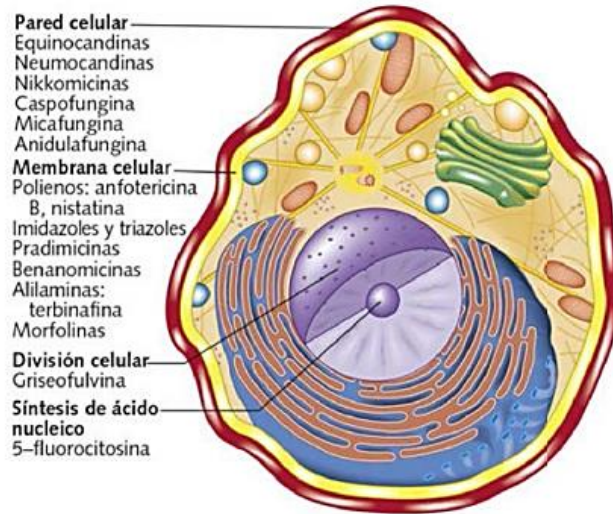


Figura 3. Sitio de acción de los antimicóticos. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.407), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Los polienos más usados e importantes son la nistatina y la anfotericina B; la pimamicina (natamicina) es de uso limitado y se usa casi de manera exclusiva en queratitis micótica; no están disponibles la tricomicina (hachimicina), la candicidina ni la hamicina.

Nistatina

En 1950, E. L. Hazen y R. Brown la aislaron a partir de *S. noursei*; también se aísla de *S. albulus*, y en 1954 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó su uso. Su nombre se deriva del lugar de las investigaciones (New York State, nystatin), que, además, fue el primer sitio en el que se encontró disponible. Es un tetraeno con 46 átomos de carbono ($C_{46}H_{77}O_{19}H$) con peso molecular de 926 g/mol con un anillo macrólido con cuatro dobles enlaces y una micosamina (figura 4). Es poco soluble en agua y ligeramente soluble en alcohol. Actúa por contacto directo. Es fungistático y fungicida; inhibe la respiración celular, altera el metabolismo del fósforo inorgánico y, debido a alteraciones secundarias en la membrana fúngica (formación de poros), permite el paso de sustancias tóxicas al interior de la célula. Es de espectro reducido y específico para infecciones por *Candida*. Quizá haya cepas resistentes.

Está indicada en todas las formas de candidosis.

Nistatina liposomal: Aún se encuentra en fase de desarrollo. Actúa de la misma manera que anfotericina B. Se ha elaborado una presentación multilaminar que conserva su actividad in vitro. Se ha usado en la candidosis y la aspergilosis, y como terapéutica empírica en pacientes con neutropenia febril. Es eficaz en aspergilosis invasiva en animales, pero es nefrotóxica en humanos. Se desconoce si estará disponible (Arenas, 2014).

Pimaricina (natamicina)

Es un derivado poliénico poco soluble en agua, extraído de *Streptomyces nataliensis* y *S. gilvosporeus*. Actúa in vitro contra dermatofitos, *Candida*, *Aspergillus*, *Acremonium* y *Fusarium*, por lo que su principal indicación es en queratitis micótica. No se absorbe, pero puede causar irritación (Arenas, 2014).

Anfotericina B

En 1955, W. Gold, Vandeputte, J. F. Pagano y colaboradores la aislaron a partir de cultivos de *Streptomyces nodosus*. Es un heptaeno (C₄₇H₇₃NO₁₇) con peso molecular de 924 g/mol; contiene siete enlaces no saturados y una micosamina unida al carbono 19 por un enlace glucosídico (figura 4). Es un polvo amarillo, insoluble en agua, alcohol y otros solventes orgánicos; cuando se hidrata, forma una solución coloidal; es soluble en dimetilsulfóxido.

Existe un éster metílico que tiene mayor hidrosolubilidad y eficacia terapéutica en animales, pero es neurotóxico en humanos. La vía de uso es intravenosa; quizá se une al colesterol de las membranas celulares de diferentes tejidos; tiene gran capacidad de almacenamiento extravascular. Se une con rapidez al ergosterol y ocasiona alteraciones estructurales reversibles ante concentraciones pequeñas, así como irreversibles a grandes concentraciones.

Tiene amplio espectro antimicótico, sobre todo en hongos de micosis sistémicas: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus*, *S. schenckii*, *Rhodotorula* y Mucorales, así como en modalidades profundas de candidosis, y de

candidosis mucocutánea crónica. Se ha informado resistencia en especies de *Candida*, en especial *C. glabrata*.

Se considera el estándar de oro de casi todas las micosis sistémicas; todavía se considera el estándar, y está indicado en candidosis sistémica, visceral, granulomatosa o mucocutánea crónica, así como en coccidioidomicosis, criptococosis, histoplasmosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, aspergilosis, mucormicosis, esporotricosis diseminada y neumocistosis. En candidosis diseminada y criptococosis, el uso junto con 5-FC tiene efecto sinérgico; esto permite reducir la dosis y, como consecuencia, la toxicidad, así como eliminar mutantes que muestran resistencia a 5-FC. No está claro si presenta sinergismo o antagonismo con los imidazoles.

El mecanismo por el cual los hongos resisten al tratamiento con anfotericina es mediante sustitución del ergosterol por otros esteroides precursores en la síntesis de sus membranas. (Arenas, 2014, p.411-412).

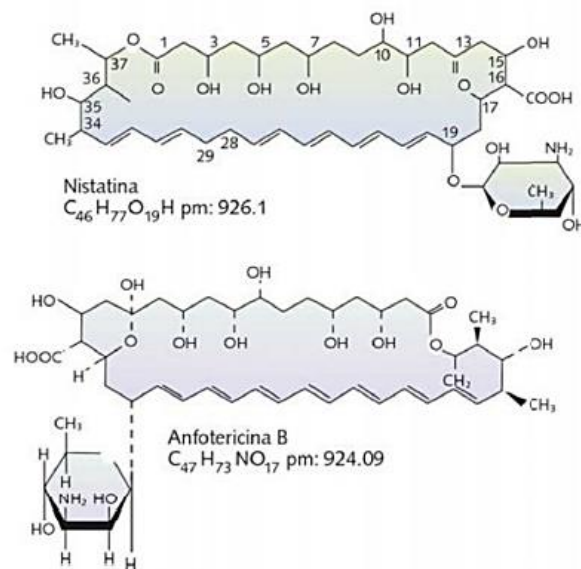


Figura 4. Estructura química de nistatina y anfotericina B, antimicóticos poliénicos. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.411), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Azoles.

Tienen un anillo con átomos de N libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad etc. En función del número de nitrógenos que posee el anillo se dividen en imidazoles: miconazol y ketoconazol y triazoles: fluconazol, itraconazol, voriconazol. Tienen actividad fungistática por inhibición de la demetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450, ello lleva a la acumulación de metil esteroides y a la reducción de la concentración de ergosterol, un esteroide esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica (Allevato, Negroni, Galimberti, 2007).

Imidazoles

Se descubrieron en 1949, pero los estudios clínicos se iniciaron a finales de la década de 1960-1969. En 1967, Roger Vanbreuseghen, Van Cutsem y Thienpont usaron por vez primera el nitrato de imidazol de manera experimental.

Son antimicóticos de amplio espectro; actúan contra los mohos y las levaduras; tienen actividad antibacteriana y contra protozoarios, y acción inmunoestimulante (Arenas, 2014).

Al principio se usaron miconazol, clotrimazol y econazol; después han aparecido muchos, casi todos para uso por vía tópica; en general, sólo corresponden a ligeras variantes de la fórmula original. El mecanismo de acción y las aplicaciones son similares en esta familia de antimicóticos, y las diferentes presentaciones tópicas no plantean ventajas terapéuticas considerables, sino tal vez sólo mejor aceptabilidad estética. Su acción antimicótica es mediante daño de la membrana celular al inhibir la 14α -desmetilasa en los hongos, un sistema de enzimas que depende del citocromo P450. De ese modo, los azoles en general entorpecen la biosíntesis de ergosterol y permiten la acumulación de 14α -metilesteroides. Estos metilesteroides alteran la disposición de los fosfolípidos y, con ello, las funciones de algunos sistemas enzimáticos, como ATPasa y enzimas necesarias para el transporte de

electrones, lo que inhibe así la proliferación de los hongos. También inhiben enzimas mitocondriales, como citocromo oxidasa, peroxidasa y catalasa, lo que acumula peróxidos y lisis celular. Se ha registrado resistencia, en particular por *Candida* (Arenas, 2014).

Disponibles	Recientes
Bifonazol	Alteconazol
Clotrimazol	Butoconazol
Econazol	Clioconazol
Isoconazol	Eberconazol
Itraconazol	Efinaconazol
Ketoconazol	Fenticonazol
Miconazol	Flutrimazol
Omoconazol	Luliconazol
Oxiconazol	Sertaconazol
Sulconazol	Benzoxabonales
Terconazol	Tavoborol
Tioconazol	Terbinafina transfersome

Cuadro 3. Antimicóticos azólicos y otros. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.416), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

De los azoles orales, el primero por vía oral fue el ketoconazol, luego aparecieron los derivados triazólicos como itraconazol y fluconazol (cuadro 3).

Clotrimazol

Fue el primer azol tópico, sintetizado a finales de la década de 1960-1969 por el entonces jefe de la división de micología de la casa Bayer, en Alemania, M. Plempel. Es un tritil, derivado del imidazol, difenil-1-imidazol-metano (C₂₂H₁₇ClN), tiene peso molecular de 352 g/mol (figura 5). Es fungistático de amplio espectro. Al disminuir la síntesis de fosfolípidos de las membranas celulares, permite un incremento del flujo de iones, lo que origina desorganización de los ácidos nucleicos e inhibe la respiración celular. También muestra actividad contra bacterias, amebas, *Trichomonas vaginalis* y *Toxoplasma*.

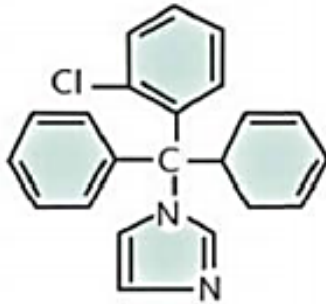


Figura 5. Estructura química del clotrimazol. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.417), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Está indicado en dermatofitosis, sobre todo de los pies. No se usa por vía sistémica debido a toxicidad gastrointestinal y neurológica, así como a inhibición por enzimas microsomales hepáticas (Arenas, 2014).

Econazol

Es un derivado imidazol, sintetizado por la casa farmacéutica Janssen en 1969. Su absorción sistémica es en extremo baja; aun así, permanece en concentraciones mínimas inhibitorias en el estrato córneo y puede llegar a la dermis media después de su aplicación tópica. Su espectro abarca dermatofitos, *Candida* y *Malassezia*. Los efectos adversos registrados son eritema, ardor y picazón locales.

Se han documentado anomalías cardiovasculares en los hijos de mujeres tratadas con éste durante el primer trimestre del embarazo (Arenas, 2014).

Miconazol

Es un congénere muy cercano al econazol. Sintetizado en 1969 por la casa Janssen de Bélgica y aprobado por la FDA en 1974. Es un derivado sintético, 1-fenilimidazol [2-4-dicloro β-nitrato de imidazol] (C₁₈H₁₄NO), con peso molecular de 416 g/mol. Es un polvo cristalino, inodoro, poco soluble en agua y soluble en solventes orgánicos.

Además de su efecto antifúngico común al resto de los azoles, inhibe las peroxidasa de los hongos, lo que provoca la acumulación de peróxido en el interior de la célula fúngica y favorece su destrucción. Está indicado en dermatofitosis, pitiriasis versicolor y candidosis.

Es posible usarlo en candidosis mucocutánea crónica, coccidioidomicosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis e infecciones por *Petrellidium boydii* (Arenas,2014).

Bifonazol

Derivado imidazólico halogenado (4-difenil)-fenilmetil-1 H-imidazol ($C_{22}H_{18}N_2$), con peso molecular de 310.4 g/mol. Es un polvo cristalino, blanco y lipofílico, que se disuelve con facilidad en solventes para lípidos y alcohol; es casi insoluble en agua. Actúa en el citocromo P450 e interfiere con la síntesis de terpenoides; está indicado en micosis superficiales por dermatofitos, *Candida*, *Malassezia (Pityrosporum)*, así como *Aspergillus* y otros mohos. En onicomosis es útil en combinación con urea al 40% (Arenas, 2014).

Ketoconazol

Fue sintetizado por Janssen farmacéutica en 1977 y se considera el primer azol de amplio espectro por vía oral. Fue aprobado por la FDA en 1981. Su estructura química es cisl-acetil-4-metofenil-piperazina (figura 6). Es soluble en agua a pH 3 (Arenas, 2014).

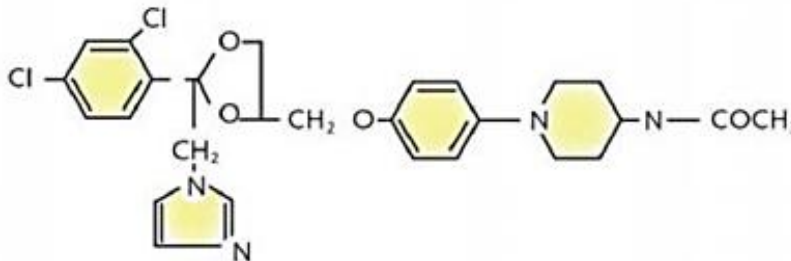


Figura 6. Estructura química del ketoconazol. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.420), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Se usó muy ampliamente antes del desarrollo de nuevos, menos tóxicos, y más eficaces compuestos del triazol como fluconazol e itraconazol, pero su utilización en estos momentos ha estado limitada. Interacción con el sitio activo: el ketoconazol pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través asociaciones Van der Waals CH₃ del fármaco y CH₃ de la enzima. El ketoconazol es un fármaco de segunda línea. La afinidad de este con las membranas celulares fúngicas es menor comparada con la del fluconazol e itraconazol. El ketoconazol tiene más potencial ante las membranas celulares de mamífero y por ello induce a la toxicidad (Gregorí, 2005).

Tiene amplio espectro antimicótico (dermatofitos, *Malassezia spp.*, *C. tropicalis*, *C. albicans*) y alguna actividad antibacteriana y antiparasitaria contra *Leishmania tropica*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma*, pero no existen datos de sinergia con otros antibacterianos. Puede haber antagonismo antimicótico con rifampicina, eritromicina y tetraciclina. También ejerce un potente efecto inhibitor sobre la 5-lipooxigenasa, lo que origina producción baja de leucotrienos (Arenas, 2014).

Su principal sitio de actividad es la membrana celular; inhibe la biosíntesis de ergosterol e inhibe la biosíntesis de ergosterol e interfiere con otros lípidos de membrana. Se ha postulado el bloqueo de la lanosterol 14- α -desmetilasa, que es dependiente del citocromo P450 y precursor del ergosterol; ello da lugar a una membrana con bajo contenido de este último, lo cual conduce a mayor permeabilidad y deterioro progresivo.

Se usa a largo plazo en candidosis mucocutánea crónica y modalidades profundas o sistémicas (Arenas, 2014).

Triazoles

Son derivados azólicos de segunda generación, que difieren de los imidazoles por poseer tres átomos de nitrógeno en el anillo imidazol en lugar de dos. Para administración sistémica se han sintetizado itraconazol, fluconazol, ravuconazol,

albaconazol, isavuconazol, pramiconazol, posaconazol y voriconazol, y para administración tópica, el terconazol.

Itraconazol

Compuesto triazólico de segunda generación, sintetizado como oriconazol a finales de la década de 1980-1989; es un derivado del dioxolano, con un átomo adicional de N y peso molecular alto; no se disuelve en agua, pero sí en propilenglicol; sólo se ioniza a pH bajo. Se absorbe por vía oral; al parecer la absorción se incrementa con el consumo simultáneo de refrescos de cola (p. ej., Coca-Cola®) o con los alimentos (con el estómago vacío su biodisponibilidad es sólo de 55%).

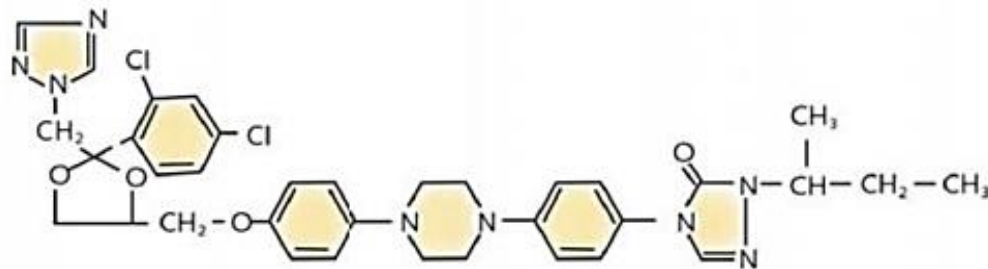


Figura 7. Estructura química del itraconazol. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.420), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Tiene amplio espectro antimicótico, que incluye *Candida spp.*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *H. duboisii*, *Aspergillus fl avus* y *A. fumigatus*, *S. schenckii*, *Trichophyton spp.*, y actividad moderada en *Candida krusei* y otras cepas de *Candida* e in vitro es más activo que el ketoconazol.

Es fungicida por actividad selectiva sobre el citocromo P450 y el peróxido de hidrógeno. Está indicado casi en todas las micosis sistémicas: paracoccidioidomicosis, blastomicosis (pulmonar y extrapulmonar) coccidioidomicosis, histoplasmosis, aspergilosis, criptococosis meníngea, peniciliosis y en otras micosis oportunistas, como fusariosis. Se recomienda a largo plazo en criptococosis meníngea, aunque no se demuestra en el LCR. (Arenas,2014).

Fluconazol

Derivado triazólico muy hidrosoluble, de bajo peso molecular, aprobado por la FDA a principios de la década de 1990-1999, pero en EUA no se acepta la indicación para las onicomycosis ni otras dermatofitosis. Es un alcohol terciario bistriazol con estabilidad metabólica. Inhibe la síntesis de esteroides en la membrana de los hongos y sólo en dosis mayores a las terapéuticas tiene efecto sobre enzimas de mamíferos.

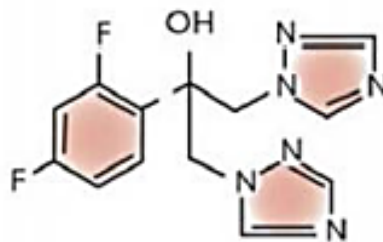


Figura 8. Estructura química del fluconazol. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.417), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Es fungicida; actúa contra mohos y levaduras. Está indicado en micosis superficiales y sistémicas, especialmente en endocarditis por *Candida*; candiduria; candidosis bucofaríngea, vaginal, o esofágica; meningitis criptocócica; aspergilosis; coccidioidomicosis y micosis por *C. (Torulopsis) glabrata*. En modelos de animales, es el azol más potente contra *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Histoplasma*. Se emplea también como profilaxis en receptores de trasplante de células madre, y en pacientes tratados con quimioterapia o radioterapia, o ambas; como usos no autorizados por la FDA se encuentran las tiñas, las onicomycosis y la candidosis mucocutánea crónica, pero en Latinoamérica se usa con regularidad. También se han observado resultados satisfactorios en aspergilosis, esporotricosis, dermatofitosis, pitiriasis versicolor y como profiláctico en candidosis (Arenas,2014).

Voriconazol

Es el primero de la segunda generación de triazoles, con modificación de la estructura del fluconazol por sustitución de un grupo fluoropiridina y la añadidura de un grupo metilo; como los otros, inhibe el citocromo P450. Fue aprobado por la FDA en 2001 para las micosis sistémicas e invasivas; en mayo de 2002 se autorizó su uso en el tratamiento de aspergilosis invasivas, así como de infecciones graves por *Fusarium* y *Scedosporium* (*P. boydii*), y en 2004, para el manejo de las candidosis sistémicas.

Es un antimicótico potente de amplio espectro que incluye *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. fumigatus* resistentes a anfotericina; *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. *C. tropicalis* resistentes a fluconazol y a triazoles en general, y *Scedosporium*, *Fusarium* *Scedosporium*, *Fusarium* (incluso *F. solani*) y *Paecilomyces lilacinus*. También es eficaz en el tratamiento de infecciones por *Candida* con invasión ósea y del SNC, candidosis en no neutropénicos, infecciones por *Scedosporium* y por *Fusarium* (Arenas, 2014).

Posaconazol

Es un derivado triazólico, análogo de itraconazol. Tiene baja solubilidad en agua, es más soluble en lípidos que fluconazol.

Su espectro incluye a las cepas resistentes de *Candida*, *C. neoformans*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *B. dermatitidis*, *Coccidioides spp.*, *H. capsulatum* y *Fusarium*. Se considera el tratamiento de primera elección en casos de candidosis orofaríngea e invasiva, aspergilosis invasiva, hialohifomicosis por *Fusarium*, y coccidioidomicosis resistente a tratamiento (incluso con resistencia a voriconazol y anfotericina B), así como para la profilaxis en postrasplantados de médula ósea, enfermedad injerto contra huésped, neoplasias hematológicas, neutropénicos, síndromes mielodisplásicos y pacientes con leucemia mieloide.

Se encuentra en perfeccionamiento un profármaco para administración intravenosa. Ha sido usado en eumicetoma y cromoblastomicosis resistentes a los tratamientos

habituales, así como otras micosis subcutáneas y sistémicas, en algunos casos se ha conseguido curación y, en otros, mejoría (Arenas, 2014).

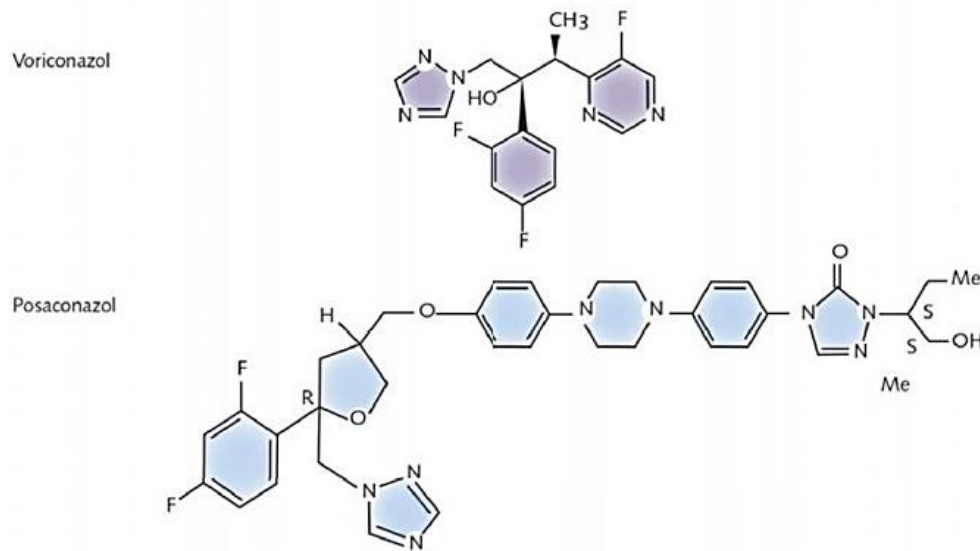


Figura 9. Estructuras químicas del voriconazol y posaconazol. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.424), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Ravuconazol

Es un derivado triazólico de acción prolongada y amplio espectro. Se absorbe con rapidez después de su administración oral con dosis única; su disponibilidad aumenta con comidas grasosas. La fórmula intravenosa del profármaco presenta una molécula di-lisina-fosfoéster, la cual difiere de la ciclodextrina con la que se combinan el itraconazol y el voriconazol.

Inhibe el citocromo P450 y tiene acción en especial contra *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, dermatofitos y *Rhizopus oryzae*. Se estudia su acción como profiláctico en una amplia gama de micosis superficiales y sistémicas (Arenas, 2014).

Alilaminas

Antimicóticos sintéticos cuya estructura consta de dos anillos bencénicos unidos a un grupo naftilo y a uno amino. In vitro, poseen actividad contra dermatofitos, *Aspergillus* y *Candida*. Se presentan dos preparados, la naftifina por vía tópica y la

terbinafina por vía oral y tópica; la presentación oral se usa de manera fundamental en dermatofitosis, especialmente en uñas, pero se han registrado buenos resultados en varias micosis profundas (Arenas,2014).

Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol.

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Gregorí, 2005).

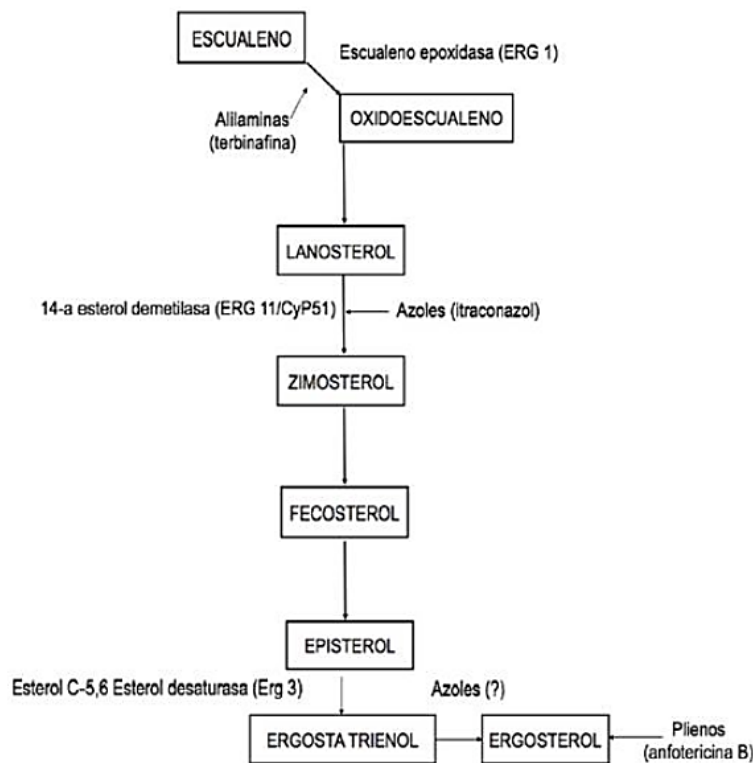


Figura 10. Mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis del ergosterol. (Nota: Adaptado de *Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en Candida albicans. Una revisión.* (p.3), por K. López-Ávila, K. Dzul-Rosado, C. Lugo-Caballero, J. Arias-León, J. Zavala-Castro. 2016, Revista biomedicina 27:127-136).

Naftifina

Es una alilamina sintética que de modo original se sintetizó para tratar trastornos del SNC. Su nombre proviene de los componentes de su estructura química: [E] N-cinamil-N-metil-1-naftalenometil-amina-3-fenil-2-propen-1-amina (figura 11). Tiene amplio espectro, con actividad alta contra dermatofitos y moderada contra. Interfiere con la actividad de la 2,3-escualeno epoxidasa, lo cual lleva a rotura de la membrana celular por acumulación del escualeno. No se ha especificado su punto de inhibición. Sus principales indicaciones son la tiña de la ingle y del cuerpo; también es efectiva en pitiriasis versicolor y candidosis cutánea; tiene penetración buena en la queratina y los folículos pilosos (indicaciones no aprobadas aún por la FDA). No está disponible en muchos países (Arenas,2014).

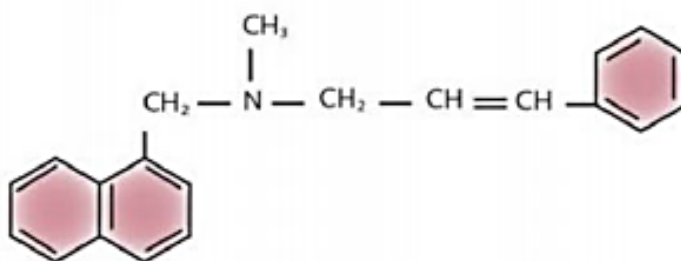


Figura 11. Estructura química de naftifina. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.426), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Terbinafina

Es un compuesto con la siguiente fórmula: [E]-N-(6,6- dimetil-1,2-hepteno-4-inil)-N-metil-1-naftalenometenamina (figura 12); fue desarrollado en 1979 a partir de la modificación a la fórmula de la naftifina.

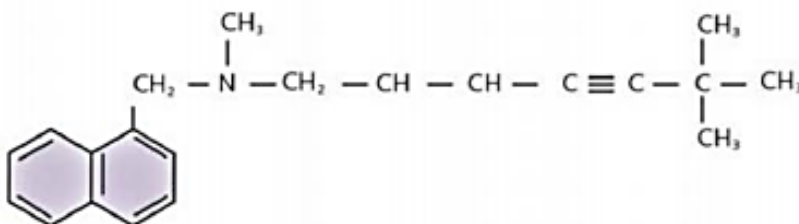


Figura 12. Estructura química de naftifina. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.426), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Es fungicida *in vitro* e *in vivo* al inhibir la epoxidación del escualeno. Es activa contra dermatofitos, y tiene poca acción contra las levaduras, aunque *in vitro* ha mostrado buena actividad contra especies de *Candida* (*C. albicans* y *C. parapsilosis*) y *Malassezia*. Ha mostrado actividad contra *S. schenckii*, *Scopulariopsis*, *Histoplasma*, *Aspergillus* y algunas cepas de *Fonsecaea pedrosoi*.

Ciclopiroxolamina

Es un sustituto de la piridona. Su fórmula es 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)piridona (C₁₂H₁₇NO₂) con peso molecular de 268 g/mol (figura 13).

Es fungicida por su afinidad a cationes trivalentes como hierro y aluminio, hace efecto por acumulación en las células fúngicas y alteración del transporte de iones y aminoácidos a través de la membrana, produce un efecto quelante de iones que inhibe enzimas fundamentales como los citocromos, lo cual interfiere con el transporte electrónico en las mitocondrias, lo que disminuye las reservas energéticas del hongo, y en altas concentraciones bloquea la respiración celular.

Inhibe la síntesis de proteínas mejor que la de ergosterol, y como efecto adicional tiene capacidad antiinflamatoria mediante la inhibición de la 5-lipooxigenasa y de la ciclooxigenasa (necesarias para la síntesis de prostaglandinas). Tiene amplio espectro antimicótico y antibacteriano que incluye *Candida albicans*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *Penicillium*, *Actinomycetes*, *Aspergillus*, *Phialophora*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* y *Malassezia spp* (Arenas,2014, p.428).

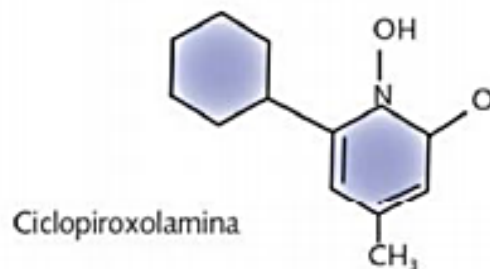


Figura 13. Estructura química de ciclopiroxolamina. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.426), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Amorolfina

Derivado desmetilado de las morfolininas; compuesto que sustituye el anillo fenilo del radical para-(p-1,1-dimetilpropil-fenil-2-metilpropio-2,6-cis-dimetilmorfolina). Originalmente se usó como fungicida en la agricultura. Es activo contra muchos hongos y tiene actividad fungicida y fungistática, con excepción de zigomicetos, *Aspergillus* y *Fusarium*. Inhibe la síntesis de ergosterol al actuar sobre la 14,15-reductasa, lo que permite la acumulación de ergosterol; también actúa sobre la 8,7-isomerasa que convierte el fecosterol en episterol. Su espectro incluye dermatofitos y *Candida*, así como onicomiasis, especialmente en terapéutica combinada (Arenas,2014).

Butenafina

Se introdujo en Japón en 1992; la FDA aprobó este fármaco en 1997, y en México se introdujo en 2006 (figura 14).

El clorhidrato de butenafina es una bencilamina con la siguiente estructura: N-(4-tert-butilbencil)-N-metil-1-naftalenometilamina; bloquea la escualeno epoxidasa y ocasiona acumulación intracelular de escualeno en forma de vesículas que funcionan al extraer componentes de la membrana celular, lo cual la hace más débil y susceptible de destrucción, pero sobre todo actúa al desintegrar las membranas vacuolares, con liberación de enzimas líticas para el hongo, por lo que su actividad fungicida es muy similar a la de las alilaminas, además de tener un importante efecto antiinflamatorio y una concentración fungicida residual de tres días.

Se une con fuerza a la queratina y posee actividad antifúngica alta contra dermatofitos, hongos dimorfos y *Aspergillus spp.*; es fungistática contra *Candida* y *Malassezia*; asimismo, posee actividad limitada contra estreptococos beta-hemolíticos de grupo A y contra *Corynebacterium spp.*, por lo que sus principales indicaciones son las tiñas de piel lampiña (Arenas, 2014).

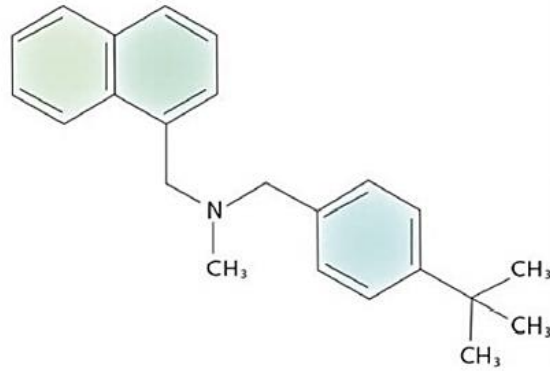


Figura 14. Estructura química de la butenafina. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.428), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Nikkomicinas (nikkomicina Z)

Son productos naturales (péptido-glucósidos muy similares a las polioxinas), metabolitos producidos por la fermentación de *Streptomyces tendae* y *S. cacaoi*; tienen un nucleósido de pirimidina ligado a un péptido (figura 15). Son inhibidores competitivos de la quitina sintetasa de la pared celular; esta enzima lleva a cabo el último paso de polimerización y formación de quitina. Su espectro antifúngico es errático, aunque también son muy activas contra bacterias grampositivas y gramnegativas, además de ser acaricidas; se necesitan grandes cantidades de los compuestos para tener concentraciones clínicas relevantes, y actúan mejor en mohos que en levaduras. *In vitro* actúan contra *C. immitis* y *B. dermatitidis* y tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado sinergia con derivados azólicos.

Tienen actividad moderada contra *Candida*, *C. neoformans* y *Aspergillus spp.* Se ha demostrado que estos compuestos entran en las células de *S. cerevisiae* y *C. albicans* por medio de peptidopermeasas y, una vez dentro, son susceptibles de degradación por peptidasa. En modelos animales son fármacos que han mostrado sinergia con algunos derivados triazólicos, pero se necesitan muchos estudios para definir su potencial en clínica (Arenas,2014).

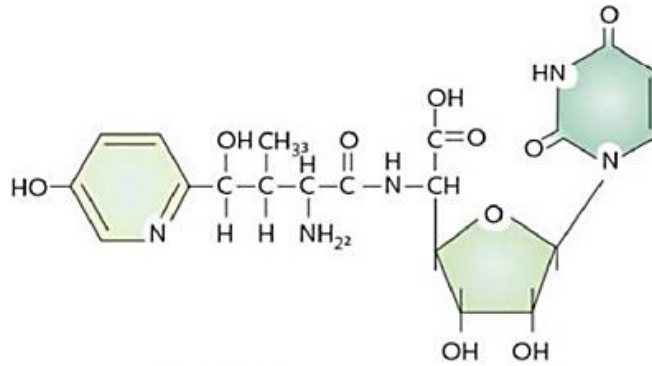


Figura 15. Estructura química de la nikkomicina Z. (Nota: Adaptado de *Micología Médica Ilustrada*. (p.429), por R. Arenas, 2014, McGrawHill).

Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo

Los lipopéptidos actúan inhibiendo la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa, enzima responsable de formar este polímero de la glucosa que es esencial para la estructura de la pared de la célula fúngica. La pared se debilita y se torna incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que la célula muere.

Pertenece a este grupo las papulacandinas, equinocandinas y los triterpenos glicosilados, productos naturales derivados de los hongos, cuyo efecto es fungicida. Estos agentes no afectan a las células de mamíferos porque carecen de las enzimas blanco de estos compuestos (Allevato, Negroni y Galimberti, 2007).

Lipopéptidos.

La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas y participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica. Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo protéico y polisacárido cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y

carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular y los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere (Gregorí, 2005).

Son fungicidas con actividad en 1,3- β -glucanos. Las primeras modalidades naturales fueron las equinocandinas aisladas de *Aspergillus nidulans* variedad *echinulatus*; luego aparecieron la aculeacina, mulundocandina, esporiofungina y FR-901379. Los lipopéptidos semisintéticos incluyen cilofungina (Lilly), caspofungina (MSD), unguina (Lilly), caspofungina (MSD), micafungina, anidulafungina y neumocandinas. Generan nefrotoxicidad y hepatotoxicidad mínima, pero sólo están disponibles para uso intravenoso. *Cryptococcus* y *Trichosporon* son resistentes (Arenas,2014).

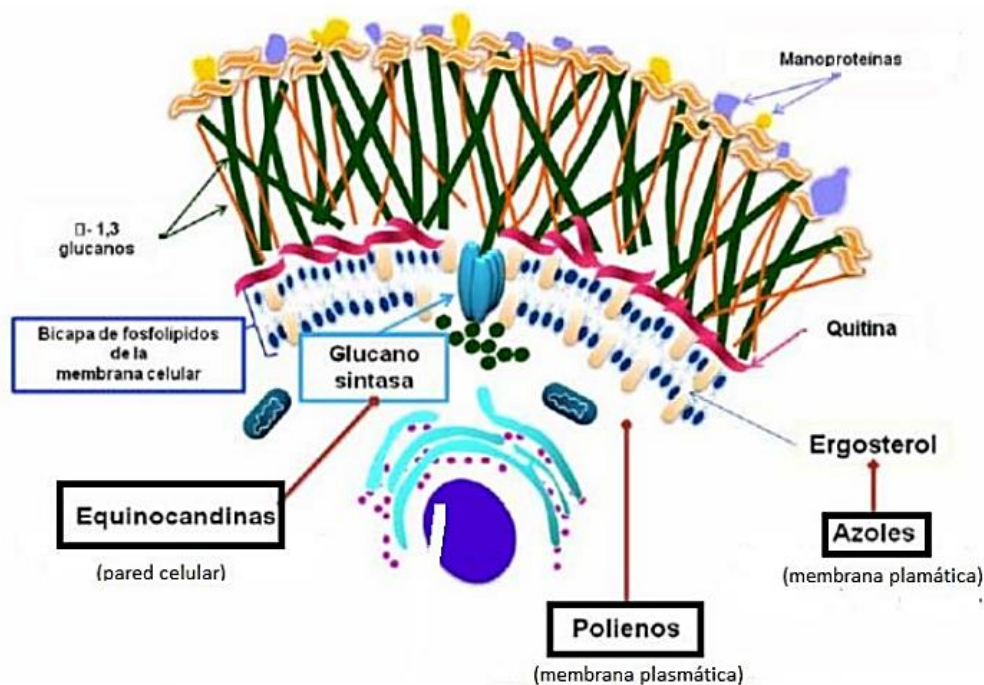


Figura 16. Un ejemplo de antifúngicos que interfieren la síntesis de la pared fúngica son las equinocandinas que inhiben la β -1,3-glucano sintetasa, situada en la pared. (Nota: Adaptado de *Mejoras farmacotécnicas en formulaciones de antifúngicos*. (p.4), por G. Gillen, 2019, Facultad de farmacia, Universidad Complutense).

Neumocandinas A y B

La fuente primaria es un producto obtenido de la fermentación del hifomiceto marino *Zalerion arboricola*, reclasificado por Bills en 1999 como *Glarea lozoyensis*, aislado en el valle del río Lozoya en España.

Corresponden a lipopéptidos incluidos en equinocandinas, que actúan al inhibir la enzima glucano sintetasa e impiden la síntesis de polímeros de glucanos, que son los componentes más importantes de la pared celular de muchos hongos patógenos; este hecho es muy importante, dado que esta enzima confiere a los hongos sus características de resistencia y adaptación (no actúan en bacterias). Generan inestabilidad osmótica y lisis de la pared celular mediante la inhibición en la síntesis de glucanos. La neumocandina B es activa contra varios hongos, así como contra *P. jiroveci* (en sus fases de trofozoíto o de quiste). Parece tener un amplio espectro de actividad en micosis cutáneas y sistémicas, con acción moderada en *C. neoformans* y especies de *Aspergillus*, pero se requieren más estudios, en especial neumonía por *P. jiroveci* en pacientes con SIDA (Arenas,2014).

Cilofungina

Equinocandina sintética soluble en agua, con actividad limitada contra *Candida*. Tiene potencia comparable a la de la anfotericina B en cepas de *Candida*; se usó por vía intravenosa en estudios en fase I, pero esta presentación ha sido abandonada por tóxica y por tener un reducido espectro. Existe una segunda generación de derivados semisintéticos de equinocandinas y neumocandinas con un espectro más amplio y mejores características farmacológicas. Su espectro incluye especies de *Aspergillus* y de *Candida*, así como *P. jiroveci*, pero no *Cryptococcus spp* (Arenas,2014).

Caspofungina

El acetato de caspofungina es un derivado semisintético de la neumocandina B. Fue aprobada por la FDA en 2001.

Se ha comprobado su eficacia en modelos animales con candidosis diseminada por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, y ha mostrado ser fungistática contra *A. flavus*, *A. terreus* y *A. fumigatus*; así como actividad moderada contra *H. capsulatum*, *C. immitis*, *B. dermatitidis*, *P. jiroveci* y algunos hongos dematiáceos. Es útil en candidemia sin neutropenia, pero no en casos por cepas sensibles a fluconazol; se considera la estrategia más eficaz en candidosis en unidades de cuidado intensivo (UCI), pero es la más costosa. En candidosis esofágica en pacientes con infección por HIV con recuentos de linfocitos CD4 menores de 50 cel/mm³, se han encontrado índices de respuesta de 85%. No se conoce su utilidad en endocarditis, meningitis, osteomielitis, endoftalmitis y abscesos cerebrales por *Candida*. Es activa en aspergilosis invasiva.

La caspofungina no es activa frente a *Cryptococcus*, *Trichosporon* ni *Rhodotorula*, por lo que debe aplicarse con precaución en sujetos con infección por VIH (Arenas,2014).

Micafungina

Es una equinocandina semisintética obtenida a partir de la fermentación de *Coleophoma empetri*; fue aprobada para su uso en 2005. Su espectro es similar al de la caspofungina interfiriendo con la síntesis de la pared celular al inhibir la glucano sintasa; actúa en infecciones por *Candida*, incluso ante cepas resistentes a fluconazol como *C. parapsilosis* y *C. rugosa*, y contra *Aspergillus in vitro* y en modelos animales. Se emplea de manera profiláctica en receptores de trasplante de células hematopoyéticas, y como tratamiento en infecciones fúngicas invasivas en pacientes que muestran resistencia o intolerancia a otros antifúngicos.

Se han informado casos de pacientes con neoplasias hematológicas y tricosporonosis de brecha (*Trichosporon beigelii* y *T. asahii*) mientras recibían tratamiento con micafungina, sola o combinada con anfotericina B. Se señala que la micafungina debió ejercer una presión selectiva que favoreció el surgimiento de hongos resistentes poco comunes (Arenas,2014).

Anidulafungina

Es un compuesto recién sintetizado, derivado de *Aspergillus nidulans*. Es fungicida para especies de *Candida* (*C. krusei*, *C. lusitanae* y *C. parapsilosis*), por lo que está indicado en candidemia y candidosis invasiva (Arenas,2014).

Es una nueva equinocandina de aprobación reciente por la Agencia Española del Medicamento. Como otras equinocandinas, inhibe de manera selectiva la síntesis del 1,3-β-D-glucano, un importante componente estructural de la pared de la célula fúngica que no está presente en la de los mamíferos, lo que evita problemas de toxicidad. La actividad antifúngica frente a la mayoría de *Candida* spp. es fungicida, incluyendo las resistentes a fluconazol, y fungistática sobre *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos. Los ensayos clínicos han demostrado buena eficacia en candidiasis orofaríngeas y esofagitis, así como en candidiasis invasoras, incluyendo candidemias, con eficacia igual o superior al fluconazol. La anidulafungina es bien tolerada y cuenta con mínimos efectos adversos. El fármaco, con una semivida muy larga, se degrada en el organismo humano lentamente por medio de peptidasas y proteasas y tiene un perfil bajo de interacciones medicamentosas al no ser sustrato, inductor o interactuar con las isoenzimas del sistema citocromo P450. Por tanto, no es necesario su ajuste de dosis. Al no interactuar con anfotericina B, voriconazol, ciclosporina, tacrolimus y otros fármacos, la anidulafungina puede coadministrarse con otros agentes antifúngicos y fármacos inmunosupresores (Gobernando, Cantón, 2008).

Pradimicina

Es un polipéptido aromático, similar desde el punto de vista estructural a las benanomycininas que son derivados de actinomicetos. La estructura tiene un esqueleto benzonftacenoquinona. Posee actividad dependiente de calcio en la parte sacárida de la manoproteína de la superficie celular. Es de amplio espectro y actúa contra *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*. Tiene actividad en modelos animales, pero presenta toxicidad hepática (Arenas,2014).

Sordarinas

Esta clase de derivados antifúngicos semisintéticos se obtiene a partir de *Graphium putredinis* (GSK-Stiefel); tienen actividad in vitro contra hongos levaduriformes, como *Candida* y *Cryptococcus*, así como contra *P. jirovecii* y otros hongos filamentosos. Actúan contra el factor de elongación 2 (EF-2, del inglés elongation factor 2), indispensable en la síntesis de proteína de la mayor parte de los hongos patógenos, y de la proteína ribosomal P0. Se ha observado aumento de la eficacia cuando se combina con anfotericina B, itraconazol o voriconazol (Arenas,2014).

Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica

Antimetabolitos.

5-Fluorocitosina (5-Fluocitosina)

En 1963, E. Grunberg, E. Titsworth y J. E. Bennett describieron la actividad antifúngica de esta sustancia. En 1967, Grunberg, Prince y John P. Utz la usaron con resultados satisfactorios en humanos.

Es una pirimidina fluorada sintética (C₄H₄ FN₃O) con peso molecular de 129 g/mol, antimetabolito de la citocina, con estructura química parecida a la del 5-fluorouracilo, y soluble en agua y alcohol. Es fungicida y fungistática in vitro, pero in vivo sólo es fungistática. Actúa sobre *Candida albicans* y otras especies como *C. (Torulopsis) glabrata*, *C. neoformans*, *Aspergillus*, *Phialophora* y *Cladophialophora (Cladosporium)*. Las cepas de *Candida* del serotipo A son sensibles en 95% y las del B son resistentes en 95%; *Cryptococcus* es resistente en 5%.

Todos los hongos sensibles desaminan la fluorocitosina hasta dar 5-fluorouracilo, que actúa por interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos. Penetra a las células por medio de la citosina permeasa. El 5-fluorouracilo es metabolizado en primer término hasta dar ácido 5-fluoruridílico por acción de la uridín monofosfato piroforilasa (UMP). Después, el compuesto se incorpora en el DNA por medio de la

síntesis de 5-fluoruridín trifosfato; o es metabolizado hasta generar ácido 5-fluorodesoxiuridílico, un potente inhibidor de la timidilato sintetasa. Esta última reacción anula la síntesis de DNA. Las células de los mamíferos no transforman fluorocitosina en fluorouracilo; acción elemental para la selectividad del compuesto.

Es recomendado en candidosis sistémica o visceral, criptococosis, aspergilosis y cromoblastomycosis. Es más útil cuando se combina con otros fármacos (Arenas, 2014).

Agentes miscelaneos

Griseofulvina

En 1939, A. E. Oxford, H. Raistrick y P. Simonart, en Inglaterra, la aislaron a partir de *Penicillium griseofulvum*, pero se abandonó su estudio por no haberse encontrado actividad antibacteriana. En 1958, J. C. Gentles, en la University of Miami, la usó por vía oral en tiñas experimentales en conejillos de Indias (cobayos, cuyos); su eficacia condujo a su empleo en tiña de la cabeza y otras dermatofitosis.

Se trata de un derivado del benzofurano ($C_{17}H_{17}ClO_6$), de estructura química parecida a la de la colchicina (colquicina), producida por varias especies de *Penicillium*. Es un polvo blanco, termoestable, inodoro, insípido e insoluble en agua. Tiene dos grupos metilo, el principal metabolito es la 6-desmetilgriseofulvina.

Tiene espectro reducido; actúa sobre dermatofitos y tiene menos acción sobre *Sporothrix*; además de su efecto antifúngico, es antiinflamatorio, inhibe la migración de los polimorfonucleares, disminuye la respuesta inmunitaria celular y deprime la transformación de linfocitos. Inhibe *in vitro* la proliferación de fibroblastos, la producción de glucosaminoglucanos y la síntesis de proteínas.

Es fungistática; no destruye los hongos, sino que los elimina porque altera el crecimiento de las hifas al producir enroscamiento de las mismas al interactuar con los microtúbulos polimerizados por medio de la unión a la α y β tubulina y a otras proteínas (factor rizante [curling factor]), aunque también se ha observado actividad inhibitoria en la síntesis de ácidos nucleicos y en la replicación de DNA al inhibir

mitosis en metafase, de tal modo que impide la invasión de la queratina. La griseofulvina carece de acción contra levaduras.

Está indicada en dermatofitosis sin importar el dermatofito; el menos sensible es *T. rubrum*; no se ha demostrado bien la resistencia in vivo, pero se ha confirmado in vitro. Aún es el mejor medicamento en la tiña de la cabeza, y en dermatofitosis diseminadas o de la ingle y los pies; tiene poca actividad en tiña de las uñas, en especial de los pies. Con todo, después de 50 años de experiencia, la griseofulvina se considera un fármaco seguro y eficaz, aunque hoy día no está disponible en muchos países. Al llevar a cabo evaluaciones comparativas de este fármaco contra terbinafina y fluconazol, se observó cura de 96, 88 y 84%, respectivamente, por lo que la primera continúa siendo el tratamiento de elección, aunque la terbinafina es más específica para tiñas tricofíticas y el fluconazol más fácil de administrar por su dosis semanal (Arenas, 2014).

Métodos de sensibilidad antifúngica

La evaluación de la sensibilidad de los microorganismos aislados a los antimicrobianos representa una función importante de los laboratorios de microbiología clínica. El desarrollo y la propagación de patógenos nosocomiales resistentes, así como la cantidad creciente de pacientes inmunocomprometidos y nuevos fármacos antimicrobianos subrayan la importancia de determinar con rapidez y exactitud la sensibilidad a los antimicrobianos de los microorganismos aislados de los pacientes en estado crítico.

La sensibilidad in vivo depende de los siguientes factores:

- Mecanismo de defensa del huésped.
- Concentración del antimicrobiano en el sitio de infección.
- Evolución natural, del tipo y severidad de la infección.
- Demoras en la insaturación del tratamiento.
- Efectos de otras medidas terapéuticas (p. ej., cirugía).

La sensibilidad in vitro depende de los siguientes factores

- Microorganismo propiamente dicho.
- Medio de cultivo.
- Atmósfera.
- Tamaño del inóculo.
- Duración y temperatura de incubación.

La sensibilidad y la resistencia se expresan como la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antimicrobiano necesaria para inhibir el desarrollo de una población definida de microorganismos o como categorías basadas en los niveles antimicrobianos en diversos sitios corporales. La mayoría de las pruebas de sensibilidad se basan directa o indirectamente en la determinación de la CMI y requieren pautas estrictas de estandarización y control de calidad.

La vigilancia de los patrones de resistencia antimicrobiana es importante para establecer principios generales de terapéutica antibiótica (Shoemaker, Ayres, Grenvik, Holbrook, 2002).

Para llevar a cabo el estudio de la CMI se utilizan procedimientos de referencia y cepas de control que proporcionan a estos métodos unos resultados reproducibles, comparables y que permiten clasificar los microorganismos en diferentes categorías: sensibles, resistentes e intermedios.

Métodos basados en la difusión en agar

Difusión en disco

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio (al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas

específicas de esa cepa). El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el antes National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), ahora CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad.

El método de disco difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento (Taroco, Seija, Vignoli, 2006).

La siguiente metodología es la estandarizada por la CLSI:

La utilidad de los métodos de sensibilidad basados en la difusión del antifúngico a partir de discos o tabletas ha estado limitada por los problemas de difusión en agar de los mismos y por su falta de correlación con la clínica. Se ha encontrado correlación con fluconazol y voriconazol entre los halos de inhibición de discos de 25 µg (fluconazol) y 1 µg (voriconazol: Becton Dickinson, Wheadtridge, Colo.) y las CMI obtenidas por el método M27-A3. En 2003, el CLSI estandarizó el método de difusión-disco (documento M44-P) y en 2004 publicó el documento definitivo (documento M44-A) para *Candida spp.* con fluconazol y voriconazol.

Fundamento

Es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias, pero con algunas modificaciones.

Medio de cultivo

Mueller Hinton agar (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (pH 7,2 - 7,4). Se puede incorporar los suplementos cuando se prepara el medio o bien incorporar los suplementos a las placas de MHA ya preparadas.

La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición. Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas S y R a fluconazol, presentando buena correlación con el método M27-A3 y con los datos in vivo. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a las 24 y 48 h, se recomienda realizarla a las 24 h.

Solución madre de glucosa (40%)

- Glucosa 40 g
- Agua destilada 100 ml

Calentar suavemente hasta completa disolución de la glucosa.

Solución azul metileno (5 mg/ml)

- Azul metileno 0,1 g
- Agua destilada 20 ml

Solución madre de glucosa-azul de metileno (GAM)

1. Añadir 200 µl de la solución de azul de metileno a 100 ml de la solución madre de glucosa para obtener una solución GAM con una concentración final de glucosa de 0,4 mg/ml y 10 µg/ml de azul de metileno.
2. Dispensar en viales en alícuotas de 3,5 o 1,5 ml.
3. Esterilizar en autoclave 25 min a 121 °C.
4. Guardar a temperatura ambiente (máximo 1 año).

Preparación de placas MHA suplementado con glucosa y azul de metileno

1. Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.
2. Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Dejar enfriar el medio a 45-50 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9-10 cm de diámetro y 67-70 ml si son de 15 cm (altura de la capa de agar 4 mm).
5. Dejar enfriar y guardar en nevera.

Una vez preparadas las placas se pueden almacenar durante 7 días a menos que se tomen precauciones adicionales que eviten el secado de las placas (figura 17).

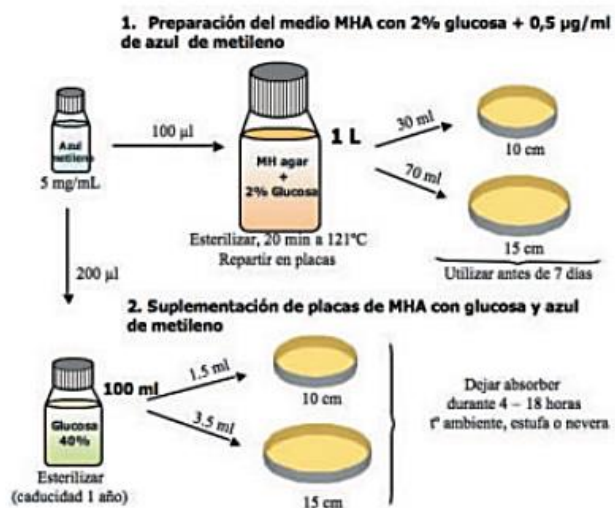


Figura 17. Preparación del medio de Mueller-Hinton agar suplementado y suplementación de las placas de MHA. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.11), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Suplementación de las placas de MHA con glucosa y azul de metileno

1. Verter 1,5 ml de la solución de GAM sobre la superficie de la placa de MHA de 9-10 cm o 3,5 ml si es de 15 cm.
2. Repartir el líquido uniformemente por toda la superficie de la placa con ayuda de un asa de cristal o bolas de cristal.
3. Dejar a temperatura ambiente o en el refrigerador el tiempo necesario para que se absorba todo el líquido antes de proceder a la inoculación de la placa. El tiempo depende de la humedad de la placa, en general de 4 - 18 h.

Preparación del inóculo

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina estéril (NaCl 0,85%) como se ha descrito para el método M27-A3. Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml.

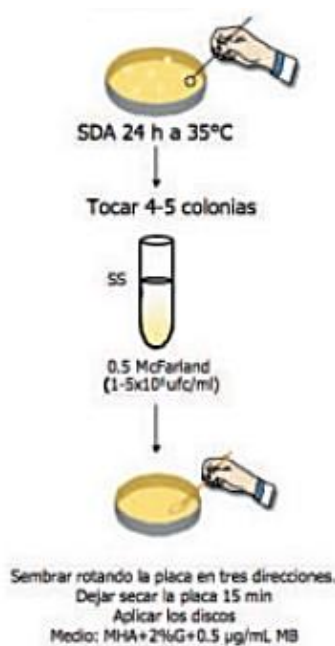


Figura 18. Preparación inóculo levaduras (M44-A). (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos* (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). (p.11), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Inoculación de las placas

1. Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
2. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
3. Sembrar la placa uniformemente (figura 19).
4. Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.
5. Aplicar los discos.

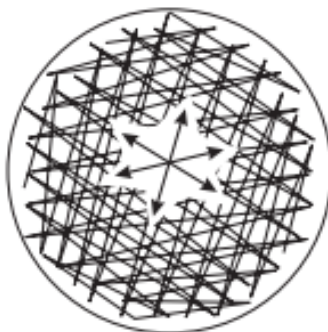


Figura 19. Direcciones en el sembrado de inóculo sobre la superficie del agar. (Nota: Adaptado de *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. (p.18), por R. Sacsquispe, J. Velásquez, 2002, Instituto Nacional de Salud (Perú)).

Temperatura y tiempo de incubación

Incubar a 35 °C durante 20-24 h para *Candida spp.* y 48 h para *Cryptococcus spp.*

Lectura

Si no hay suficiente crecimiento a las 24 h reincubar y leer a las 48 h. Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento. La lectura es subjetiva y se requiere experiencia para dar medidas exactas. La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo deben ser ignoradas. *C. glabrata* y *C. krusei*, pueden necesitar 48 h de incubación.

Cepas control de calidad

En cada ensayo debe incluirse al menos una cepa control de calidad para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas:

- *C. parapsilosis* ATCC 22019
- *C. krusei* ATCC 6258
- *C. albicans* ATCC 90028
- *C. tropicalis* ATCC 750

En el cuadro 4 se especifican los diámetros de los halos de inhibición para las cepas control de calidad.

Antifúngico	Carga del disco	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750
Fluconazol	25 µg		22-33	28-39	26-37
Voriconazol	1 µg	16-25	28-37	31-42	*
Posaconazol	5 µg	23-31	25-36	24-34	23-33

*No se han establecido en esta cepa debido a la variedad encontrada

Cuadro 4. Diámetro de las cepas control de calidad. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.9), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Control de calidad

Para proceder a la lectura de los antibiogramas debemos previamente asegurarnos de que se cumpla un estricto control de calidad para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología. Esto se realiza debido a que existe un gran número de variables que pueden afectar los resultados dentro de las que se destacan:

- a) Actividad de los discos (cuidar que no estén vencidos o que pierdan su carga por almacenamiento incorrecto).

- b) Inadecuada composición y espesor del medio.
- c) Alteraciones en más o en menos en el inóculo (patrón de turbidez 0.5 de la escala de Mc Farland).
- d) Problemas con el tiempo o temperatura de incubación, etc.

Para llevar a cabo eficientemente este control de calidad al mismo tiempo que se realiza el procedimiento para la cepa en estudio se realiza para una cepa control. Las cepas control utilizadas serán las recomendadas por la NCCLS. Estas cepas son denominadas ATCC, una marca registrada (American Type Culture Collection). Estas son cepas conocidas, de las cuales se sabe su patrón de resistencia o sensibilidad. Se conocen y se han establecido los rangos de diámetros en el que debe estar la zona de inhibición de crecimiento bacteriano si las condiciones del procedimiento son las adecuadas. Estos datos se encuentran en tablas de la NCCLS. Se debe verificar que los diámetros de inhibición del crecimiento bacteriano de los discos de antibióticos entren dentro de los establecidos en las tablas, de lo contrario podremos concluir que existe alguna variable que está cambiando las condiciones en que debe ser realizado el procedimiento (Documentos M27-A3, M38-A, 2007).

Ventajas del método

Es un método sencillo, barato y de fácil control y estandarización. Una ventaja adicional del método y específicamente del medio, es que se le pueden realizar algunas modificaciones en cuanto a los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo el antibiograma con microorganismos exigentes o muy exigentes que necesitan más nutrientes que los que este medio les puede ofrecer (Taroco, Seija, Vignoli, 2006).

Etest®

Es un método cuantitativo de difusión en agar comercializado por AB biodisk (Solna, Suecia) y distribuido en España por Izasa S.A.

Las tiras de Etest son tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación a 35 °C durante 24- 48 h para *Candida spp.* y 48-72 h para *C. neoformans*, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de Etest. La correlación con el método M27-A2 varía entre el 60 y el 100%, según los estudios pudiendo depender de varios factores mencionados abajo (Martín-Mazuelos, Cantón Lacasa, Espinel-Ingroff, 2007).

a) Medio de cultivo: mejor correlación en los medios de agar casitona y agar RPMI 1640 con 2% de glucosa y agar Mueller Hinton suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno que en el medio RPMI sin glucosa.

b) Combinación especie/antifúngico: correlación más baja para *C. glabrata* - fluconazol/voriconazol, *C. tropicalis* - fluconazol e itraconazol, y *C. neoformans* - anfotericina B.

c) Tiempo de incubación: mejor correlación con lectura a las 24 h que a las 48 h, excepto para *C. neoformans* que la mejor correlación se consigue a las 48 h.

d) Antifúngico: la correlación es más baja en los azoles debido a que la lectura es más problemática por la aparición de doble halo. En sus trabajos (10 y datos no publicados), han observado una correlación global para voriconazol del 91%, para fluconazol del 74,6% y del 61,7% para itraconazol.

Las asociaciones *C. glabrata* fluconazol/voriconazol y *C. parapsilosis* itraconazol son las que presentan menor correlación (66,6%, 83% y 42,5%, respectivamente), el resto de las especies tienen una correlación por encima del 90% para el voriconazol, del 75% para fluconazol y por encima del 60% para el itraconazol. En el caso de *C. neoformans*, la correlación para fluconazol y 5-fluorocitosina es del 81% y 90%, respectivamente; sin embargo, para itraconazol, la correlación es

inferior al 60%. Sus resultados y los de otros autores, sugieren que este método puede ser útil de rutina sólo para anfotericina B con *Candida spp*, pero es poco útil para los azoles; en el caso de *C. neoformans*, se puede utilizar con 5-fluorocitosina y fluconazol.

Parece ser el método de elección para detectar las cepas resistentes a anfotericina B usando el medio RPMI 1640 suplementado con un 2% de glucosa tanto para *Candida spp*. como para *C. neoformans* cambiando los tiempos de incubación (24 h para *Candida spp*. y 48-72 h para *C. neoformans*) (Martín-Mazuelos, Cantón Lacasa, Espinel-Ingroff, 2007).

Medio de cultivo

RPMI 1640 + MOPS (0,164 M), a pH 7, adicionado con un 2% de glucosa y 1,5% de agar (Angus Biochemicals, Niagara Falls, NY, EE.UU.) suministrado en España por Izasa S.A.

Inóculo

Para *Candida spp*. preparar una suspensión al 0,5 McFarland en solución salina (0,85% de NaCl) a partir de un cultivo de 24 h en SDA. Para *C. neoformans*, preparar una suspensión al 1 McFarland en solución salina a partir de un cultivo de 48-72 h en SDA.

Inoculación

A partir de estas suspensiones, inocular las placas de agar con una torunda sembrando en tres direcciones. Dejar secar 10-15 min para que se absorba el exceso del inóculo. Aplicar las tiras de Etest sobre la superficie del agar, bien manualmente o con el aplicador suministrado por la casa comercial. Colocar 5 tiras si la placa es de 14 mm y 2 si es de 9 mm, situando el extremo de mayor concentración del antifúngico hacia la parte exterior de la placa (figura 20) (Martín-Mazuelos, Cantón Lacasa, Espinel-Ingroff, 2007).



Figura 20. Etest: distribución de las tiras. (Nota: Adaptado de *Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*. (p.6), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Incubación

A 35 °C en aerobiosis durante 24-48 h para *Candida spp.* y 48-72 h para *C. neoformans*.

Lectura

En los azoles, la CMI es la concentración de antifúngico en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento (> 80%) con la tira. En el caso de observarse colonias de menor tamaño en el interior de la elipse de inhibición de los azoles, no hay que tenerlas en cuenta para la determinación de la CMI (figura 21). A veces, con algunos azoles, se observa doble halo de inhibición, pero con colonias del mismo tamaño (grandes) en su interior, en cuyo caso debe considerarse resistente. En el caso de observarse triple halo de inhibición, la CMI es la concentración donde las colonias cambian de tamaño. En el caso de la anfotericina B, toda colonia en el interior de la elipse de inhibición, independientemente de su tamaño, debe valorarse para la lectura de la CMI (Martín-Mazuelos, Cantón Lacasa, Espinel-Ingroff, 2007. p.6).

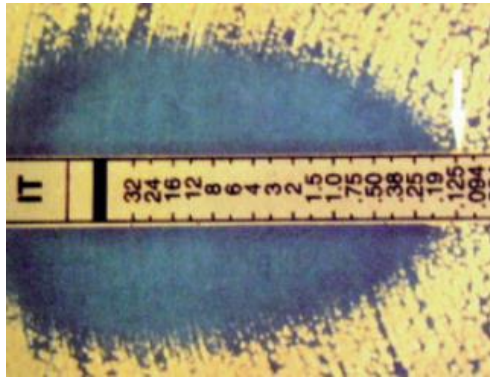


Figura 21. Etest: Lectura de la CMI de itraconazol. (Nota: Adaptado de *Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*. (p.6), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

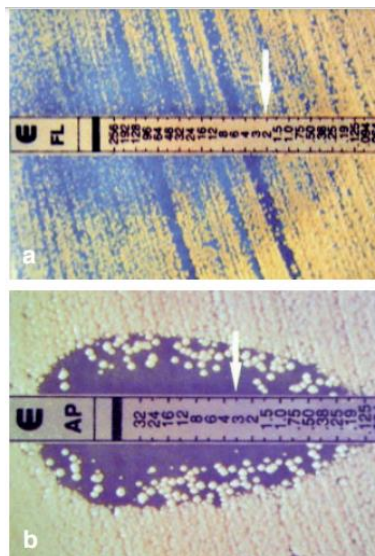


Figura 21. Etest: Lectura de la CMI (flecha) en presencia de colonias en el interior de la elipse de inhibición. a: fluconazol; b: anfotericina B. (Nota: Adaptado de *Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*. (p.6), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Etest hongos filamentosos: Este método es muy útil para la determinación de la sensibilidad in vitro de hongos filamentosos a los antifúngicos, ya que, al contrario de lo que ocurre en las levaduras, las elipses de inhibición son nítidas y más fáciles de interpretar para los azoles y anfotericina B, pero no ocurre lo mismo con las equinocandinas. La correlación con el método M38- A es superior al 88% para anfotericina B y voriconazol y alrededor del 70% para itraconazol, cuando la lectura se hace a las 24 h con Etest y a las 48 h con el M38-A. Sin embargo, la correlación a las 48 h fue del 73,3% para anfotericina B y del 42,6% para itraconazol. Para

A. flavus, *P. boydii* y *S. prolificans* los valores de CMI por Etest son más bajos que los obtenidos por el método M38-A. A pesar de los buenos resultados preliminares de este método todavía se requieren más estudios para poder ser introducido en los laboratorios de microbiología clínica, y para determinar su correlación de los datos in vivo.



Figura 22. Placa de Etest inoculada con *A. fumigatus*. Lectura de la CMI a las 24 h (flecha). (Nota: Adaptado de *Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*. (p.8), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).



Figura 23. Placa de Etest inoculada con *Aspergillus* spp, observación del doble halo en la tira de caspofungina. (Nota: Adaptado de *Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos*. (p.8), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Métodos de dilución

Las primeras determinaciones se realizaron empleando una cantidad considerable de tubos con caldo de cultivo, a los cuales se le colocaban diluciones crecientes de

antibióticos con el mismo fundamento que el descrito para el método de dilución en agar. Este procedimiento se denominó macrodilución en caldo. Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización.

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución en caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento de su costo (Taroco, Seija, Vignoli, 2006).

Macrodilución en caldo

Método de macrodilución en caldo (levaduras)

Se establece a la macrodilución como uno de los métodos utilizados para definir la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) del antibacteriano, la misma que puede determinarse mediante observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico. Es una técnica en la que se prueba la actividad inhibitoria de una sustancia o medicamento sobre una suspensión normalizada de bacterias frente a varias concentraciones del agente antibacteriano, mediante diluciones seriadas que reducen la concentración progresivamente, en un medio líquido estandarizado. La técnica necesita de tubos de dilución con un contenido mínimo de 1ml. Este procedimiento tiene algunas ventajas como: la posibilidad de lograr el cultivo estandarizado de la mayoría de microorganismos y también nos permite reproducir resultados. Por otro lado, resulta engorroso, por la cantidad de material, de manipulación y del trabajo requerido para preparar los tubos de dilución en caldo, razón por la que no es muy utilizada en los laboratorios clínicos (Carmilema, Delgado, 2010).

El siguiente método descrito es la estandarización de la CLSI de macrodilución para levaduras (M27-A3).

En este método se utilizan tubos estériles de 11x70 mm y el volumen final en cada tubo es de 1 ml. El medio de cultivo, la preparación del mismo y de la solución madre de antifúngico es igual al método de microdilución.

Preparación de las diluciones de antifúngico

Antifúngicos solubles en agua

1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la figura 24.
2. Las diluciones se reparten en alícuotas de 0,1 ml, en tubos de 11x70 y se congelan a -70°C hasta su utilización completamente cerrados.
3. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado.

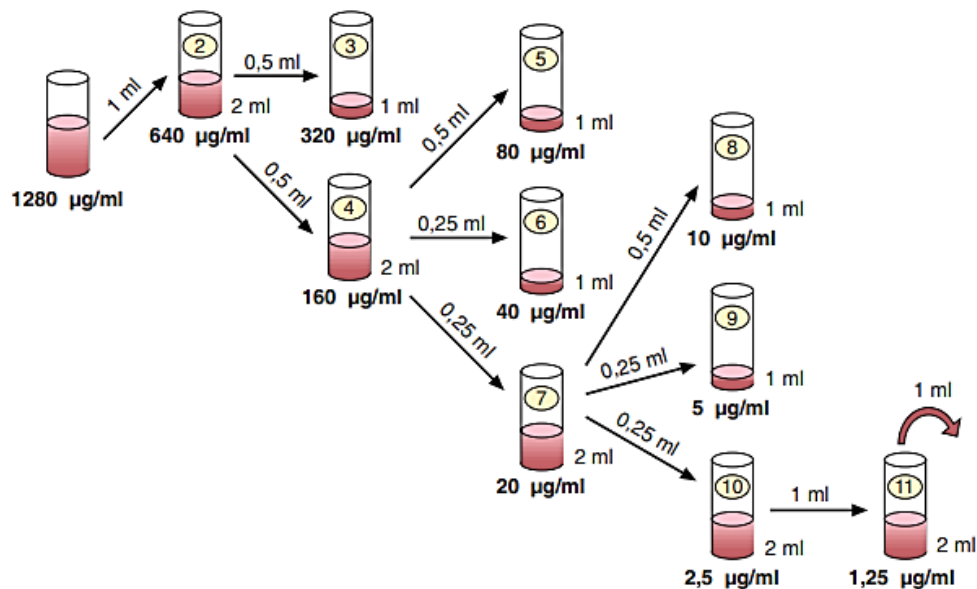


Figura 24. Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua. Diluyente RPMI 1640. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.3), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

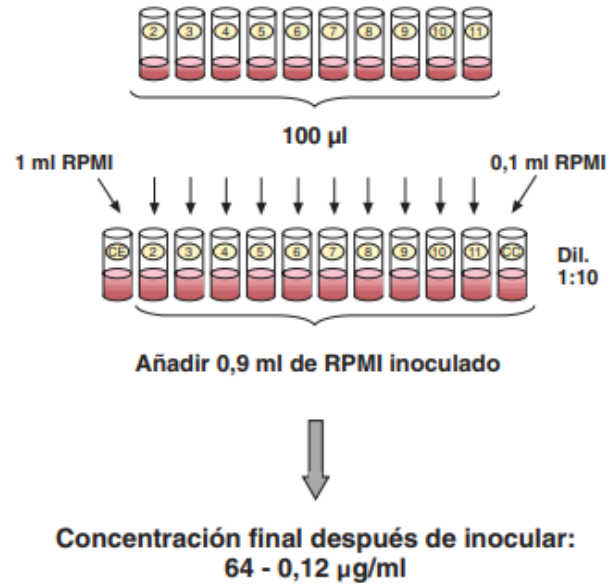


Figura 25. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.9), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Antifúngicos insolubles en agua

1. Preparar las diluciones del antifúngico siguiendo los pasos de la figura 26.
2. Diluir 1/10 en RPMI.
3. Se reparten en alícuotas de 0,1 ml en tubos de 11x70 y se congelan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, completamente cerrados, hasta su utilización.
4. El día del ensayo se descongelan los tubos y se diluyen 1/10 añadiendo a cada tubo 0,9 ml de RPMI inoculado.

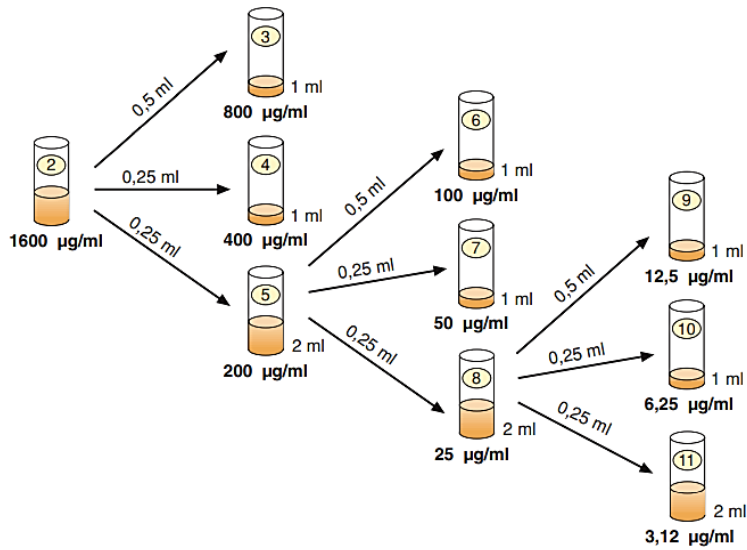


Figura 26. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO). (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos* (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). (p.5), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

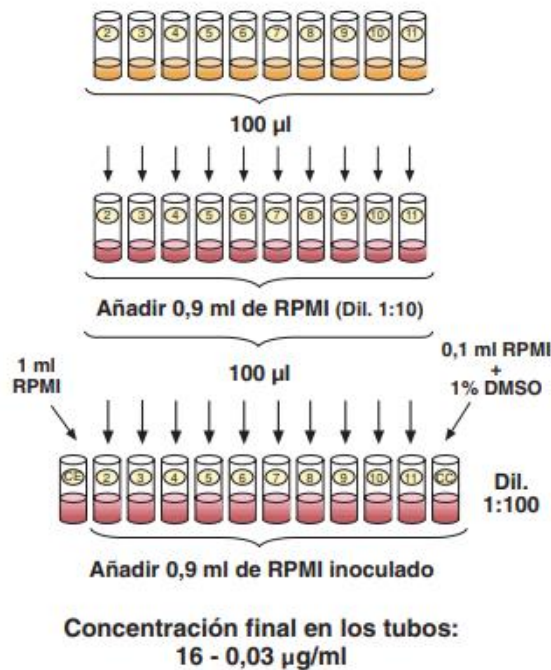


Figura 27. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de macrodilución). (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos* (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). (p.9), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución. A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de McFarland se diluye 1/2000 en medio RPMI (concentración 0,5-2,5x10³ UFC/ml).

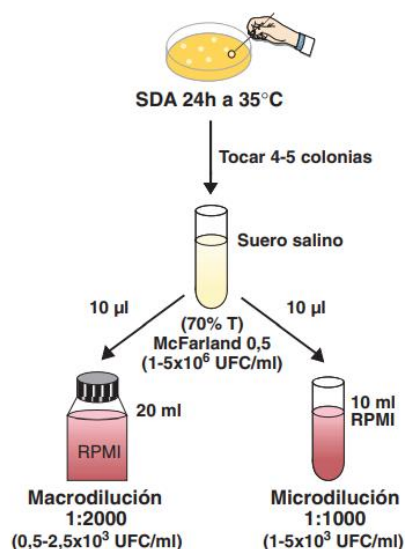


Figura 28. Preparación del inóculo de levaduras. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.6), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Temperatura y tiempo de incubación

Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h y las inoculadas con *C. neoformans* durante 72 h.

Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control diluido 1/20 (0,2 ml del tubo control más 0,8 ml de RPMI). La CMI de los azoles y 5- fluorocitosina es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición del crecimiento del 80%. La CMI de la anfotericina B es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición del crecimiento

del 100%. En el cuadro 5 se resume las CMI de las cepas control de calidad para este método.

Antifúngico	Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	C. parapsilosis ATCC22019	C.krusei ATCC6258
Anfotericina B	0,25-1	0,25-2
Fluconazol	2-8	16-64
Itraconazol	0,06-0,25	0,12-0,5
Ketoconazol	0,06-0,25	0,12-0,5
5-fluorocitosina	0,12-0,5	4-16

Cuadro 5. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de macrodilución M27-A3. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.9), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Método de macrodilución en caldo (filamentosos)

Se utilizan tubos estériles de 11x70 mm. Volumen final: 1 ml. El medio de cultivo y preparación del mismo, la solución madre y diluciones del antifúngico igual al método de microdilución.

Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución. A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de MacFarland se diluye 1/100 en medio RPMI (concentración $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml) y se inoculan los tubos que contienen las concentraciones de antifúngico con 0,9 ml del inóculo diluido lo cual diluye estas concentraciones 1/10.

Temperatura y tiempo de incubación

Igual que para el método de microdilución.

Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. La CMI de los azoles, anfotericina B y 5-fluorocitosina

es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición total del crecimiento (100%). La CME de las equinocandinas es la concentración más baja en la que se observan colonias muy pequeñas y ramificadas. Debe leerse a las 24 h en *Aspergillus spp.* y a las 48 h en *Scedosporium spp.*

Según la CLSI las pruebas de sensibilidad deben realizarse en las siguientes situaciones:

1. En las micosis invasoras, en las que conviene conocer si la cepa es resistente al antifúngico puesto que se correlaciona con fracaso terapéutico. Lo contrario no siempre se cumple.
2. En las micosis orofaríngeas que no responden al tratamiento.
3. Cuando se quiere conocer la prevalencia de cepas resistentes en la institución.
4. En las micosis producidas por patógenos emergentes.

Microdilución en caldo

Método de microdilución en caldo (levaduras)

La microdilución en caldo, es una técnica basada en la actividad inhibitoria, se realiza en una placa de poliestireno que contiene 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos, usando una celdilla como control positivo (caldo+inóculo), otra como control negativo (sólo caldo) y también una para el control de la estabilidad del antibacteriano usando una concentración ya conocida. La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1ml en cada celdilla. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó el desarrollo de dicho método, que interpreta el crecimiento microbiano en los diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia). Con este método, los resultados son más rápidos, dando la posibilidad de un cambio oportuno de terapia antimicrobiana, lo que se traduce en una importante reducción de los costos totales en cuanto a días de hospitalización

y exámenes de laboratorio, también confiere un control de estandarización y reproducibilidad de los resultados. A diferencia de la macrodilución, se disminuyen las horas de trabajo en los laboratorios ya que se realizan en menor tiempo, por ello no requiere de tanto personal.

La microdilución, actualizada por el National Committee for Clinical Institute (NCCIS), permite un informe selectivo de los antimicrobianos.

Pero al igual que la macrodilución presenta desventajas, como que los paneles o tarjetas vienen determinadas por el fabricante, también están las discrepancias con los métodos convencionales (Carmilema, Delgado, 2010).

La siguiente metodología está estandarizada por la CLSI en el documento M27-A3:

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH $7\pm 0,1$ y con 0,2% de glucosa.

Componentes:

- RPMI 1640 10,40 g
- Tampón MOPS. 34,53 g
- Agua destilada 1.000 ml

Preparación:

1. Disolver en 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución.
2. Ajustar el pH a 6,9 - 7,1, utilizando NaOH 1N o 10N (medir la cantidad utilizada).
3. Añadir agua destilada hasta completar 1 L.
4. Filtrar estérilmente.
5. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).

Preparación de la solución madre de antifúngicos:

Preferiblemente debe utilizarse sustancia valorada que se puede solicitar a los laboratorios productores, en caso de no disponer de sustancia valorada se puede utilizar el preparado comercial para infusión endovenosa, comprobando que las CMI para las cepas control estén dentro del intervalo recomendado.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración al menos 10 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y disolverla en agua destilada estéril.
2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización (máximo 6 meses), o a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (máximo 2 meses).

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

1. Preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de $1.600\text{ }\mu\text{g/ml}$ (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y disolverla en dimetil sulfóxido (DMSO).
2. Repartir en alícuotas de 1,1 ml y congelar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización (máximo 6 meses), o a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (máximo 2 meses).

Preparación de las diluciones de antifúngico

Se recomienda seguir el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua.

Antifúngicos solubles en agua (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina)

Seguir las indicaciones del cuadro 7 y la figura 21. Las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 64 y $0,12\text{ }\mu\text{g/ml}$. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente RPMI 1640.

2. Seguidamente se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml).

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
n°1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	n°2
n°2	640 µg/ml	0.5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	n°3
n°3	640 µg/ml	0.5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	n°4
n°4	160 µg/ml	0.5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	n°5
n°5	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	n°6
n°6	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	n°7
n°7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	n°8
n°8	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	n°9
n°9	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	n°10
n°10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	n°11

Cuadro 6. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.3), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, excepto el tubo n° 11 (2 ml). De este último se desechará 1 ml.

En los tubos n° 2 al n° 11 la concentración del antifúngico es 10 veces superior a la concentración final deseada.

Antifúngicos insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol)

Los pasos a seguir se detallan en el cuadro 7 y en la figura 24 las concentraciones a ensayar son las comprendidas entre 16 y 0,03 µg/ml. Los volúmenes indicados son suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

1. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO.

2. Seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32 µg/ml - 0,06 µg/ml) y la de DMSO, 2%.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
n°2	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 µg/ml	n°3
n°2	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 µg/ml	n°4
n°2	1600 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 µg/ml	n°5
n°5	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 µg/ml	n°6
n°5	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 µg/ml	n°7
n°5	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 µg/ml	n°8
n°8	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	n°9
n°8	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	n°10
n°8	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	n°11

Cuadro 7. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.4), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Añadir a todos los tubos 4 ml de RPMI

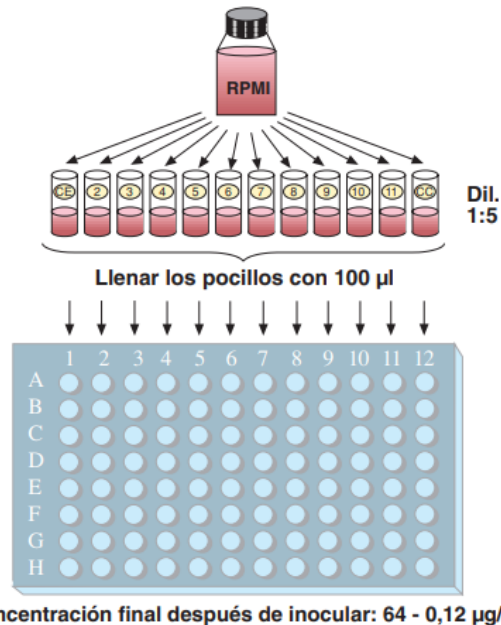


Figura 29. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua (método de microdilución). (Nota: Tomado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.4), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Llenado de las placas

Las placas de microtiter se rellenan con 100 µl de solución de antifúngico siguiendo los siguientes pasos:

1. El contenido del tubo nº 2 se vierte en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 µl y se llenan los pocillos de la columna nº 2 (2A - 2H).
2. Con el contenido del tubo nº 3 se llenan los pocillos de la columna nº 3 (3A - 3H).
3. Con el contenido del tubo nº 4 se llenan los pocillos de la columna nº 4 (4A - 4H).
4. Etc.... y así hasta la columna nº 11.
5. Los pocillos de la columna nº 12 se llenan con 100 µl de RPMI (control de crecimiento).

ATENCIÓN: cuando se trata de antifúngicos insolubles en agua, la columna nº 12 se rellena con 100 µl de RPMI con un 2% de DMSO, o el disolvente que se haya utilizado.

- Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad).
- Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa de plástico o con papel de estaño, para evitar la evaporación, y se congelan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, o bien a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

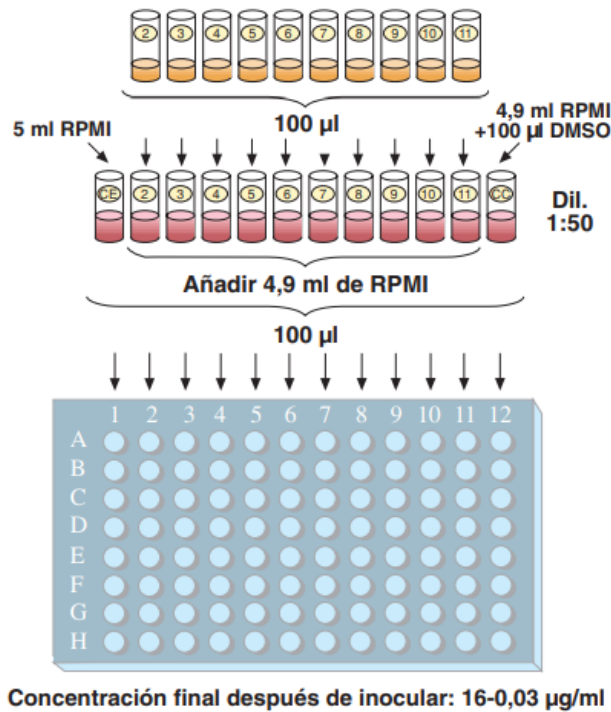


Figura 30. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.5), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Preparación del inóculo

Si la levadura ha estado almacenada o congelada, antes de realizar las pruebas de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pases en medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA).

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (NaCl 0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de 1×10^3 - 5×10^3). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$.

Inoculación de placas

El día del ensayo se sacan las placas del congelador y se dejan a temperatura ambiente hasta su completa descongelación. Se inoculan con 100 μ l de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12.

La columna nº 1 (1A - 1H) que contiene 200 μ l de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. También sirve para leer la absorbancia del medio. La columna nº 12 (12A - 12H) no contiene antifúngico, pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento.

Control de pureza del cultivo

Es conveniente hacer un control del inóculo utilizado; para ello se siembran 10 μ l del pocillo control (nº 12) en una placa de CHROMagar y, a las 24 h, se cuentan las UFC. De esta forma se controla la pureza y densidad del cultivo y se comprueba la identificación de la cepa.

Incubación de las placas

Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h y las inoculadas con *C. neoformans* durante 72 h.

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura visual debe realizarse con ayuda de un espejo invertido.

Azoles y 5-fluorocitosina: la CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ($\geq 50\%$), comparada con el crecimiento control después de 48 h de incubación.

Equinocandinas: La CMI se lee como en los azoles, pero a las 24 h de incubación.

Anfotericina B: la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

Lectura espectrofotométrica

Aunque no es la recomendada por el CLSI, puede hacerse una lectura espectrofotométrica a 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), también puede leerse a 490 y 530 nm ya que, prácticamente, la CMI no varía.

Antes de realizar la lectura espectrofotométrica es conveniente agitar las placas para obtener una suspensión homogénea y, una vez realizada, se resta a todos los pocillos la absorbancia del medio, es decir la absorbancia del pocillo de la columna nº 1.

La CMI para los azoles, 5-fluorocitosina, equinocandinas y, en general, los antifúngicos fungistáticos, es la concentración más baja de antifúngico cuya densidad óptica es $\leq 50\%$ del pocillo control de crecimiento (pocillo de la columna nº 12). La CMI para la anfotericina B y, en general, otros antifúngicos fungicidas, es la concentración más baja cuya densidad óptica es $\leq 5\%$ del control.

Cepas control de calidad

En cada ensayo debe incluirse una cepa control para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas: *C. parapsilosis* ATCC 22019 *C. krusei* ATCC 6258 Son cepas que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CMI se ha determinado repetidamente. En el cuadro 8 se especifica las CMI de los antifúngicos para estas cepas.

Antifúngico	Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$)			
	C. parapsilosis ATCC 22019		C.krusei ATCC 6258	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Anfotericina B	0,25-2	0,5-4	0,5-2	1-4
Anidulafungina	0,25-2	0,5-2	0,03-0,12	0,03-0,12
Caspofungina	0,25-1	0,5-4	0,12-1	0,25-1
Micafungina	0,25-2	0,5-4	0,12-0,5	0,12-0,5
Fluconazol	0,5-4	1-4	8-64	16-128
Itraconazol	0,12-0,5	0,12-0,5	0,12-1	0,25-1
Ketoconazol	0,03-0,25	0,06-0,5	0,12-1	0,25-1
Posaconazol	0,06-0,25	0,06-0,25	0,06-0,5	0,12-1
Ravuconazol	0,016-0,12	0,03-0,25	0,06-0,5	0,25-1
Voriconazol	0,016-0,12	0,03-0,25	0,06-0,5	0,12-1
5-fluorocitosina	0,06-0,25	0,12-0,5	4-16	8,0-32

Cuadro 8. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A3. (Nota: Adaptado de *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. (p.8), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

El EUCAST es un organismo europeo, creado por la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID), cuya función primordial es el desarrollo de estándares para realizar pruebas de sensibilidad in vitro a los antimicrobianos. Este comité debe tomar en consideración las metodologías preexistentes en países europeos, lograr el mayor consenso posible entre expertos y las sociedades nacionales, así como intentar que los estándares

sean compatibles con los procedimientos de organismos homólogos no europeos, como el Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) estadounidense.

La metodología que se describe a continuación es la propuesta por el EUCAST:

Medio de cultivo

El medio de cultivo recomendado es RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y a pH 7,0. Además, el medio debe complementarse con glucosa hasta alcanzar una concentración del 2%. La adición de glucosa se realiza con la intención de favorecer el crecimiento de las levaduras.

Preparación de los antifúngicos

Los antifúngicos deben obtenerse en forma de polvo valorado solicitándolo al laboratorio que los produce o en aquellos casos en los que sea posible, comprándolos a un distribuidor acreditado. Debe conocerse el número de lote, potencia, fecha de caducidad y condiciones de conservación. Las preparaciones clínicas no deben emplearse. Las soluciones madre deben prepararse según la siguiente fórmula: peso (mg) es igual a volumen (ml) multiplicado por concentración ($\mu\text{g/ml}$) entre potencia ($\mu\text{g/mg}$), y deben obtenerse tomando en cuenta las concentraciones a las que se quieren preparar las placas para los estudios de sensibilidad.

Se recomienda pesar, al menos, 100 mg de polvo valorado en balanza de precisión, para disminuir al máximo los errores de pesado. Las soluciones madre deben prepararse a una concentración 100 veces superior a la concentración más elevada que se quiera incluir en el estudio de sensibilidad. En el cuadro 9, se muestran los disolventes que pueden utilizarse con cada antifúngico y las concentraciones recomendadas de las soluciones madre, para estudios clínicos rutinarios. Si se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO), los tubos deben ser de vidrio.

Antifúngico	Disolvente	Concentración de la solución madre (mg/l)	Intervalos de concentración recomendados (m/l)
Anfotericina B	DMSO	3.200	0,03-16
5-Fluorocitosina	DMSO o 50:50 acetona: agua	12.800	0,125-64
Fluconazol	Agua	12.800	0,125-64
Itraconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Ketoconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Voriconazol	DMSO	1.600	0,015-8

DMSO: Dimetilsulfóxido

Cuadro 9. Resumen de la preparación de los antifúngicos en estudios de sensibilidad. (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 20), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

El documento 7.1 describe el procedimiento para realizar estudios de sensibilidad con 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol y ketoconazol. La anfotericina B no fue incluida, ya que existen ciertas dudas sobre si los estudios de sensibilidad con RPMI sirven para detectar la resistencia a este polieno. No obstante, varios estudios han demostrado que el método del EUCAST puede emplearse en los estudios con este antifúngico, ya que produce resultados comparables a los obtenidos con el documento del CLSI. También se han realizado estudios con voriconazol, con resultados similares.

Habitualmente, no es necesario esterilizar las soluciones, pero si se tienen dudas sobre la esterilidad de la misma, pueden utilizarse filtros de membrana. No deben emplearse otros materiales ya que pueden absorber cantidades significativas del antifúngico. Los viales con las soluciones madre pueden conservarse a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o inferior, pero no más de seis meses. Una vez descongelados los viales no deben recongelarse otra vez.

El intervalo de concentraciones a dispensar en las placas puede variar según los estudios. Generalmente, se recomiendan diluciones dobles basadas en una concentración de 1 mg/l. En el cuadro 9 se incluyen los intervalos de

concentraciones recomendados para hacer pruebas de sensibilidad con *Candida spp.*

Preparación de las placas de antifúngicos

Las placas deben ser de microdilución, estériles, con 96 pocillos de fondo plano. Las placas deben rellenarse con medio de cultivo a concentración doble (2x), ya que al ser inoculadas se producirá una dilución de un medio. El EUCAST recomienda dos formas diferentes de preparación según el tipo de antifúngico.

Preparación de las placas de antifúngicos hidrófilos

De esta forma se preparan las placas de fluconazol y de 5-fluorocitosina.

1. Para obtener los intervalos expuestos en el cuadro 9, la solución madre debe ser diluida 100 veces en RPMI-2% glucosa 2x, obteniéndose una solución de trabajo a una concentración de 128 mg/l.
2. Tras ello, se dispensan 200 µl de la solución de trabajo en la columna número 1 de la placa de microdilución. Las columnas 2 a la 12 se rellenan con 100 µl de RPMI-2% glucosa 2x sin antifúngico.
3. A continuación, se toman 100 µl de la columna 1 y se transfieren a la columna 2. Luego, se toman 100 µl de la 2 (que ahora tiene 200 µl) y se pasan a la 3, y así hasta llegar a la columna 10.
4. Los últimos 100 µl recogidos en la columna 10 se desechan.
5. En las columnas 11 y 12 no se dispensa antifúngico, ya que se utilizarán como control de crecimiento (CC) y control de esterilidad (B).
6. Las placas pueden almacenarse a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante seis meses o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un mes. Las placas deben mantenerse selladas en plástico o papel aluminio mientras estén congeladas.

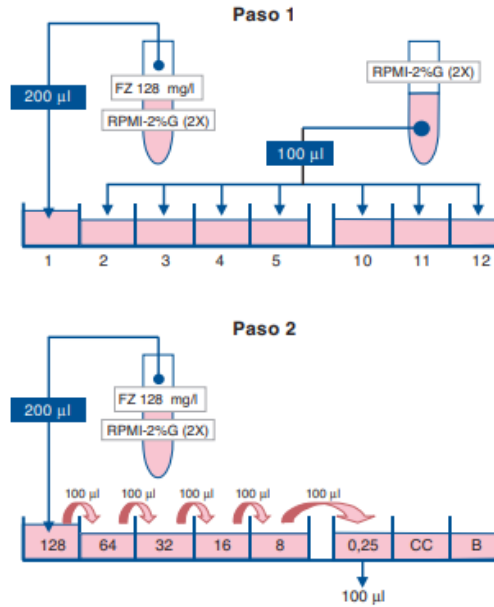


Figura 31. Preparación de las placas de microdilución de antifúngicos hidrófilos (se toma fluconazol a modo de ejemplo). (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 21), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Preparación de placas de antifúngicos hidrófobos

De esta forma se preparan las placas de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y voriconazol:

1. Se toma una alícuota de solución madre.
2. Se llenan 9 tubos más con 150 µl de DMSO (los tubos deben de ser de vidrio).
3. Se toman 150 µl de la solución inicial del antifúngico y se hacen diluciones consecutivas 1:2, en los 9 tubos.
4. A continuación, se llenan 10 tubos con 9,9 ml de RPMI-2% glucosa 2x.
5. Se traspasan 100 µl de cada uno de los tubos con diluciones dobles del antifúngico en DMSO, a los tubos con RPMI, obteniéndose diluciones 1:100 del antifúngico.
6. Un método alternativo es utilizar un reservorio para pipetas con doce pocillos de 5 ml.

7. Tras ello, se dispensan 100 μ l en la primera columna de la placa de microdilución, del primer tubo o del primer depósito del reservorio, otros 100 μ l en la segunda columna desde el segundo tubo o depósito, otros 100 μ l en la tercera columna desde el tercer tubo o tercer depósito, y así, hasta la columna 10.

8. En las columnas 11 y 12 se añaden 100 μ l en cada pocillo de RPMI-2% glucosa 2x sin antifúngico.

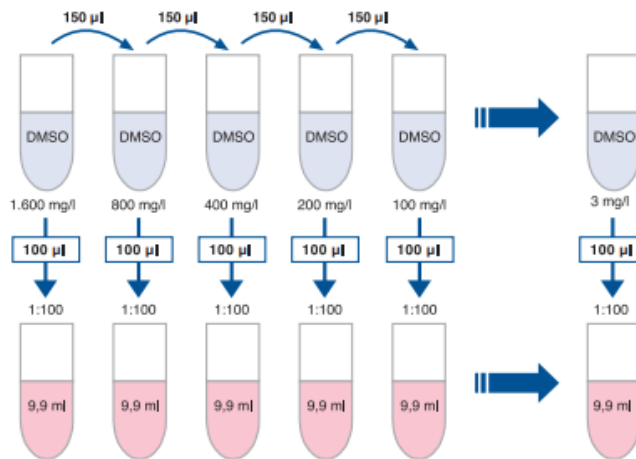


Figura 32. Preparación de las soluciones de trabajo para preparar placas de microdilución de antifúngicos hidrófobos (solución madre de 1.600 mg/l, a modo de ejemplo). (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 21), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

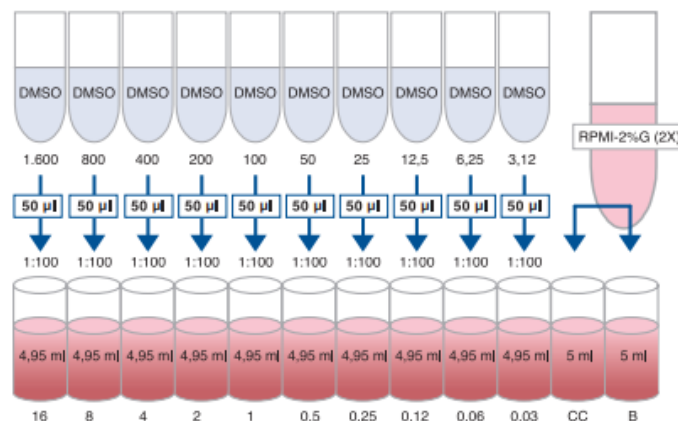


Figura 33. Método alternativo para preparar las soluciones de trabajo para preparar placas de microdilución de antifúngicos hidrófobos. (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 21), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

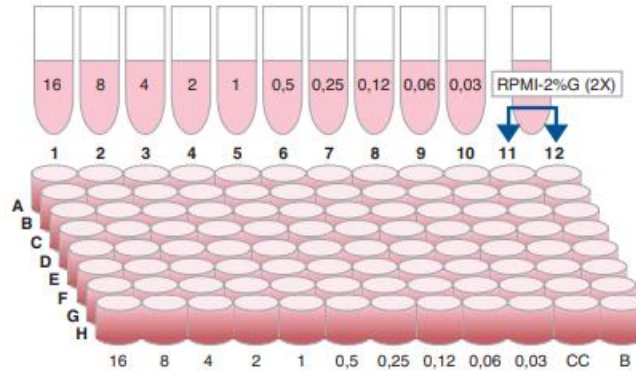


Figura 34. Llenado de las placas de microdilución de antifúngicos hidrófobos. (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 22), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Preparación del inóculo de *Candida* spp.

El inóculo se prepara de la siguiente forma:

1. Un día antes de hacer el estudio de sensibilidad, las levaduras se subcultivan en agar glucosado de Sabouraud o en agar glucosado de peptona, y se incuban 18-24 h, a 35-37 °C.
2. El inóculo se prepara picando cinco colonias distintas, de 1 mm de diámetro, y resuspendiéndolas en 5 ml de agua destilada.
3. La suspensión se homogeniza con un agitador de sobremesa a 2.000 rpm, durante 15 segundos.
4. El inóculo se ajusta a un 0,5 McFarland (mediante escala o turbidímetro) con agua destilada. Tras ello, se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro a 530 nm (la densidad óptica será de 0,09-0,13), lo que equivale a una suspensión de levaduras de 1-5 x 10⁶ UFC/ml.
5. Por último, se hace una dilución 1:10 en agua destilada, preparando la suspensión de trabajo que tendrá 1-5 x 10⁵ UFC/ml.

Inoculación e incubación de las placas de microdilución

En cada placa pueden estudiarse hasta ocho cepas, una por fila, recordando que en todas las placas debería incluirse, al menos, una cepa control de calidad. Cada pocillo es inoculado con 100 µl de las suspensiones de trabajo, por lo que todos los pocillos se diluyen a la mitad, de ahí la utilización del RPMI a doble concentración. La columna 11 también se inocula con 100 µl, ya que es el control de crecimiento. A la columna 12 se añaden 100 µl de agua destilada, ya que es el control de esterilidad y el blanco.

Las placas se incuban a 35-37 °C en estufa con ambiente normal (sin CO₂), durante 24 h.

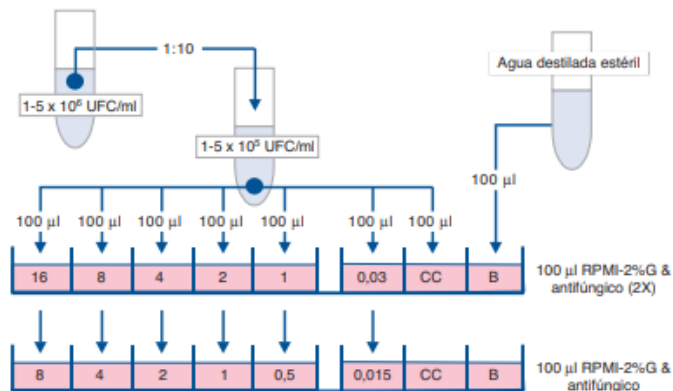


Figura 35. Inoculación de las placas de microdilución. (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 22), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Lectura de los resultados

Las placas deben leerse en un lector de placas de microdilución, en el que se detecte la densidad óptica de los pocillos. La longitud de onda recomendada es de 530 nm, al igual que al preparar el inóculo, pero también pueden emplearse otras longitudes de onda [9]. El valor de densidad óptica de los pocillos de la columna 12 (blanco) debe sustraerse siempre a las lecturas del resto de los pocillos. Las placas pueden agitarse si se desea antes de la lectura, pero al ser de fondo plano, no suele

formarse botón en el centro del pocillo, por lo que la lectura no necesita de homogenizado previo.

El subcomité de EUCAST recomienda que, si el control de crecimiento no supera 0,5 de densidad óptica, las placas deben reincubarse otra vez y determinar la CMI a las 48 h. No obstante, una densidad óptica de 0,2 es suficiente para determinar la CMI, por lo que es probable que se incluya este valor en las siguientes versiones del documento. La CMI de los antifúngicos se determina de la siguiente forma: * 5-fluorocitosina y azoles: es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la densidad óptica igual o superior al 50%, con respecto a la del control de crecimiento. * Anfotericina B: es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la densidad óptica igual o superior al 90%, con respecto a la del control de crecimiento.

Interpretación de los resultados

Aún no se han propuesto los puntos de corte para interpretar los resultados obtenidos con la metodología EUCAST. Debe destacarse que los puntos de corte del CLSI, recomendados para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina, no pueden utilizarse para el método del EUCAST. Esto se debe a que la metodología europea recomienda la lectura a las 24 h de incubación, mientras que la estadounidense aconseja a las 48 h. Este cambio en el tiempo de lectura produce algunas diferencias sustanciales entre ambos métodos, sobretodo en las cepas con crecimiento residual (trailing) y en algunos organismos resistentes.

El EUCAST está inmerso, actualmente, en el proceso de definición de los puntos de corte. Para ello, se están utilizando distribuciones de CMIs de cepas clínicas, obtenidas por la metodología EUCAST. Se realizan análisis epidemiológicos, observando cómo se distribuye la población de cepas de cada una de las especies, para definir qué cepas pertenecen a la población salvaje (wild type), es decir, aquellas cepas que no han desarrollado mecanismos de resistencia. Los resultados se relacionan con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antifúngicos. Tras ello, si se observan cepas con CMIs significativamente más elevadas que la mayoría de los miembros de su especie, y esas CMIs se sitúan por

encima de los valores de las variables farmacocinéticas críticas de cada antifúngico, se propondrán los puntos de corte.

Hasta la fecha, el subcomité ha recogido las CMI de más de 5.000 cepas, ha depurado y tabulado los datos, y está analizando las distribuciones poblacionales, por lo que es probable que pronto se propongan puntos de corte. En caso de utilizar el método EUCAST, las recomendaciones actuales para interpretar los resultados son considerar como resistentes in vitro, aquellas cepas que muestran una CMI significativamente más elevada que los miembros de su especie. Así, por ejemplo, CMIs de fluconazol por encima de 16 mg/l o de anfotericina B por encima de 1 mg/l podrían considerarse como resistentes in vitro.

Control de calidad

El control de calidad se realiza de forma similar al descrito en documentos publicados previamente, particularmente el M23-A y el M27-A2 del CLSI. El subcomité del EUCAST está realizando un estudio multicéntrico para establecer cepas control de calidad. Hasta ese momento, el subcomité recomienda utilizar las cepas cuyos valores control se recogen en el cuadro 10. Estos valores fueron establecidos en un trabajo preliminar realizado en nueve laboratorios. El subcomité recomienda mantener las cepas control de calidad a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si se quieren mantener almacenadas para uso frecuente, pueden subcultivarse en agar Sabouraud y conservar a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 días. Tras esas dos semanas deben subcultivarse de nuevo. Las cepas control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMIs están dentro del intervalo de control. Si la CMI de la cepa control no se incluye en el intervalo en más de una ocasión, tras repetir el test 20 veces en días distintos, debe analizarse todo el método en busca del error. Por último, se recomienda hacer controles de los lotes de RPMI y del proceso de preparación de las placas de microdilución.

Cepa	Antifúngico	Media geométrica	Moda	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo Control de Calidad	% cepas dentro del intervalo	Valores del CLSI
ATCC 6258	5FC	2,6	2	2	1	8	1 - 4	97	8 - 32
<i>C. krusei</i>	FLZ	25,7	16	32	8	32	8 - 32	100	16 - 128
	ITZ	0,12	0,12	0,12	0,03	0,5	0,06 - 0,25	95	0,25 - 1
ATCC 22019	5FC	0,25	0,25	0,25	0,12	0,5	0,12 - 0,5	100	0,12 - 0,5
<i>C. parapsilosis</i>	FLZ	1,51	2	2	1	4	1 - 4	100	1 - 4
	ITZ	0,07	0,06	0,06	0,03	0,25	0,03 - 0,12	97	0,12 - 0,5

Cuadro 10. Valores para realizar el control de calidad. (Nota: Adaptado de *Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1)*. (p. 20), 2007, Revista Iberoamericana de Micología).

Parámetro	CLSI	EUCAST
Medio	RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y concentración de glucosa de 0,2%	RPMI 1640 con glutamina, sin barbonato y concentración de glucosa de 2%
Densidad del inóculo	0,5-2,5x10 ³ ufc/ml	1-5x10 ³ ufc/ml
Lectura	Visual	Espectrofotométrica
Punto final para la lectura de la CIM de anfotericina B	Ópticamente transparente y con evidente disminución	Concentración más baja que inhibe el crecimiento al menos en 90%
Punto final para la lectura de CIM de azoles y equinocandinas	Evidente disminución	Concentración más baja que inhibe el crecimiento al menos en 50%
Tiempo de incubación	48 h	24 h
Forma del pocillo de la placa	Redondo	Plano

Cuadro 11. Diferencias entre los métodos de dilución en caldo. (Nota: Adaptado de *Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos*. (p. 2), 2012, Revista CES Med. 26(1)).

Resistencia

Algunos hechos

- La resistencia a fármacos ha sido un problema desde la década de 1990, no sólo con los hongos, sino también con las bacterias.
- Lo anterior se debe a la epidemia de SIDA, que ha generado una mayor prevalencia de tuberculosis y de otras infecciones.

- Cada vez hay pacientes más graves, lo que ha determinado una mayor incidencia de infecciones fúngicas.
- El uso de drogas de amplio espectro va seleccionando cepas resistentes y si además el paciente tiene el sistema inmunitario o de barrera comprometido, aparecen los patógenos oportunistas.
- En la actualidad, hay un aumento de patologías con alteración de la respuesta inmune celular, debido al SIDA, la quimioterapia y los trasplantes.
- Otros factores de riesgo son las edades extremas; por ejemplo, ha habido brotes en unidades de neonatología, donde los prematuros que antes morían ahora generalmente sobreviven.
- Otros factores de riesgo son la diabetes, el uso de terapias de amplio espectro y el uso de drogas antifúngicas en candidiasis orofaríngeas, que permiten la aparición de resistencia secundaria.

Hay dos conceptos de resistencia, que no siempre están asociados en las infecciones micóticas; distinto es el caso de las bacterias, en las que lo que sucede in vitro se asocia generalmente con lo que sucede in vivo y por eso es tan importante conocer el antibiograma, del cual depende la decisión de los esquemas terapéuticos. En el caso de los hongos no siempre es así.

El concepto microbiológico de resistencia establece que una cepa es resistente cuando su CMI es más elevada que la habitual para esa especie. En cambio, según el concepto clínico, un hongo es resistente a un antifúngico cuando sigue produciendo la enfermedad en el paciente, a pesar de que la concentración del agente antimicótico sea máxima en el lugar de la infección. Lo anterior puede ocurrir porque en muchos casos de infecciones micóticas el paciente tiene un compromiso grave de la respuesta inmune; si es así, por más que se le administren fármacos, su sistema inmunitario no va a ser capaz de eliminar el agente patógeno.

La resistencia clínica depende de lo siguiente:

- La respuesta inmune del hospedero.

- La penetración de las drogas.
- La presencia de un foco de infección persistente o protegido, lo que ocurre con los catéteres y con los abscesos.
- A diferencia de lo que ocurre con las bacterias, en las infecciones fúngicas, la correlación in vitro e in vivo no siempre se da. Esta correlación se ha demostrado en pacientes con SIDA y candidiasis orofaríngea con tratamientos prolongados con azoles, en los que se empiezan a ver cepas con CMI más elevado y, además, aparece fracaso terapéutico.

Entre los factores que pueden contribuir a la resistencia clínica hay factores propios de la célula fúngica, factores dependientes de la droga y factores del hospedero, que se pueden ver en detalle en el cuadro 12 (Tapia, 2004).

Factores fúngicos	Factores de los medicamentos	Factores del hospedero (otros)
CMI inicial	Naturaleza fungistática del medicamento	Estado inmunitario
Tipo celular: Levadura/hifa Swift fenotipo Serotipo	Dosificación: Frecuencia Cantidad Horarios Dosis acumulativa	Sitio de la infección
Estabilidad genómica de la cepa	Farmacocinética: Absorción Distribución Metabolismo	Severidad de la infección
Tamaño de la población	Interacciones medicamento-medicamento	Presencia de materiales extraños (dentadura, catéteres, válvulas protésicas)
Población "cuello de botella" Biofilms		Formación de abscesos No adherencia del paciente al régimen del medicamento

Cuadro 12. Factores que pueden contribuir a la resistencia clínica a drogas antifúngicas. (Nota: Adaptado de *Resistencia a antifúngicos*. (p.1), 2004, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile 5(4)).

Hay tres tipos de resistencia microbiológica:

1. Resistencia intrínseca: ningún miembro de la especie es sensible a la droga.
Ej.: *Candida krusei* y el fluconazol;
2. Resistencia primaria: una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico presenta resistencia natural a éste sin haber estado en contacto con el compuesto, por mutaciones que ocurren al azar.
Ej.: *C. albicans* y 5-fluorocitosina;
3. Resistencia secundaria: la más interesante desde el punto de vista clínico, ocurre en una cepa previamente sensible que adquiere resistencia al compuesto después de que el hongo ha estado en contacto con él.
Ej.: *C. albicans* y 5-fluorocitosina y fluconazol (Tapia, 2004. p.1).

Entre los mecanismos celulares de resistencia a antifúngicos están los siguientes:

- Cambio a cepas más resistentes (cepas endógenas con resistencia intrínseca);
- Reemplazo con cepas más resistentes de *C. albicans* (0-33%);
- Alteraciones genéticas en cepas, es decir, resistencia secundaria;
- Como las levaduras tienen plásmidos, igual que las bacterias, sufren mutaciones no cromosomales, con expresión génica transitoria, lo que da células temporalmente resistentes (resistencia epigenética);
- Alteraciones en el tipo celular (serotipo; levadura/hifa; colonias);
- Alteraciones de la población fúngica (predisposición genética a S o R).

En cuanto a los mecanismos moleculares de resistencia, las levaduras tienen muchos. Por este motivo es importante conocerlos y preocuparse de ellos, igual que en el caso de las bacterias. Son los siguientes:

- Alteraciones en la importación del fármaco, como ocurre con la fluorocitosina: al mutar la enzima permite la entrada del fármaco;
- Alteraciones en el procesamiento intracelular de la droga (modificación, degradación);

- Alteraciones en la enzima target (mutaciones puntuales, sobreexpresión, amplificación génica, conversión génica o recombinación mitótica);
- Alteraciones de otras enzimas que participan en la vía biosintética del ergosterol;
- Alteraciones en bombas de eflujo (transportadores ABC, facilitadores mayores) (Tapia, 2004).

Mecanismos de resistencia a los antifúngicos

El incremento de la prevalencia de las infecciones fúngicas observado en las últimas décadas ha producido un aumento en la utilización de fármacos antifúngicos. La extensión del uso de un antimicrobiano siempre origina, como efecto colateral, la aparición de microorganismos resistentes y los fármacos antifúngicos no son una excepción. En los últimos años se han descrito resistencias a estos compuestos si bien debe resaltarse que no son frecuentes en la práctica clínica. No obstante, la detección de resistencias a los antifúngicos se ha convertido en una técnica rutinaria en muchos laboratorios asistenciales y los avances tecnológicos han permitido que se realicen estudios para conocer la prevalencia de los mecanismos moleculares por los que se producen las resistencias (Cuenca, 2010)

En el campo de la micología, la resistencia se define de forma similar que en otras áreas de la microbiología. No obstante, las micosis sistémicas son infecciones oportunistas que se producen en enfermos con factores predisponentes, por lo que son difíciles de tratar independientemente de que la cepa causante sea sensible o no a los antifúngicos. Además, los antifúngicos muestran un margen terapéutico corto, al tener efectos tóxicos en células humanas e interaccionar con varias familias farmacológicas, lo que influye sobre su dosificación y perfil farmacocinético. Otro aspecto que debe destacarse es que determinadas características de las especies fúngicas como la capacidad de desarrollar filamentos o de formar biofilms, películas compuestas por células y detritus, también pueden influir en la respuesta, ya que algunos antifúngicos pueden tener menor actividad frente a las hifas o dificultades para penetrar en los biofilms. Por todo lo anterior, la susceptibilidad de la cepa a los

antifúngicos y la presencia de mecanismos de resistencia deben considerarse como dos variables más dentro del conjunto de aspectos que son determinantes a la hora de predecir la respuesta al tratamiento (Cuenca, 2010).

No obstante, desde que existen métodos estandarizados para realizar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, así como técnicas para detectar los mecanismos moleculares de resistencia, y gracias a la aparición de nuevos antifúngicos y de nuevas presentaciones, la detección de microorganismos resistentes *in vitro* y de sus mecanismos de resistencia puede ayudar a elegir la mejor alternativa terapéutica. En los siguientes párrafos se incluye una breve revisión sobre los mecanismos de resistencia descritos para las diferentes clases de antifúngicos utilizados en las micosis sistémicas.

Resistencia a los polienos

La resistencia a anfotericina B es poco frecuente, aunque se ha detectado cepas de levaduras y de hongos filamentosos con mecanismos de resistencia. Estos mecanismos son poco conocidos, aunque la mayor parte de ellos están relacionados con un descenso en la cantidad de ergosterol de la membrana o un aumento de los fosfolípidos que reduce la interacción del fármaco con los esteroides. Estas alteraciones se han asociado con mutaciones en los genes ERG2 ó ERG3, que codifican enzimas que participan en la vía de síntesis del ergosterol. En los últimos años, se han propuesto otros mecanismos de resistencia a anfotericina B relacionados con el efecto oxidativo que presenta el polieno en el interior celular. *A. terreus* y otros hongos filamentosos que muestran resistencia a anfotericina B tienen un aumento en la actividad de su catalasa, lo que podría colaborar a reducir el daño oxidativo originado por este antifúngico (Cuenca, 2010).

Resistencia a la fluorocitosina

La resistencia intrínseca a la fluorocitosina aparece con frecuencia en levaduras y en casi todas las especies de hongos miceliales. Ésta suele deberse a mutaciones en el gen que codifica la citosina deaminasa, enzima que convierte el antifúngico en fluorouracilo. La resistencia secundaria se desarrolla con facilidad y casi

invariablemente si se emplea este antifúngico en monoterapia. Este fenómeno se produce por mutaciones en los genes que regulan la fosforilación de los productos derivados de la fluorocitosina.

Resistencia a los azoles

La resistencia a los azoles es la cuestión que suscita mayor interés en la actualidad. La resistencia a fluconazol en levaduras, a itraconazol en *Aspergillus*, así como el aumento en la prevalencia de especies resistentes a voriconazol como los Mucorales se consideran los problemas más importantes dentro de la resistencia a los antifúngicos.

La diana de estos fármacos es la 14-alfa lanosterol demetilasa, producto del gen ERG11 en levaduras, conocido como CYP51 en hongos miceliales. Se han descrito alteraciones del ERG11 relacionadas con la resistencia, como mutaciones puntuales, sobreexpresión del gen, amplificación genética debida a la duplicación cromosómica, conversión genética y recombinación mitótica. Entre estos, el mecanismo más frecuente son las mutaciones puntuales que producen una enzima alterada, con un descenso en la afinidad por los azoles. Se han publicado decenas de mutaciones de este tipo en *Candida*. En hongos filamentosos también se ha encontrado varios mecanismos de resistencia, siendo también más habituales las mutaciones puntuales y la sobreexpresión o amplificación genética. En *Aspergillus spp.* se han descrito dos genes que codifican la 14-alfa lanosterol demetilasa, CYP51A y CYP51B, lo que complica el estudio de las resistencias (Cuenca, 2010).

No obstante, el mecanismo de resistencia que se detecta con mayor frecuencia en cepas clínicas de levaduras y con menor frecuencia en hongos filamentosos, es la reducción de la concentración intracelular de los azoles. Esta reducción puede deberse a una disminución en la captación del fármaco o mucho más frecuentemente, a un aumento en la expulsión del azol por incremento en el número y en la actividad de las bombas de flujo o transportadores. Es un mecanismo de resistencia secundaria que se debe a la sobreexpresión de los genes que los regulan. Existen dos tipos de bombas, transportadores ABC (ATP binding cassette) y los MFS (major facilitators superfamily). Los transportadores ABC se asocian con la

expulsión de todos los azoles. Los MFS parece que sólo se relacionan con la resistencia a fluconazol.

En *C. albicans* y otras especies de levaduras como *C. glabrata* se han descrito hasta diez genes diferentes relacionados con la producción de los transportadores ABC, llamados CDR1-CDR10. La resistencia a azoles se ha observado en cepas con aumento en la expresión de los genes CDR1 y CDR2. Las bombas MFS, codificadas por los genes MDR, emplean el gradiente de protones como fuente de energía, en lugar del ATP, y se han asociado con resistencia secundaria al fluconazol y quizá al voriconazol (Cuenca, 2010).

La resistencia a fluconazol entre las cepas causantes de candidiasis sistémicas sigue siendo poco frecuente en nuestro país (<10%), aunque en otros países puede alcanzar hasta un 30%, por ello deben realizarse estudios epidemiológicos periódicos para detectar cambios con trascendencia terapéutica, como incrementos en la prevalencia de *C. glabrata*, *C. krusei* o de levaduras emergentes que pueden ser resistentes a los azoles.

En el caso de los hongos filamentosos, la resistencia a itraconazol es infrecuente con menos de un 10% de prevalencia en *A. fumigatus*. No obstante, en algunos países como Holanda e Inglaterra se han comunicado porcentajes por encima del 10%, resistencia que suele ser cruzada a otros azoles como voriconazol y posaconazol. Esta resistencia podría estar relacionada con la utilización de plaguicidas en agricultura, con un mecanismo similar al de los azoles (Cuenca, 2010).

Resistencia a las equinocandinas

Se han descrito resistencias intrínsecas a esta familia de antifúngicos en especies que tienen 1,6-beta glucano en su pared, como *Cryptococcus spp.*, *Fusarium spp.* y otras especies, particularmente de *Basidiomycota* y *Zygomycota*. Asimismo, se han descrito mutaciones y sustituciones de aminoácidos en dos regiones (FKS1 y 2) del gen *Fks1*, que codifica la subunidad mayor de la glucano-sintetasa. Estas mutaciones generan resistencia a las tres equinocandinas y se han asociado a

fracasos terapéuticos. Su prevalencia es baja, aunque podría ser la causa de la menor susceptibilidad de *C. parapsilosis*, ya que se ha descrito un cambio de esta clase (alanina por prolina) en la región Fks1 en todas las cepas de esta especie (Cuenca, 2010).

Perfiles de susceptibilidad in vitro de los diferentes medicamentos antifúngicos

Anfotericina B

Es un antifúngico de amplio espectro de la familia de los polienos. Actúa contra casi todos los hongos causantes de micosis endémicos y oportunistas. Las excepciones son *Candida lusitanae* y algunos patógenos emergentes como *Trichosporon asahii*, *Fusarium spp*, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium prolificans*, y *Paecilomyces lilacinus*. Reportes más recientes han sugerido que *C. glabrata* y *C. krusei* podrían ser menos susceptibles a la anfotericina B que otras especies de levaduras. También *Aspergillus terreus* y *Scedosporium apiospermum* han demostrado una reducida susceptibilidad in vitro a la anfotericina B y aun así responden mejor in vivo que otros agentes (Zapata-González, 2012).

Especie	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol	Equinocandinas	Anfotericina B
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	SDD a R	SDD a R	SDD a R	S	S	S a I
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S a I	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. krusei</i>	R	SDD a R	S	S	S	S a I
<i>C. lusitanae</i>	S	S	S	S	S a I	S a R
<i>C. guilliermondii</i>	S	S	S	S	S	S a R
<i>C. dubliniensis</i>	SDD	S	S	S	S	S

S= sensible; SDD= sensible dosis dependiente; I= Intermedio; R= resistente.
Tomada de referencias 6,13,35.

Cuadro 13. Perfil de susceptibilidad de levaduras del género *Candida*. (Nota: Adaptado de *Lo que debemos de saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos*. (p.7), 2012, Revista CES Med. 26(1)).

La resistencia a anfotericina puede ser primaria o secundaria. La primera es la más frecuente y se debe principalmente a alteraciones en el ergosterol que forma la membrana. La descripción de resistencia secundaria se restringe a casos anecdóticos de pacientes que habían recibido polienos no reabsorbibles como profilaxis antifúngica.

Los datos disponibles sugieren que la anfotericina B debe ser suministrada en dosis diarias y que para el éxito de la terapia se deben alcanzar concentraciones elevadas. Las infusiones prolongadas deben evitarse y las dosis de escalamiento parecen ser útiles en las infecciones clínicamente refractarias (Zapata-González, 2012).

Azoles

Los triazoles son efectivos contra los dermatofitos, *C. albicans*, especies no *C. albicans* s., *Cryptococcus neoformans* y hongos dimórficos endémicos. El fluconazol es inefectivo contra todos los mohos, mientras que itraconazol, voriconazol, posaconazol y ravuconazol, ofrecen una mejor actividad.

La susceptibilidad in vitro del posaconazol ha demostrado una excelente efectividad contra *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, Zigomicetos (incluyendo *Rhizopus*, *Absidia* y *Cunninghamella spp.*) y *Scedosporium apiospermum*. Sin embargo, no es efectivo para *S. prolificans*, que es refractario a todos los antifúngicos disponibles. La efectividad in vitro de posaconazol es superior a voriconazol contra de *Fusarium spp.* y Zigomicetos. Esta actividad ha sido demostrada clínicamente en varios estudios utilizando posaconazol para el tratamiento de fusariosis y otras infecciones fúngicas refractarias (Zapata-González, 2012).

Con respecto a las levaduras, el tratamiento con derivados azólicos ha sido asociado con la nueva emergencia de *Candida krusei* (la cual es innatamente resistente a fluconazol) y *Candida glabrata* (que puede tener resistencia innata o desarrollarla rápidamente mediante generación de bombas de eflujo del medicamento). Las curvas de dispersión de CMI de voriconazol o posaconazol versus CMI de fluconazol para *C. glabrata* muestran altos niveles de correlación,

sugiriendo que el aislamiento de ésta a menudo muestra reducida susceptibilidad, aunque no necesariamente resistencia completa a los otros azoles. Esto no es cierto para *C. krusei*, la cual, a pesar de ser innatamente resistente a fluconazol, es susceptible a voriconazol y posaconazol.

Antes de la introducción del tratamiento antirretroviral altamente efectivo para el VIH (HAART, por sus siglas en inglés), la resistencia emergente a los azoles en contra de *C. albicans* de la cavidad oral era un problema; sin embargo, esta infección ha venido en descenso en los últimos años. Concomitantemente, se ha reconocido que altas dosis con regímenes cortos de azoles disminuyen el riesgo de resistencia (Zapata-González, 2012).

También ha habido reportes de resistencia a *Cryptococcus neoformans* en pacientes con VIH con tratamientos prolongados con fluconazol. Sin embargo, a pesar del tratamiento supresor a largo plazo con fluconazol en este grupo de pacientes, no han surgido problemas clínicos serios y la resistencia es raramente la causa de las recaídas.

Equinocandinas

Hay tres equinocandinas disponibles en la práctica clínica: caspofungina, micofungina y anidulafungina. Los tres medicamentos han demostrado buena efectividad contra *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*, pero poca actividad para otros géneros de levaduras.

En particular, los basidiomicetos como *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.* y *Trichosporon spp.*, los mohos del género *Fusarium* y los zigomicetos, demostraron resistencia innata a este tipo de agentes

Las ventajas de las equinocandinas son considerables debido a sus excelentes perfiles de seguridad; además, con micafungina y anidulafungina es posible escalar sus dosis por encima de la dosis estándar. Como resultado, las equinocandinas tienden a ser usadas en combinación con otros antifúngicos en el manejo de afecciones por mohos (Zapata-González, 2012).

Especie hongo filamentoso	Itraconazol	Voriconazol	Posaconazol	Equinocandinas	Anfotericina B
<i>A. fumigatus</i>	S	S	S	S	S
<i>A. terreus</i>	S	S	S	S	R
<i>S. apiospermum</i>	S	S	S	R	R
<i>S. prolificans</i>	R	R	R	R	R
<i>F. solanii</i>	R	S a R	S	R	S
<i>Zygomycetes</i>	R	R	S	R	S

S= sensible; SDD= sensible dosis dependiente; I= Intermedio; R= resistente.

Tomada de referencias: 6,9

Cuadro 14. Perfil de susceptibilidad de hongos filamentosos de importancia médica. (Nota: Adaptado de *Lo que debemos de saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos*. (p.8), 2012, Revista CES Med. 26(1)).

Hasta el momento hay pocos reportes de fallas clínicas debido a la emergencia de resistencia a esta clase de agentes (cuadro 14).

Propuesta de una metodología de microdilución para la práctica de antimicóticos

Objetivos

- Realizar la revisión bibliográfica de la técnica de MIC orientado a antimicóticos, utilizando medios digitales actualizados con el fin de aportar una investigación sintetizada que pueda ser utilizada para su consulta en la asignatura de Micología para la Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica.
- Implementar con base en la investigación previamente realizada la propuesta de una metodología con la finalidad de economizar tiempo y recursos en su uso para la práctica de antimicóticos en la asignatura de Micología.

Metodología de la técnica de MIC para la práctica de antimicóticos.

Para comenzar el estudio de sensibilidad se utiliza el método de difusión en agar, un método cualitativo el cual debe partir de un aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa de estudio. Una vez teniendo los resultados de este método y saber si la cepa con la cual se está trabajando presenta sensibilidad o resistencia al antimicótico de estudio es que se procede con la técnica de microdilución para obtener la Cantidad Mínima Inhibitoria (MIC).

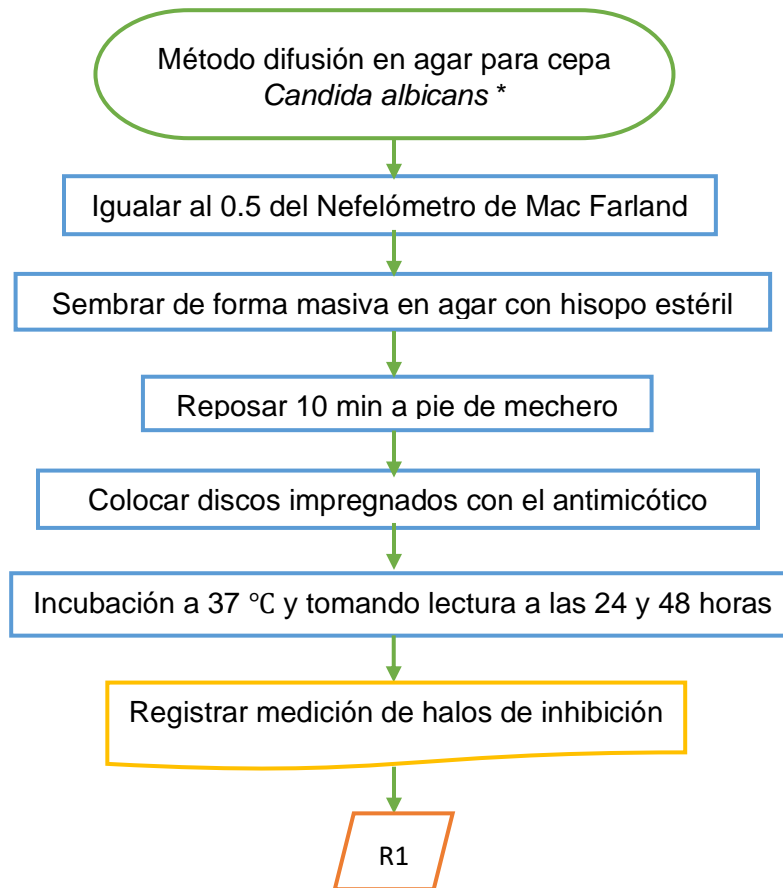
Material para método de difusión en agar

- ✓ Agar Müeller-Hinton con 2% glucosa
- ✓ Solución salina fisiológica
- ✓ Hisopo estéril
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Discos con antimicóticos (nistatina, bifonazol, miconazol, clotrimazol y fluconazol)
- ✓ Cepas: *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

Método difusión en agar hongos levaduriformes

1. Igualar con la cepa *Candida albicans* al 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1×10^6 UFC/ml).
2. Sembrar de forma masiva en agar Müeller-Hinton con hisopo estéril.
3. Reposar 10 min a pie de mechero.
4. Colocar discos impregnados con el antimicótico.
5. Incubación a 37 °C y tomando lectura a las 24 y 48 horas respectivamente.
6. Lectura: medición de halos de inhibición.

Método difusión en agar hongos levaduriformes



*Realizar misma metodología para cepa *Cryptococcus neoformans*.

R1: Cajas con agar e inculo se inactivan en autoclave 121°C/ 15lb y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Microdilución

Hongos levaduriformes

Material

- ✓ Agua destilada estéril
- ✓ DMSO estéril
- ✓ Solución salina fisiológica
- ✓ Hisopo estéril
- ✓ Asa bacteriológica

- ✓ Caldo Müller-Hinton con 2% glucosa
- ✓ Soluciones stock de antimicóticos
- ✓ Balanza digital
- ✓ Vidrio de rejoj esterilizado
- ✓ Espátula
- ✓ Pipeta volumétrica de 1 ml
- ✓ Frascos esterilizados
- ✓ Micropipetas
- ✓ Puntas para micropipeta estériles
- ✓ Mechero bunsen
- ✓ Microplaca de 96 pocillos fondo redondo
- ✓ Espejo invertido
- ✓ Cepas: *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*

Método microdilución

Preparación del stock de antimicótico

1. Preparar la solución stock de los antimicóticos. Los solubles en agua se preparan con concentración 1,280 µg/ml diluyendo la cantidad necesaria de la presentación del antimicótico en 1 ml de agua destilada y los insolubles en agua con concentración 1,600 µg/ml diluyendo la cantidad necesaria de la presentación del antimicótico en 1 ml de DMSO, el cual se recomienda antes de utilizar, realizar una prueba de esterilidad.
2. Colocar 50 µl de caldo M-H 2% glucosa del pocillo 3 al 11 por las filas a ensayar (1 fila por antimicótico).
3. Colocar en la columna 2A (2A-2H) 150 µl de la solución stock del antimicótico y realizar con ayuda de la misma punta estéril por antimicótico, una dilución seriada homogenizando el contenido del pocillo hasta el número 11.

Preparación del inóculo

1. El inóculo para *Candida* se prepara tocando con el asa el cultivo 5 colonias $\geq 1\text{mm}$ y de 24h de crecimiento en placa SDA que se resuspenden en un tubo con solución salina (NaCl 0,85%). Se agita bien y se ajusta a una densidad óptica de 0.5 Mc Farland, la cual tiene una concentración de $1-5 \times 10^6$.
2. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con caldo M-H 2% glucosa.
3. Se inoculan con 100 μl de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12 con ayuda de una punta estéril distinta por pocillo.

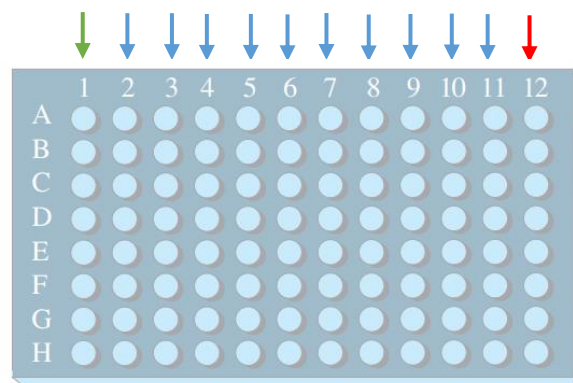
Columnas control

1. La columna 1 (1A-12H) contiene 200 μl de caldo M-H 2% glucosa, se usa para el control de esterilidad del medio.
2. La columna 12 (12A-12H) no contiene antifúngico, pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento.

Incubación y lectura

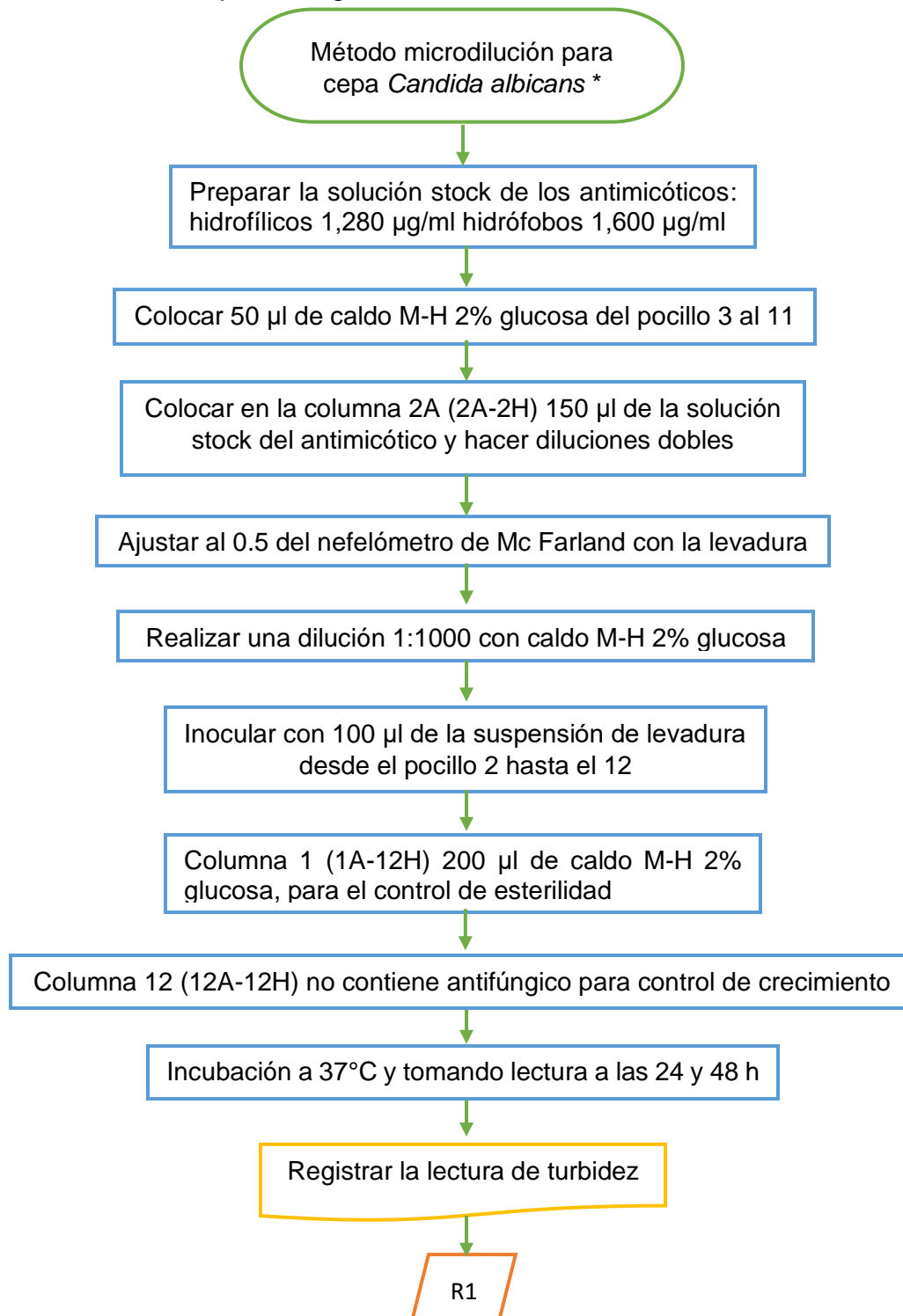
1. Incubación a 37°C y tomando lectura a las 24 y 48 horas respectivamente.
2. Lectura con ayuda de un espejo invertido.

Esquema de la placa para microdiluciones con la metodología implementada.



↓ Control de esterilidad de medio. ↓ Ensayo de antimicóticos. ↓ Control de crecimiento.

Método microdilución para hongos levaduriformes



*Realizar misma metodología para cepa *Cryptococcus neoformans*, pero con crecimiento de 48h.

R1: La microplaca con agar e inóculo se inactivan en autoclave 121°C/ 15lb y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Discusión

Al utilizar diversos medios digitales para realizar esta revisión bibliográfica sobre la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con antimicóticos, pude observar algunos puntos en la actualización de esta información. Las instituciones que realizaron la estandarización del método indican actualizaciones periódicas en cuanto a antimicóticos en desarrollo, sin embargo, no hay cambios en el documento de las metodologías con los antimicóticos ya estandarizados. De igual forma en los artículos consultados, su información es consistente con el contenido de los artículos experimentales, es decir la información publicada de mayor antigüedad es actualizada y utilizada como base de investigación sin mayor cambio y la información que se publica recientemente sobre antimicóticos se enfoca en probar el efecto de algunos componentes de plantas o semillas como antifúngicos.

Esta investigación tiene como finalidad aportar esta síntesis de información actualizada para ser utilizada y/o consultada en la asignatura de Micología, aunado a esto se propone una metodología para la técnica de MIC con la que se pueda economizar tiempo y recursos, si bien se puede utilizar la técnica de macrodiluciones, implica el uso de un gran número de tubos, medios, reactivos y más tiempo de experimentación y lo que se pretende es optimizar los recursos. Es por ello que el cambio al método de microdiluciones podría aportar un cambio significativo.

De acuerdo con Cuenca y Rodríguez (2007), las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos deben realizarse en aquellos hongos causantes de enfermedad, más si la infección es grave, especialmente el tratamiento en pacientes expuestos a antifúngicos o bien la infección está causada por especies raras. Además, estas pruebas también son importantes para vigilar la resistencia, realizar estudios epidemiológicos y para comparar la actividad *in vitro* de nuevos antifúngicos con los ya existentes.

Por tal motivo se plantea trabajar con *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, debido a que la candidiasis invasora es la micosis más común y la causa de una

mortalidad excesivamente alta. *Candida albicans* es la etiología más frecuente, pero se está observando un importante cambio epidemiológico en las últimas décadas, la criptococosis es una causa importante de meningitis en personas infectadas por el VIH, y se está convirtiendo en un desafío clínico en receptores de trasplantes. Tanto el “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) como el “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) estandarizaron su metodología para analizar la sensibilidad de levaduras importantes desde el punto de vista clínico.

Al contar con la información de estos dos documentos estandarizados como referencia para realizar la propuesta de metodología es que se opta por el uso de las placas de microdilución de fondo redondo y no plano, ya que la lectura es con ayuda de un espejo invertido por medio de la turbidimetría observable, no una lectura espectrofotométrica, en el fondo plano no es posible observar la formación de botones. Ambas instituciones recomiendan el uso del antimicótico en su presentación en polvo valorado o solución intravenosa para la preparación de las soluciones stock, se propone una modificación al utilizar la presentación comercial disponible para su uso oral o tópico en suspensión o bien en crema/ungüento debido a la facilidad para adquirirlo.

No se especifica en ninguno de los documentos la cantidad de disolvente a utilizar para tener el antimicótico disponible para realizar las soluciones stock por lo cual se utiliza 1ml tanto de agua destilada como de DMSO ya que con esa cantidad es posible disolver la cantidad a utilizar de las presentaciones de antimicóticos necesaria para alcanzar las concentraciones solicitadas.

Se propone utilizar el medio M-H y adicionarlo con 2% de glucosa, la adición de glucosa en este porcentaje se realiza de acuerdo al documento del EUCAST con la intención de favorecer el crecimiento de las levaduras ya que produce una curva de crecimiento con la fase de latencia corta y una gran fase de crecimiento exponencial, que termina alrededor de las 24 horas de incubación.

Con estas características cinéticas es que se permite determinar la MIC a las 24 horas de incubación, lo nos permite reducir el tiempo de experimentación. Mientras

que con el método del CLSI al proponer una adición menor de glucosa, el crecimiento a las 24 horas es escaso para la mayoría de las cepas, por lo que los resultados deben obtenerse tras 48 horas de incubación.

Sin embargo, en el caso de *Cryptococcus spp* al ser levaduras no fermentadoras se compromete el crecimiento en placas de microdilución según los protocolos definidos por CLSI y EUCAST y es necesaria su incubación por 48 horas a diferencia de *Candida*.

Las modificaciones propuestas contribuyen a adaptar los recursos con los que se cuentan dentro del laboratorio a la metodología estandarizada, así obtener un resultado visible y utilizarlo en la práctica de antimicóticos para la asignatura de Micología.

Al llevar a cabo la metodología propuesta mi expectativa es que además de lograr una correcta optimización de los recursos y el tiempo de experimentación en el laboratorio, se logre una lectura clara en la placa de microdilución para poder realizar un análisis con los datos observables. Siendo que los recursos modificados semejan las condiciones sugeridas para el crecimiento de ambas cepas y las diluciones para la disponibilidad de los antimicóticos aseguran su visualización, por lo que se espera obtener resultados concordantes con los obtenidos en los documentos estandarizados.

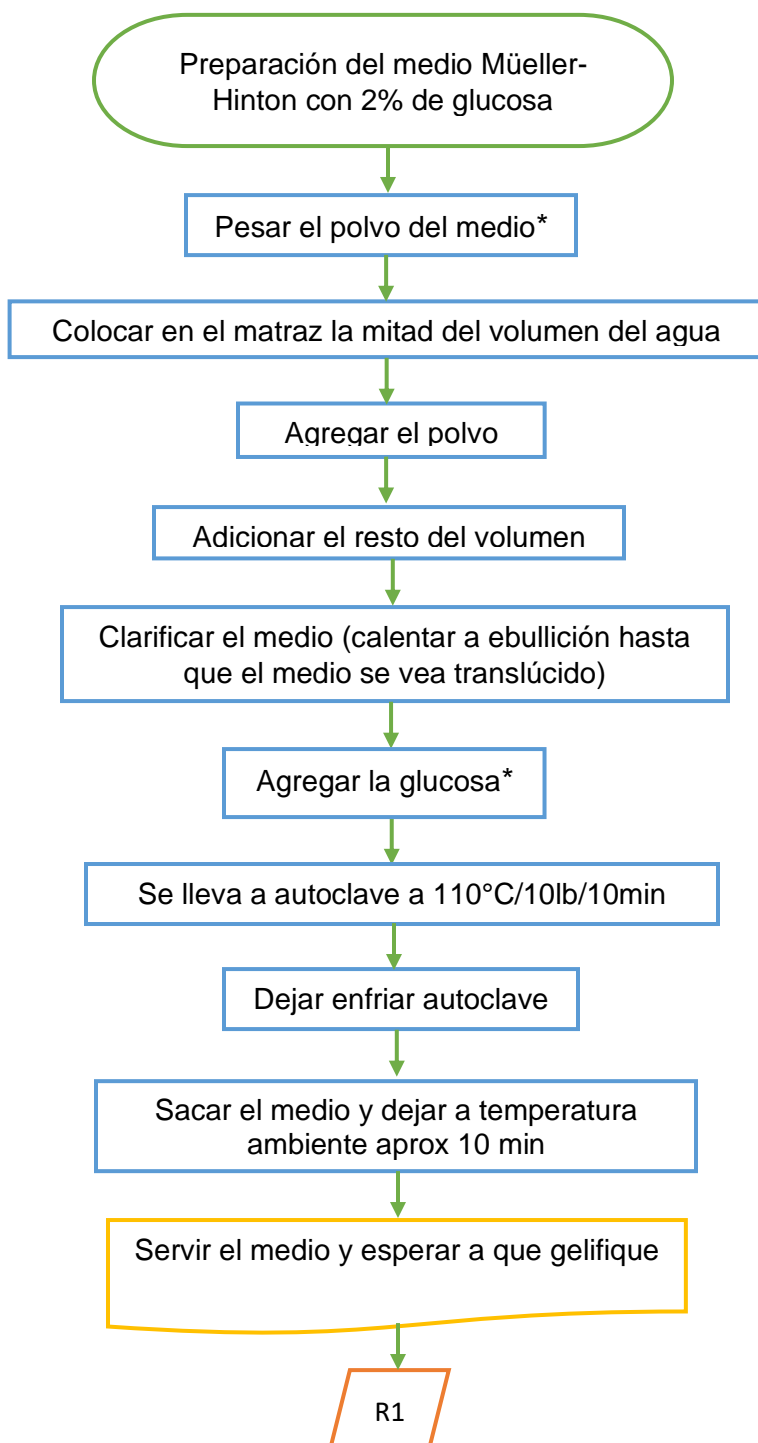
Conclusiones

Se realizó la revisión bibliográfica de la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria orientado a antimicóticos, en la cual se utilizaron medios digitales actualizados, esto con el fin de aportar una investigación sintetizada que pueda ser utilizada para su consulta en la asignatura de Micología en la Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica.

Además, con base en la investigación previamente realizada se implementó la propuesta de una metodología basada en los documentos de la técnica estandarizada por las instituciones CLSI y EUCAST, con la finalidad de adaptar la metodología a los recursos disponibles, así como economizar tiempo en su uso para la práctica de antimicóticos en la asignatura de Micología.

ANEXOS

Anexo 1.



*Previamente se realizan los cálculos para pesar el medio y la glucosa.

R1: Después de obtener resultados. Las cajas con agar e inóculo se inactivan en autoclave 121°C/15lb/30 min y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Anexo 2.

Cálculos en la preparación del medio Müller-Hinton con 2% de glucosa

1. Cálculo para pesar el medio

En el marbete se especifica que se necesitan 38g del medio por cada 1000ml de agua, además se tiene en cuenta la cantidad a preparar, es decir; las cajas Petri a utilizar (las cajas grandes requieren 20 ml y las pequeñas 15 ml) por lo tanto se establece la siguiente relación con el ejemplo de preparación de 10 cajas Petri grandes:

$$38 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \longleftarrow 200 \text{ ml}$$

$$X = 7.6 \text{ g}$$

medio Müller-Hinton

2. Cálculo para pesar la glucosa

El medio requiere 2% de glucosa por lo que se realiza la siguiente relación siguiendo con el ejemplo de la preparación de 10 cajas Petri:

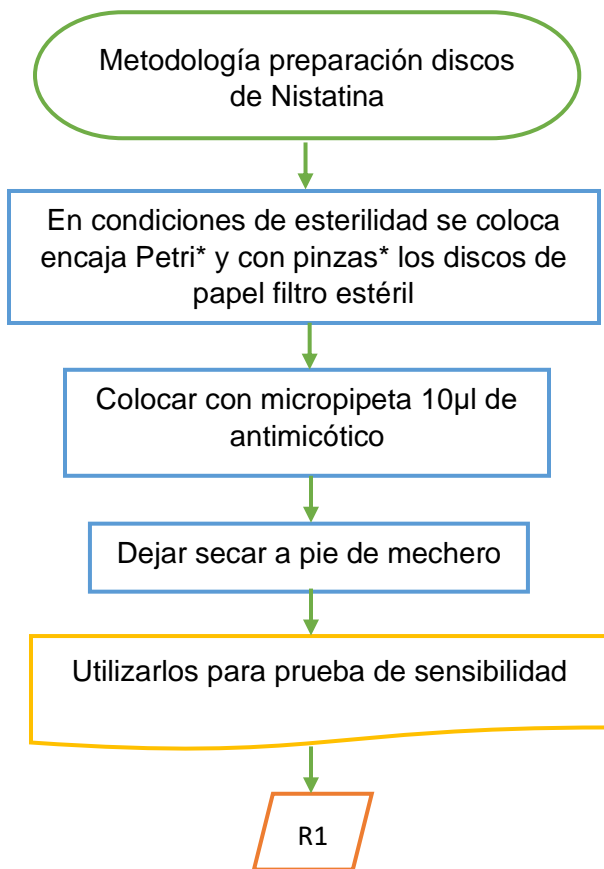
$$2 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ g}$$

$$X \longleftarrow 200 \text{ ml}$$

$$X = 4.0 \text{ g}$$

glucosa

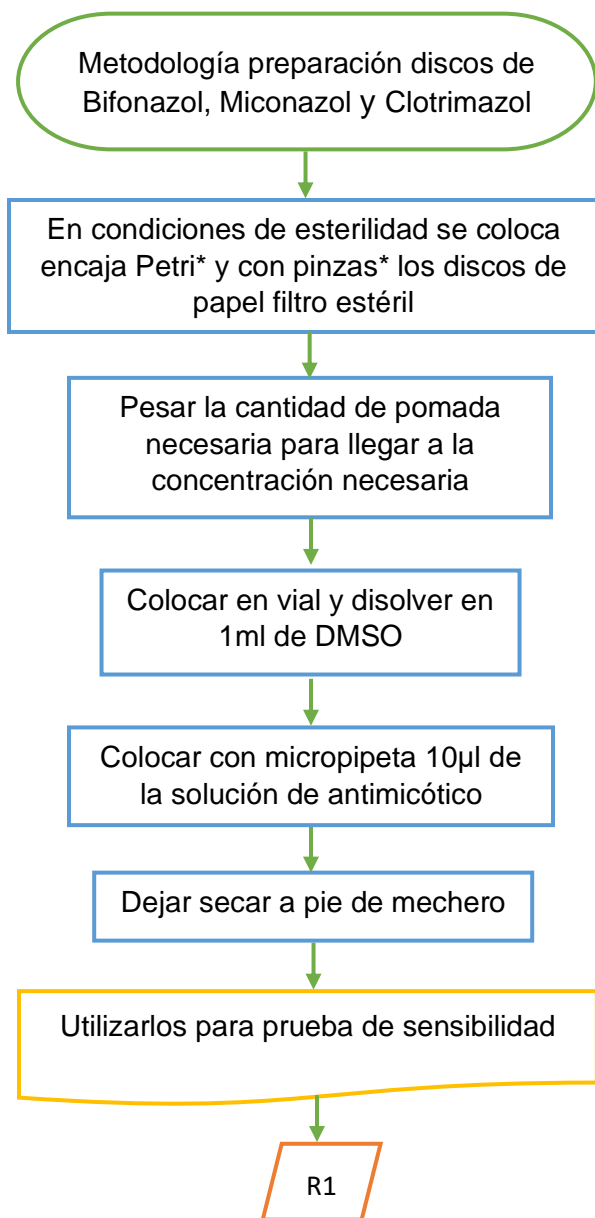
Anexo 3.



*Material estéril

R1: Después de obtener resultados. Las cajas con agar e inóculo se inactivan en autoclave 121°C/ 15lb/30 min y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Anexo 3.1



*Material estéril

R1: Después de obtener resultados. Las cajas con agar e inóculo se inactivan en autoclave 121°C/15lb/30 min y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Anexo 4.

Cálculos para realizar las soluciones stock de antimicóticos

Miconazol

Si la presentación a utilizar se encuentra en pomada con una concentración del 2% de antimicótico, es decir 2 g de 100 g por lo que se realiza la siguiente relación matemática:

2000 mg miconazol \longrightarrow 100 g fármaco

X \longleftarrow 1 g

X= 20mg de miconazol

en 1g de medicamento

20 mg miconazol \longrightarrow 1 g fármaco

1.6 g miconazol \longleftarrow X

X= 0.08 g de miconazol

Bifonazol y Clotrimazol

Si la presentación a utilizar se encuentra en pomada con una concentración del 1% de antimicótico en caso de bifonazol y clotrimazol por separado, es decir 1 g de 100g por lo que se realiza la siguiente relación matemática:

1000 mg antimicótico \longrightarrow 100 g fármaco

X \longleftarrow 1g

X= 10mg de antimicótico

en 1g de medicamento

20 mg antimicótico \longrightarrow 1 g fármaco

1.6 g antimicótico \longleftarrow X

X= 0.16 g de antimicótico

Nistatina

Si la presentación a utilizar se encuentra en suspensión a una concentración de 100,000 UI de antimicótico, es decir 2,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por lo que se realiza la siguiente relación matemática:

2,500 μg antimicótico \longrightarrow 1 mL fármaco

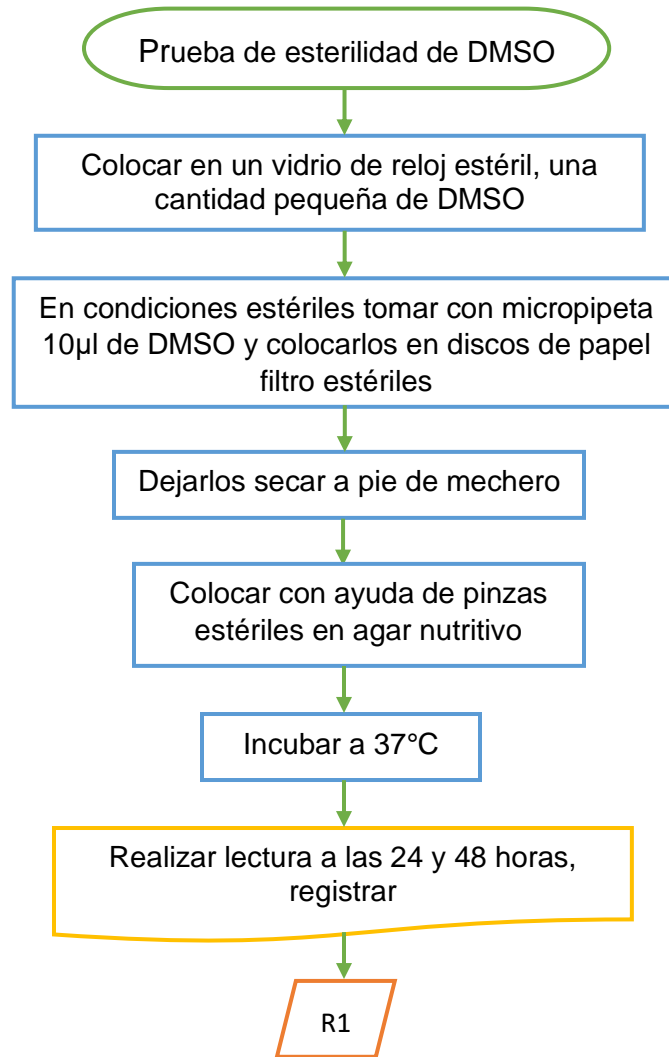
1,600 μg \longleftarrow X

X= 0.64 μg de antimicótico

en 1 ml de medicamento

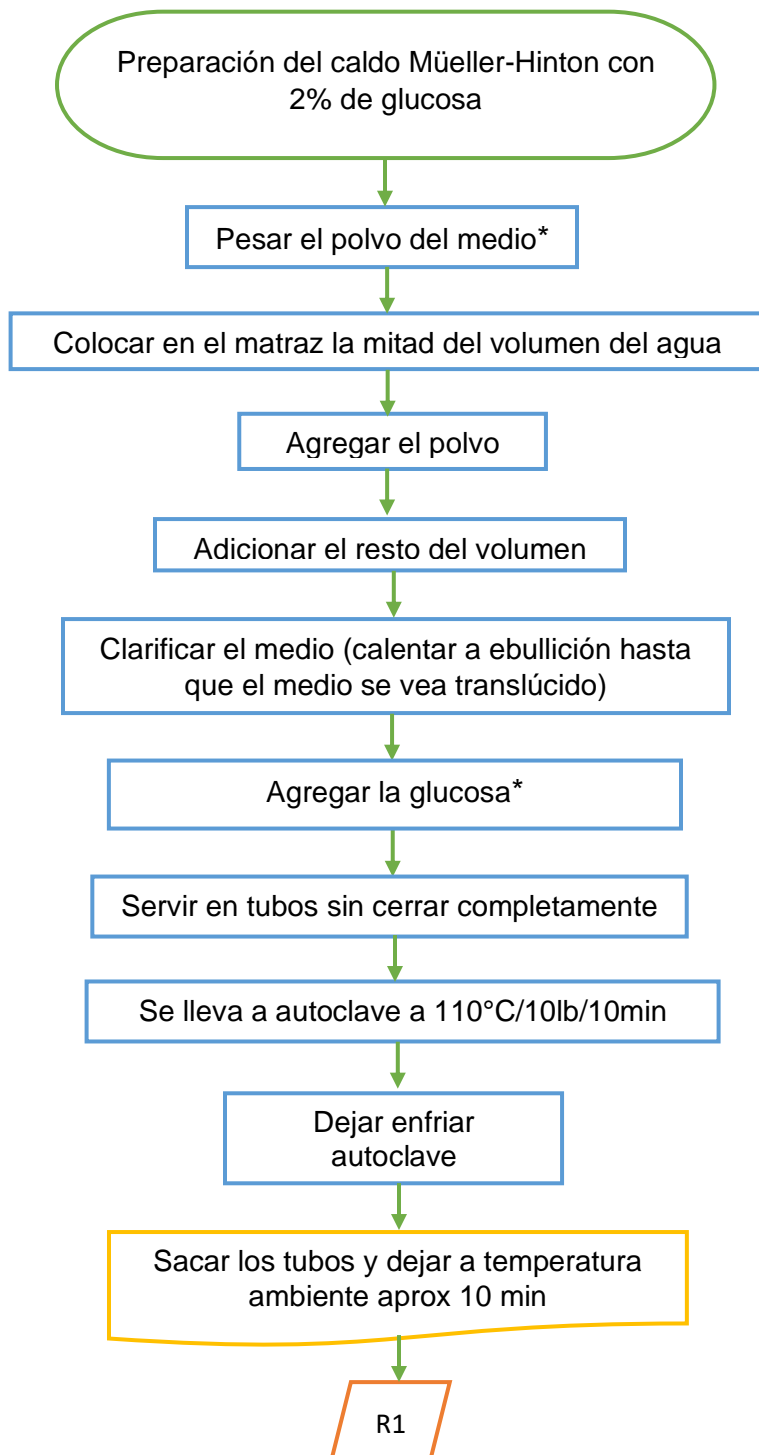
Anexo 5.

Metodología prueba de esterilidad de Dimetilsulfóxido (DMSO)



R1: Después de obtener resultados. Las cajas con agar e inóculo se inactivan en autoclave 121°C/ 15lb/30 min y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Anexo 6.



*Previamente se realizan los cálculos para pesar el medio y la glucosa.

R1: Después de obtener resultados. Los tubos con caldo e inóculo se inactivan en autoclave 121°C/15lb/30 min y se desechan en la bolsa de desechos biológicos.

Anexo 7.

Cálculos en la preparación del caldo Müller-Hinton con 2% de glucosa

1. Cálculo para pesar el medio

En marbete se especifica que se necesitan 21 g del medio por cada 1000 ml de agua, además se tiene en cuenta la cantidad a preparar, es decir; los tubos a utilizar requieren 2-3 ml por lo tanto se establece la siguiente relación con el ejemplo de preparación de 5 tubos:

$$21 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \longleftarrow 30 \text{ ml}$$

$$X = 0.63 \text{ g}$$

caldo Müller-Hinton

2. Cálculo para pesar la glucosa

El medio requiere 2% de glucosa por lo que se realiza la siguiente relación siguiendo con el ejemplo de la preparación de 5 tubos:

$$2 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ g}$$

$$X \longleftarrow 30 \text{ ml}$$

$$X = 0.6 \text{ g}$$

glucosa

Referencias

1. Allevato, M, Negroni, R y Galimberti, R. (2007). Antifúngicos ayer, hoy y mañana. *Revista Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas y Estéticas*, 30(8).
2. Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. McGrawHill.
3. Carmilema Sánchez, C, Delgado Delgado, R. (2010). *Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (Ortiga, Ajenjo, Malva olorosa)*. (Tesis de licenciatura, Universidad de Cuenca).
4. Carrillo-Muñoz, A, Abarca, L, Quindós, G. *Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos*. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 18:150-5.
5. Cuenca-Estrella, M, Rodríguez-Tudela, J. (2007). Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1). *Revista Iberoamericana de Micología*.
6. Cuenca-Estrella, M. (2010). *Antifúngicos en el tratamiento de infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias*. Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. 23(4).
7. Gobernando, M, Cantón, E. (2008). Anidulafungina. *Revista Española de Quimioterapia*. 21(02):99-114.
8. Gregorí Valdés, B. S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana Farm*, 39(2).
9. Guillen, G. (2019). *Mejoras farmacotécnicas en formulaciones de antifúngicos*. Facultad de farmacia. (Tesis de licenciatura, Universidad Complutense).
10. Linares Sicilia, M, Solís Cuesta, F. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*. 11-1.

11. López-Ávila, K, Dzul-Rosado, C, Lugo-Caballero, J, Arias-León, J, Zavala-Castro, J. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Revista biomedicina* 27:127-136).
12. Martín Mazuelos, E, Cantón Lacasa, E, Espiguel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología* 15-1.
13. Martín Mazuelos, E, Cantón Lacasa, E, Espiguel-Ingroff, A. (2007). Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 16-1.
14. Morejón García, M. (2014). Indicación de nuevos antimicóticos en pacientes con candidiasis invasiva. *Revista Médica de Santiago de Chile*.18(9).
15. Quindós, G, Pemán, J. (2016). Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. *Revista Iberoamericana de Micología*.33(3).
16. Rosco Diagnostica A/S. (2013). *Ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos*. 1(1).
17. Sacsquispe Contreras, R, Velásquez Pomar, J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Instituto Nacional de Salud (Perú), 30(1).
18. Shoemaker, W, Ayres, W, Grenvik, A, Holbrook, P. (2002). *Tratado de Medicina crítica y terapia intensiva*. Editorial Médica Panamericana.
19. Tapia, C. (2004). *Resistencia a antifúngicos*. Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile 5(4).
20. Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*. 26(2).
21. Taroco, R, Seija, V, Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 36(1).
22. Torres, N. (2005). Métodos para la detección de resistencia a los antimicóticos. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología*. 9(4).

23. Tortora, G, Funke, R, Case, L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Editorial Médica Panamericana.
24. Zapata-González, F, Cardona-Castro, N. (2012). Lo que deberíamos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista CES Med.* 26(1).