



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y SENSIBILIDAD
ANTIFÚNGICA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* DE
ASPIRADO TRAQUEAL EN PACIENTES
HOSPITALIZADOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LIZBETH BERENICE HERNÁNDEZ GÓMEZ

MÉXICO, CDMX. CIUDAD UNIVERSITARIA 2023.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE: JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO

VOCAL: JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

SECRETARIO: ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

1er. SUPLENTE: HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PEREZ

2° SUPLENTE: MARTHA GILES GÓMEZ

SITIO DEL DESARROLLÓ DE TEMA:

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Número de proyecto 41-2023.

Laboratorio de Microbiología del Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado".

ASESOR DEL TEMA:

María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso.

SUSTENTANTE:

Lizbeth Berenice Hernández Gómez.

Agradecimientos.

Al QFB Joaquín González Monroy y a la QFB Ileana Berenice Gálvez Gallo, del laboratorio del Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro, del ISSSTE. Por las facilidades y el apoyo que dieron para la realización de este trabajo.

Dr. Iván Ortega Blake. Instituto de Ciencias Físicas, UNAM. Por su colaboración y la aportación de la molécula A21.

Al Dr. Ricardo Alfredo Luna Mora colaborador en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Sección de Química Orgánica, FESC, Universidad Nacional Autónoma de México, Campo I y de la Facultad de Química, Departamento de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Por la aportación de las diferentes moléculas sintetizadas a partir de 3,3'- diindolilmetano.

A la Dra. Patricia Manzano Gayosso por su apoyo para la realización y termino de este trabajo, así como su tiempo, constancia y dedicación para compartir su conocimiento.

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES.	1
I.1 Agentes etiológicos.	1
I.1.1 Características morfológicas de las especies del género <i>Candida</i> .1	
I.1.2 Variabilidad morfológica.	2
I.1.3 Hábitat natural.	3
I.1.4 Factores de virulencia.	5
I.1.4.1 Adhesinas.	6
I.1.4.2 Enzimas hidrolíticas.	7
I.1.4.3 Formación de hifas.	8
I.1.4.4 Biopelículas.	8
I.1.4.4.1 Interacción levadura-levadura.	10
I.2 Patogenia de la colonización e infecciones pulmonares por <i>Candida</i> spp.	11
I.3 Factores de oportunismo.	12
I.4 Mecanismo de transmisión.	14
I.5. Manifestaciones clínicas de las infecciones pulmonares.	14
I.6 Epidemiología.	15
I.7 Pruebas diagnósticas.	17
I.7.1 Pruebas serológicas.	17
I.7.2 Toma de muestra.	19
I.7.3 Pruebas fenotípicas para la identificación de <i>Candida</i> spp.	20
I.7.4 Medios cromógenos para la identificación presuntiva de <i>Candida</i> spp.	26
I.8 Antifúngicos.	29
I.8.1 Mecanismos de resistencia a los antifúngicos por especies de <i>Candida</i>	33
I.9 Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	37
I.9.1 Método de microdilución en caldo.	37
I.9.2 Métodos de difusión en disco (M44-A2)	40
I.9.3 Métodos comerciales de sensibilidad antifúngica.	40
I.10 Tratamiento.	41

I.11 Nuevas moléculas.	41
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	44
III. OBJETIVOS.	45
IV. METODOLOGIA.	46
V. RESULTADOS.	55
VI. DISCUSIÓN.	73
VII. CONCLUSIONES.	85
VIII. ABREVIACIONES.	86
IX. ANEXOS. MEDIOS Y TINCIONES.	89
X. REFERENCIAS.	93

I. ANTECEDENTES.

Las infecciones pulmonares asociados a hongos afectan el parénquima pulmonar, los bronquios y alvéolos. Los agentes etiológicos causantes de estas micosis se pueden dividir en hongos patógenos primarios y en hongos oportunistas, que para los fines de este trabajo se desarrollarán la colonización e infección causadas por especies de *Candida*. En algunos casos pueden ser punto de partida de diseminaciones a otros órganos. Las infecciones pulmonares por *Candida* son difíciles de diagnosticar, lo que resulta en tratamientos antimicóticos tardíos que se han asociado con mortalidad hospitalaria^{6, 23, 82}.

I.1 Agentes etiológicos.

Aproximadamente hay de 200 a 300 especies de *Candida* identificadas actualmente, pero solo algunas están formando parte de la microbiota humana con la capacidad de causar infección^{11, 18, 41}.

I.1.1 Características morfológicas de las especies del género

***Candida*.**

Las especies del género *Candida* presentan diferentes morfologías como globosas, cilíndricas, ovaladas y elípticas, de 3-10 μm de diámetro. Algunas especies de *Candida* son dimórficas, por la capacidad de crecer en fase de blastoconidios y transformarse a hifa. *Candida albicans* es la especie representativa de la variabilidad morfológica, la cual forma blastoconidios, que coexisten con pseudohifas y/o hifas^{48, 53, 86}. En el cuadro 1, se muestra las características macroscópicas de las especies de *Candida* más comunes, en agar dextrosa Sabouraud (ADS) y microscópicas en agar harina de maíz.

Cuadro 1. Características morfológicas de las especies más comunes de *Candida*³⁹.

Especie.	Características de las colonias.	Características microscópicas.
<i>C. albicans</i>	Blancas, cremosas, con bordes limitados, superficie lisa. Las variaciones morfológicas pueden dar colonias secas y rugosas.	Clamidoconidios aislados o en racimos y blastoconidios formados en cúmulos con hifas ramificadas. Tamaño de 6 a 12 μm de diámetro.
<i>C. glabrata</i> (actualmente <i>Nakaseomyces glabratus</i>)	Blancas, lisas y brillantes, pequeñas.	Blastoconidios pequeños (1 a 4 μm). Ausencia de hifas y pseudohifas.
<i>C. tropicalis</i>	Blancas, cremosas, opacas, con margen filamentoso.	Blastoconidios ovales (3.7- 7 x 5.5 – 10 μm), dispuestos a lo largo de la pseudohifa o hifas.
<i>C. parapsilosis</i>	Blancas, cremosas, brillantes, lisas y rugosas.	Blastoconidios únicos (3 x 8 μm) o en cadena, pseudohifas alargadas.
<i>C. krusei</i> (actualmente <i>Pichia kudriavzevii</i>)	Blancas, secas planas y rugosas.	Blastoconidios alargados a cilíndricos, de 4-5 x 2.5 μm , pseudohifas.

I.1.2 Variabilidad morfológica.

El desarrollo de técnicas de biología molecular ha proporcionado otra herramienta útil para la identificación más precisa de especies de *Candida*. Este método es más caro comparado con las técnicas fenotípicas, sin embargo, en los aislados atípicos de *Candida* spp. sería de utilidad; aunque las morfologías coloniales de las diversas especies dependerán del sustrato adicionado al medio de cultivo donde crecen; por tanto, las colonias que muestran una morfología atípica a la que se describe comúnmente, se debe valorar el medio de cultivo en el que se promueva el crecimiento²⁶.

Albaina, *et al.* evaluaron 477 muestras de diferentes sitios anatómicos para la identificación de especies de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, donde 9 de los aislados identificados por técnicas moleculares correspondieron a *C. dubliniensis*. Estos aislados mostraron características fenotípicas atípicas que dificultaron su identificación por técnicas clásicas, por ejemplo, microscópicamente tres de estos aislados presentaron conidios de tamaños más pequeños, ovoides, estrechos y alargados, en comparación con la cepa de referencia *C. dubliniensis* NCPF 3949, además en CHROMagar Candida® (CH) formaron colonias de color blanco amarillento o rosa, diferente al color verde descrito en el inserto relacionado para esta especie. Por otra parte, los seis aislados restantes no formaron clamidoconidios en el medio de cultivo CHROMagar Candida® adicionado con agar semillas de girasol, ni en los medios sintéticos que proporcionan condiciones bajas en nutrientes para estimular la formación abundante de estas estructuras³.

Lipperheide, *et al.*, reportaron estudios del tamaño variable del crecimiento de *C. glabrata* en ADS diferente a la descripción clásica. Dos tipos de tamaño, colonias grandes y pequeñas, esta variación en el tamaño de colonias los llevó a probar el agar Sabouraud-cloranfenicol adicionado con floxina B, donde los aislados de *C. glabrata* presentan un fenotipo liso de color rosa oscuro, sin embargo, diez de las colonias (tamaño grande) mostraron un fenotipo más claro⁴⁴. Actualmente propusieron modificar el nombre de *C. glabrata* por *Nakaseomyces glabratus* en honor al Dr. Takashi Nakase⁷⁹.

I.1.3 Hábitat natural.

Candida spp. tienen la capacidad de transformarse para soportar los cambios en el microambiente donde habitan. Las diferentes especies se presentan desde los primeros días del nacimiento y tienen una gran

predilección por las mucosas. Aproximadamente, del 20 al 50% se encuentran en el tracto gastrointestinal, genitourinario y tracto respiratorio superior, boca, laringe y faringe, entre otras áreas del cuerpo, dependiendo de la especie^{15, 18, 63}.

Candida albicans se localiza en el tracto digestivo y las regiones mucocutáneas. Diversas especies distintas de *C. albicans* son comensales en la piel de personas sanas. El número de levaduras está controlado de forma natural por las bacterias saprobias. Las situaciones que alteren la composición de la microbiota normal van a producir proliferación de las especies de *Candida* y aumento del riesgo de infección. Es importante destacar que *Candida* spp. en el tracto respiratorio pueden representar a microorganismos espectadores inocentes, que estén al acecho en situaciones donde se presente la pérdida del equilibrio, como se dan en los adultos que son tratados con antibióticos o con corticoides inhalados, estos últimos tienden a causar proliferación en las vías aéreas superiores. También relacionado con enfermedades o situaciones que condicionen un aumento en el riesgo de colonización como la diabetes mellitus, debilidad crónica, catéteres urinarios y catéteres intravenosos permanentes, estancia prolongada en el hospital y otras inmunodeficiencias, por ejemplo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)^{28, 63}. En el cuadro 2 se describen las especies de *Candida* en los diferentes sitios anatómicos en su etapa de comensales.

Cuadro 2. Relación entre especies de *Candida* y localización anatómica en personas sanas^{6,59}.

Especie	Sitio anatómico en personas sanas.
<i>C. albicans</i>	Cavidad oral y vaginal, tracto gastrointestinal y piel.
<i>C. glabrata</i> (<i>N. glabratus</i>)	Forma parte de la microbiota de mucosas: orofaringe, vaginal, vías urinarias y tracto gastrointestinal.
<i>C. tropicalis</i>	Tracto gastrointestinal, piel, cavidad oral, tracto urogenital
<i>C. parapsilosis</i>	Cavidad oral, piel, tracto urogenital.
<i>C. krusei</i> (<i>P. kudriavzevii</i>)	Tracto gastrointestinal y urogenital, piel.

I.1.4 Factores de virulencia.

Los tres factores que contribuyen en la capacidad patogénica de *Candida* spp., son: 1) La habilidad para pasar de la fase levaduriforme a la formación de pseudohifa, esto les posibilita una rápida adaptación a las condiciones del huésped y la evasión de los mecanismos de defensa de éste, ya que las estructuras filamentosas son difíciles de fagocitar por las células inmunes y aparentemente se requiere de mecanismos extracelulares para lograr su muerte. 2) Cambios fenotípicos en un mismo aislado, este incluye sensibilidad a fármacos, variación morfológica y secreción de un factor de virulencia (proteínasa ácida). Esta expresión diferencial de los genes le permite al organismo una gran adaptabilidad a las condiciones del huésped. 3) Los factores de virulencia propios de la especie. Diversos autores han descrito algunos de los factores de virulencia detectados en infecciones experimentales en animales⁴⁸. En el estudio de Crearly *et al.*, donde infectaron animales con varias cepas mutantes de *C. albicans* defectuosas en la capacidad de transición entre los diferentes morfotipos, demostrando que la capacidad de cambiar la morfología es fundamental para que *C. albicans* cause enfermedad diseminada. Las biopelículas formadas en los

tejidos infectados contienen una asociación de blastoconidios y células filamentosas, cada forma contribuye en la virulencia. El papel de los blastoconidios podría ser en la diseminación a otros órganos, mientras que las hifas son esenciales para la adhesión célula-célula y la formación de biopelículas. Estos autores realizaron un experimento, para comprobar este hecho utilizando ratones BALB/c, al infectarlos con hifas preformadas, demostraron la capacidad de estas estructuras para causar enfermedad en el modelo. Mientras que la inducción de pseudohifa, a través del agotamiento del represor transcripcional (TUP1) resultó en una virulencia atenuada, es decir las pseudohifas sin *TUP1* se eliminan de los tejidos, de manera mucho más eficiente que los blastoconidios (avirulentos) o las células con capacidad para formar hifas y hacer la transición entre diferentes morfologías (virulentas)²¹.

I.1.4.1 Adhesinas.

Las proteínas involucradas en la adherencia se denominan adhesinas. Las familias de proteínas de la pared celular involucradas en la adhesión de las células endoteliales y epiteliales incluyen los genes de la familia de adhesinas epiteliales (siglas en inglés, EPA), el grupo de genes de adherencia a las células endoteliales (siglas en inglés, AED) y los genes que codifican proteínas de pared (siglas en inglés, PWP), que contienen el dominio PA14. La adherencia a varias células del huésped es el factor principal que da lugar a la colonización inicial que puede progresar a infección por especies de *Candida*. Esta adherencia también les permite colonizar superficies de dispositivos médicos y formar biopelículas. En *C. albicans* las proteínas "agglutinin-like sequence" (Als) son las que llevan a cabo la función de adherencia, mientras que en *C. glabrata* la familia de genes EPA, codifican para un grupo importante de adhesinas. Las adhesinas Epa1, 6 y 7 se unen a las células epiteliales y endoteliales del huésped, mientras que Pwp7p y Aed1p interactúan con las células

endoteliales. La eliminación de adhesinas Epa1 en la célula fúngica atenuó la virulencia en un modelo murino de candidosis diseminada. En *C. parapsilosis* se han descrito cinco proteínas Als y seis para "predicted glycosylphosphatidylinositol-anchored protein 30" (PGA-30); mientras que, en *C. tropicalis* se han identificado tres Als^{78, 80}.

Las adhesinas de *C. albicans* contribuyen no solo a su capacidad para adherirse y colonizar múltiples tipos de tejidos del huésped, sino que también sirven como fracciones de unión para otros microorganismos como *Streptococcus gordonii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Tati *et al.*, identificaron por primera vez la adherencia de *C. glabrata* a las hifas de *C. albicans* mediada por adhesinas específicas en ambas especies. Este hallazgo es la base de esta asociación⁸⁰.

I.1.4.2 Enzimas hidrolíticas.

La destrucción de los tejidos del huésped por las especies de *Candida* puede verse facilitada por la liberación de enzimas hidrolíticas. Las proteinasas aspárticas secretadas (siglas en inglés, Saps), fosfolipasas, lipasas (LIPs) y hemolisinas son las enzimas más frecuentemente implicadas en la patogenicidad de las especies de *Candida*⁷⁸.

Las Saps facilitan la invasión y colonización de los tejidos huésped, por la interrupción de las membranas mucosas y por la degradación de importantes proteínas de defensa inmunológica y estructural⁷⁸.

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los fosfolípidos en ácidos grasos. Diversos autores han descrito la producción de todas las clases de fosfolipasas en las especies de *Candida*; estas contribuyen en el daño a la membrana celular del huésped, y podrían exponer los receptores para facilitar la adhesión. *Candida albicans* es la especie que produce los niveles más elevados de fosfolipasa extracelular^{20, 77, 78}.

Las lipasas están involucradas en la hidrólisis de los triglicéridos. En un modelo de infección murina se demostró que cepas mutantes de *C. albicans* (CaLIP8) fueron significativamente menos virulentas; mientras que un inhibidor de la lipasa redujo el daño tisular durante la infección por *C. parapsilosis* en un tejido humano reconstituido, y que los mutantes CpLIP1/CpLIP2 formaron biopelículas más delgadas y menos complejas⁷⁸.

Los microorganismos patógenos pueden crecer en el huésped usando hemoglobina como fuente de hierro. Las hemolisinas se consideran factores de virulencia que permiten a *Candida* spp. sobrevivir y persistir como patógeno en el huésped, ya que son utilizadas por las especies de *Candida* para degradar la hemoglobina y obtener hierro elemental de las células huésped⁷⁸.

I.1.4.3 Formación de hifas.

Las hifas juegan un papel importante en la invasión de los tejidos. Las hifas y/o pseudohifas de las especies de *Candida* muestran mayor resistencia a la fagocitosis en comparación con los blastoconidios⁷⁸.

I.1.4.4 Biopelículas.

Una vez que los blastoconidios se adhieren a las superficies de las células del huésped, se inicia el proceso de formación de las biopelículas. Éstas se definen como comunidades de células adherentes, con distintas propiedades biológicas, que están incrustadas en una matriz extracelular autosintetizante compuesta predominantemente de proteínas, glicoproteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. En las especies de *Candida* es un factor de virulencia importante, ya que actúa como barrera física para evitar la penetración del fármaco, además de proteger al patógeno de células inmunes^{6, 78}.

La matriz que forman las biopelículas de *C. albicans* suelen estar formadas por dos capas: una basal de blastoconidios que es cubierta por la segunda capa formada de hifas envueltas en una matriz gruesa, se compone principalmente de carbohidratos, proteínas, fósforo y hexosaminas. Las biopelículas de *C. parapsilosis* forman una monocapa o multicapas discontinuas compuestas en agregados de blastoconidios y pseudohifas, son más delgadas, menos estructuradas y con gran contenido de carbohidratos y menos contenido de proteínas. Las biopelículas de *C. glabrata* forman una monocapa o multicapas compactas con blastoconidios, contienen altos niveles de proteínas y carbohidratos. Las biopelículas de *C. tropicalis* presentan una monocapa compacta discontinua con morfologías filamentosas que contienen bajos niveles de carbohidratos y proteínas en comparación con las otras especies. Las biopelículas formadas por aislados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* se han asociado con tasas de morbilidad y mortalidad más altas en comparación con los aislados incapaces de formar biopelículas^{6, 20, 78}.

Las biopelículas pueden estar conformadas por más de una especie como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria que a menudo se aísla con *C. albicans*, principalmente de catéteres y que no posee la capacidad de adherirse a los blastoconidios, pero puede adherirse a las hifas de *C. albicans*. Este evento conduce a la lisis de las hifas, principalmente debido a moléculas citotóxicas o enzimas degradantes que se acumulan en los focos bacterianos que se forman sobre las hifas²⁰.

Streptococcus gordonii, puede agregarse con *C. albicans* mediante interacciones adhesina-receptor. La adhesina SspB presente en la superficie de *S. gordonii*, se une a la proteína hifal Als3p, formando una asociación sinérgica entre los dos microorganismos, *C. albicans* puede

mejorar la formación de biopelículas estreptocócicas, mientras que *S. gordonii* estimula la filamentación de las células fúngicas^{20, 72}.

I.1.4.4.1 Interacción levadura-levadura.

La asociación de especies se ha observado en la formación de biopelículas, de las más comunes ha sido el co-aislamiento de *C. albicans* y *C. glabrata*. Bekkal, *et al.*, investigaron la formación de biopelículas de aislados de *C. albicans* y *C. glabrata* co-aisladas de catéter venoso central (CVC), observando que los diversos aislados mixtos exhibían una actividad metabólica diferente en comparación con el monotípico. La biopelícula mixta produjo más biomasa que la biopelícula mono-específica sin tener que introducir más nutrientes. Por microscopía electrónica de barrido se mostró la arquitectura de la biopelícula mixta, donde los blastoconidios de *C. glabrata* estaban unidos a las hifas de *C. albicans*, formando biopelículas complejas (Figura 1)¹².

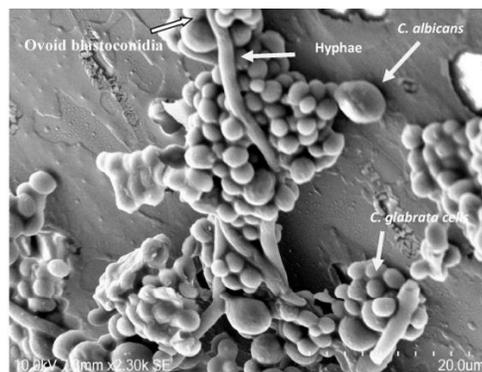


Figura 1. Biopelícula de *C. albicans* y *C. glabrata*. (Tomada de Bekkal O. 2020)¹².

Pathak, *et al.* evaluaron las biopelículas formadas por cuatro especies de *Candida* aisladas de lesiones orales: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, el estudio consistió en la formación de biopelículas mixtas en tiras de resina acrílica donde observaron la mayor densidad

óptica con la combinación de *C. albicans* y *C. glabrata*, seguida de la combinación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, a diferencia de la densidad óptica más baja con la formación de biopelículas de una sola especie. La presencia de *C. albicans* en biopelículas de múltiples especies aumentó la producción de la biopelícula cuando se inoculó con las demás especies; mientras que *C. tropicalis* retrasó la producción de las biopelículas con *C. glabrata* y *C. krusei*⁶⁰.

Thein, *et al.* informaron sobre su experimento donde utilizaron aislados de *C. albicans* y *C. krusei* con alta y baja capacidad de formación de biopelículas, demostrando que las biopelículas de las monoespecies tenían una mejor capacidad de formación en comparación con las biopelículas formadas por dos especies, además de que *C. albicans* mostró un grado menor de crecimiento filamentoso, demostrando así en todos sus experimentos un efecto antagónico mutuo⁸¹.

I.2 Patogenia de la colonización e infecciones pulmonares por *Candida* spp.

Para comprender el proceso de infección causada por estos hongos es fundamental conocer que las especies de *Candida* son comensales en diferentes áreas anatómicas, pueden colonizar y causar infección. Para establecer la infección, los patógenos oportunistas tienen que evadir el sistema inmunológico, sobrevivir, reproducirse en el microambiente del huésped, y en el caso de infección sistémica, diseminarse a otros órganos⁷⁸.

El 95-97% de las micosis invasoras son causadas por cinco especies de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. El 3-5% restante se encuentra representado por un grupo de 15-18 especies diferentes entre las que

destacan *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida auris*, *Candida famata* y *Candida rugosa*^{40, 62}.

La colonización se define como la existencia de uno o más aislados de *Candida* spp. en una o más muestras no estériles (exudados de heridas o mucosas, orina, heces, líquido gástrico, aspirado bronquial, drenajes, catéteres), con o sin signos de infección diseminada¹.

La infección es la existencia de uno o más aislados de *Candida* spp. en una o más muestras significativas (sangre, líquido cefalorraquídeo, pleural, pericardio, peritoneal o articular, fragmentos de tejido, pus o exudados de cavidades o abscesos) que deben obtenerse por un procedimiento estéril (biopsias, punción percutánea, intervención quirúrgica), con sospecha clínica o radiológica de infección¹.

Las especies de *Candida* pueden causar dos tipos principales de infecciones en humanos: 1) infecciones superficiales (que incluyen candidosis cutánea y mucosa) que afectan la piel, la mucosa gastrointestinal, vaginal, esofágica y orofaríngea, forman lesiones o pseudomembranas blanquecinas; 2) infecciones sistémicas invasivas. En personas inmunocomprometidas, la candidosis superficial puede superar la débil inmunidad del huésped y diseminarse por el torrente sanguíneo, evolucionando hacia una candidosis sistémica invasiva llamada candidemia y eventualmente puede colonizar otros órganos y causar una candidosis diseminada. La candidemia también se puede adquirir a través de dispositivos médicos, como catéteres².

I.3 Factores de oportunismo.

Los factores de oportunismo son diversos, en el cuadro 3 se muestran las descripciones de diversos autores, quienes reportan el porcentaje de colonización y los factores de oportunismo.

Cuadro 3. Relación entre factores de oportunismo y aislados de *Candida* del tracto respiratorio^{24, 36, 51}.

Factores de oportunismo	Porcentaje	Autores, año.
Antibióticos, más comorbilidades, relación PaO ₂ /FiO ₂ es más baja.	Colonización 17.8%	Delisle MS, et al. 2008
Diabetes mellitus, el uso de inhibidores de la bomba de protones y un índice de masa corporal bajo.	Colonización 43%	Mojazi AH, et al. 2012
Exposición prolongada a antibióticos de amplio espectro, el uso de esteroides e inmunosupresores, ventilación mecánica, neutropenia y diabetes	Tasa de aislamiento de <i>Candida</i> spp. del 10 - 56% en el líquido de aspirado traqueal en pacientes con sospecha clínica de VAP.	Huang D, et al. 2020

VAP: "ventilator-associated pneumonia"

UCI. Unidad de cuidados intensivos.

PaO₂/FiO₂: presión arterial de oxígeno / fracción inspirada de oxígeno (indicador del intercambio gaseoso).

Numerosos factores han contribuido al aumento de las infecciones fúngicas. El más importante es una población en constante expansión con inmunocompromiso debido a la alteración de la barrera mucosa o cutánea, defectos en el número y función de los neutrófilos o en la inmunidad mediada por células, disfunción metabólica y edades extremas. El aumento del uso de antibióticos de amplio espectro, quimioterapias citotóxicas y trasplantes aumenta aún más el riesgo de hongos oportunistas comunes y poco comunes⁶⁷.

La colonización del tracto respiratorio por especies de *Candida* es común en pacientes que reciben ventilación mecánica por períodos de más de dos días. La estancia prolongada en la unidad de cuidados intensivos y la hospitalización. Por otro lado, también son importantes las infecciones micóticas invasivas en pacientes quirúrgicos con sepsis grave. Además, el órgano más afectado por la infección micótica invasiva fue el pulmón⁷⁷.

Candida glabrata (*N. glabratus*) y *C. tropicalis* se observan más comúnmente en pacientes con neoplasias malignas de órganos hematológicos o sólidos y neutropenia; las infecciones por *C. krusei* ocurren especialmente en pacientes que han sido sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas. *Candida parapsilosis* relacionada con infecciones en neonatos y el uso de CVC⁷⁰.

I.4 Mecanismo de transmisión.

El principal mecanismo de transmisión es a través de la candidemia endógena, de las especies de *Candida* que constituyen la microbiota de varios sitios anatómicos. Estas especies en condiciones de inmunosupresión del huésped se comportan como patógenos oportunistas. Aparentemente, la mayoría de las personas suelen tener una sola especie de *Candida* en diferentes regiones anatómicas, sin embargo, algunos individuos tienen más de una especie o especies al mismo tiempo. Este hallazgo se ha demostrado en pacientes hospitalizados. Otro mecanismo de transmisión es exógeno, y esto ocurre principalmente a través de las manos de los profesionales de la salud que cuidan a los pacientes⁷⁷.

I.5. Manifestaciones clínicas de las infecciones pulmonares.

La bronconeumonía puede originarse por la diseminación hematógena del hongo o por la introducción del patógeno en el pulmón⁵⁰.

La neumonía causada por *Candida* es poco frecuente en pacientes no inmunodeprimidos, por lo que las manifestaciones clínicas son difíciles de establecer, los síntomas son variables como: tos productiva purulenta, dolor torácico, disnea, hemoptisis, fiebre, llegando a insuficiencia respiratoria. Esta entidad se clasifica como primaria cuando no existe otra manifestación hematógena de candidosis. La infección es

rara y por lo general es resultado de la aspiración. La secundaria es más frecuente y se asocia a candidosis hematogena^{7, 30}.

I.6 Epidemiología.

La distribución de las especies de *Candida* varía según la edad, la forma clínica de candidosis y el país (cuadro 4). *Candida albicans* sigue siendo la especie más frecuente en todo el mundo, representa el 37% en América Latina y el 70% en Noruega; *C. glabrata* ha surgido progresivamente en los EUA (20-24%); en Canadá y en el norte de Europa del 9-10%; en América Latina se reporta en baja frecuencia. *Candida parapsilosis* prevalece en América Latina, Europa meridional y Asia. Otra de las especies que predomina en América Latina es *C. tropicalis*. En cuanto a la edad *C. glabrata* es más frecuente en personas mayores de 60 años, mientras que *C. albicans* y *C. parapsilosis* predominan en el recién nacido, receptores de trasplantes y pacientes que reciben nutrición parenteral. *Candida tropicalis* se asocia comúnmente a pacientes con neutropenia y malignidad^{31, 58, 78}.

Los datos de morbilidad han sido difíciles de estimar, debido al conflicto que existe para catalogar a *Candida* spp. como comensales o causantes de infección. En la literatura se ha descrito que la candidosis invasiva (CI) ha afectado a más de un cuarto de millón de personas y es la causa de más de 50,000 muertes en el mundo por año³¹.

En la última década, *C. albicans* ha mostrado una tendencia a producir menos CI, mientras que *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* muestran una tendencia opuesta. La mortalidad en las infecciones debidas a especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* es más elevada que las producidas por *C. albicans*⁵⁸.

Cuadro 4. Epidemiología de la candidemia y candidosis invasiva en diferentes países^{31, 54, 71, 84}.

Candidosis	Morbilidad	Especie predominante	Mortalidad	País, año	Autor, (año)
Candidemia	1.1 casos por cada 1000 pacientes ingresados.	<i>C. parapsilosis</i> y <i>C. albicans</i>	46%	Costa Rica, 2007-2010	Villalobos-Vindas, et al. (2016)
Candidosis superficial	4,103 pacientes con sospecha, en el 51.1% fue positivo.	<i>C. albicans</i> , la diferencia depende de la forma clínica y otras especies.	—	México, 2005-2015	Reyes-Montes, et al. (2017)
Candidosis invasiva	4,387 pacientes con sospecha, en el 49.8% fue positivo	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	—	México, 2015	Reyes-Montes, et al. (2017)
Candidosis invasiva	705 casos	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>	30%	España, 2011-2012	Nieto, et al. (2015)
Candidemia	252 casos	<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	50%	Arabia Saudita, 2002-2009	Ghazi, et al. (2019)
Candidemia	289 casos	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	-	Qatar, 2009-2014	Ghazi, et al. (2019)
Candidemia	1,062 aislados	<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>	-	Turquía, 1996-2012	Ghazi, et al. (2019)
Candidosis invasiva	28 aislados de infantes	<i>C. parapsilosis</i> y <i>C. albicans</i>	42.8%	Turquía, 2000-2007	Ghazi, et al. (2019)
Candidemia	235 pacientes	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	41%	Turquía, 2007-2014	Ghazi, et al. (2019)
Candidemia	125 pacientes	<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i>	-	Irán, 2014-2015	Ghazi, et al. (2019)

La asociación de especies más frecuente que causa infección por *Candida* es *C. glabrata* y *C. albicans*, en aproximadamente el 70% de los pacientes con candidosis oral⁷⁸.

De acuerdo con los datos reportados en la literatura internacional informaron el rango de la incidencia de neumonía por *Candida*, la cual oscila entre el 0.23% y el 0.4%. El diagnóstico y tratamiento tempranos de las infecciones por *Candida* son dos factores clave para disminuir las tasas de mortalidad en los pacientes con la asociación de varios factores de riesgo^{2, 49}.

I.7 Pruebas diagnósticas.

I.7.1 Pruebas serológicas.

Las pruebas que se realizan están relacionadas al diagnóstico de CI, el estándar de referencia es el cultivo de sitios estériles (sangre, líquido peritoneal y líquido pleural). La sensibilidad general de los hemocultivos es del 50% (rango 21–71%). La sensibilidad del cultivo para sitios no estériles es del 42% (rango 30–61%) y está limitada por la necesidad de cirugía o procedimientos invasivos³².

De los ensayos antígeno/anticuerpo sin cultivo para el diagnóstico de CI se encuentra la detección de mananos y las inmunoglobulinas anti-manano, que tienen sensibilidad y especificidad de 83% y 96%, respectivamente, al usarlas en combinación^{32, 49}.

El 1-3 β -D-glucano (BDG), es un polisacárido de la pared celular que se encuentra en la mayoría de los hongos. Varios estudios de meta-análisis mostraron que el ensayo de Fungitell® que detecta BDG en suero tiene una sensibilidad y especificidad del 80% y del 82%, respectivamente. La principal limitación es el número de afecciones asociadas con resultados

falsos positivos, ya que se pueden detectar micosis por hongos diferentes a *Candida*³².

La detección de BDG en el aspirado endotraqueal y el lavado bronqueo alveolar (LBA) fueron mejores predictores de sospecha de candidosis pulmonar en comparación con la BDG sérica⁴⁹.

Finalmente, los hallazgos radiológicos de las infecciones pulmonares por *Candida* son inespecíficas, lo que hace que el diagnóstico sea difícil de confirmar y carece de métodos para la diferenciación entre comensalismo, colonización e infección por especies de *Candida*⁴⁹.

Algunos autores han descrito la diferenciación por UFC/mL entre estas entidades, aunque aún la colonización no se distingue claramente de la infección, debido a la ausencia de umbrales específicos, los valores pueden variar dependiendo de la muestra, por ejemplo $\geq 10^2$ UFC/mL para la obtención de la muestra por cepillado; $\geq 10^4$ UFC/mL para aspirados bronquiales, independientemente de la especie de microorganismos. Laroumagne *et al.*, tomaron como referencia los valores que se muestran en el cuadro 5 para la diferenciación entre comensalismo e infección bacteriana en pacientes con cáncer de pulmón, a pesar de que su estudio estaba enfocado en la detección de bacterias, aislaron a *C. albicans* en el 13.9%⁴².

Cuadro 5. Número de UFC/mL de acuerdo con el tipo y/o infección⁴².

Tipo de manifestación clínica.	UFC/mL
Comensalismo	$< 10^2$
Colonización	$> 10^2$
Infección	$> 10^5$

I.7.2 Toma de muestra.

La toma de muestras para el diagnóstico de micosis pulmonares por *Candida* spp. presenta ciertas limitaciones debido a que estos hongos se encuentran en la cavidad bucal, por lo que la toma de muestra es de suma importancia, así como el número de levaduras presentes en los especímenes. Existen diferentes métodos para obtener muestras del sistema respiratorio, algunas técnicas son invasivas como el lavado bronquial (LB) y el LBA, mientras que otras como el esputo y el aspirado traqueal son mediante métodos no invasivos, a continuación, se describe en qué consisten cada uno de ellos¹⁹.

El esputo se obtiene por la expectoración espontánea o inducida mediante nebulizadores, además de microorganismos contiene una mezcla de componentes entre los que se encuentran células del epitelio respiratorio del huésped, proteínas y otros componentes del exudado producido en los pulmones, como resultado de la respuesta inflamatoria. Su utilidad es mínima debido a la gran cantidad de microorganismos que se encuentran en el tracto respiratorio superior¹⁹.

El aspirado traqueal o endotraqueal es el método más sencillo para obtener líquido o exudado respiratorio de los pacientes con ventilación mecánica. La obtención de la muestra se realiza por aspiración a través del tubo endotraqueal, las muestras mucoides o viscosas, se pueden diluir con solución salina (Figura 2). Este método es recomendado para la detección cuantitativa de los agentes causales de la infección del tracto respiratorio inferior¹⁹.

El lavado bronquial se realiza a través de una broncoscopia donde se instilan de 5 a 10 mL de solución salina en un bronquio principal, seguida de una aspiración inmediata para la obtención de la muestra.

Esta muestra es similar al aspirado traqueal, ya que no representa material bronquial, ni alveolar¹⁹.



Figura 2. Material utilizado para obtener las muestras de LAT.

El lavado bronqueo-alveolar. Con el broncoscopio situado en el bronquio se instilan de 20 a 100 mL de solución salina estéril, la cual se aspira tratando de recuperar la mayor cantidad de líquido, se toman varias alícuotas descartando la primera, ya que suele contener exceso de células, esta muestra se considera que lava y obtiene material de alrededor de un millón de alvéolos¹⁹.

I.7.3 Pruebas fenotípicas para la identificación de *Candida* spp.

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo siguiendo cuatro criterios: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos⁴³.

Los criterios morfológicos incluyen las características microscópicas o macroscópicas. 1. Macroscópicas. Crecimiento de las especies *Candida* en diferentes medios de cultivo como agar sangre, agar chocolate, ADS con o sin antibióticos. Generalmente, las colonias crecen de forma definida, planas o convexas, cremosas y de color blanco-beige. 2. Microscópicas incluyen la prueba de formación de tubo germinativo, producción de hifas y clamidoconidios⁴³.

El tubo germinativo es una extensión cilíndrica del blastoconidio, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. La prueba de tubo germinativo identifica a dos especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*. La metodología más utilizada consiste en colocar una pequeña porción de la colonia de 24 h de crecimiento en suero humano o de conejo, incubar a 37°C por dos h, pasando el tiempo colocar una gota en un portaobjetos cubriendo con un cubreobjetos y observando al microscopio con el objetivo de 40x⁴³.

Otras técnicas que han sido probadas para la formación de tubo germinativo son, sueros de distintos animales (conejo, caballo o la mezcla de ambos); medios líquidos (caldo de soya tripticasa o el agua peptonada) mostrando sensibilidad del 35% al 95%; medios sólidos como agar crema de arroz, medio oxgall al 2% o el agar infusión de arroz-oxgall-Tween 80, por la técnica de Dalmau, los cuales mostraron sensibilidades del 98-100%, sin embargo, la desventaja sería que no están disponibles comercialmente. Rimek *et al.*, evaluaron el agar Mueller-Hinton (AM-H) para la formación de tubos germinativos, obteniendo una sensibilidad del 91.5% para la identificación presuntiva de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, mientras que la especificidad fue del 96 al 100%. La mejor especificidad fue obtenida al incubar la muestra por 2 h, ya que a mayor tiempo los aislados de *C. tropicalis* forman estructuras similares que pueden dar falsos positivos⁷³.

Los clamidoconidios son estructuras de formas redondas (tres a cuatro veces el tamaño del blastoconidio), de 6-12 µm de diámetro y pared gruesa. Esta forma es característica de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y se emiten en respuesta a las condiciones pobres en nutrientes. La producción se obtiene en agar harina de maíz adicionado con Tween 80, sembrado por la técnica Dalmau, la cual consiste en sembrar

paralelamente tres líneas separadas por 1 cm, colocando un cubreobjeto sobre la superficie donde se encuentra el inóculo, las placas se incuban a 30°C por 24-48 h y observando al microscopio en 40X. Otros medios utilizados son el cultivo sólido Oxgall- Tween-ácido cafeico, leche diluida y agar papa zanahoria con Tween 80 (APZ)⁴³.

La formación de clamidoconidios y tubos germinativos son micromorfologías características de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, por lo que su diferenciación por estas técnicas es complicada. Varias pruebas basadas en características fenotípicas han sido desarrolladas como la discriminación basada en el color de la colonia en CHROMagar Candida®, el crecimiento a 42-45°C y los perfiles de asimilación de diversos sustratos, aparentemente sin ser totalmente confiables. Los diferentes medios de cultivo que han sido probados para obtener la diferenciación entre estas dos especies se basan principalmente en la morfología de la colonia, algunos de estos medios son: agar de creatinina de semillas de Níger (agar Staib), agar ácido cafeico-citrato férrico, agar de semilla de girasol. Khan, *et al.*, propusieron que el agar tabaco quizá podría ser útil para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*; los resultados demostraron que los aislamientos de *C. dubliniensis* desarrollaron colonias rugosas de color marrón-amarillento con bordes de hifas periféricas después de la incubación de 48 a 72 h a 28°C, formando abundantes clamidoconidios, principalmente en las hifas periféricas. Por el contrario, los aislamientos de *C. albicans* mostraron colonias lisas de color blanco a crema, sin franjas de hifas, ni clamidoconidios incluso después de una prolongada incubación de 10 días³⁷.

Los cambios morfológicos pueden ser inducidos por una serie de estímulos diferentes, como la temperatura, pH, el nivel de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. La formación de clamidoconidios no ha sido

muy estudiada y hasta la fecha se desconoce su función, sin embargo, el hecho de que se hayan conservado sugiere una función importante. Aunque los clamidoconidios se semejan a las esporas vegetativas, tienen limitaciones, ya que no son más resistentes al calor, a la sequedad y a la disminución en la cantidad de nutrientes. Los medios inductores típicos son ricos en fuentes complejas de carbono (ejem., harina de maíz o arroz) y detergentes. *Candida dubliniensis* produce mayor número de clamidoconidios en comparación con *C. albicans* que puede permanecer en forma de blastoconidios. Algunos autores consideran la diferenciación fenotípica entre estas dos especies por la formación o ausencia de clamidoconidios ^{16, 37, 43}.

Böttcher, *et al.* realizaron un estudio para demostrar los efectos que tienen diferentes estímulos sobre la producción de clamidoconidios en *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Sus resultados muestran que la adición de una fuente de carbono fermentable y fácilmente disponible (monosacáridos y disacáridos) como la glucosa al 2%, galactosa, maltosa, sacarosa y suero (contiene glucosa), inhibieron la formación de clamidoconidios en *C. albicans*. Sin embargo, la presencia de fuentes adicionales de carbono y nitrógeno disminuyó la formación de estas estructuras en *C. dubliniensis*. El agar-agua, medio altamente restringido en nutrientes indujo la formación de estas estructuras en las dos especies. Un medio mínimo que proporciona solo trazas de metales, vitaminas y minerales esenciales es la base de nitrógeno de levadura, este medio indujo fácilmente clamidoconidios en ambas especies. Los medios inductores de clamidoconidios comunes se basan en maíz o arroz y, por lo tanto, son ricos en almidón, lo que indica que los polisacáridos tienen un efecto inductor o al menos no represor sobre el desarrollo de clamidoconidios. La glucosa es un importante inductor de hifas y represor de clamidoconidios en *C. albicans*, mientras que el

mismo sustrato juega el papel opuesto, aunque menos pronunciado, en las transiciones morfogénicas de *C. dubliniensis*. La suplementación con fuentes de carbono no fermentables como el glicerol y la lactosa no inhibió, sino que mejoró la esporulación de *C. albicans*. Solo los nutrientes fácilmente utilizables pueden bloquear la formación de clamidoconidios en respuesta a la limitación en nutrientes. Otro factor inductor de la formación de clamidoconidios por *C. albicans* es la incubación en la oscuridad¹⁶.

La formación de hifas o pseudohifas es útil para la identificación de algunas especies de *Candida*, las pseudohifas tienen zonas de constricción y paredes celulares menos rígidas. Las hifas son extensiones de forma tubular de la célula con paredes gruesas, paralelas. La producción de pequeñas cantidades de blastoconidios, muy esparcidos o en agrupaciones pequeñas a lo largo de las hifas nos puede indicar que se trata de *C. tropicalis*. Los blastoconidios de *C. parapsilosis* y *C. krusei* se disponen a lo largo de las pseudohifas, siendo esta la característica que permite su identificación; además, algunos aislados pueden producir hifas gigantes⁴³.

Otra prueba fenotípica para la identificación de las especies de *Candida* es la resistencia/sensibilidad a la cicloheximida al 0.1% contenida en el ADS-CC, *C. albicans*, *C. guilliermondii* (0.01%) y *C. tropicalis* son resistentes, mientras que la sensibilidad se observa en *C. krusei*, *C. parapsilosis*, y *C. glabrata*¹⁰.

La identificación mediante criterios bioquímicos incluye los procesos enzimáticos, de asimilación de nutrientes por técnicas semiautomáticas o automáticas y bioquímicos-enzimáticos. Los sistemas enzimáticos consisten en la detección de dos enzimas que solo *C. albicans* produce (β -galactosaminidasa y L-prolina aminopeptidasa). La asimilación de

nutrientes consiste en el crecimiento puro del aislado en diferentes sustratos, entre los más utilizados se encuentran el auxonograma convencional, auxacolor® y el Sistema Uni-Yeast-Tek®. Los sistemas manuales simplifican el uso y la interpretación de estos métodos, uno de los más comunes es el API 20C AUX® que se compone de 20 pozos con sustratos deshidratados, que se inoculan con un medio mínimo semisólido y donde los aislados solo crecen si asimilan estos nutrientes (Figura 3 y 4), permite la identificación de 34 especies diferentes. El sistema Vitek 2® es un método automatizado, está basado en tecnología de fluorescencia, se compone de las tarjetas de análisis con 63 pozos, una consola satélite que almacena la información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado, identifica 51 especies diferentes (Figura 5). Por último, los sistemas bioquímicos-enzimáticos como el sistema RapID Yeast Plus System®, el cual consiste en un panel de 18 pozos (Figura 6); cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos, permitiendo identificar aproximadamente 43 especies de levaduras⁴³.

Finalmente, MALDI-TOF es una técnica que se basa en el patrón proteico único mostrado por cada especie microbiana y su detección de las proteínas ribosomales usando un láser UV. Las bases de datos disponibles están actualizadas para identificar especies comunes y raras de importancia médica. Su uso en la identificación de levaduras, especialmente de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*, se realiza directamente desde el crecimiento de las colonias en medios de cultivo y desde especímenes clínicos. Aunque, algunas levaduras como las especies de *Trichosporon* han representado un desafío para este sistema

de identificación; el uso de kits comerciales de asimilación ha ayudado a superar este problema. La limitación de este método es la identificación confiable en muestras polimicrobianas⁵⁷.

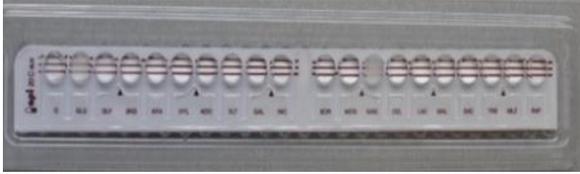


Figura 3. Galería de API 20C AUX®. Código 2000104 que identifica a *C. krusei* con el ID de 99.0%.



Figura 5. Equipo Vitek 2®



Figura 4. Galería de API 20C AUX®. Código 2000040 que identifica a *C. glabrata* con el ID de 99.4%.



Figura 6. Galería de RapID Yeast Plus System®.

1.7.4 Medios cromógenos para la identificación presuntiva de *Candida* spp.

En la actualidad existe una gran variedad de estos medios tales como CHROMagar *Candida*®, Cromogen *Albicans*®, *Candida* ID®. La incorporación de medios con sustratos cromogénicos ha sido un gran adelanto en la identificación presuntiva de levaduras, a la vez que ha permitido reconocer la presencia simultánea de dos o más especies en una misma muestra clínica. Estos medios que contienen sustratos cromogénicos que, ante la presencia de actividad enzimática específica de las levaduras, producen un color determinado, de tal manera que nos

da un indicio sobre la especie que puede estar causando colonización o infección por hongos⁴³. Los dos sustratos diseñados son 5-bromo-4-cloro-3-indol N-acetil B-D-glucosamida (X-NAG) y 5-bromo-6-cloro-3-indol fosfatasa p-toludina (BCIP) que detectan la actividad de las enzimas hexosaminidasa y fosfatasa alcalina, respectivamente. X-Gal detecta β -galactosidasa activa^{4, 83}.

CHROMagar Candida® es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento e identificación de tres especies de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, las cuales crecen de color verde, azul-gris oscuro con un halo púrpura y color rosa, respectivamente. Después de 24-48 h de incubación a 37°C. Las colonias presentan una coloración resultante de la asimilación de sustratos cromogénicos por enzimas específicas de la especie⁵³.

Inicialmente, Odds en 1994 evaluó la especificidad y sensibilidad del medio CHROMagar Candida® en varios aislados, para evitar confusión en la determinación del color utilizaron la Guía de colores Pantone®, donde *C. albicans* mostró un color verde amarillo a verde azulado. La sensibilidad y especificidad para el reconocimiento de *C. albicans* fue del 100%. Estos datos permitieron la identificación presuntiva de esta especie. Los aislamientos de *C. tropicalis* desarrollaron un color central azul-gris oscuro después de 48 h de incubación. Las colonias estaban rodeadas por un halo de color marrón oscuro a púrpura. La sensibilidad y especificidad fueron >99%. La especificidad y sensibilidad para la presunta identificación de *C. krusei* fue la forma de colonia de color rosa pálido, extensa, plana y rugosa fueron >99 y 100%, respectivamente⁵⁵.

Dos años más tarde, por la aparición de especies menos sensibles a fluconazol se requería de una detección más rápida, por lo que Pfaller, *et al.*, utilizaron el medio CHROMagar Candida®, encontrando que este

medio identificó correctamente el 94% de los aislados de *C. glabrata*, el 95% de los aislados de *C. albicans* y el 100% de los aislados de *C. tropicalis* y *C. krusei*. Además, su experimento comparaba a CHROMagar Candida® con agar papa dextrosa y ADS, los resultados mostraron que, de 207 aislamientos, CHROMagar Candida® fue más sensible que ADS en la detección de *C. tropicalis* y menos sensible en la detección de *C. parapsilosis*. Otra ventaja de CHROMagar Candida® fue el crecimiento adecuado de diferentes especies de *Candida* similar al observado con agar Sabouraud glucosa. Este medio fue de utilidad para tomar directamente la colonia y continuar con los procedimientos estándar de identificación y pruebas de sensibilidad sin alterar en la exactitud de los resultados. Por otra parte, el 92% de las identificaciones de Vitek® de aislados cultivados en CHROMagar Candida® coincidieron con los de los aislados cultivados en agar papa dextrosa o ADS⁶⁸.

De acuerdo con el fabricante CHROMagar Candida® puede identificar a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, por lo que Hospenthal, *et al.*, experimentaron sobre la posible identificación de otras especies en este medio, sus resultados demostraron mayor variación en los aislamientos de *C. parapsilosis* de todas las especies analizadas, tanto en color como en morfología de la colonia; mientras que *C. glabrata* fue fácilmente identificable, por las características de la morfología de la colonia y el color, destacando colonias pequeñas, convexas, de color rosa oscuro a púrpura. Los aislamientos de *C. glabrata* típicamente producían colonias con bordes delgados y pálidos y un pigmento púrpura intenso que se difundía en el medio³⁵.

Candida auris es una levadura patógena resistente a múltiples fármacos, que ha mostrado brotes importantes, especialmente en la UCI. CHROMagar Candida® no identifica presuntivamente a esta especie, ya que crece de un color inespecífico de blanco a malva. Recientemente, en

2021, se introdujo un nuevo medio cromogénico denominado CHROMagar Candida Plus® (CHp), desarrollado para discriminar las colonias de *C. auris*, las cuales crecen y producen un color azul claro específico con un halo azul. Mulet *et al.*, evaluaron a CHp, sus resultados demostraron que *C. auris* se puede diferenciar de *C. parapsilosis*, además de que CHp detectó a un aislado de *C. albicans*, *C. glabrata* y ocho *C. auris* que no crecieron en CH. Los datos de especificidad fueron del 100% para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. auris* y *C. tropicalis*, mientras que la sensibilidad fue del 99.3% para *C. albicans*, del 98.8% para *C. glabrata* y del 100% para las demás especies. En el cuadro 6 se muestran las tonalidades que se observan para cada especie en CH y CHp y las condiciones de incubación⁵².

Cuadro 6. Diferencia en las tonalidades del color en las especies de *Candida* en CH y CHp⁵².

Especie	Color CH 48 h, 35 – 37°C	Color CHp 36 – 48 h, 30 – 37°C
<i>C. albicans</i>	Verde	Azul turquesa – verde
<i>C. krusei</i>	Rosa, borroso	Rosa a morado con bordes blancos
<i>C. glabrata</i>	Púrpura claro a fuerte	Rosa a morado
<i>C. tropicalis</i>	Azul metálico	Azul metálico con halo rosa
<i>C. auris</i>	Blanco a púrpura claro	Azul claro con halo azul
<i>Complejo C. parapsilosis</i>	Blanco a púrpura claro	Azul claro

I.8 Antifúngicos.

Actualmente son dos las clasificaciones más utilizadas para incluir a los antifúngicos: en base a su diana o mecanismo de actividad (Figura 7) sobre la célula fúngica y por su estructura química (cuadro 7). En los

años 60 existía una larga lista de compuestos con actividad antifúngica que se obtuvieron de cultivos de actinomicetales, uno de los ejemplos fueron los polienos que son compuestos macrólidos que comparten características químicas, pero difieren en sus espectros de absorción de acuerdo con el número de dobles enlaces conjugados presentes en su estructura (de tres a siete), un éster en la parte interna, con un grupo carboxilo libre y una hexosa lateral asociada a un grupo amino primario denominado micosamina, son inestables en presencia de la luz y en soluciones ácidas o alcalinas, así como insolubles en agua. Los tres polienos usados con mayor frecuencia son nistatina, natamicina y anfotericina B, este último es un heptaeno aislado de *Streptomyces nodosus* (Figura 8), son fungicidas debido a su capacidad de interactuar con el ergosterol dentro de la membrana celular para generar poros, causando pérdida de contenido citoplasmático. Los estudios realizados han demostrado la elevada afinidad de la anfotericina B por el ergosterol, es decir diez veces mayor que su afinidad por el colesterol; este hecho, le confiere cierta selectividad por las membranas fúngicas. La anfotericina B es uno de los antifúngicos de mayor espectro disponible hasta el momento, y se utiliza por vía intravenosa, principalmente para el tratamiento de micosis graves⁷⁵.

Los azoles son compuestos heterocíclicos que están estructuralmente relacionados con el pirrol compuesto de un anillo de cinco miembros. En los azoles, uno o más de los átomos de carbono en el anillo pentagonal del pirrol se reemplazan por heteroátomos que pueden ser átomos adicionales de nitrógeno, oxígeno o azufre. Si el anillo tiene dos átomos de nitrógeno el compuesto resultante es un imidazol (ketoconazol, miconazol, clotrimazol). Si hay tres átomos de nitrógeno los compuestos se denominan triazoles, donde se encuentran los de primera generación (fluconazol (Figura 9) e itraconazol) y los de segunda generación

(voriconazol (Figura 10) y posaconazol). Los azoles son compuestos sintéticos o semisintéticos que pueden considerarse derivados de los compuestos de un solo anillo imidazol o de los isómeros del triazol^{46, 74}.

Los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol interfiriendo con la enzima fúngica (codificada por el gen ERG11) lanosterol 14 α demetilasa. Una función clave de esta enzima es convertir lanosterol en ergosterol y la inhibición de este paso conduce al agotamiento del esterol en la membrana celular fúngica. Tienen una actividad fungistática o fungicida contra especies de *Candida*⁷⁴.

Las equinocandinas son lipopéptidos hidrosolubles semisintéticos, derivados de la fermentación de productos del hongo *Glarea lozoyensis*. Entre los fármacos de este grupo se encuentran: caspofungina, micafungina y anidulafungina. Es activo *in vitro* e *in vivo* frente a las especies de *Candida*, incluidos aislados resistentes a los azoles. Caspofungina (Figura 11) inhibe la síntesis de (1-3)- β -D-glucano, componente de la pared celular fúngica, a través de la inhibición de la enzima (1-3)- β -D-glucano sintetasa, debido a su baja biodisponibilidad por vía oral solo se administra por vía endovenosa³⁴.

5-flucitosina (Figura 12) es un antifúngico que entra en la célula fúngica a través de una citosina permeasa, es convertido por el hongo en 5-fluorouracilo. Este análogo nucleósido se incorpora a las moléculas de ARN y posteriormente interfiere con la síntesis de proteínas dentro de la célula fúngica³³.

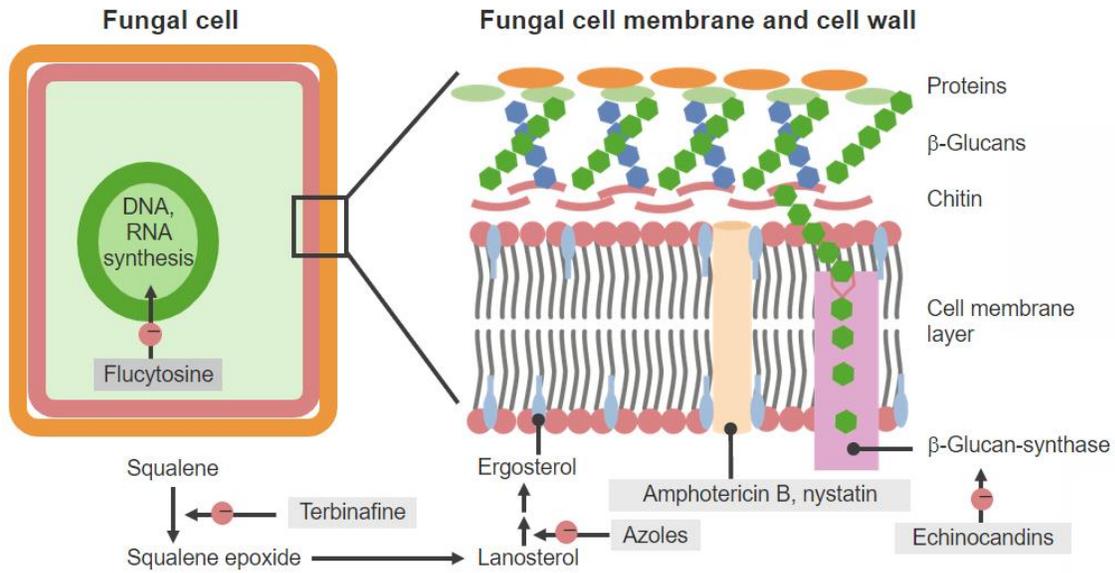


Figura 7. Esquema que muestra los sitios de acción de algunos antifúngicos. (Tomada de Oiseth A, *et al.* 2022⁵⁶).

Cuadro 7. Clasificación de los antifúngicos en base a su estructura química^{5, 33}.

	Nombre	Mecanismo de acción
Polienos	Anfotericina B	Membrana citoplasmática
Azoles	Imidazol: ketoconazol. Triazoles: fluconazol, itraconazol. Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol, isavuconazol.	Membrana citoplasmática, que inhibe la enzima 14 α -demetil-lanosterol.
Equinocandinas	Caspofungina, anidulafungina, micafungina	Pared celular, inhibiendo (1,3)- β -glucano sintasa
Pirimidinas	Flucitosina.	Núcleo, a través de una citocina permeasa.

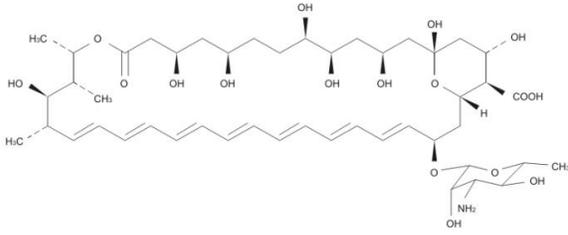


Figura 8. Estructura química de anfotericina B³³.

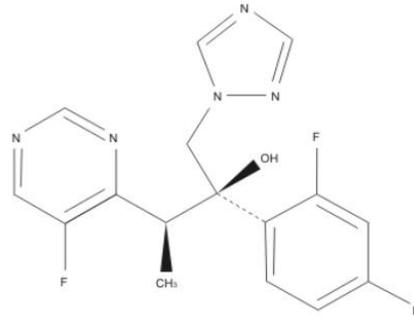


Figura 10. Estructura química de voriconazol³³.

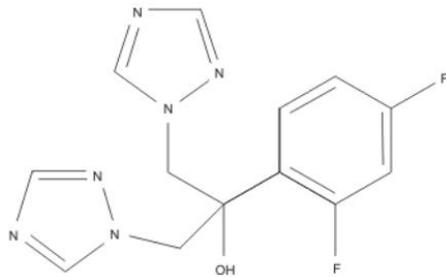


Figura 9. Estructura química de fluconazol³³.

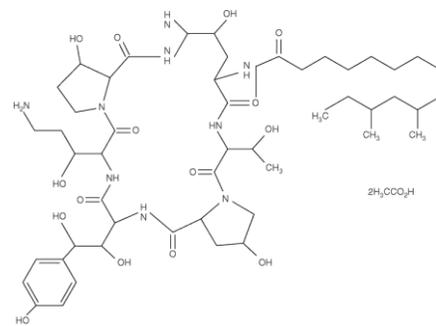


Figura 11. Estructura química de caspofungina³³.

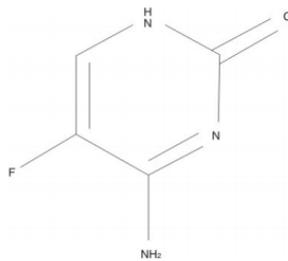


Figura 12. Estructura química de flucitosina³³.

I.8.1 Mecanismos de resistencia a los antifúngicos por especies de *Candida*.

La resistencia se define como la falta de sensibilidad relativa *in vitro* de un hongo a un fármaco antifúngico concreto. La resistencia microbiológica se puede dividir en tres grupos¹³:

1. Resistencia intrínseca o innata: Es la que presentan todos los hongos de una misma especie, sin exposición previa al antifúngico.
2. Resistencia primaria: ocurre en una especie fúngica normalmente sensible a un antifúngico, cuando aparecen de forma espontánea aislados resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.
3. Resistencia secundaria o adquirida: Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.

En los mecanismos implicados en la resistencia intrínseca destaca la capacidad de formación de biopelículas. Las biopelículas muestran resistencia a los antifúngicos mediante tres mecanismos: a) la heterogeneidad de morfologías (blastoconidios, pseudohifas e hifas); b) la capacidad de secuestrar algunos antifúngicos en la matriz extracelular y c) el "quorum sensing", que es la respuesta de todas las células que conforman la biopelícula mediante el uso de señales para activar genes coordinadamente¹³.

En algunas especies de *Candida*, dependiendo del fármaco se han descrito dos mecanismos de resistencias: 1) resistencia antifúngica primaria (intrínseca), donde el patógeno nunca se inhibe, aún con dosis altas; 2) secundaria (adquirida) surge a través de la exposición al antifúngico por un periodo prolongado, principalmente si el fármaco es fungistático^{14, 46, 78}.

La resistencia a la anfotericina B es poco común durante el tratamiento, pero los informes de aislados que exhiben una concentración mínima inhibitoria (CMI) elevada, cada vez es más frecuente. La resistencia a

los polienos es el resultado de la alteración en la ruta de biosíntesis de ergosterol, debido a mutaciones en ciertos genes que codifican enzimas claves en la síntesis de esteroides. Las mutaciones que han sido reportadas son en los genes ERG2, ERG3, ERG5, ERG6 y ERG11 de *C. albicans*. En los aislados de *C. glabrata* se han identificado mutaciones en el gen ERG6. En la Figura 13 se muestra un ejemplo de la mutación en los genes ERG que impide la unión de AMB^{14, 78}.

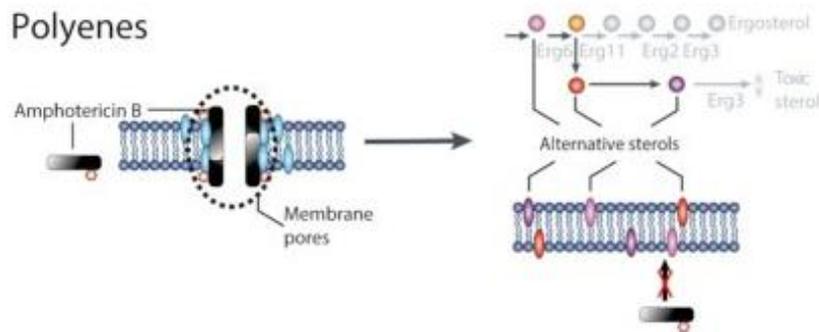


Figura 13. Representación de resistencia a AMB. (Tomada de Bohner F. 2022)¹⁴.

Los fármacos azoles se han indicado ampliamente en los pacientes por su actividad y su toxicidad reducida, lo que ha llevado a que los hongos desarrollen resistencia a este grupo de antifúngicos, particularmente a fluconazol⁷⁸.

Los diversos estudios de vigilancia global han reportado un aumento en la resistencia a los antifúngicos a través de los años, desde la introducción del fármaco para uso clínico. En el cuadro 8 se muestran los resultados de diferentes estudios y el porcentaje de resistencia observado⁷⁶.

La resistencia a los azoles se asocia principalmente con la modificación de la vía biosintética del ergosterol. Ya se han identificado mutaciones puntuales en regiones de puntos calientes de ERG11 en aislamientos resistentes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C.*

auris. Estas mutaciones (como Y132H, Y132F, K143R en *C. albicans*) reducen la capacidad de los azoles para unirse a la enzima diana, disminuyendo la actividad tóxica de los antifúngicos¹⁴.

Cuadro 8. Resistencia a los antifúngicos por especies de *Candida*⁷⁶.

Especie	Antifúngico	Aislamientos	Resistencia	Autor, año
<i>Candida</i> spp.	FLZ	>190,000	9.8%	Pfaller, et al. 1997 – 2007
<i>Candida</i> spp.	VRZ	>190,000	<5.02%	Pfaller, et al. 1997 – 2007
<i>C. albicans</i>	FLZ	3107	0.4%	Pfaller, et al. 2010 – 2011
<i>C. glabrata</i>	FLZ	3107	8.8%	Pfaller, et al. 2010 – 2011
<i>C. tropicalis</i>	FLZ	3107	1.3%	Pfaller, et al. 2010 – 2011
<i>C. parapsilosis</i>	FLZ	3107	2.1%	Pfaller, et al. 2010 – 2011
<i>C. glabrata</i>	VRZ	3107	10.5%	Pfaller, et al. 2010 – 2011
<i>Candida</i> spp.	Equinocandinas	3107	0 – 1.7%	Pfaller, et al. 2010 – 2011

En *C. krusei* es bien conocida la resistencia innata a fluconazol y una reducción en la sensibilidad a anfotericina B¹⁷.

Diversos autores han descrito la resistencia en los aislados de *C. glabrata* a todos los azoles y alrededor del 20% de los aislados desarrollan resistencia durante la terapia y la profilaxis a fluconazol⁷⁸.

La resistencia a las equinocandinas está mediada por mutaciones en las regiones altamente conservadas del gen FKS que codifica la glucano sintetasa. En aislados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicalis* se han descrito casos de resistencia. Varios estudios han demostrado que la fungemia persistente y la mala respuesta al tratamiento son más frecuentes en infecciones por *C. parapsilosis*. Los aislamientos con mutaciones puntuales en FKS1 y FKS2 se encuentran con frecuencia en entornos clínicos, lo que sugiere que estas modificaciones tienen un papel *in vivo* a medida que se desarrollan después de la terapia con equinocandinas^{14, 74}.

En general, fluconazol es activo contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Itraconazol es moderadamente activo contra las especies de *Candida*, con la excepción de *C. glabrata*. Voriconazol ejerce actividad fungicida contra la mayoría de las levaduras y es activo contra especies de *Candida* resistentes a fluconazol, con la excepción de *C. tropicalis*. Posaconazol ejerce actividad fungistática contra *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*⁷⁸.

Todas las equinocandinas presentan actividad fungicida, son altamente activas contra *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* tanto *in vitro* como *in vivo*. Es importante destacar que los valores de CMI son más altos en aislados de *C. parapsilosis* al compararlos con la mayoría de otras especies de *Candida*⁷⁸.

I.9 Pruebas de sensibilidad *in vitro*.

I.9.1 Método de microdilución en caldo.

Las pruebas de sensibilidad en antifúngicos se han llevado a cabo por métodos cualitativos y cuantitativos basados inicialmente en técnicas de difusión en agar o difusión de disco que llevaron a resultados diversos

como los propios métodos. En la búsqueda de métodos estandarizados y de referencia se crearon comités institucionales, para cumplir con las normas y plasmar en documentos los consensos realizados. En 1982, el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) antes conocidas como Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico, el cual estableció un subcomité para la revisión de las pruebas de sensibilidad antifúngica. La recopilación de datos fue documentada tres años más tarde y declararon que aproximadamente el 20% del hospital y los laboratorios de referencia estaban realizando pruebas de sensibilidad antifúngica como parte de su programa de atención al paciente. Las pruebas antifúngicas se limitaron a variaciones de un método en caldo para hongos levaduriformes. Debido a la diferenciación en los resultados obtenidos en cepas sensibles y/o resistentes se concluyó que era necesario desarrollar un método estándar para estas pruebas. El objetivo fue desarrollar un método de microdilución en caldo reproducible entre laboratorios. Siete años después del informe inicial se diseñó un documento preliminar (M27-P) que incluyó los siguientes parámetros: el uso de un medio sintético (RPMI-1640), inóculo a una concentración final de ensayo de 0.5 a 2.5×10^3 UFC/ml, temperatura de incubación de 35°C durante 48 horas. Los criterios para determinar la CMI fueron los siguientes: para anfotericina B la ausencia de crecimiento, es decir ópticamente claro y para los azoles una reducción del 80% en el crecimiento. Con aportaciones de la comunidad científica, este método se ha sometido a revisiones periódicas (M27-A, M27-A2, M27-A3, M27-S4) y se ha modificado a su versión actual de M27-60 Ed2 (2020)²⁷. En este último documento se propuso el uso de DMSO como solvente para todos los antifúngicos (Cuadro 9) y se clasificaron los puntos de corte de algunas especies y los diferentes antifúngicos²². Mientras que este método se estaba desarrollando en Estados Unidos, la comunidad europea comenzó a trabajar en un método estándar similar.

El método EUCAST (European Community Antifungal Susceptibility Testing), con algunas diferencias como: mayor concentración de glucosa al caldo RPMI-1640. La cual facilita la tasa de crecimiento de hongos permitiendo que la CMI se determine a las 24 horas. Los estudios han demostrado que los dos métodos son equivalentes y en conjunto las cepas probadas presentaron CMI similares, independientemente del método utilizado²⁷. En el cuadro 10 se presentan los puntos de corte establecidos por el CLSI para las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 por el método de microdilución en caldo.

Cuadro 9. Solventes y diluyentes para la preparación de las soluciones madre de los antifúngicos en las pruebas de microdilución en caldo²².

Antifúngico	Solvente	Diluyente
Anfotericina B	DMSO	RPMI
Caspofungina	DMSO	RPMI
Fluconazol	DMSO	RPMI
Isavuconazol	DMSO	RPMI
Itraconazol	DMSO	RPMI
Posaconazol	DMSO	RPMI
Voriconazol	DMSO	RPMI

DMSO: dimetil sulfóxido

Cuadro 10. Límites de CMI a las 24 h para cepas control de calidad por microdilución en caldo²².

Organismo	Antifúngico	CMI (µg/mL)	% de CMI
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Anfotericina B	0.25 – 2	99.5
	Fluconazol	16 – 64	99.1
	Itraconazol	0.12 – 0.5	94.0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Anfotericina B	0.25 – 1	99.1
	Fluconazol	2 – 8	99.1
	Itraconazol	0.06 – 0.25	99.0

I.9.2 Métodos de difusión en disco (M44-A2)

Otro método basado en ensayos de difusión en disco para levaduras escrito en el documento M44-A, fue diseñado para el uso práctico en laboratorios clínicos debido a lo laborioso del método de microdilución en caldo. El método de difusión en disco es similar al de Kirby-Bauer utilizado a nivel mundial para las pruebas de sensibilidad bacteriana. Las limitaciones son la evaluación de dos antifúngicos (fluconazol y voriconazol), el uso de agar Mueller-Hinton que se requiere para las pruebas bacterianas, con la adición de azul de metileno y glucosa que ayuda al crecimiento de los hongos y mejora la visualización de los diámetros de la zona de inhibición²⁷.

I.9.3 Métodos comerciales de sensibilidad antifúngica.

La industria ha introducido kits para ayudar a los laboratorios con pruebas de sensibilidad antifúngica. Los sistemas evaluados incluyen el ETEST® de AB Biodisk, este en un método cuantitativo de difusión utilizando tiras impregnadas con concentraciones decrecientes de los antifúngicos y el sistema Yeast One de Trek Diagnostics® es una prueba de microdilución en caldo. Estos métodos son variables y la reproducibilidad puede ser un problema. La clasificación de los resultados de CMI son: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). Sin embargo, las pruebas para azoles requieren un cambio en estas categorías. En el caso de azoles, incluyen sensibles (S) y resistentes (R), se sustituye la categoría intermedia por sensible dosis-dependiente (SD-D), que es utilizable únicamente en las pruebas con levadura. Esta categoría es en reconocimiento de que la sensibilidad a la levadura depende de la concentración máxima del antifúngico en sangre. Manteniendo el nivel sanguíneo con la dosis más alta, un aislado con un valor de CMI en SD-D puede tratarse con éxito con un azol. El problema

principal con las pruebas de sensibilidad antifúngica es la correlación de la CMI con la evolución de la infección fúngica en el paciente²⁷.

I.10 Tratamiento.

El tratamiento para estas infecciones varía considerablemente con las especies de *Candida* aisladas, ya que se ha reportado un incremento en la resistencia a algunos antifúngicos como es el caso de *C. glabrata* a fluconazol; los antifúngicos disponibles por lo que identificar la especie causante de la infección y su perfil de sensibilidad es importante para la resolución de la enfermedad⁶⁹.

I.11 Nuevas moléculas.

Con fundamento en el desarrollo limitado de los antifúngicos, en la última década se han diseñado diversas moléculas similares a los polienos y los azoles.

Los polienos son moléculas que se han utilizado durante más de seis décadas, considerados los antifúngicos más potentes conocidos. Diversos estudios se han realizado para reducir su toxicidad con diferentes presentaciones como un complejo lipídico, una formulación liposomal y más recientemente, la propuesta de nanopartículas poliméricas y nanosuspensiones. Existen ventajas en el uso de estas presentaciones, pero la toxicidad remanente aún dificulta su uso. Otra desventaja para considerar estas presentaciones es el aumento en los costos del tratamiento, lo que posiblemente disminuya la eficacia del fármaco. Por lo tanto, se requieren derivados químicos más selectivos. Antillón, *et al.*, presentaron derivados, considerando sustituciones de amida en el grupo carboxílico para forzar el anillo de azúcar hacia la membrana, el cual es esencial para la actividad del fármaco. Basados en estas consideraciones, sintetizaron siete análogos, de los cuales sus

resultados los llevaron a la síntesis de una molécula más denominada A21 (dihidrocloruro de éster metílico de *L*-histidina). A21 (Figura 14) mostró una mayor selectividad por las células fúngicas en comparación con las células de mamíferos, los resultados farmacológicos demostraron una actividad de los compuestos AMB y A21 contra las cepas de *C. albicans* muy similar, lo que indica que se conserva el carácter antimicótico de la molécula original. Además, A21 presenta mayor actividad contra *C. krusei*, que es resistente a AMB. El efecto de A21 sobre los eritrocitos y sobre las células renales mostró una reducción importante en comparación con AMB. Para probar la seguridad del fármaco utilizaron ratones Balb-C, las DL₅₀ obtenidas fueron 29.3 mg/kg para AMB y 199.48 mg/kg para A21, confirmados con el análisis histológico del daño al riñón. Otro de sus estudios consistió en infectar ratones con *C. albicans*, los ratones que no recibieron tratamiento mostraron infección en el intestino, sangre, riñón y pulmón, mientras que los ratones tratados con AMB y A21 presentaron algunos residuos de levaduras⁸.

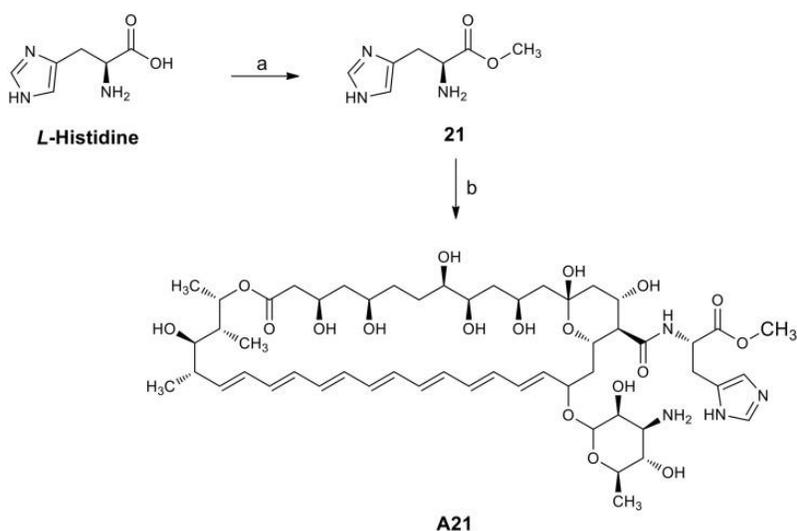


Figura 14. Síntesis del análogo A21 a partir de anfotericina B. (Tomada de Antillón, A. 2016)⁸.

Reactivos y condiciones: (a) SOCl₂, MeOH, 60°C; (b) AMB, PyBOP, Et₃N, DMSO, T_{amb}

El benzimidazol pertenece a una clase de estructuras que forman parte integral de medicamentos y fármacos que exhiben una amplia gama de funciones farmacológicas, como anticancerígeno, antimicrobiano, antiviral y antifúngico⁶⁴.

Penieres–Carrillo, *et al.* utilizaron técnicas de química verde para la síntesis de derivados de benzimidazoles, obteniendo una pequeña biblioteca de 1Hbenzimidazoles, además detectaron su actividad antifúngica y antibacteriana contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 y ATCC43300). Tres de estos benzimidazoles mostraron actividades inhibitorias significativas contra *C. albicans*, mientras que dos compuestos exhibieron actividades notables contra *S. aureus* resistente a metilina⁶⁴.

En otro de sus estudios utilizaron 3,3'- diindolilmetano (DIM) donde sustituyeron diferentes moléculas en el metileno de la unidad DIM, la sustitución en este metileno les dio otra pequeña biblioteca de compuestos de los cuales las moléculas 14f y 14g mostraron actividad sustancial contra *C. parapsilosis* y *C. neoformans*⁶⁵.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las infecciones pulmonares causadas por las especies del género *Candida* han ido en aumento, actualmente es un reto establecer el diagnóstico de colonización y/o infección por estos hongos, debido a que los parámetros de la formación de UFC/mL para diferenciar los dos eventos, aun no son claros. En general, debe tomarse en cuenta que la colonización por *Candida* spp. es una condición que se presenta en pacientes con múltiples comorbilidades, el uso de dispositivos médicos o que reciben tratamiento para enfermedades subyacentes. Dicho evento explicará el incremento de la colonización y/o infección por estas especies en los pacientes con múltiples factores de oportunismo.

Aún hay dificultad para establecer el papel que juegan las especies de *Candida* al ser obtenidas del espécimen de líquido de aspirado traqueal en los cultivos estándar, es importante impulsar estos estudios en los laboratorios clínicos microbiológicos para que sean adoptados en la práctica y establecer el papel de *Candida* como colonizante o causante de infección, y por ende el inicio del tratamiento que evite un desenlace fatal en los pacientes. Por tal motivo, basados en el valor establecido ($\geq 10^4$ UFC/mL) para los microorganismos obtenidos de líquido de aspirado traqueal, con este estudio se pretende una actualización epidemiológica de las especies de *Candida*, su identificación presuntiva sobre dos medios cromógenos diferentes, así como el porcentaje de aislados que muestran resistencia a diferentes antifúngicos. Además de evaluar la actividad de nuevas moléculas antifúngicas, las cuales podrán ser una nueva opción terapéutica en pacientes con infecciones sistémicas levaduriformes.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Identificar las especies de *Candida* obtenidas del líquido de aspirado traqueal y su perfil de sensibilidad a los antifúngicos. Evaluar la especificidad y sensibilidad de CHROMagar Candida® y CHROMagar Candida plus®.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Identificar fenotípicamente las especies de *Candida* obtenidas de líquido de aspirado traqueal.
- Evaluar la especificidad y sensibilidad de dos medios cromógenos para la identificación presuntiva de *Candida* spp.
- Comparar la frecuencia de aislados de *Candida* spp. obtenidos de líquido de aspirado traqueal de los años 2019, 2021 y 2022.
- Determinar el perfil de sensibilidad a antifúngicos para cada especie de *Candida* aislada.
- Analizar el porcentaje de asociación de especies de *Candida*.
- Evaluar la actividad de nuevas moléculas antifúngicas sobre los aislados del líquido de aspirado traqueal.

IV. METODOLOGIA.

Estudio prospectivo, observacional y transversal realizado en los aislados de *Candida* obtenidos del aspirado traqueal de pacientes hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos, medicina interna y cirugía.

Aislados.

Los aislados fueron obtenidos de pacientes del Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro", del Instituto de los Trabajadores del Estado, mediante líquido de aspirado traqueal (LAT). La muestra del aspirado fue sembrada en placas de agar sangre (AS) y agar chocolate, el crecimiento abundante de colonias levaduriformes (10^6 UFC/mL) (Figura 15 izq) era verificado por frotis y tinción de Gram observada al microscopio, ante la evidencia de crecimiento abundante de levaduras se resembraban en placas de CHROMagar *Candida*® (CH). En la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la UNAM se continuo con su identificación fenotípica. Del crecimiento levaduriforme en CH (Figura 16) se preparó una suspensión al 0.5 en la escala de McFarland (MF) y se sembraron 5 μ L en placas de CH extendiéndolos por toda la superficie, se incubaron a 37°C por 48 h, para la obtención de un cultivo monospórico. Del crecimiento de una sola colonia se resembró en placas de ADS. En el caso de observar el crecimiento de dos o más colonias con diferente coloración (figura 15 Der) se tomó de cada una y se resembraron en ADS, se incubaron a 28°C por 24-48 h. De acuerdo con las características colorimétricas se hizo una identificación presuntiva de las especies de *Candida*.



Figura 15. Izq. placa de AS con crecimiento levaduriforme de una muestra de LAT. Der. Cultivo de asociación de especies de *Candida* sobre CH.

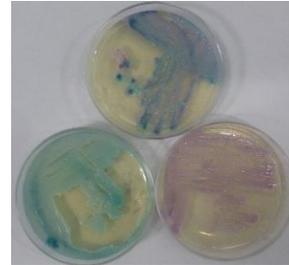


Figura 16. Aislamiento de especies de *Candida*. Se muestra en la placa de arriba la asociación de especies de *Candida* en CH y la separación de cada especie en las placas de abajo.

Identificación Fenotípica.

Del crecimiento de 24-48 h en ADS se preparó una suspensión en solución salina al 0.5 en la escala de MF, se tomaron 5 μ L y se colocaron en el centro de una placa de CHROMagar (CH) y 5 μ L en CHROMagar plus (CHp), las placas se incubaron a 37°C por 48 h y se compararon con la plantilla Pantone para determinar el código de color de cada especie obtenida (Figura 17). Además, medir el tamaño de la colonia y describir las características morfológicas.

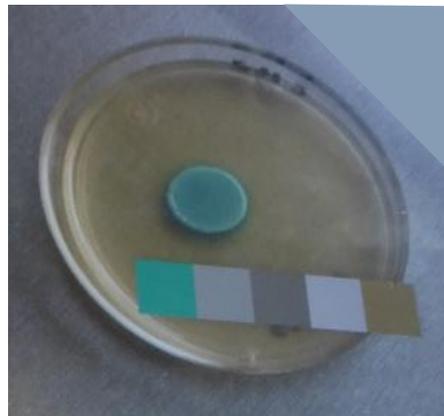


Figura 17. Obtención del color de la colonia con la plantilla Pantone (código 17-5641 TCX Esmeralda).

Determinación de la sensibilidad y especificidad de CHROMagar Candida® y CHROMagar Candida plus®.

A partir de los datos obtenidos en los medios cromógenos se analizó la sensibilidad y especificidad de ambos medios para cada especie, utilizando las fórmulas de sensibilidad y especificidad⁸⁵.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

VP: verdadero positivo

VN: verdadero negativo

FN: falso negativo

FP: falso positivo

Los aislados se sembraron por estría sobre la superficie de agar Mueller-Hinton (AM-H), del crecimiento colonial de 24-48 h en ADS, se cubrieron con un cubreobjeto estéril, las placas se incubaron a 37°C por 2 h y se observaron directamente al microscopio bajo el objetivo 10X, para la búsqueda de tubos germinativos y la presencia de pseudohifas⁵³. En la figura 18 se observan numerosos tubos germinativos y en la figura 19 el acercamiento de tubos germinativos en caldo Mueller-Hinton.

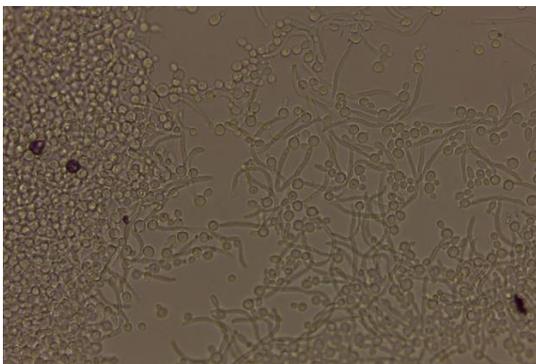


Figura 18. Numerosos tubos germinativos a 40x.



Figura 19. Acercamiento del tubo germinativo a 100x.

Todos los aislados fueron sembrados en agar papa zanahoria más Tween 80 al 1% (APZ), por la técnica Dalmau (Figura 20); esta técnica consiste en tomar con el asa bacteriológica una porción de la colonia

problema de 24-48 h de crecimiento a 30°C y se inoculó de manera lineal sobre la superficie del agar, se trazaron dos líneas paralelas de un centímetro de distancia, esterilizar el asa y pasarla de abajo hacia arriba sobre las líneas antes trazadas, para disminuir el inóculo, incubar a 28°C por 72-96 h y observar al microscopio bajo el objetivo 10X para la búsqueda de clamidoconidios (Figura 21) y la formación de diferentes disposiciones de las pseudohifas.

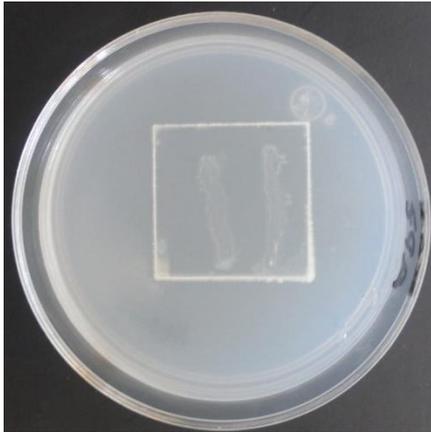


Figura 20. Siembra en APZ por la técnica Dalmau.

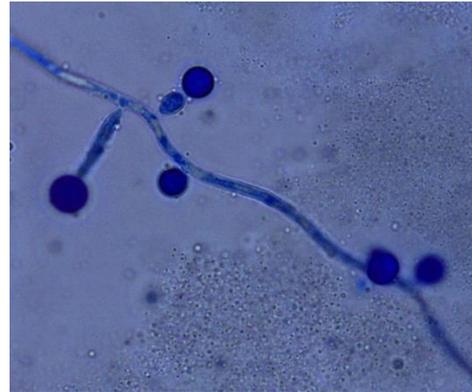


Figura 21. Clamidoconidios en APZ observados en examen directo con azul de algodón.

El crecimiento de 24-48 h de cada uno de los aislados problema se resembró en ADS-adicionado con cloranfenicol y cicloheximida (ADS-CC) y se incubaron a 28°C por 24-48 h, para valorar resistencia o sensibilidad a la cicloheximida (Figura 22).

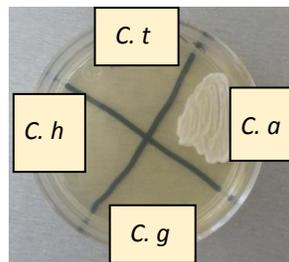


Figura 22. Sensibilidad y resistencia de diferentes especies de *Candida* en ADS-CC. *C. t*: *Candida tropicalis*, *C. a*: *Candida albicans*, *C. g*: *Candida glabrata* y *C. h*: *Candida haemulonii*.

Todos los aislados fueron conservados en viales con NaCl y etiquetados.

Pruebas de sensibilidad antifúngica por microdilución en caldo.

Para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos se siguió el método de microdilución en caldo del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI), siguiendo los lineamientos del documento M27-A3 para los siguientes antifúngicos: fluconazol (FLZ), itraconazol (ITZ), posaconazol (PSZ), voriconazol (VRZ), isavuconazol (ISA), caspofungina (CSF), anfotericina B (AMB) y un fármaco desarrollado denominado A21. De cada uno de los antifúngicos se prepararon soluciones madre en DMSO (dimetilsulfóxido), con excepción de CSF.

De acuerdo con el documento M60-Ed2 del CLSI se utilizaron los controles de calidad *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Para realizar el ensayo se ocuparon placas de microdilución de 96 pozos de fondo en U; la lectura se hizo visualmente con un espejo invertido, después de incubar las placas a 35°C por 48 h. En la fila A y B se inocularon los controles de calidad y de la fila C a H los inóculos de los aislados de pacientes. Para la preparación de las microplacas, se llenaron con 100 µL de las diluciones de cada uno de los antifúngicos en caldo RPMI, los cuales se distribuyeron de manera decreciente en los pozos de las columnas (1-10), de tal manera que en la columna 1 quedó la concentración más alta correspondiente a 16 µg/mL y en la columna 10 la concentración más baja 0.03 µg/mL. Este procedimiento se realizó para ITZ, VRZ, PSZ, ISA, CSF, AMB Y A21; mientras que para FLZ las concentraciones utilizadas fueron 64 µg/mL y 0.125 µg/mL, respectivamente. La columna 11 y 12 correspondieron al control de crecimiento y al control de esterilidad, respectivamente. En la Figura 23 se muestra un esquema para la preparación del inóculo y en la Figura 24 se esquematiza el llenado de las microplacas.

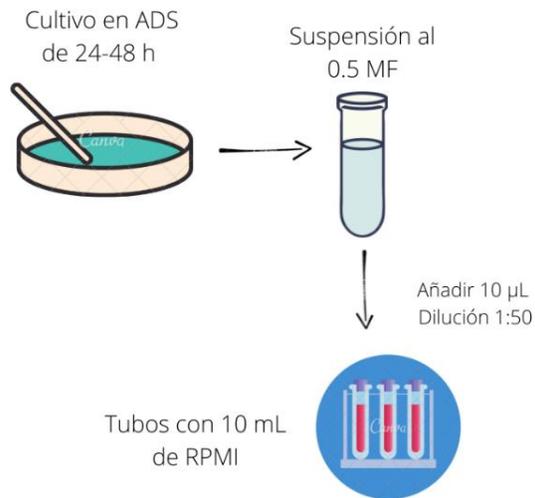


Figura 23. Preparación del inoculo en RPMI.



Figura 24. Prueba de sensibilidad. Llenado de placas de 96 pozos. La inoculación de los aislados problema de la fila C-H.

Las lecturas para la interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se hacen visualmente con un espejo invertido, para ISA, ITZ, FLZ y PSZ la CMI corresponde al pozo donde se observe el 80% de inhibición, para VRZ y CSF la CMI es el pozo con el 50% de inhibición de crecimiento y para A21 y AMB la CMI corresponde al pozo con el 100% de inhibición del crecimiento.

Los valores de CMI se compararon con los puntos de corte establecidos por el CLSI en el documento M60-Ed2 que se muestran en el cuadro 11.

En el caso de ISA y A21 no están establecidos los puntos de corte para la CMI por lo que solo hablaremos de una buena o pobre actividad comparando a ISA con los puntos de corte establecidos para VRZ y PSZ, para A21 la comparación será con AMB.

Cuadro 11. Clasificación de los puntos de corte establecidos por el CLSI.

Antifúngico	Especie	S	I^a	SDD^b	R
Caspofungina ^{c,e}	<i>C. albicans</i>	≤0.25	0.5	-	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0.125	0.25	-	≥0.5
	<i>C. krusei</i>	≤0.25	0.5	-	≥1
	<i>C. parapsilosis^d</i>	≤2	4	-	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.25	0.4	-	≥1
Fluconazol ^{1, b}	<i>C. albicans</i>	≤2	-	4	≥8
	<i>C. glabrata^f</i>	-	-	≤32	≥64
	<i>C. krusei^g</i>	-	-	-	-
	<i>C. parapsilosis^d</i>	≤2	-	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤2	-	4	≥8
Voriconazol ^c	<i>C. albicans</i>	≤0.125	0.25 – 0.5	-	≥1
	<i>C. glabrata^h</i>	-	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≤0.5	1	-	≥2
	<i>C. parapsilosis^d</i>	≤0.125	0.25 – 0.5	-	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≤0.125	0.25 – 0.5	-	≥1
Anfotericina B	<i>Candida</i> spp.				≥2
Itraconazol	<i>Candida</i> spp.				≥1
Posaconazol	<i>Candida</i> spp.				≥1
Isavuconazol	<i>Candida</i> spp.	NI			NI

Tomada y modificada del documento M60-Ed2²² NI: No indicado.

“1. Se han establecido los puntos de corte seleccionados para distinguir las variantes resistentes de los aislados susceptibles. Las diferencias en los puntos de corte reflejan cuestiones metodológicas.

a. Las cepas con CMI intermedias pueden responder clínicamente a una dosis de antifúngico superior a la estándar o en situaciones en las que se maximiza la penetración del antifúngico.

b. La susceptibilidad depende de alcanzar el nivel sanguíneo máximo posible. Para el fluconazol, dosis superiores a la dosis estándar (6 mg/kg/día) pueden ser necesarias en adultos con función renal normal y habitus corporal.

c. Para estos agentes antifúngicos, los datos se basan en gran medida en la experiencia de pacientes no neutropénicos con candidemia. La relevancia clínica de los agentes antifúngicos en otros entornos es incierta

d. Cuando el aislado es alguna de las especies del complejo de *C. parapsilosis*, no se aplican los puntos de corte para *C. parapsilosis*, se deben considerar los valores de corte epidemiológico del documento M59 del CLSI.

e. La prueba de susceptibilidad a caspofungina *in vitro* se ha asociado con una variabilidad significativa, contribuyendo a informes de falsa resistencia cuando se utiliza el método de referencia descrito en el documento CLSI M27. Cuando se prueba la caspofungina, los resultados susceptibles pueden ser reportados como "susceptibles." Sin embargo, los laboratorios deben confirmar los resultados "intermedios" o "resistentes" con una de las siguientes opciones:

- Pruebas de susceptibilidad adicionales con micafungina o anidulafungina.

- Análisis de secuencias de ADN de genes FKS para identificar mutaciones en FKS1 (*Candida* spp.) y FKS2 (*C. glabrata*).
- Envío del aislado a un laboratorio de referencia para confirmación de que son resistentes a la anidulafungina o micafungina o que poseen mutaciones características en la región FKS, que se consideran resistentes a todas las equinocandinas, incluida la caspofungina, y deben notificarse como tales.

f. Para el fluconazol, estos puntos de corte se basan en una amplia experiencia con infecciones mucosas e invasivas debido a *Candida* spp. Cuando un aislado se identifica como *C. glabrata* y la CMI es de 32 µg/ml, el clínico debe determinar si el fluconazol es apropiado en el contexto clínico específico. Si es así, los pacientes deben recibir el régimen de dosis máxima de fluconazol.

g. Los aislamientos de *C. krusei* son intrínsecamente resistentes al fluconazol, por lo que sus CMI no deben interpretarse utilizando esta escala.

h. Los datos actuales son insuficientes para demostrar una correlación entre las pruebas in vitro y el resultado clínico”.

Finalmente se probaron 5 moléculas que correspondieron a precursores de DIM sintetizados en la FES Cuautitlán UNAM, numeradas como: M-1, M-4, M-8, M-12 y M-13. Para la preparación de las placas se siguió la metodología antes descrita en la prueba de sensibilidad por microdilución en caldo, con algunas variantes que correspondieron al uso de placas de microdilución planas, lectura visual y por espectrofotómetro (CHROMATE awareness technology INC®) para la determinación de la absorbancia (DO).

En las moléculas donde se observará actividad se tomaron 2 µL del pozo control de crecimiento (11) y 2 µL del pozo donde se observará la mayor actividad de la molécula problema, los cuales se sembraron en una placa con ADS distribuyendo el volumen uniformemente sobre toda la superficie. Todas las placas se incubaron durante 48 h a 32°C, posteriormente se contó el número de UFC de cada placa. Sí el número de UFC era incontable, el ensayo de microdilución se repitió utilizando una concentración más alta correspondiente a 64 µg/mL y se utilizó el procedimiento antes descrito para la determinación de UFC/mL.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se creó una base de datos en el programa Excel, con la información de los pacientes, de los aislados obtenidos y la CMI de cada uno de los antifúngicos sobre los aislados de *Candida*. La estadística descriptiva fue utilizada para la obtención de porcentajes de comparación de resistencia, promedio, frecuencias, medias. Así como, los valores verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos para la determinación de sensibilidad y especificidad de los medios cromógenos. Finalmente, para la comparación de las CMI del fármaco A21 respecto a AMB se utilizó la prueba no paramétrica, U de Mann-Whitney con ayuda del programa Excel, para analizar si hubo diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 95%, de acuerdo con las siguientes hipótesis y con la fórmula que se muestra para calcular Z.

$$H_0: P(A > B) = P(B > A)$$

$$H_1: P(A > B) \neq P(B > A)$$

$$Z = \frac{U - \frac{N_1 N_2}{2}}{\sqrt{\frac{N_1 N_2 (N_1 + N_2 + 1)}{12}}} \sim (0,1)$$

V. RESULTADOS.

De acuerdo con los datos obtenidos en el registro del laboratorio de Microbiología del Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro", ISSTE, del 1 de enero al 31 de diciembre de 2019 se procesaron 204 muestras de líquido de aspirado traqueal (LAT), de las cuales se obtuvieron 26 aislados levaduriformes correspondientes a 11 pacientes; del 1 de enero al 31 de diciembre de 2021 de 211 muestras procesadas, 15 aislados levaduriformes de 19 pacientes y de 1 de enero al 31 de julio de 2022 de las 80 muestras obtenidas, 35 aislados levaduriformes correspondientes a 26 pacientes. El total de aislados levaduriformes durante los tres periodos fueron 75 de 56 pacientes. Diez de las muestras no se pudieron reactivar de su conservación.

Del total de aislados, el 53.9% se obtuvieron de mujeres (Figura 25), con ligero predominio por este género, sin diferencia significativa. El rango de edad de los pacientes fue de 20 años a 90 años (Figura 26), el mayor porcentaje de aislados correspondieron a pacientes entre los 61 a 70 años. El promedio de edad fue de 65.5 años.

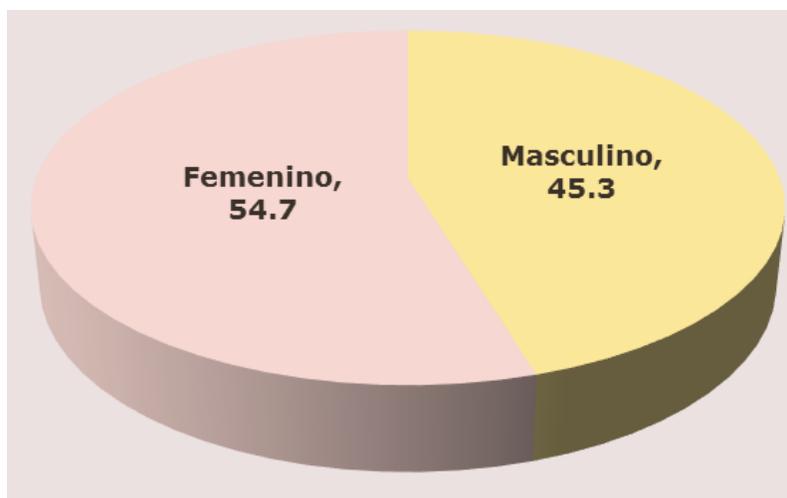


Figura 25. Porcentaje de aislados que correspondieron a mujeres y hombres.

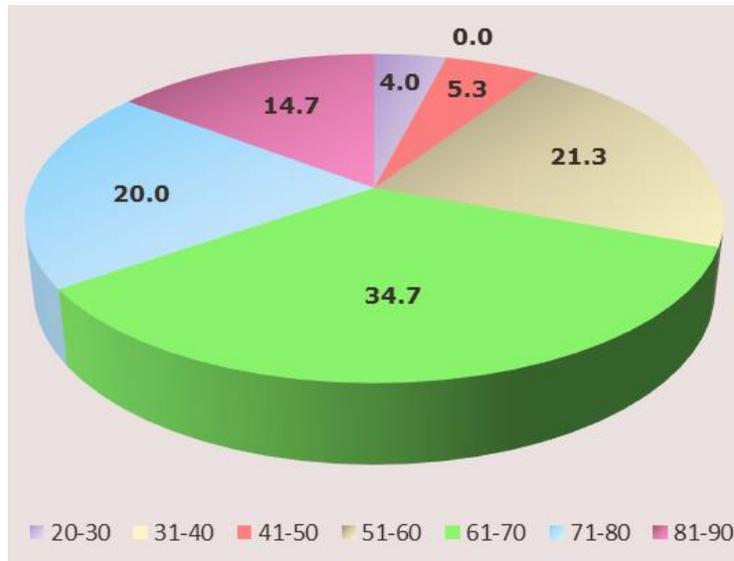


Figura 26. Frecuencia de edades. Predominio en los pacientes de 61-70 años.

En la Figura 27 se presenta la distribución de los aislados obtenidos de LAT en los diferentes meses, de los años 2019, 2021 y 2022, donde se muestra un incremento en los meses de junio y julio de los años 2019 y 2022; mientras que en 2021 el aumento se presentó en agosto, septiembre y octubre.

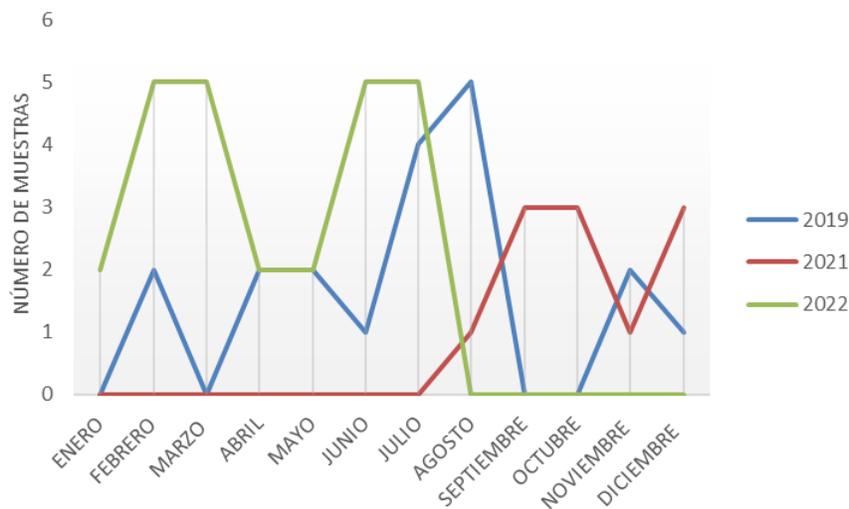


Figura 27. Número de aislados obtenidos del LAT en los diferentes meses de los años 2019, 2021 y 2022.

El 26.8% de los pacientes estuvieron hospitalizados en el servicio de medicina interna (MI), el 16.1% de los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente y por la gravedad se hospitalizaron en la unidad de cuidados intensivos (UCI). El 14.3% fueron hospitalizados en MI y trasladados a la UCI. Finalmente, el 7.1% en el servicio de cirugía. Los factores o enfermedades de riesgo fueron múltiples, los más comunes se enlistan en el cuadro 12. Otros factores menos frecuentes fueron el uso de catéter urinario, sepsis severa y abdominal, perforación intestinal, colecistectomía, derrame pleural, insuficiencia cardíaca, anemia y choque hipovolémico, entre otros. El porcentaje de mortalidad de los pacientes de los cuales se aisló *Candida* spp. fue de 37.5%.

Cuadro 12. Factores de riesgo y enfermedades subyacentes más frecuentes encontrados en los pacientes incluidos en este estudio.

FACTOR O ENFERMEDAD SUBYACENTE	NÚMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE
Antibióticos	36	64.3%
Ventilación mecánica	29	51.8%
Intubación	29	51.8%
Sedación	29	51.8%
Neumonía	19	33.9%
CVC	17	30.4%
Diabetes mellitus	16	28.6%
Catéter urinario	12	21.4%
Hipertensión arterial	11	19.6%
Insuficiencia respiratoria aguda	7	12.5%
Acidosis y cetoacidosis	7	12.5%
Laparotomía exploratoria	6	10.7%
Enfermedad renal	6	10.7%
Lavados quirúrgicos	6	10.7%
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	5	8.9%
Tabaquismo	5	8.9%
Tratamiento con FLZ	3	5.4%

CVC: Catéter venoso central

En el cuadro 13 se muestra el número de pacientes y los días de estancia que permanecieron en los diferentes servicios, el paciente con menos días de estancia fue de 5 y el paciente con más días de estancia fue de 62.

Cuadro 13. Días de estancia hospitalaria de los pacientes incluidos en este estudio.

Días de estancia	Número de pacientes	Porcentaje
5 - 9	8	14.3%
10 - 20	16	28.6%
21 - 30	8	14.3%
31 - 40	7	12.5%
41 - 62	4	7.1%

Todos los aislados teñidos con Gram, adquirieron el colorante primario mostrando una coloración violeta. (Figuras 28 a 32.) En el cuadro 14 se describe el rango de tamaños de los blastoconidios de cada especie.



Figura 28. Frotis de *C. albicans* con tinción de Gram. Se observaron blastoconidios ovalados de diferentes tamaños.



Figura 29. Frotis de *C. tropicalis* con tinción de Gram. Blastoconidios con diferentes morfologías y tamaños, pseudohifas de diferente grosor y longitud.

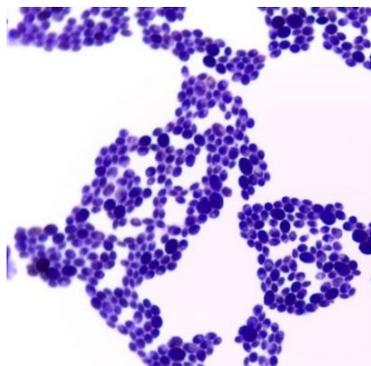


Figura 30. Frotis de *C. glabrata* (*N. glabratus*) con tinción de Gram, con blastoconidios redondos y pequeños.

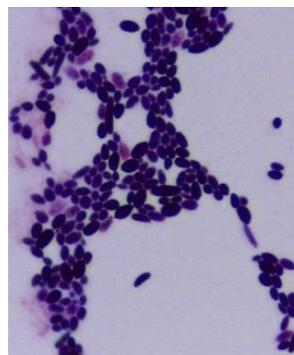


Figura 31. Frotis de *C. parapsilosis* con tinción de Gram. Blastoconidios alargados, redondos, de diferentes tamaños.

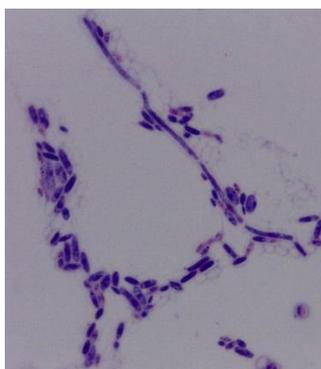


Figura 32. Frotis de *C. krusei* (*P. kudriavzevii*) con tinción de Gram. Blastoconidios rectangulares e hifas rectangulares largas.

Cuadro 14. Tamaño de los blastoconidios e hifas para cada especie.

Especie de <i>Candida</i>	Tamaño de los blastoconidios	Tamaño de la hifa
<i>C. albicans</i>	4.47 - 1.6 μm a 4.94 - 3.29 μm	-
<i>C. tropicalis</i>	1.65 - 3.29 a 4.11 μm	3.29 - 4.12 a 5.76 - 9.06 μm
<i>C. glabrata</i> (<i>N. glabratus</i>)	1.65 - 2.47 μm	-
<i>C. parapsilosis</i>	1.65 - 3.29 a 3.29 - 4.94 μm	1.65x8.24 μm .
<i>C. krusei</i> (<i>P. kudriavzevii</i>)	1.64 x 2.47-7.41 μm	1.65 μm de ancho y 22.23-32.94 μm de largo.

En el cuadro 15 se muestran las características fenotípicas que presentaron las especies incluidas en este estudio, en los medios de cultivo AM-H, APZ y la resistencia en ADS-CC, de los 65 aislados identificados. Todos los aislados de *C. tropicalis* no crecieron en ADS-CC durante las primeras 48 h, sin embargo, a las 72 h se observó crecimiento.

Cuadro 15. Observación microscópica en AM-H y APZ, resistencia o sensibilidad en ADS-CC para las diferentes especies de *Candida*.

Especie	Número	AM-H	APZ	ADS-CC
<i>C. albicans</i>	37/37	Tubo germinativo	Clamidoconidios	Resistente
<i>C. tropicalis</i>	11/12	Pseudohifas y blastoconidios	Pseudohifas.	Sensible
<i>C. glabrata</i> (<i>N. glabratus</i>)	11/11	Blastoconidios pequeños	Blastoconidios pequeños	Sensible
<i>C. parapsilosis</i>	3/3	Blastoconidios	Pseudohifas	Sensible
<i>C. krusei</i> (<i>P. kudriavzevii</i>)	2/2	Blastoconidios rectangulares, ovoides e hifas largas	Hifas rectangulares y blastoconidios rectangulares	Sensible

AM-H: agar Mueller-Hinton; APZ: agar papa zanahoria; ADS-CC agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida y cloranfenicol.

Con los resultados fenotípicos y la asimilación de diferentes sustratos se determinó la especie de *Candida*, las cuales se muestran en la Figura 33. La especie más aislada fue *C. albicans* seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* en orden decreciente. Tres aislados mostraron morfotipos atípicos que correspondieron a *C. tropicalis*.

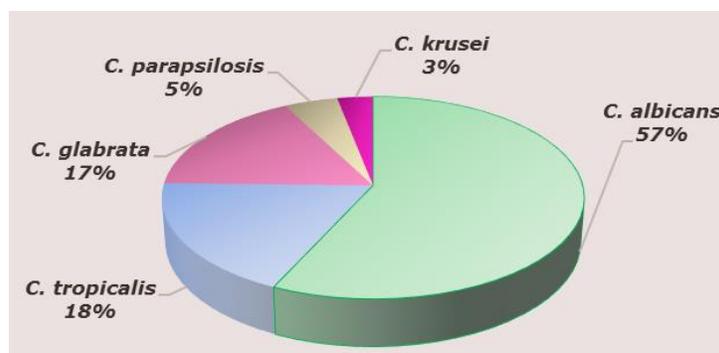


Figura 33. Porcentaje de especies de *Candida* aisladas.

En el cuadro 16 se presentan las asociaciones de dos o tres especies de *Candida*, correspondientes a los tres años de estudio. Catorce aislados combinados correspondientes al 24% de las muestras procesadas, siendo *C. albicans* con *C. glabrata* (*N. glabratus*) la asociación más frecuente.

Cuadro 16. Combinaciones de especies de *Candida* obtenidas en las muestras de líquido de aspirado traqueal.

Especies	Número de muestras
<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i> .	2
<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i> .	5
<i>C. tropicalis</i> y <i>C. glabrata</i> .	2
<i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> .	1
<i>C. tropicalis</i> y <i>C. krusei</i> .	1
<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i> .	1
<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> y <i>C. tropicalis</i> .	2

Los colores de los aislados en CH y CHp (Figuras 34-38) fueron leídos y comparados con la plantilla de colores Pantone, en el cuadro 17 se describen las características morfológicas de las colonias, la tonalidad del color y el tamaño de la colonia.

Cuadro 17. Especies de *Candida* y su morfología, color y tamaño de la colonia en CH y CHp.

Especie	Morfología de la colonia	Color en CH y CHp	Tamaño en CH	Tamaño en CHp
<i>C. albicans</i>	Circular, lisa, cremosa y brillante. Margen definido.	Verde	0.6 y 0.7 cm	1.1 a 1.5 cm
<i>C. tropicalis</i> ¹	Circular, rugosa, cremosa y brillante. Margen ondulado	Azul oscuro, en los dos; el margen de la colonia más claro que el centro en CH y en CHp se observó un halo púrpura que difundía al medio	0.7 cm	1.1 - 1.4 por 1.4 - 2 cm.
<i>C. glabrata</i> (<i>N. glabratus</i>)	Circular. lisa, cremosa y brillante. Margen definido.	Rosa fuerte - púrpura	0.6 y 0.7 cm	1.2 - 1.6 por 1.6 - 1.8 cm
<i>C. parapsilosis</i>	Circular, lisa, cremosa y brillante Margen ondulado.	En CH de rosa pálido-beige. En CHp presentaron un halo azul que difundía al medio	0.6 - 0.7 cm	1.1 - 1.6 por 1.6 cm
<i>C. krusei</i> ² (<i>P. kudriavzevii</i>)	Circular, plana y seca. Margen ondulado.	Rosa claro - lila, margen más claro. CHp crecimiento en círculos concéntricos.	1.1 - 1.3 cm	2.8 por 2.9 - 3 cm

¹*C. tropicalis* a las 48 h presentaba tonalidad verde fuerte y en el margen se llegaba a observar una coloración azul por lo que para tomar la lectura del color se dejó incubando hasta las 72 h.

²*C. krusei* las colonias de esta especie crecieron más grande en ambos medios en comparación con las otras especies (Figura 38).



Figura 34. Colonias de *C. albicans* en CH (izquierda) y CHp (derecha). La lectura con Pantone identificó ambos colores con el código 17-5641 TCX que corresponde al color Esmeralda.

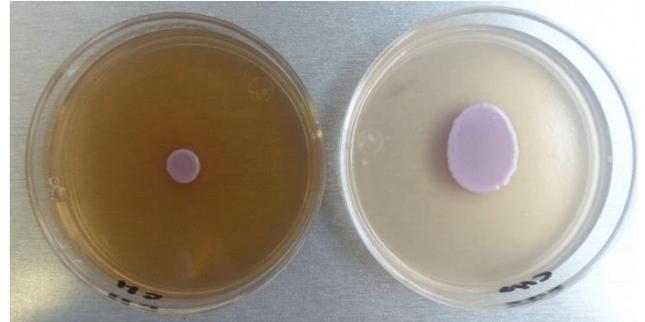


Figura 36. Colonias de *C. glabrata* en CH (izquierda) y CHp (derecha). La lectura con Pantone identificó el código 9340 C en CH y 13-1805 TSX Gecko rosa en CHp.



Figura 35. Colonias de *C. tropicalis* en CH (izquierda) y CHp (derecha). La lectura con Pantone identificó el código 15-3919 TCX Serenidad en CH y 15-4020 TCX Azul claro en CHp.

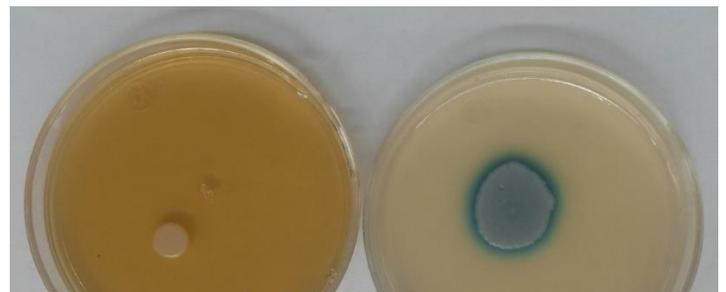


Figura 37. Colonias de *C. parapsilosis* en CH (izquierda) y CHp (derecha). La lectura con Pantone identificó el código 20-0025 TCM Beige pulido en CH y 20-0016 TPM Lustre gris en CHp.



Figura 38. Colonias de *C. krusei* en CH (izquierda) y CHp (derecha). La lectura con Pantone identificó el código 13-1106 TCX Dólar de arena en CH y Red 0331 C en CHp.

En la Figura 39 se muestra la diversidad de tonalidad de colores en ambos medios cromógenos observados en los aislados de *C. albicans*, donde predominó el código 17-5641 TCX (57% en CH y 59% en CHp) que correspondió a Esmeralda.

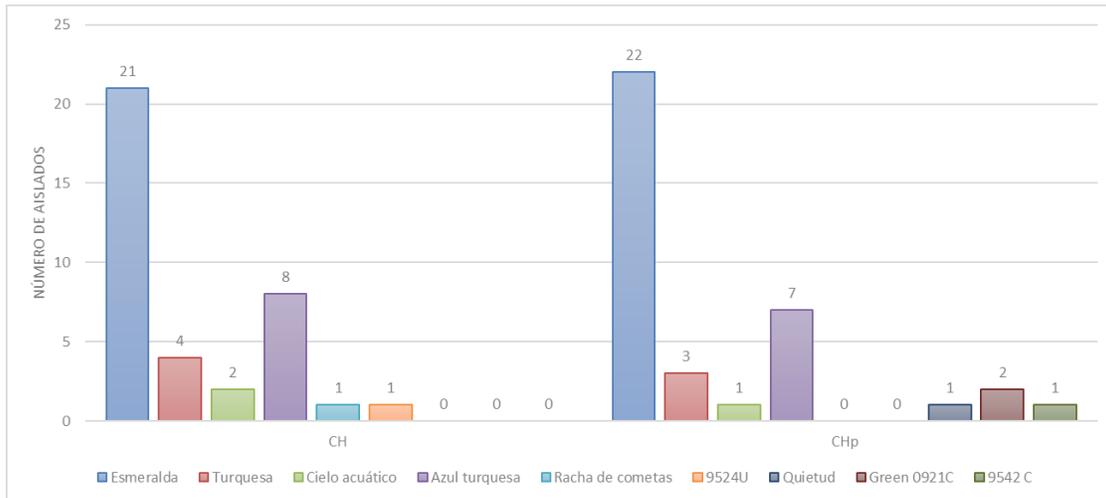


Figura 39. Colores obtenidos con la plantilla Pantone para *C. albicans*.

Para los aislados de *C. tropicalis*, las diferentes tonalidades obtenidas en ambos medios de cultivo predominó el código 7686 C (25%) en CH y el código 19-4052 TCX (33%) azul clásico en CHp. (Figura 40).

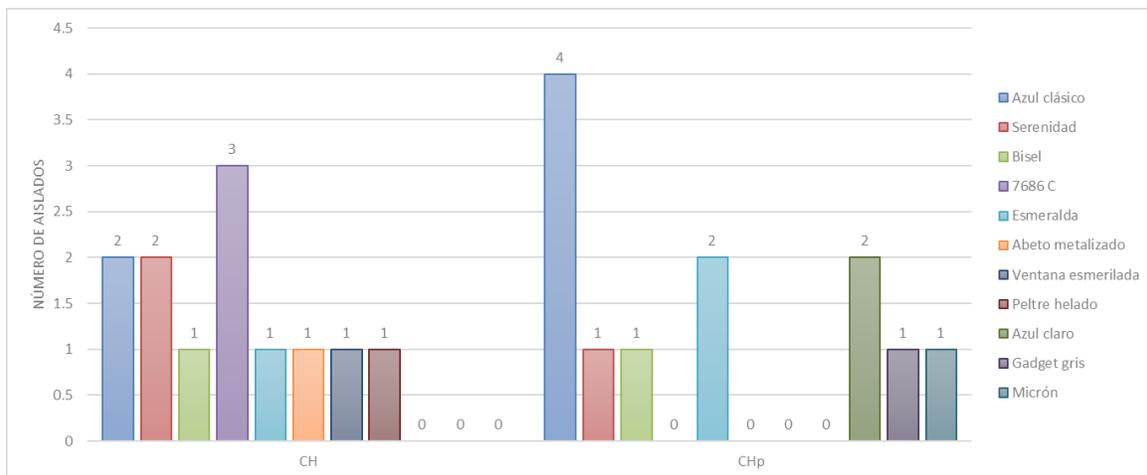


Figura 40. Colores obtenidos con la plantilla Pantone para *C. tropicalis*.

Las tonalidades del color que mostraron los aislados de *C. glabrata* (*N. glabratus*) en CH, predominó el código 2Y01 SP (27%) en CH y el código 13-1805 TSX (27%) que correspondió a Geco Rosa para CHp. (Figura 41).

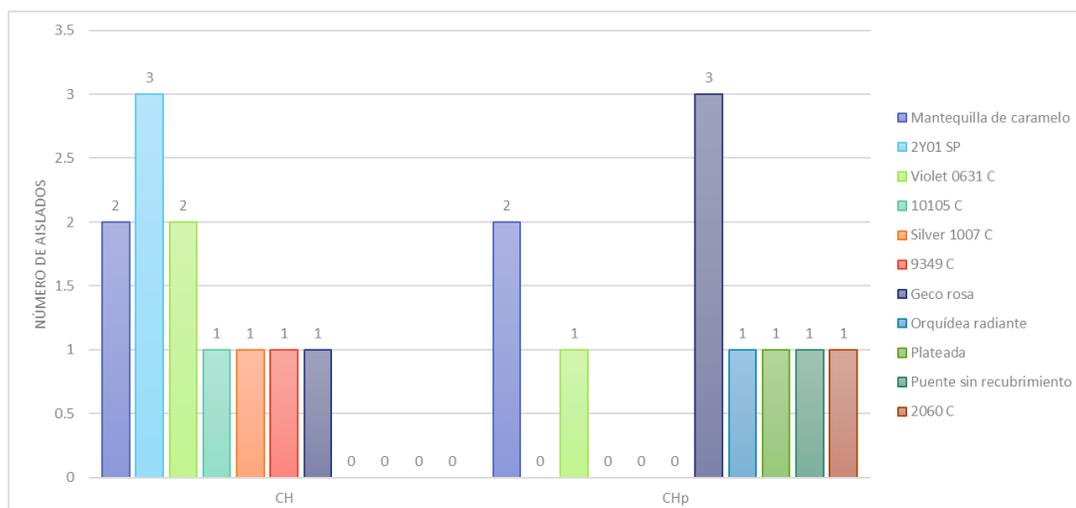


Figura 41. Colores obtenidos con la plantilla Pantone para *C. glabrata* (*N. glabratus*).

En la Figura 42 se presenta los colores observados en los aislados de *C. parapsilosis*, donde se muestra que fueron diferentes colores para cada aislado en ambos medios.

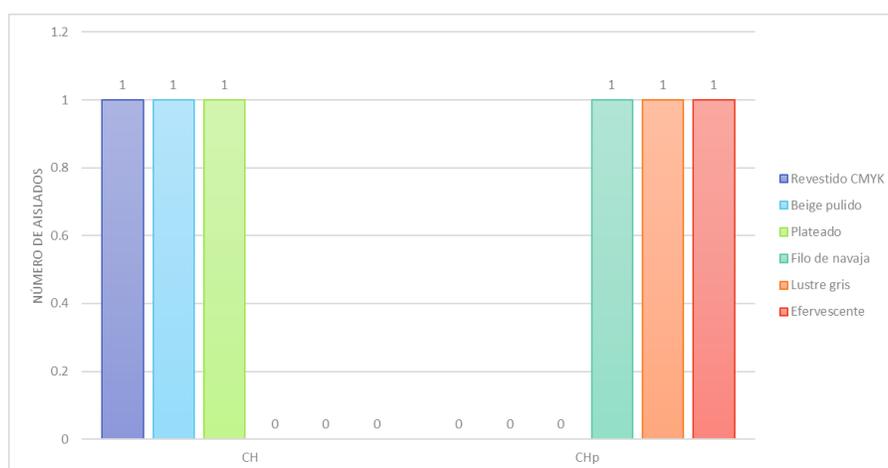


Figura 42. Variabilidad de tonalidad de colores obtenidos con la plantilla Pantone en *C. parapsilosis*.

En la Figura 43 se muestran los cuatro colores de los aislados de *C. krusei* (*P. kudriavzevii*), siendo todos diferentes en los dos medios cromógenos utilizados.

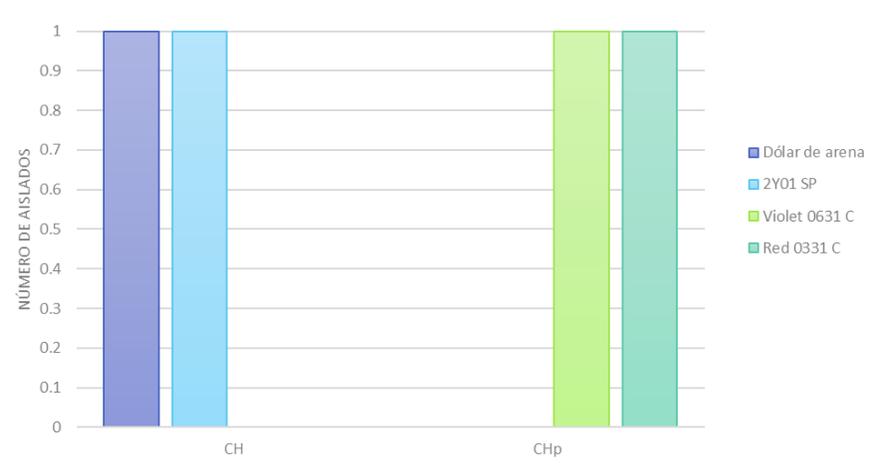


Figura 43. Tonalidades de los colores obtenidos en CH y CHp comparado con la plantilla Pantone para *C. krusei* (*P. kudriavzevii*).

De acuerdo con la especificidad y sensibilidad que se presentó con los dos medios cromógenos fue evidente que para la identificación de dos de las especies (*C. parapsilosis* y *C. krusei*) el porcentaje fue del 100%; en cambio en *C. albicans* se observó una mayor especificidad (100%) con CH y menor sensibilidad, en comparación con CHp que presentó menor especificidad y mayor sensibilidad. En *C. glabrata* se observó mejor especificidad (100%) y sensibilidad en CHp. (Cuadro 18).

Cuadro 18. Especificidad y sensibilidad de CH y CHp en la identificación presuntiva de *Candida* spp.

Especie	CHROMagar Candida®		CHROMagar Candida plus®	
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
<i>C. albicans</i>	73.0	96.4	100	57.1
<i>C. tropicalis</i>	97.1	81.1	83.3	83.0
<i>C. glabrata</i>	81.8	96.3	90.9	100
<i>C. parapsilosis</i>	100	100	100	100
<i>C. krusei</i>	100	100	100	100

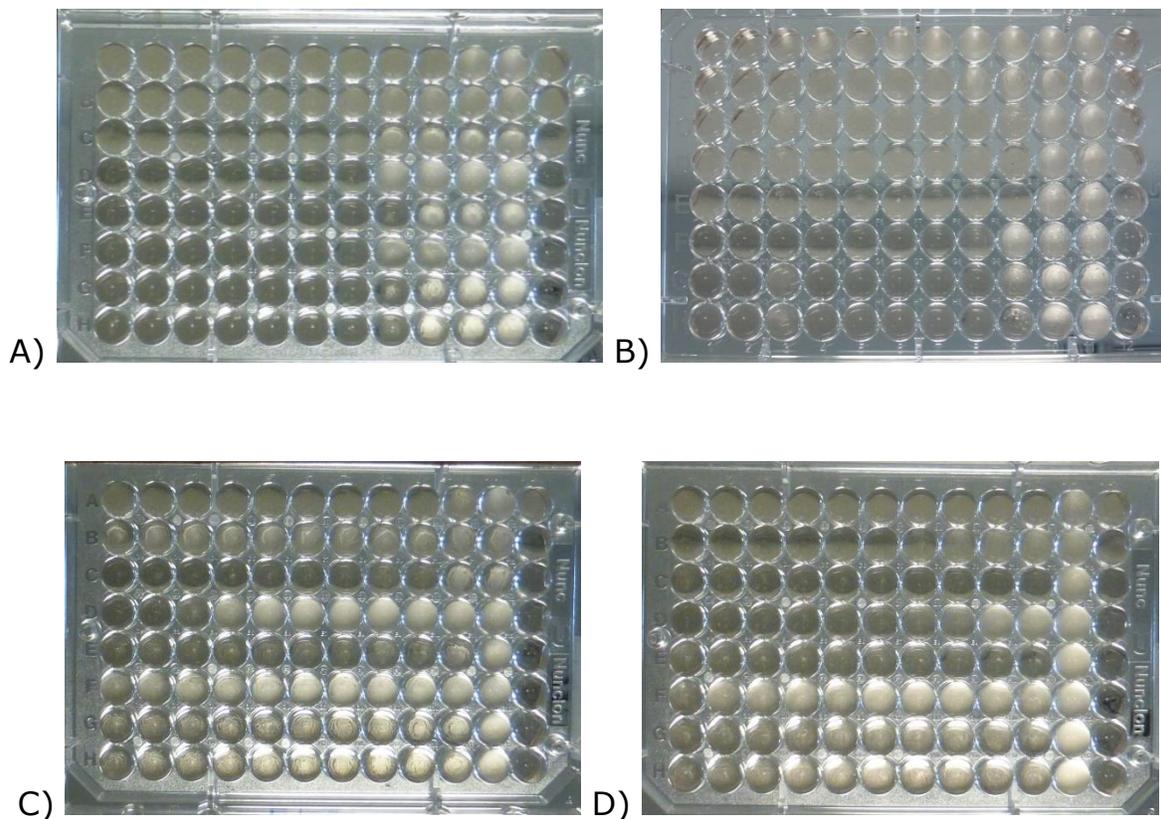
El análisis de los resultados de la CMI obtenidas con los diferentes antifúngicos frente a los aislados estudiados mostró que la mayoría fueron sensibles a los diferentes antifúngicos. En general, el porcentaje de sensibilidad en cada antifúngico independientemente de la especie de *Candida* fue el siguiente: el 87.7% frente a PSZ y VRZ; 86.2% a ISA; 83.1% a FLZ; 73.8% a ITZ y el 100% de los aislados a AMB y CSF.

En el cuadro 19 se muestran los aislados que presentaron resistencia a uno o más antifúngicos. En el caso particular de ISA, la CMI ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ obtenida sobre los aislados de *Candida* spp. se catalogaron como resistentes. De los 65 aislados incluidos en el estudio, 21 (32.3%) fueron resistentes a algún antifúngico y 10 (15.4%) de éstos mostraron multiresistencia a 2 o más antifúngicos. La especie con mayor número de aislados multiresistentes fue *C. tropicalis*, seguida de manera descendente *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei*. De los 22 aislados de *Candida* resistentes 16 de ellos estuvieron en asociación, principalmente *C. albicans* y *C. glabrata* (5), *C. tropicalis* y *C. glabrata* (3) y la asociación de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (3).

Cuadro 19. Resistencia mostrada en *Candida* spp. frente a los diferentes antifúngicos.

Especie	Antifúngico				
	FLZ	PSZ	VRZ	ISA	ITZ
<i>C. albicans</i> (1/3)	R	-	R	-	-
<i>C. albicans</i> (1/3)	R	R	R	R	R
<i>C. albicans</i> (1/3)	R	-	R	-	R
<i>C. tropicalis</i> (2/7)	R	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> (1/7)	-	-	R	R	R
<i>C. tropicalis</i> (4/7)	R	R	R	R	R
<i>C. glabrata</i> (7/10)	R	-	-	-	R
<i>C. glabrata</i> (1/10)	R	R	-	R	-
<i>C. glabrata</i> (1/10)	R	-	-	R	R
<i>C. glabrata</i> (1/10)	R	R	-	-	R
<i>C. krusei</i> (1/1)	R	R	-	R	R
<i>C. parapsilosis</i> (1/1)	R	-	-	-	-

De los resultados de CMI, en los 37 aislados de *C. albicans* se demostró que el 91.9% de ellos fueron sensibles a los diferentes antifúngicos. Solo un aislado presentó una CMI de 0.25 µg/mL, el cual se clasificó como SD-D frente a VRZ. En *C. tropicalis* solo el 41.7% fue sensible a todos los antifúngicos. Aunque fue un resultado esperado en los diez de los 11 aislados de *C. glabrata*, la CMI se clasificó como SD-D frente a FLZ. Tomando en cuenta que *C. krusei* presenta resistencia innata frente a FLZ, el valor de CMI fue de 32 µg/mL frente a este fármaco. En la Figura 44 se representa un ejemplo del crecimiento de los diferentes aislados problema en las placas de microdilución en caldo frente a los diferentes antifúngicos analizados.



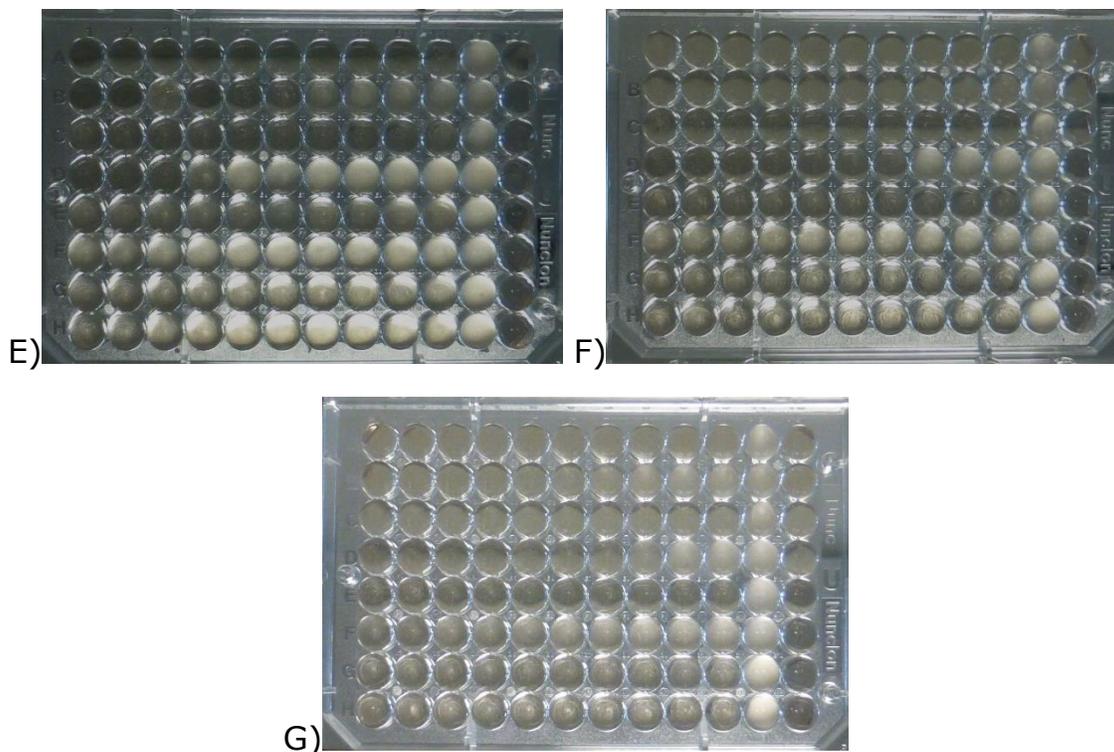


Figura 44 A) Placa de microdilución en caldo para valorar la CMI en los aislados problema frente a AMB. En general, la CMI en los seis aislados problema (fila C-H) fue de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B) Placa de microdilución en caldo para CSF. La CMI del aislado de la fila F fue de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los de las filas C, D, G y H de 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$. C) Placa de microdilución en caldo de FLZ. En la fila D se observa CMI de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en la fila F de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. D) Placa de microdilución en caldo de ISA. En la fila F se tiene una CMI de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en las filas C, E, G y H se observan CMI de 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$. E) Placa de microdilución en caldo de ITZ. La CMI en la fila D corresponde a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en las filas F y H la CMI es de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en la fila G de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. F) Placa de microdilución en caldo de PSZ. En la fila F se observa una CMI mayor a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. G) Placa de microdilución en caldo de VRZ. En la fila F se observa CMI de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en las filas C, E, G y H tienen CMI de 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El fármaco A21 mostró buena actividad frente a los 65 aislados de *Candida* spp. (Figura 45), ya que los rangos de CMI estuvieron entre 0.25 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La CMI mostrada fue de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el 70.8 % de los

aislados. En la Figura 46 se representan los datos de DO obtenidos en la prueba de microdilución en caldo, en las cepas de referencia y en la Figura 47 un aislado representativo de cada especie de *Candida*. La CMI de 1 µg/mL estuvo presente en el 9.2% de los aislados y la de 2 µg/mL en el 3.1% de los aislados.



Figura 45. Actividad de A21 frente a diferentes especies de *Candida*. La CMI más alta (1 µg/mL) se observa en la fila B que corresponde a la cepa de referencia *C. krusei* 6258.

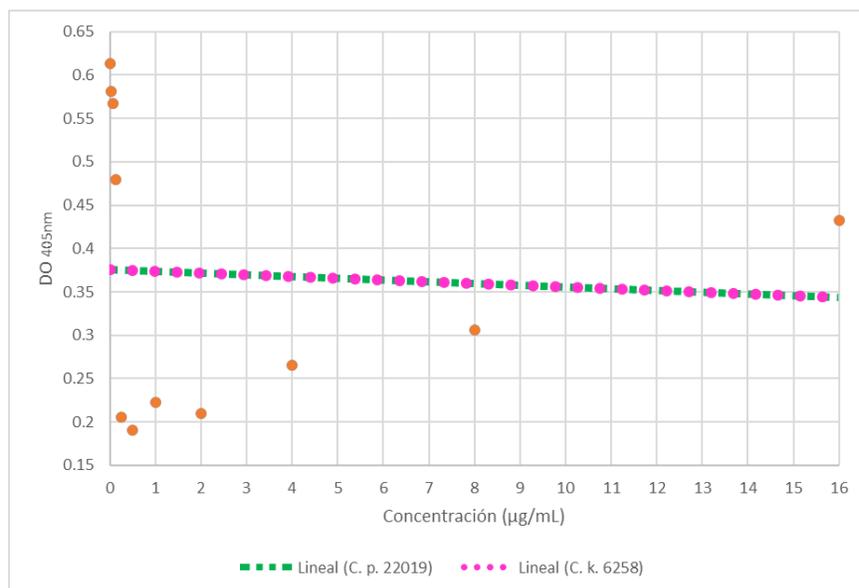


Figura 46. Actividad de A21 en las cepas de referencia. *C. parapsilosis* 22019 y *C. krusei* 6658.

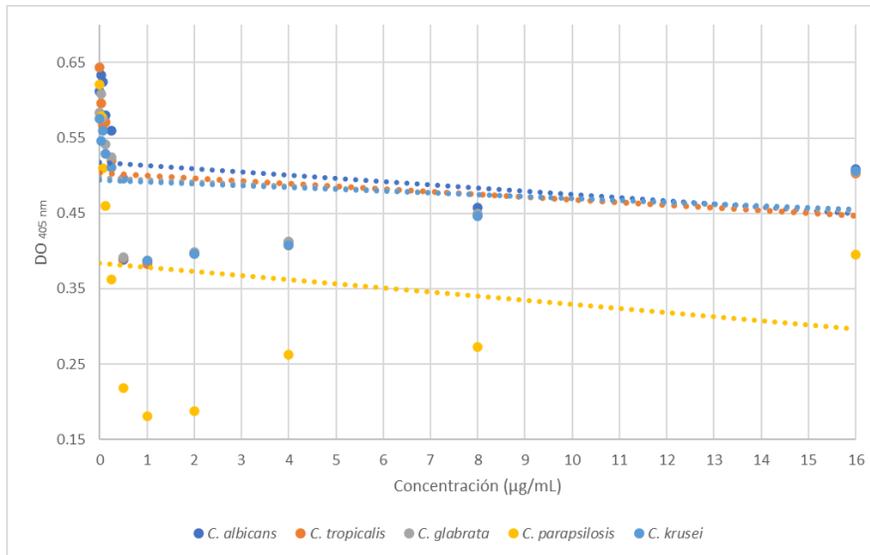


Figura 47. Actividad de A21 en aislados de especies de *Candida*.

Con el análisis estadístico por la prueba de U de Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95% se determinó que las CMI de AMB y de la molécula A21 no presentaron diferencia significativa con un valor de $Z=1.96$.

En general, las cinco moléculas derivadas de DIM probadas sobre los 65 aislados no mostraron ninguna actividad (Figura 48). Sin embargo, en tres (M-8, M-12 y M-13) se observó una actividad mínima, por lo que se repitieron los ensayos con concentraciones más altas, sin embargo, al determinar las UFC/mL no hubo diferencia en el crecimiento entre el pozo control de crecimiento respecto al crecimiento en los pozos donde se encontraba la mayor concentración de la molécula (Figura 49). Estos cambios observados se confirmaron con la lectura de la DO en el espectrofotómetro, donde al graficar la concentración (µg/mL) respecto a la absorbancia se observó una línea de tendencia en aumento.



Figura 48. Placa de microdilución en caldo con la molécula derivada de DIM denominada M-13. En todos los aislados se observa CMI mayor a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Figura 49. Unidades formadoras de colonias del pozo sin antifúngico (izquierda) y el pozo con la mayor concentración de antifúngico (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (derecha).

VI. DISCUSIÓN.

Las infecciones sistémicas por hongos del género *Candida* han aumentado en las últimas dos décadas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. Aunque las infecciones pulmonares son menos frecuentes y es difícil establecer el diagnóstico, aparentemente también han ido en aumento. Por otro lado, el papel que juega *Candida* spp. como colonizantes es importante, ya que puede ser el origen endógeno de la mayoría de las candidosis invasivas (CI), tomando en cuenta que la colonización es considerada un prerrequisito para el desarrollo de la infección^{45, 61}.

En la actualidad, ninguna prueba basada en cultivos o molecular de las muestras respiratorias pueden diferenciar entre comensalismo, colonización o infección por *Candida*, debido a que las especies de este género forman parte de la microbiota. Los únicos métodos considerados para confirmar el diagnóstico de infección de vías respiratorias son por la demostración de las estructuras parasitarias, ya sea pseudohifas, hifas o numerosos blastoconidios junto con células inflamatorias en el fragmento de tejido pulmonar obtenido por biopsia; el problema es que en pacientes en estado crítico no es un procedimiento factible. En el presente estudio se utilizó el LAT como método para el aislamiento de levaduras, aunque es una técnica que presenta dificultad para el acceso a la vía respiratoria baja y la interpretación del aislado. Por lo tanto, los parámetros para considerar una colonización o infección fueron basados en la descripción de algunos autores que fue de 10^6 UFC/mL^{49, 63}.

Diversos autores han descrito el aumento en la colonización en vías respiratorias que está relacionada a los días de hospitalización de los pacientes. Logan, *et al.* demostraron que la proporción de pacientes de UCI colonizados por *Candida* aumenta con el tiempo (50-80%), solamente el 5-30% puede desarrollar CI⁴⁵. En el presente estudio el

rango de días de hospitalización fue de 5 a 62 días, con el porcentaje más alto de 28.6% entre 10 y 20 días, los pacientes a los que se les aisló *C. parapsilosis* presentaron 31 y 62 días de estancia. Por otro lado, en los resultados de este trabajo se muestra una disminución en el número de pacientes del año 2019 a 2021 y un aumento del año 2021 al 2022. La disminución entre el año 2019 y 2021 podría deberse a la pandemia por Covid-19 que obligo a los hospitales a tener un cambio en el manejo de los especímenes de vías respiratorias, debido al virus SARS-CoV-2. Además, se observó un aumento en la asociación de especies de *Candida*. Por otra parte, el aumento en la incidencia de infecciones por *Candida* se atribuye al incremento en la población con factores de riesgo^{47, 49, 76}, dato que coincide con este estudio que presentaron más de cuatro factores de riesgo.

La colonización del tracto respiratorio por especies de *Candida* es común en pacientes que reciben ventilación mecánica por períodos de más de dos días⁷⁷, como se demostró en este estudio donde el 51.8% recibía ventilación mecánica, siendo este uno de los principales factores de riesgo.

El aumento en el número de trasplantes de órganos y de individuos inmunocomprometidos, así como el uso de dispositivos invasivos (catéteres, articulaciones artificiales y válvulas, administración de antibióticos de amplio espectro) son factores que contribuyen a una mayor susceptibilidad del paciente a las infecciones nosocomiales⁴⁹, además facilitan la entrada de las diferentes especies de *Candida* en la circulación sanguínea y por ende la diseminación a diferentes órganos⁶¹. En los pacientes que forman parte de este estudio la mayoría (78.6%) se encontraban hospitalizados en los servicios de UCI, MI y cirugía, con más de cuatro factores o comorbilidades, entre las que destacaron la administración de antibióticos (64.3%), intubación y ventilación

mecánica (51.98%), el uso de diferentes catéteres (51.8%), posiblemente estos fueron los factores que contribuyeron en la proliferación y colonización de *Candida* en el área pulmonar de estos pacientes.

Es importante tomar en cuenta que estas especies tienen la capacidad de crecer en los diferentes dispositivos como el CVC. Las especies que crecen comúnmente en estos dispositivos es *C. parapsilosis*, la tasa de mortalidad ha sido del 20% en CI. Su origen exógeno ha permitido que se puedan indicar medidas preventivas eficaces, como el lavado correcto de las manos, la manipulación adecuada de los catéteres y el cumplimiento estricto de los protocolos de control de las infecciones, aunque en este estudio se aislaron en tres de las muestras de pacientes que tuvieron la relación con la aplicación de catéteres, además de que los tres pacientes padecían hipertensión.

Algunos autores consideran que la incidencia de neumonía por *Candida* es baja y oscila entre el 0.23% y el 0.4%, se atribuye a la diseminación hematológica o a la aspiración de contenido orofaríngeo o gástrico colonizado por *Candida*. En los pacientes de este estudio se diagnosticó neumonía (33.9%) sin atribuirla a *Candida*, en tres de ellos, se les administró FLZ, uno de estos pacientes presentó una asociación de *C. glabrata* con CMI de 16 µg/mL para FLZ y *C. tropicalis* con CMI >64 µg/mL, lo que nos sugiere que el uso de FLZ aumenta la aparición de especies distintas de *C. albicans* y que además presentan resistencias posiblemente por el uso previo de este antifúngico. Otro hallazgo observado en estos pacientes fue la mortalidad del 37.5%. Los datos de mortalidad que se obtuvieron en el estudio correspondieron a pacientes que presentaban diferentes enfermedades, sin embargo, la colonización por especies de *Candida* quizá contribuyó indirectamente a la enfermedad respiratoria, ya que se ha demostrado que la colonización

por *Candida* en el tracto respiratorio se asocia con una mayor duración de la ventilación mecánica y la prolongación de la estancia hospitalaria en la UCI, además, de que se ha reportado una asociación entre la colonización por *Candida* del tracto respiratorio y la neumonía asociada al ventilador debido a *Pseudomonas aeruginosa*^{49, 63}.

Candida albicans es el agente etiológico más comúnmente aislado^{47, 76}, en este estudio se aisló *C. albicans* en el 60%. Por otro lado, se ha descrito el aumento en la incidencia de otras especies diferentes de *C. albicans* como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. krusei*^{47, 76}; en este estudio las especies diferentes a *C. albicans* representaron el 40% de los aislados, especialmente por *C. tropicalis* y *C. glabrata*. La prevalencia de especies distintas de *C. albicans* se atribuye al uso de fluconazol, ya que la exposición previa a este azol aumenta el riesgo de *Candida* resistente, otros factores que se atribuyen son el uso de CVC, cirugía gastrointestinal reciente, edad avanzada, terapia con glucocorticoides, candiduria, diabetes, factores similares al grupo de pacientes de este estudio.

La edad es un factor que debe tomarse en cuenta, ya que los pacientes ancianos tienen múltiples comorbilidades y una mayor predisposición general a las infecciones por agentes oportunistas²⁰. Los resultados de este estudio mostraron un mayor número de pacientes entre 61-70 años con un promedio de edad 65.5 años y que presentaban diferentes padecimientos que comprometieron su respuesta inmune. Las infecciones pulmonares afectan por igual a hombres y mujeres, en este estudio hubo un ligero predominio en mujeres sin diferencia significativa. Por su parte *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* causan CI en pacientes de edad avanzada^{61, 62}, a pesar de que los pacientes de este trabajo eran adultos no se pudo corroborar la presentación de CI.

La inmunidad innata y la adquirida son esenciales para una defensa contra las infecciones fúngicas. Las altas tasas de mortalidad por CI se deben en parte a la incapacidad del paciente para montar una respuesta inmune exitosa contra los hongos invasores. Khoo, *et al.*, reportaron el efecto modulador de la 1,25-dihidroxitamina D₃ en la respuesta de las citocinas proinflamatorias, involucradas en el reconocimiento de *Candida*, estas citocinas se ven afectadas en la variación estacional, comprometiendo la respuesta inmune a través del año³⁸. Otro ejemplo del efecto de la variación estacional son las infecciones virales en invierno, principalmente en el tracto respiratorio superior que pueden llevar a infecciones sistémicas. Por su parte, las infecciones del tracto respiratorio inferior, como la neumonía muestran un patrón estacional similar que normalmente se presentan en ancianos²⁵. Los resultados obtenidos aquí muestran una frecuencia mayor en adultos y aunque de las muestras obtenidas a través de estos 3 años aparentemente no hubo un mes específico donde se recabaran un mayor número de muestras; sin embargo en el año 2022, el mayor número de muestras obtenidas fueron en los meses de febrero y marzo que aún son fríos; retomando el virus SARS-CoV-2 hay una posibilidad de que los datos representados en 2021 y 2022 sean menores debido a que, en los hospitales implementaron protocolos de atención, donde todos los pacientes con enfermedades respiratorias fueron atendidos en áreas específicas de los hospitales y en general se limitó la atención de los pacientes.

En los programas de vigilancia global han reportado que el FLZ ha mostrado una sensibilidad del 90.2% (1997-2007) frente a las especies de *Candida*⁷⁶. En este estudio el 85.3% de los aislados fueron sensibles a FLZ, ésta ligera disminución en la sensibilidad posiblemente explique el incremento en aislados resistentes, principalmente a los azoles. La resistencia a VRZ reportada es menor al 5%, en este estudio fue casi del

10% lo que confirmó el cambio que se ha observado en la última década.

La identificación de las especies es fundamental, así como la detección de asociaciones, ya que influirá en la indicación del tratamiento para las infecciones por estas especies. Los métodos de identificación fenotípica son procedimientos prácticos, aún utilizados en los laboratorios clínicos de microbiología, en este estudio la mayoría de los aislados fueron identificados por las pruebas fenotípicas, sin embargo, tres de ellos mostraron variabilidad morfológica que dificultó su identificación, los tres aislados correspondieron a *C. tropicalis*, dos de ellos presentaron variabilidad morfológica en CH, por la diferenciación en la tonalidad de colores: rosa y azul intenso, el último aislado presentó una morfología similar a la que se observó en las especies del género *Trichosporon*, es decir, colonias secas y de superficie rugosa, esta morfología se observó en ADS y ADS-CC, en los medios cromógenos CH y CHp en los cuales presentó una tonalidad azul fuerte, brillante. La variabilidad de tonalidad en los medios cromógenos se puede deber a la variación en la expresión de las enzimas que detectan los sustratos del medio, lo que provoca una variación de la tonalidad. En la literatura no se encontraron reportes de *C. tropicalis* con morfologías similares a las presentadas, aunque se sabe que microscópicamente los blastoconidios e hifas/pseudohifas de *C. tropicalis* son las que presentan mayor variación, tanto en forma como en tamaño, además de que esta especie es la principal en causar falsos positivos con *C. albicans*, debido a las estructuras que forma: a) pseudohifas y tubos germinativos semejantes a los de *C. albicans*; b) la variación en la morfología de las colonias; c) la alta tasa de resistencia a los diferentes antifúngicos; d) la multirresistencia que muestran los aislados y e) la frecuencia en el aislamiento de esta especie, junto con otras especies de *Candida*. Estos datos llevan a pensar que ante un

aislado de *C. tropicalis* se deberá tener precaución. Es fundamental identificarla e indicar un tratamiento dirigido, ya que se ha relacionado con una mayor mortalidad en comparación con otras especies, particularmente en pacientes neutropénicos y oncológicos⁵³.

Los medios cromógenos son de utilidad para la identificación presuntiva de especies de *Candida*, la descripción macroscópica de las colonias en estos medios junto con la observación microscópica con tinción de Gram para la descripción de los blastoconidios, hifas y/o pseudohifas son factores que pueden ayudar a una identificación más precisa de estas especies. Aunque estos medios presentan varias ventajas, una de las desventajas es la falta de un marcador cromogénico específico para *C. glabrata*, que es una de las especies no albicans aislada con mayor frecuencia de muestras clínicas, diferentes autores han reportado que sí se puede diferenciar *C. glabrata* de otras especies⁶⁶. En este estudio, los aislados de *C. glabrata* mostraron una tonalidad que sí las puede diferenciar de las otras especies²⁹.

Los reportes de diversos hospitales del mundo informan de la asociación entre diferentes especies de *Candida*, siendo la más frecuente entre *C. albicans* y *C. glabrata*, los datos obtenidos en el presente estudio mostraron la alta frecuencia de esta asociación, y menos común otras asociaciones como *C. albicans* y *C. tropicalis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, así como la asociación de las tres especies. Aunque no se conocen los motivos de estas asociaciones, se han planteado varias teorías: a) la dureza que adquieren las biopelículas al tener dos o más especies de *Candida*; b) *C. glabrata* al no formar hifas, utiliza las formadas por *C. albicans* para poder colonizar los tejidos humanos^{12, 60}, posiblemente también explicaría la asociación de *C. glabrata* con *C. tropicalis*. El 24% de las muestras procesadas estaban asociadas con dos o más especies de *Candida* y el uso de CH fue el que permitió observar estas

asociaciones, cuando los aislados no eran separados y se procesaban en el Vitek 2®, el sistema identificó una sola especie y no coincidió con ninguna de las especies presentes, por lo que los medios cromógenos siguen siendo de gran ayuda en los laboratorios clínicos de microbiología a pesar de la incorporación de sistemas automatizados como el Vitek 2®²⁹.

Con la descripción de *Candida auris* en 2009 como una nueva especie del complejo de *C. haemulonii*, llevo al desarrollo de nuevos medios de cultivo como CHp, con la finalidad de tener una herramienta útil para la identificación presuntiva y oportuna, debido a la multirresistencia que han descrito diversos autores⁵². Aunque en este estudio no se aisló *C. auris*. El medio CHp permitió la comparación del crecimiento y color en los aislados de este estudio. Sí se observó una diferencia en la tonalidad que presentaban las colonias de la misma especie en CH y CHp. La especificidad y sensibilidad para *C. krusei* y *C. parapsilosis* fue del 100% en ambos, sin embargo, se debe considerar que los aislados de estas especies fueron muy pocos por lo que no se trata de una muestra representativa, es importante destacar que las colonias de *C. parapsilosis* difunden un halo color azul en el medio CHp, que en personal con poca experiencia les podría causar incertidumbre con las colonias de *C. auris* que también difunden un halo azul en el medio. En los aislado de *C. albicans* los datos de sensibilidad fueron mejores en CHp y los de especificidad en CH; en *C. glabrata* la mejor sensibilidad y especificidad se observó en CHp; para *C. tropicalis* la mayor sensibilidad fue en CH y la especificidad en CHp, aunque los datos variaron para cada especie, ambos medios podrían ser de utilidad, ya que ambos cumplen con la función de dar una identificación presuntiva de las especies más comunes de *Candida*.

Los medios cromógenos probados en este estudio son distribuidos por el mismo fabricante y aunque no especifican la diferencia en los sustratos que contienen cada uno, mencionan una mezcla cromogénica que difiere en CHp para poder identificar a *C. auris*. Sin embargo, las colonias presentaron un mayor tamaño en CHp lo que sugiere que un componente de la mezcla cromogénica influye en el crecimiento de las colonias que también ha sido reportado por otros autores⁵². El aumento en el tamaño de las colonias abre la posibilidad de la identificación presuntiva de estas especies en menor tiempo, solo se tendría que corroborar la presencia del pigmento, ya que en ocasiones requiere más tiempo de incubación, como se observó para *C. tropicalis* en CH.

A pesar de que, con la plantilla de Pantone se detectaron diferentes códigos para las especies de *Candida*, en *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* las tonalidades de los códigos correspondieron al color general reportado por el fabricante, mientras que en *C. parapsilosis* y *C. glabrata* las tonalidades variaron de rosa claro a lila, con la peculiaridad del halo azul difundido al medio por *C. parapsilosis* en CHp, lo que sugiere una ventaja de CHp sobre CH que permitió diferenciar *C. parapsilosis* de otras especies con la misma tonalidad.

La epidemiología acerca de la resistencia a los antifúngicos por especies de *Candida* es variable, aunque se carece de información en los hospitales⁷⁶. Algunos reportes indican que la resistencia intrínseca de *C. krusei* a FLZ es del 78.3%, aunque en este estudio solo hubo dos aislados de *C. krusei* con CMI de 32 µg/mL para ambos aislados. El CLSI no establece puntos de corte para esta especie debido a que su resistencia es intrínseca. En cambio, *Candida glabrata* tiene una tasa de resistencia global del 15.7%, en este estudio solo un aislado no mostró resistencia, en los demás los valores de CMI se clasificaron como SD-D para FLZ. La resistencia primaria a FLZ es rara para *C. albicans* (1.4%),

C. parapsilosis (3.6%) y *C. tropicalis* (4.1%)^{76, 9}, la mitad de los aislados de *C. tropicalis* de este estudio presentaron resistencia a FLZ y uno más se clasificó como SD-D, por lo que los datos de resistencia no coinciden con los reportes de algunos autores^{76,9}.

Las publicaciones descritas sobre la resistencia de las levaduras a las equinocandinas son eventos poco comunes, con tasas que oscilan entre 0% y 1.7%, datos que concuerdan con este estudio, en el que todos los aislados fueron sensibles a CSF. Estos resultados confirman que las equinocandinas podrían considerarse como los fármacos de primera línea para las CI, sobre todo en pacientes con exposición previa a azoles. De las especies que han mostrado resistencia a las equinocandinas (CSF) ha sido *C. glabrata*, principalmente cuando hay uso prolongado de estos antifúngicos; a diferencia, en los aislados de *C. albicans* la resistencia es menos frecuente sobre todo en pacientes con deficiente control de la fuente de infección^{76, 9}. Este hecho hace pensar en la importancia de conocer el estado en el que se encuentran las levaduras, es decir si son comensales o causantes de infección.

En general, la resistencia que se ha reportado en los aislados frente a AMB ha sido poco común⁹, en este estudio todos los aislados mostraron sensibilidad frente a este antifúngico.

La resistencia antifúngica es una preocupación importante, sobre todo las resistencias cruzadas que se han reportado, principalmente a los azoles sobre *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*⁷⁶. En este trabajo se presentó resistencia cruzada en estas especies, a excepción de *C. parapsilosis*, además un aislado de *C. krusei* mostró resistencia a tres azoles y SD-D a los otros dos, hecho que debe tomarse en cuenta al indicar la terapia antifúngica. La presencia de aislados que muestran resistencia cruzada en las diferentes especies

destaca la importancia de realizar pruebas de sensibilidad antifúngica y contar con la opción de nuevas terapias seguras.

De las indicaciones de AMB ha sido en los pacientes que han presentado infecciones por especies de *Candida* que han mostrado resistencia cruzada a azoles y con valores altos de CMI para las equinocandinas, donde la tasa de fracaso clínico aumenta. A pesar de que se han creado diferentes formulaciones de este fármaco, aún hay riesgo de toxicidad, este tipo de aislados ha llevado a la búsqueda de nuevos fármacos, aquí se determinó la actividad de la molécula denominado A21, que presenta analogías con anfotericina B, los resultados de la CMI para A21 no son mejores que los que se obtuvieron para AMB, sin embargo mostró muy buena actividad, además se debe tomar en cuenta que de acuerdo con los estudios reportados por Antillón *et al.*, esté molécula presenta un rango muy por debajo de toxicidad en comparación con los mostrados por AMB, otro hallazgo interesante es que mostró buena actividad frente a los aislados multirresistentes a los azoles; sólo el 12.3% presentó CMI de 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$, con lo que se demostró la buena actividad contra las diferentes especies de *Candida*^{8,9}.

A pesar de que las moléculas derivadas de DIM no mostraron actividad, es importante mencionar la preocupación de los investigadores por desarrollar la síntesis de nuevos fármacos antifúngicos, por el incremento en la frecuencia de las infecciones causadas por especies de *Candida*, así mismo la variación en la etiología de estas especies y la aparición de aislados multirresistentes donde la terapia se ve limitada debido al menor número de antifúngicos disponibles para el tratamiento sistémico en comparación con los antibióticos. Además, la búsqueda de moléculas similares donde solo haya sustituciones en algunos grupos abre aún más la posibilidad de encontrar moléculas activas contra estos

hongos, como fue el caso para A21 que ha mostrado buena actividad y toxicidad reducida.

VII. CONCLUSIONES.

La frecuencia de aislados de *Candida* en muestras de aspirado traqueal fue alta, los valores para establecer el papel que desempeñan como colonizantes o causantes de infección fue difícil de estimar, sin embargo, fue evidente que contribuyeron en la morbilidad de este grupo de pacientes, lo que se ve reflejado en la mayor estancia hospitalaria y por ende en el aumento de los costos hospitalarios.

La identificación utilizando medios cromógenos como CHROMagar Candida® o CHROMagar Candida Plus® son de gran importancia en los laboratorios de microbiología para la identificación de más de una especie de *Candida* o sus asociaciones.

El cambio observado en las especies de *Candida* y el aumento en las especies resistentes y multirresistentes, indican el valor de las pruebas de sensibilidad a antifúngicos, así como la creación de nuevas moléculas activas contra estos hongos para el control de las infecciones. La molécula A21 mostró buena actividad, incluso con aislados multirresistentes, abre un camino favorable para su uso sistémico, aunado aparentemente a la menor toxicidad que AMB.

VIII. ABREVIACIONES.

ADS: agar dextrosa Sabouraud.

ADS-CC: agar dextrosa Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloranfenicol.

AED: familia de genes "Endothelial adhesin."

Als: proteínas "Agglutinin Like Sequence."

AMB: anfotericina B.

AM-H: agar Mueller-Hinton.

APZ: agar papa zanahoria.

AS: agar sangre.

ATCC: "American Type Culture Collection."

BCIP: 5-bromo-6-cloro-3-indol fosfatasa p-toludina.

BDG: 1-3 β -D-glucano.

CH: CHROMagar Candida®.

CHp: CHROMagar Candida plus®.

CI: candidosis invasora.

CLSI: "Clinical and Laboratory Standards Institute."

CMI: concentración mínima inhibitoria.

CSF: caspofungina.

CVC: catéter venoso central.

DL₅₀: dosis letal 50.

DMSO: dimetil sulfoxido.

ELISA: "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay."

EPA: familia de genes "Epithelial adhesin."

EUCAST: "European Community Antifungal Susceptibility Testing."

FES: Facultad de Estudios Superiores.

FLZ: fluconazol.

I: intermedio.

ISA: isavuconazol.

ITS2: Espaciador transcrito 2.

ITZ: itraconazol.

LAT: líquido de aspirado traqueal.

LB: lavado bronquial.

LBA: lavado bronqueo alveolar.

LIP: lipasas.

MF: McFarland.

MI: medicina interna.

PA14: dominio PA14.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PGA-30: "predicted glycosilphosphatidylinositol-anchored protein 30".

PSZ: posaconazol.

PWP: familia de genes "PA14 domain containing Wall Protein."

R: resistente.

RPMI: "Roswell Park Memorial Institute."

S: sensible.

Saps: "Secreted aspartyl proteinases."

SD-D: sensible dosis-dependiente.

TUP1: Represor transcripcional negativo.

UCI: unidad de cuidados intensivos.

UFC: unidades formadoras de colonias.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

VRZ: voriconazol.

X-NAG: 5-bromo-4-cloro-3-indol N-acetil B-D-glucosamida.

IX. ANEXOS. MEDIOS Y TINCIONES.

Medios de cultivo.

Agar dextrosa Sabouraud.

Disolver 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, remojar de 10 a 15 minutos, mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 118-121°C durante 15 minutos.

Fórmula	Cantidad (g)
Dextrosa	40.0
Peptona de carne	5.0
Peptona de caseína	5.0
Agar	15.0

Agar Mueller-Hinton.

Añadir 38 g a 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Fórmula	Cantidad (g)
Ternera, infusión deshidratada	300.0
Hidrolizado de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0

Agar dextrosa Sabouraud cloranfenicol y cicloheximida.

Suspender 36 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente, hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Fórmula	Cantidad (g)
Harina de soya digerida por enzimas papaícas	10.0
Dextrosa	10.0
Cicloheximida	0.4
Cloranfenicol	0.05
Agar	15.5

Agar papa zanahoria.

Agregar en un vaso de precipitados 300 mL de agua destilada, la fécula de papa y la pulpa de zanahoria, calentar y agitar constantemente hasta ebullición, mantener por 10 minutos. Verter la mezcla en el embudo que contiene gasas, el filtrado es recibido en un matraz Erlenmeyer con el agar y se afora con agua destilada, agregar el Tween 80 y dejar en ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Fórmula	Cantidad (g)
Pulpa de zanahoria	10.0
Fécula de papa	10.0
Tween 80	10.0 (mL)
Agar	18.0

CHROMagar Candida®

Suspender 47.8 g de la base en polvo en 1 litro de agua destilada. Calentar hasta la ebullición, agitando constantemente sin sobrepasar los 100°C. Esterilizar por ebullición por tres minutos y vaciar en placas, almacenar en oscuridad a 4°C.

Fórmula	Cantidad (g)
Peptona	10.2
Cloranfenicol	0.5
Mezcla cromogénica	22.0
Agar	15.0

CHROMagar® Candida plus

Suspender 50.9 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición, agitando constantemente sin sobrepasar los 100°C. Dejar en ebullición por tres minutos y vaciar en placas, almacenar en oscuridad a 4°C.

Fórmula	Cantidad (g)
Peptona	11.0
Mezcla cromogénica y selectiva	24.9
Agar	15.0

Caldo RPMI.

Suspender 34.53 g de ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico (MOPS) en un vaso de precipitado con 500 mL de agua Milli Q y agitador magnético, disolver en su totalidad el polvo y ajustar a pH 6.9 – 7.1 con NaOH 1N. Adicionar 10.40 g del medio RPMI y disolver, ajustar pH 6.9 – 7.1 y aforar a 1000 mL. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

Solución Madre de los antifúngicos.

Pesar la cantidad de fármaco necesaria para obtener 100 veces la concentración más alta del antifúngico, los antifúngicos solubles en agua se disuelven en agua Milli Q y los antifúngicos no solubles en agua se disuelven en DMSO. Transferir todo el volumen en alícuotas de 500 μL a tubos Eppendorf y almacenar a -20°C .

Tinción de Gram.

Realizar un frotis en un portaobjetos y fijar al calor. Adicionar cristal violeta por un minuto, retirar y lavar con agua destilada. Agregar lugol, dejar actuar por un minuto, retirar y lavar con agua destilada. Decolorar con alcohol-acetona y lavar con agua destilada. Por último, adicionar safranina, dejar actuar por un minuto y lavar con agua destilada. Dejar secar la preparación y observar al microscopio.

X. REFERENCIAS.

1. Aguilar GC. Colonización por *Candida* en pacientes no neutropénicos en la unidad de cuidados intensivos. *Med Int Mex.* 2013; 29: 595-599.
2. Ahmed N, Mahmood MS, Ullah MA, Araf Y, Rahaman TI, Moin AT, Hosen MJ. COVID-19-associated candidiasis: possible pathomechanism, predisposing factors, and prevention strategies. *Curr Microbiol.* 2022; 79(5): 127. doi: 10.1007/s00284-022-02824-6.
3. Albaina O, Sahand IH, Brusca MI, Sullivan DJ, Fernandez de Larrinoa I, Moragues MD. Identification and characterization of nine atypical *Candida dubliniensis* clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2014; 64(Pt2): 147–156. doi:10.1099/jmm.0.078832-0.
4. Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone M del C, Guelfand L, Bianchi M. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. *Rev Iberoam Micol.* 2010; 27(2): 90-3. doi: 10.1016/j.riam.2010.01.008.
5. Allevato MA, Negroni R, Galimberti R. Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol.* 2007; 30: 8.
6. Alves R, Barata-Antunes C, Casal M, Brown AJP, Van Dijck P, Paiva S. Adapting to survive: How *Candida* overcomes host-imposed constraints during human colonization. *PLoS Pathog.* 2020; 16(5): e1008478. doi: 10.1371/journal.ppat.1008478.
7. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical mycology.* United States of America: Churchill Livingstone; 2003. p 290.
8. Antillón A, de Vries AH, Espinosa-Caballero M, Falcón-González JM, Flores Romero D, González-Damián J, Jiménez-Montejo FE, León-Buitimea A, López-Ortiz M, Magaña R, Marrink SJ, Morales-Nava R, Periole X, Reyes-Esparza J, Rodríguez Lozada J, Santiago-Angelino

- TM, Vargas González MC, Regla I, Carrillo-Tripp M, Fernández-Zertuche M, Rodríguez-Fragoso L, Ortega-Blake I. An amphotericin B derivative equally potent to amphotericin B and with increased safety. *PLoS One*. 2016; 11(9): e0162171. doi: 10.1371/journal.pone.0162171.
9. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*. 2017; 216(3): S445-S451. doi: 10.1093/infdis/jix131.
 10. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeast characteristics and identification. 3^a ed. UK: Cambridge; 2000.
 11. Begum N, Lee S, Portlock TJ, Pellon A, Nasab SDS, Nielsen J, Uhlen M, Moyes DL, Shoaie S. Integrative functional analysis uncovers metabolic differences between *Candida* species. *Commun Biol*. 2022; 5(1): 1013. doi: 10.1038/s42003-022-03955-z.
 12. Bekkal O, Boucherit-otmani Z, Boucherit K, Djediat C. Interaction in a dual-species biofilm of *Candida albicans* and *Candida glabrata* co-isolated from intravascular catheter. *Microbial Pathogenesis*. 2021; 152: 104613. doi:10.1016/j.micpath.2020.104613.
 13. Bilbao BN. Estado actual de las resistencias de *Candida* a las fármacos antifúngicos y estudio de los mecanismos implicados. 2018. Disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/30830/TFG_Bilbao_Bilbao_Rev.pdf
 14. Bohner F, Papp C, Gácsér A. The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. *FEMS Yeast Res*. 2022; 22(1): foac019. doi: 10.1093/femsyr/foac019.
 15. Bonifaz TJA. *Micología médica básica*. 5^a ed. México: McGraw-Hill; 2015.

16. Böttcher B, Pöllath C, Staib P, Hube B, Brunke S. *Candida* species rewired hyphae developmental programs for chlamydospore formation. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1697. doi: 10.3389/fmicb.2016.01697.
17. Brandt ME, Lockhart SR. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012; 6(3): 170-177. doi: 10.1007/s12281-012-0094-x.
18. Calderone RA, Cornelius JC. *Candida* and candidiasis. 2^a ed. USA: ASM Press; 2012.
19. Cercenado E, Cantón R. *Procedimientos en microbiología clínica.* SEIMC; 2003. Disponible en:
<https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
20. Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. *Microorganisms.* 2020; 8(6): 857. doi: 10.3390/microorganisms8060857.
21. Cleary IA, Reinhard SM, Lazzell AL, Monteagudo C, Thomas DP, Lopez-Ribot JL, Saville SP. Examination of the pathogenic potential of *Candida albicans* filamentous cells in an animal model of haematogenously disseminated candidiasis. *FEMS Yeast Res.* 2016; 16(2): fow011. doi: 10.1093/femsyr/fow011.
22. "Clinical and Laboratory Standards Institute". *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.* 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
23. Cortegiani A, Einav S. Being candid about *Candida* airway colonization and clinical outcomes: What can we really learn from unadjusted associations? *Am J Infect Control.* 2020; 48(5): 587-588. doi: 10.1016/j.ajic.2020.01.024.

24. Delisle MS, Williamson DR, Perreault MM, Albert M, Jiang X, Heyland DK. The clinical significance of *Candida* colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients. *J Crit Care*. 2008; 23(1): 11-7. doi: 10.1016/j.jcrc.2008.01.005.
25. Eccles R. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta oto-laryngologica*. 2002; 122(2): 183-191. doi: 10.1080/00016480252814207
26. Fotedar R, al-Hedaithy SS. Identification of chlamydospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar Candida medium. *Mycoses*. 2003; 46(3-4): 96-103. doi: 10.1046/j.1439-0507.2003.00867.x.
27. Fothergill AW, Rinaldi MG, Sutton DA. Antifungal susceptibility testing. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20(3): 699-709. doi: 10.1016/j.idc.2006.06.008.
28. Fraser RS, Colman N, Müller NL, Paré PD. Enfermedades infecciosas de los pulmones. *Fundamentos de las enfermedades del tórax*. 2006:222–336. Spanish. doi: 10.1016/B978-84-458-1603-5.50006-X.
29. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol*. 2001; 39(1): 9-33. doi: 10.1080/mmy.39.1.9.33.
30. Gassiot C, Pino AP, Rodriguez VC, Ramos GM, Páez PI, Gundían GJ. A propósito de las micosis pulmonares. *Acta médica*. 2000; 9(1-2): 59-66
31. Ghazi S, Rafei R, Osman M, El Safadi D, Mallat H, Papon N, Dabboussi F, Bouchara JP, Hamze M. The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. *J Mycol Med*. 2019; 29(3): 245-252. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.07.006.

32. González-Lara MF, Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020; 41(1): 3-12. doi: 10.1055/s-0040-1701215.
33. Gregorí BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*. 2005; 39(2): 1-1. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/237767583>
34. Hamdan SG. Caspofungin. *MEDICRIT*. 2007; 4(1): 25-35
35. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006; 5: 1. doi: 10.1186/1476-0711-5-1.
36. Huang D, Qi M, Hu Y, Yu M, Liang Z. The impact of *Candida* spp. airway colonization on clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control*. 2020; 48(6): 695-701. doi: 10.1016/j.ajic.2019.11.002.
37. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(10): 4796-8. doi: 10.1128/JCM.42.10.4796-4798.2004
38. Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, Kullberg BJ, Joosten I, van der Ven AJ, Netea MG. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates cytokine production induced by *Candida albicans*: impact of seasonal variation of immune responses. *J Infect Dis*. 2011; 203(1): 122-30. doi: 10.1093/infdis/jiq008.
39. Koundal S, Cojandaraj L. *Candida* species–morphology, medical aspects and pathogenic spectrum. *Eur J Mol Clin Med*. 2020; 7(7): 4015-4021

40. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; 50(4): 243-60. doi: 10.1053/jhin.2001.1151.
41. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeast: a taxonomic study.* 5ª ed. USA:Elsevier Science; 2011.
42. Laroumagne S, Lepage B, Hermant C, Plat G, Phelippeau M, Bigay-Game L, Lozano S, Guibert N, Segonds C, Mallard V, Augustin N, Didier A, Mazieres J. Bronchial colonisation in patients with lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J.* 2013; 42(1): 220-9. doi: 10.1183/09031936.00062212.
43. Linares SMJ, Solís FC. Identificación de levaduras. *Rev Iberoam Micol.* 2007. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
44. Lipperheide V, Bikandi J, García-Fernández JF, Quindós G, Pontón J. Colony variation in *Candida glabrata* isolates from patients with vaginitis. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19(3): 161-4.
45. Logan C, Martin-Loeches I, Bicanic T. Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions. *Intensive Care Med.* 2020; 46(11): 2001-2014. doi: 10.1007/s00134-020-06240-x.
46. Martínez-Matías N, Rodríguez-Medina JR. Fundamental concepts of azole compounds and triazole antifungals: a beginner's review. *P R Health Sci J.* 2018; 37(3): 135-142.
47. Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia.* 2014; 177(5-6): 223-40. doi: 10.1007/s11046-014-9749-1.
48. Medvedeff MG, Chade ME, Mereles BE, Vedoya MC. Identificación de hongos levaduriformes de interés médico. *Editorial Universitaria.* 2008; 1-76. Disponible en:

https://editorial.unam.edu.ar/images/documentos_digitales/e8_978-950-579-112-5.pdf

49. Meena DS, Kumar D. *Candida* pneumonia: an innocent bystander or a silent killer?. *Med Princ Pract*. 2022; 31(1): 98-102. doi: 10.1159/000520111.
50. Merz WG, Hay RJ. *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections: Medical mycology*. 10^a ed. London: Hodder Arnold; 2005. p 600.
51. Mojazi AH, Frandah W, Colmer-Hamood J, Raj R, Nugent K. Risk factors of *Candida* colonization in the oropharynx of patients admitted to an intensive care unit. *J Mycol Med*. 2012; 22(4): 301-7. doi: 10.1016/j.mycmed.2012.08.001.
52. Mulet BJ, Salvador GC, Tormo PN, Valentín MA, González PC, Colomina RJ, Pemán J, Gimeno CC. Novel chromogenic medium CHROMagar™ *Candida* Plus for detection of *Candida auris* and other *Candida* species from surveillance and environmental samples: a multicenter study. *J Fungi*. 2022; 8(3): 281. doi: 10.3390/jof8030281.
53. Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*. 2014; 20(4): 329-44. doi: 10.1111/odi.12123.
54. Nieto MC, Tellería O, Cisterna R. Sentinel surveillance of invasive candidiasis in Spain: epidemiology and antifungal susceptibility. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 81(1): 34-40. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.021.
55. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically

- important *Candida* species. J Clin Microbiol. 1994; 32(8): 1923-9. doi: 10.1128/jcm.32.8.1923-1929.1994.
56. Oiseth S, Jones L, Maza E. Polienos: mecanismo de acción. 2022. Disponible en: <https://cdn.lecturio.com/assets/Antifungal-agents-and-mechanisms-of-action.png>
57. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2021; 39(4): 192-200. doi: 10.1016/j.eimc.2020.02.027.
58. Palacio A, Villar J, Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(1): 2-7 doi: 10.1016/S1130-1406(09)70002-6.
59. Panizo MM, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2001; 21(2): 38-45. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es.
60. Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. J Appl Oral Sci. 2012; 20(1): 70-5. doi: 10.1590/s1678-77572012000100013.
61. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. Rev Iberoam Micol. 2016; 33(3): 133-139. doi: 10.1016/j.riam.2015.10.001.
62. Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(2): 90-8. doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.004.
63. Pendleton KM, Huffnagle GB, Dickson RP. The significance of *Candida* in the human respiratory tract: our evolving

- understanding. *Pathog Dis.* 2017; 75(3): ftx029. doi: 10.1093/femspd/ftx029.
64. Penieres-Carrillo JM, Ríos-Guerra H, Pérez-Flores J, Rodríguez-Molina B, Torres-Reyes Á, Barrera-Téllez F, González-Carrillo J, Moreno-Gonzalez L, Martinez-Saldivar A, Nolasco-Fidencio JJ, Matus-Meza AS, Luna-Mora RA. Reevaluating the synthesis of 2,5-disubstituted-1 H-benzimidazole derivatives by different green activation techniques and their biological activity as antifungal and antimicrobial inhibitor. *J Heterocycl Chem.* 2019; 57(1): 436–455. doi:10.1002/jhet.3801.
 65. Penieres-Carrillo JM, Ríos-Guerra H, Solano-Becerra JD, Pérez-Flores FJ, Barrera-Téllez FJ, Luna-Mora RA. Synthesis of turbomycin-based alkaloids through infrared light-induced multicomponent reactions and assessment of their cytotoxic and antifungal bioactivity. *Monatsh Chem.* 2021; 152: 1337-1346. <https://doi.org/10.1007/s00706-021-02855-y>
 66. Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol.* 2007; 103(6): 2046-55. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03442.x.
 67. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1): 133-63. doi: 10.1128/CMR.00029-06.
 68. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(1): 58-61. doi: 10.1128/jcm.34.1.58-61.1996.
 69. Pfaller MA, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH

- Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(4): 323-31. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.003.
70. Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol.* 2015; 91: 139-235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002.
71. Reyes-Montes MDR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 2017; 34(4): 203-210. doi: 10.1016/j.riam.2017.05.001.
72. Ricker A, Vickerman M, Dongari-Bagtzoglou A. *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase promotes biofilm interactions with *Candida albicans*. *J Oral Microbiol.* 2014; 6. doi: 10.3402/jom.v6.23419.
73. Rimek D, Fehse B, Göpel P. Evaluation of Mueller-Hinton-agar as a simple medium for the germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycosis.* 2007; 51(3): 205-208. doi:10.1111/j.1439-0507.2007.01469.x.
74. Rivas GA, Cardona-Castro N. Antimicóticos de uso sistémico: ¿con que opciones terapéuticas contamos? *Rev CES Med.* 2009; 23(1): 61-76. Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/1004>
75. Rivera-Toledo E, Jiménez-Delgadillo AU, Manzano-Gayosso P. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Rev. Fac. Med (Méx).* 2020; 63(2): 7-17. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422020000200007&lng=es
76. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015; 58(2): 2-13. doi: 10.1111/myc.12330.

77. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013; 62(Pt 1): 10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.
78. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36(2): 288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.
79. Takashima M, Sugita T. Taxonomy of pathogenic yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*. Med Mycol J. 2022; 63(4): 119-132. doi: 10.3314/mmj.22.004.
80. Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B, Edgerton M. *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal candidiasis. PLoS Pathog. 2016; 12(3): e1005522. doi: 10.1371/journal.ppat.1005522.
81. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 2007; 52(12): 1200-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.06.007.
82. Torres RJ. Hongos y patología respiratoria en nuestro medio. Archivos de bronconeumología. 1989; 25(1): 18-24. Disponible en:
<https://www.archbronconeumol.org/index.php?p=revista&tipo=pdf-simple&pii=S0300289615317798>
83. Vedoya MC. Producción de biopelícula y actividad *in vitro* de una solución saturada de sacarosa en levaduras del complejo *Candida parapsilosis* [Tesis de doctorado]. Argentina: Universidad Nacional

de Misiones; 2019. Recuperado a partir de:
<https://rid.unam.edu.ar/handle/20.500.12219/3124>

84. Villalobos-Vindas JM, Castro-Cordero JA, Avilés-Montoya A, Peláez-Gil MC, Somogyi-Pérez T, Sandoval-Carpio L. Epidemiología de la candidemia en el Hospital México. *Acta méd. Costarricense*. 2016; 58(1): 15-21. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022016000100015&lng=en.
85. Vizcaíno-Salazar GJ. Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina & Laboratorio*. 2017; 23: 365-386.
86. Whiteway M, Oberholzer U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7(4): 350-7. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.005.