



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

---

## **FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Levaduras Asociadas a Infecciones  
Nosocomiales y su Sensibilidad a los  
Azoles”**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**LISBET BERENICE GARCIA FLORES**

**DIRECTOR:**

**M. en E.Q. MACARIO MORALES RODRIGUEZ**



**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO AGOSTO DE 2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por todas sus bendiciones, a mis padres Timoteo García Jimenez y Vicenta Flores Flores por todo el apoyo moral y económico que me brindaron durante mis estudios y a mis hermanos Alan, Veronica y Araceli por su cariño y compañía.

También agradezco de manera muy atenta a:

Al profesor Macario Morales Rodríguez por haberme permitido formar parte del proyecto “Efecto de los derivados del triazol sobre levaduras patógenas” y por la beca concedida, por el tiempo dedicado durante la preparación y revisión de este trabajo.

Al profesor Sergio Humberto Pavón Romero por su paciencia, ayuda, asesoría y recomendación.

A todo el personal del laboratorio 9 de Microbiología que me ayudo y me facilito reactivos, medios de cultivo, material y su ayuda en determinadas ocasiones.

Al profesor Erick Cuevas Yañez por haberme permitido evaluar los derivados triazolicos sintetizados en el CCIQS.

A todas las personas que de alguna manera me apoyaron o colaboraron o hicieron parte de mi trabajo cuando yo no pude hacerlo.

Y finalmente a mis amigos por su lealtad y confianza.

## **Dedicatoria**

A mis padres:

Timoteo García Jimenez

Vicenta Flores Flores

A mis hermanos:

Araceli García

Veronica García

Alan García

# Índice

Resumen .....	6
Capítulo 1: Introducción .....	7
1.1 Infecciones Nosocomiales .....	7
1.1.1 Impacto de las Infecciones Nosocomiales. ....	7
1.1.2 Factores Influyentes en la Manifestación de las Infecciones Nosocomiales .....	9
1.1.3 Vigilancia Hospitalaria .....	10
1.1.4 Prevención y Control .....	10
Capítulo 2: Marco Teórico .....	12
2.1 Generalidades de los hongos .....	12
2.1.1 Infecciones por Hongos.....	13
2.1.2 Estructura .....	14
2.1.3 Nutrición y metabolismo.....	16
2.1.4 Reproducción .....	17
2.1.5 Clasificación de los Hongos .....	19
2.2 Micosis.....	20
2.2.1 Generalidades de las micosis .....	20
2.2.2 Clasificación de las micosis.....	21
2.2.3 Factores de patogenicidad .....	22
2.2.4 Formas de transmisión.....	23
2.2.5 Mecanismos de defensa del organismo contra los hongos .....	23
2.3 Candidiasis.....	24
2.3.1 Clasificación taxonómica de las Levaduras del genero <i>Candida</i> .....	25
2.3.2 Características generales de las levaduras del género <i>Candida</i> .....	26
2.3.3 Formas clínicas de la Candidiasis.....	26
2.3.5 Factores predisponentes.....	32
2.3.6 Mecanismos de infección relación huésped-parásito.....	33

2.3.7 Factores de virulencia .....	34
2.4 Diagnóstico.....	34
2.4.1 Toma de muestra .....	35
2.4.2 Identificación preliminar en el laboratorio .....	35
2.4.3 Cultivo.....	36
2.4.4 Pruebas adicionales en la identificación del laboratorio .....	39
2.4.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de las diferentes especies de levaduras. ....	41
2.4.6 Pruebas inmunológicas .....	42
2.4.7 Tratamiento.....	42
2.4.8 Antimicóticos y el Embarazo .....	43
2.5 Agentes antifúngicos .....	44
2.5.1 Mecanismos de acción de algunos antifúngicos de uso terapéutico.....	45
2.5.2 Clasificación de los fármacos antifúngicos.....	46
2.5.3 Polienos .....	47
2.5.4 Alilaminas .....	48
2.5.5 Equinocandinas .....	49
2.5.6 Fluoropirimidas .....	50
2.5.7 Azoles .....	51
2.5.8 Resistencia.....	56
2.6 Pruebas de sensibilidad a antifúngicos .....	58
2.6.1 Documento M44–A método de difusión en placa .....	60
2.6.2 Métodos comerciales .....	61
2.6.3 Pruebas de sensibilidad por dilución.....	63
2.6.4 Métodos de dilución en caldo para levaduras (M27-A3).....	63
2.6.5 Método de macrodilución.....	66
2.6.6 Consideraciones especiales.....	67
2.6.7 Puntos de corte para determinar sensibilidad en <i>Candida</i> .....	67
Capítulo 3: Parte Experimental.....	70
3.1 Hipótesis.....	70

3.2 Objetivo general.....	70
3.2.1 Objetivos específicos.....	70
3.3 Metodología .....	71
3.3.1 Identificación y mantenimiento de las Cepas en Estudio .....	71
3.3.2 Preparación del medio de cultivo RPMI-1640.....	71
3.3.3 Preparación del medio RPMI-1640. ....	72
3.3.4 Preparación del Inoculo .....	72
3.3.5 Compuestos evaluados obtenidos en el CCIQS- UAEMex.....	73
3.3.6 Preparación de la solución madre y diluciones de los antifúngicos.....	74
3.3.7 Incubación y Lectura de las placas .....	75
Capítulo 4: Resultados y Discusión.....	76
4.1 Resultados de las pruebas de sensibilidad para <i>Candida</i> .....	76
4.2 Promedios de la CMI por especie.....	78
4.5 Análisis de resultados.....	80
4.6 Discusión de Resultados.....	83
Capítulo 5: Conclusiones.....	87
5.1 Recomendaciones .....	88
Bibliografía.....	89
Apéndice A.....	93
Apéndice B.....	99
Apéndice C.....	100

## Resumen

Las infecciones nosocomiales son un problema relevante de salud pública al tener gran trascendencia económica y social constituyendo un gran desafío para las instituciones de salud y para el personal médico responsable de su atención. A pesar del avance en la síntesis de nuevos antifúngicos con buenos resultados en cuanto a efectividad y espectro de acción farmacocinética; la aparición de resistencia en ciertas cepas, especialmente a fármacos azólicos ha hecho necesario llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad “*in vitro*”, sobre todo en aquellas infecciones en donde se ha experimentado un fracaso terapéutico.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antifúngica “*in vitro*” de 5 derivados de triazol empleando las técnicas de microdilución en placa propuesto por el CLSI documentos M27-A3 para levaduras del género *Candida* y determinar su Concentración Mínima Inhibitoria.

Se emplearon los 5 compuestos derivados triazólicos y 100 cepas de *Candida*, de diferentes especies, predominando *Candida albicans*, caracterizadas en el laboratorio por procedimientos tradicionales, como cepa control se utilizó *Candida albicans* ATCC 10231.

Las cepas fueron expuestas a concentraciones de 16 - 0.03 µg/ml, frente a los 5 compuestos derivados de los azoles sintetizados en el Laboratorio de Química Orgánica siguiendo la técnica de microdilución como lo establece el CLSI utilizando como control al Itraconazol e incubando las placas a 35°C por 24 horas. La Concentración Mínima Inhibitoria de los compuesto oscilan entre 0.12-0.65 µg/ml comparado con el Itraconazol que fue de 0.0625 µg/ml, en la mayoría de las cepas.

Los derivados de azoles sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica muestran un efecto antifúngico eficaz “*in vitro*” en las cepas de *Candida* provenientes de infecciones nosocomiales, por lo que se requiere llevar a cabo más estudios microbiológicos para asegurar su uso como antimicóticos eficaces.

# Capítulo 1: Introducción

## 1.1 Infecciones Nosocomiales

Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud, conocidas también como infecciones nosocomiales, son un problema relevante de salud pública y tienen una gran trascendencia económica como social, creando así un gran desafío para las instituciones de salud y para el personal médico responsable de su atención [3].

Las Infecciones Nosocomiales se definen como “la condición localizada o sistémica que resulta de la reacción adversa a un agente infeccioso o su toxina, sin tener evidencia de que estuviera presente o en periodo de incubación en el momento de ingresar al hospital”. Operacionalmente, las infecciones que ocurren después de 48 horas del internamiento se consideran como nosocomiales. Conforme a la **NOM-045-SSA2-2005 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales** [58].

### 1.1.1 Impacto de las Infecciones Nosocomiales.

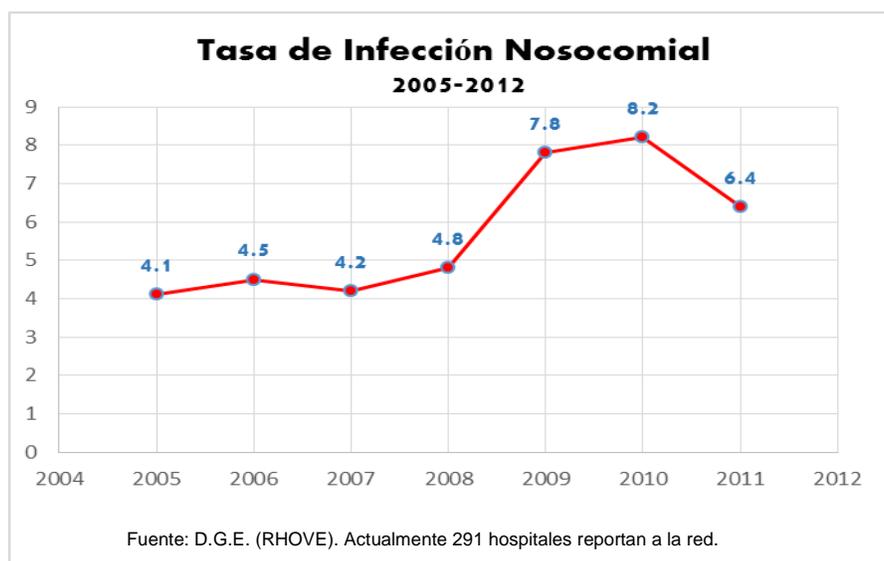
Las Infecciones Nosocomiales se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que se traduce no sólo en un incremento en los días de hospitalización y los costos de atención, aumento en la resistencia a antibióticos y también pueden ocasionar trastornos incapacitantes que reducen la calidad de la vida del paciente [3].

Debido a que las infecciones nosocomiales son complicaciones en las que se conjugan diversos factores de riesgo que en su mayoría pueden ser susceptibles de prevención y control; resulta fundamental la evaluación continua sobre los programas y políticas establecidas para su control a nivel nacional [58].

Una estadía prolongada aumenta no solo los costos directos para los pacientes, sino también los indirectos por causa del trabajo perdido. El mayor uso de medicamentos, la necesidad de aislamiento y el uso de más estudios de laboratorio y otros con fines de diagnóstico también elevan los costos [16].

Las infecciones nosocomiales más frecuentes son las de heridas quirúrgicas, las vías urinarias y las vías respiratorias inferiores. En estudios de la OMS y en otros, se ha demostrado también que la máxima prevalencia de infecciones nosocomiales ocurre en unidades de cuidados intensivos y en pabellones quirúrgicos y ortopédicos de atención de enfermedades agudas. Las tasas de prevalencia de infección son mayores en pacientes con mayor vulnerabilidad por causa de edad avanzada, enfermedad subyacente o quimioterapia [57].

En la gráfica 1.1 se observa la tasa de Infección Nosocomial reportada a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), entre los años del 2005-2012. En el año 2010 se observa un notable incremento en la tasa de IN en comparación con el año 2005.



**Gráfica 1.1** Perfil estadístico de las Infecciones Nosocomiales en México 2005-2012

Por su importancia como causa de muertes y enfermedad, y con base en las evidencias que muestran la factibilidad de prevenir estos eventos, el Programa Sectorial de Salud incluyó entre sus metas para el periodo 2007-2012 la de reducir la prevalencia de estas infecciones a un máximo de 6 por cada 100 egresos [57].

En la Tabla 1.1 observa el porcentaje de las Infecciones Nosocomiales notificadas a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), entre los años de 2007-2012.

**Tabla 1.1** Número de Infecciones Nosocomiales por tipo y por año notificadas al (RHOVE). México, 2007-2012

Sitios de Infección	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Neumonía	12%	15%	18%	17%	17%	16.8%
Infecciones de Vías Urinarias	15	14	16	15	15	13
Bacteriemia primaria	7.9	6.5	8.6	7	7	6.4
Infección de herida quirúrgica superficial	7.2	6.6	6.6	6	7	6.7
Infección de herida quirúrgica profunda	6.9	6.6	6.6	7	7	6.4
Flebitis	6.4	7.4	7.4	6	6	6
Otros	44	44	35.3	42	41	44.7
<b>Total de Infecciones nosocomiales notificadas</b>	<b>38,200</b>	<b>37,358</b>	<b>32,664</b>	<b>44,330</b>	<b>51,389</b>	<b>54,446</b>

### 1.1.2 Factores Influyentes en la Manifestación de las Infecciones Nosocomiales

Los pacientes hospitalizados que tienen infección o son portadores de microorganismos patógenos son focos potenciales de infección para los demás pacientes y para el personal de salud. Los pacientes que se infectan en el hospital constituyen otro foco de infección. Las condiciones de hacinamiento dentro del hospital, el traslado frecuente de pacientes de una unidad a otra y la concentración de pacientes muy vulnerables a infección en un pabellón (por ejemplo, de recién nacidos, pacientes quemados, inmunosuprimidos, cuidados intensivos) contribuyen a la manifestación de infecciones nosocomiales.

La flora microbiana puede contaminar objetos, dispositivos y materiales que ulteriormente entran en contacto con sitios vulnerables del cuerpo de los pacientes.

El paciente está expuesto a una gran variedad de microorganismos durante la hospitalización. El contacto entre el paciente y un microorganismo, en sí, no produce necesariamente una enfermedad clínica, puesto que hay otros factores que influyen en la naturaleza y frecuencia de las infecciones nosocomiales. La posibilidad de exposición

conducente a infección depende, en parte, de las características de los microorganismos, incluso la resistencia a los antimicrobianos, la virulencia intrínseca y la cantidad de material infeccioso (inoculo). Los pacientes inmunosuprimidos tienen una mayor vulnerabilidad a las infecciones por agentes patógenos oportunistas como es el caso de levaduras del género *Candida*.

### **1.1.3 Vigilancia Hospitalaria**

La vigilancia epidemiológica de IN se debería realizar a través de un sistema que unifique criterios para la recopilación dinámica, sistemática y continua de la información generada por cada unidad de atención médica para su procesamiento, análisis, interpretación, difusión y utilización en la resolución de problemas epidemiológicos en las distintas instituciones de Salud. La vigilancia epidemiológica activa permite la detección oportuna de casos y su control, limitando la diseminación nosocomio de patógenos.

El comité para la detección control de las IN (CODECIN), es el organismo conformado por diversos trabajadores de la salud; enfermeras, epidemiólogos e infectólogos, que coordina las actividades de vigilancia de IN. Según la NOM-045, este comité debe de presentar informes mensuales de evaluación de las actividades de vigilancia epidemiológica, control y prevención de Infecciones Nosocomiales. Para llevar registro de la vigilancia epidemiológica de cada institución [57].

### **1.1.4 Prevención y Control**

Ante la sospecha de infección, lo ideal sería realizar previamente un estudio microbiológico, pues la elección correcta de un antimicrobiano es la que se instaura después de estudiar su sensibilidad *in vitro*. El consumo (uso y/o abuso) de los antimicrobianos influye en las resistencias, no solo de los microorganismos patógenos, sino también de los saprofitos y oportunistas.

Son necesarias varias acciones para tratar de resolver la amenaza de las Infecciones Nosocomiales, tales como determinar la amplitud del problema, investigar la tendencia de cepas resistentes y su distribución geográfica, establecer la asociación con brotes epidémicos, la detección adecuada de las resistencias en el laboratorio, la prevención habitual de las infecciones nosocomiales, concientizar a los médicos acerca del problema, la prescripción adecuada de los antimicrobianos en general (tipo, vía, dosis, intervalo de administración), especialmente en las unidades críticas y de larga estancia, consultar guías orientadoras y consensos de tratamiento, el seguimiento de una política de antimicrobianos (formularios de hospital, rotaciones, terapia combinada, terapia secuencial, etc.) tratamientos específicos por área y, en general, educación sanitaria [13].

Por otra parte, es importante hacer una vigilancia estricta desde el laboratorio pues allí es donde se van a detectar las resistencias, lo que generara un trabajo en conjunto (laboratorio-práctica clínica) para que la vigilancia sea realmente válida [7]

# Capítulo 2: Marco Teórico

## 2.1 Generalidades de los hongos

Los hongos representan un grupo ubicuo y diverso de microorganismos que se dedica principalmente a la degradación de materia orgánica, llevan una vida heterotrófica como saprofitos, simbioses, comensales o parásitos [45].

De acuerdo a la clasificación taxonómica de Wittaker y Margulis los hongos (del *latín fungus*, seta), pertenecen al reino FUNGI, ya que son organismos eucariotas quimioorganoheterótrofos, portadores de esporas, poseedores de pared celular de quitina con nutrición por absorción, carentes de clorofila y se reproducen tanto de forma sexual como asexual [32]. En comparación con las bacterias los hongos son seres de crecimiento lento cuyos tiempos de duplicación celular alcanzan horas en lugar de minutos [45].

Los hongos poseen una distribución cosmopolita debido a que poseen una capacidad extraordinaria de adaptarse y desarrollarse sobre cualquier medio o superficie [20]. Dentro de las características y aspectos funcionales más relevantes de los hongos, podemos mencionar que tienen una gran importancia en la conservación del equilibrio ecológico de la naturaleza [45].

Por otro lado los hongos tienen un gran interés para el hombre, ya sea como alimentos de consumo directo, o bien como herramientas para obtener otro tipo de productos a nivel industrial principalmente en la producción de vinos, cerveza, licores, quesos, y fármacos como antibióticos (penicilina) o inmunosupresores (ciclosporina) etc.

En el área médica tienen una gran importancia puesto que producen enfermedades en animales y humanos con elevada morbilidad e impacto económico, además que dichas enfermedades se incrementan con el paso del tiempo y los fármacos para controlarlos aún siguen siendo escasos [36].

### 2.1.1 Infecciones por Hongos

A lo largo de las últimas décadas, los hongos se han convertido en una importante causa de enfermedad en el ser humano especialmente en los individuos inmunodeprimidos con trastornos subyacentes graves. En este tipo de pacientes, los hongos actúan como patógenos oportunistas que originan una considerable morbilidad y mortalidad. La incidencia global de las micosis invasivas específicas continúa incrementándose con el paso del tiempo y el listado de patógenos fúngicos oportunistas se amplía igualmente cada año [45].

Las infecciones fúngicas pueden afectar a cualquier persona en condiciones específicas, dado que muchos factores propician la infección en pacientes hospitalizados entre los cuales se encuentran, la reducción de la inmunidad de los pacientes, el uso elevado de los procedimientos médicos y técnicas invasivas, que crean posibles vías de infección, las endocrinopatías como la diabetes, así como los déficits inmunitarios que pueden ser congénitos o adquiridos (leucemias, linfomas o VIH-SIDA), los tratamientos con inmunosupresores locales o sistémicos como los corticoides entre otros, son parte de los factores más importantes para ocasionar el oportunismo por agentes como *Candida*, pudiéndose diseminar a órganos y provocar infecciones que pueden volverse mortales sin el tratamiento adecuado, así como ocasionar la aparición de resistencia hacia muchos fármacos [48].

La severidad de las micosis oportunistas depende principalmente de la incapacidad del sistema inmune del individuo para limitar el proceso infeccioso, de los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito [17].

Se han realizado pocos estudios clínico-epidemiológicos a nivel nacional enfocados a determinar la frecuencia de infecciones micóticas en pacientes inmunodeprimidos, por lo que se desconoce la magnitud del problema para establecer las medidas terapéuticas y preventivas oportunas [32].

La candidiasis o candidosis, es la micosis oportunista más frecuente, causada por la levadura del género *Candida* y varias de sus especies pero la más frecuente de todas estas es *Candida albicans*.

### **2.1.2 Estructura**

Los hongos están formados por células eucariotas. El DNA está organizado en cromosomas que se hallan envueltos por la membrana nuclear. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, está limitado por una membrana citoplasmática rica en ergosterol. Recubriendo la membrana se encuentra una pared celular rígida de estructura polisacárida compleja resistente y flexible, la cual posee residuos de N-acetilglucosamina, la membrana está compuesta mayoritariamente por quitina, mananos y glucanos y proteínas que protege de lisis osmótica y regula el paso de moléculas.

Un hongo filamentoso o moho consiste en una serie de hifas unidas en forma de filamentos largos ramificados y entrelazados lo que forma un micelio. En algunos hongos el citoplasma fluye a lo largo del micelio sin paredes transversales que lo interrumpen y es llamado cenocítico. Si el micelio posee tabiques transversales llamados septos con uno o varios poros que permitan el flujo, estos micelios son llamados septados.

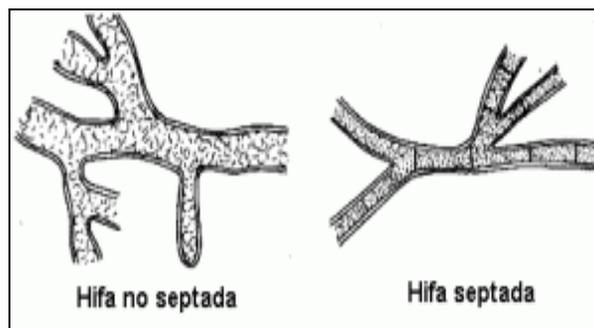
Una levadura es un hongo unicelular con un único núcleo, que se produce asexualmente por gemación y división transversal o sexualmente por la formación de esporas, algunas se agrupan hasta formar colonias. Son más grandes que las bacterias y su forma puede variar ya que pueden ser esféricas u ovaladas, estas no poseen flagelos pero si poseen la mayoría de los organismos eucariotas [53].

Algunos hongos pueden presentar dimorfismo es decir pueden presentarse en 2 formas, de levadura o filamentosa, esto es en respuesta a cambios de factores ambientales tales como; las diferentes condiciones de crecimiento, temperatura, nutrientes, presión etc. La mayoría de los hongos que presentan dimorfismo causan algún tipo de enfermedad para

el ser humano, cuando el hongo está en la forma levaduriforme se encuentra dentro del huésped, adoptando la forma filamentosa cuando está en el medio externo [44].

Las colonias levaduriformes son pastosas o cremosas, formadas por microorganismos unicelulares que cumplen las funciones vegetativas y reproductivas. Las colonias filamentosas pueden ser algodonosas, aterciopeladas o pulverulentas; son constituidas fundamentalmente por elementos multicelulares en forma de tubo: las hifas las cuales son estructuras filamentosas de forma tubular, que se consideran la unidad estructural de un hongo [47].

Las hifas pueden ser continuas o cenocíticas y tabicadas o septadas (Ver fig. 2.1). Poseen hifas septadas los hongos de las divisiones *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Deuteromycota* y poseen hifas cenocíticas los de las divisiones *Mastigomycota* e *Zygomycota*.



**Figura. 2.1** Morfología de las Hifas.

Al conjunto de hifas se les denomina talo o micelio; de acuerdo con su función el talo o micelio se divide en:

**Micelio vegetativo:** la parte del micelio que se encuentra dentro del sustrato se conoce como micelio vegetativo y es el encargado de efectuar las funciones de nutrición, mediante la absorción de nutrientes.

**Micelio reproductor o aéreo:** se encuentra por encima del sustrato y se encarga de la formación de esporas, efectuando por lo tanto la función reproductora [47].

### 2.1.3 Nutrición y metabolismo

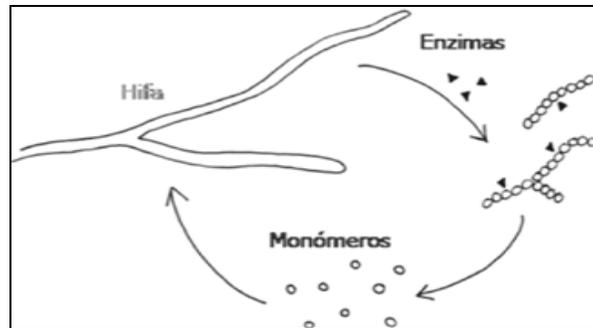
En cuanto a su metabolismo, los hongos son heterótrofos y versátiles desde el punto de vista bioquímico; producen metabolitos primarios (como ácido cítrico, etanol, glicerol) y secundarios (por ejemplo antibióticos, penicilina, amanitotoxina, aflatoxinas).

Todos los hongos heterotróficos presentan digestión externa, segregan enzimas digestivas al exterior que hidrolizan los alimentos y de esta forma son absorbidas por el hongo. Sin embargo, por su comportamiento y su citología los hongos son verdaderos vegetales saprófitos (que viven a costa de materia orgánica muerta), parásitos (que viven a expensas de otros organismos vivos) o comensales en la piel y mucosas de vertebrados como el ser humano.

Tienen un metabolismo de tipo quimioheterótrofo absorptivo, es decir obtienen energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica. El glucógeno es el principal polisacárido que utilizan como reserva de energía, la mayoría utilizan carbohidratos, principalmente glucosa y maltosa, y compuestos nitrogenados para sintetizar sus propios aminoácidos y proteínas. Los hongos obtienen sus nutrientes liberando enzimas hidrolíticas para digerir sustratos externos, después toman los productos solubles por absorción [44].

Los hongos obtienen su alimento y se nutren por absorción como parásitos infectando organismos vivos, como saprobios atacando sustancias orgánicas muertas, o en simbiosis. La mayoría de los hongos conocidos, son capaces de vivir sobre materia orgánica muerta como lo demuestra el hecho de poder cultivarlos artificialmente sobre medios sintéticos [45]

En la figura 2.1 se puede observar una representación gráfica sobre la alimentación de los hongos. Estos seres tienen que digerir su alimento antes de que éste pase a través de la pared celular a la hifa. La hifa secreta ácidos y otras sustancias que degradan al material orgánico.



**Figura. 2.2** Nutrición de los Hongos

Casi todos los hongos son aerobios, aunque algunos son anaerobios (fermentadores) facultativos y otros son anaerobios estrictos, un ejemplo de anaerobios facultativos son algunas levaduras que pueden obtener energía mediante la fermentación [45].

Las proteasas y las amilasas son dos de las enzimas más importantes producidas por hongos, para el desdoblamiento de fuentes de carbono, de cadena larga. Por el empleo de estos organismos es más accesible la obtención de estos productos.

Las amilasas actúan sobre almidones o sus productos de degradación; pueden poseer actividad dexnitrificante o licuente, o acción glucogénica. Se usan en la fabricación de adhesivos y en la eliminación de fibras textiles (almidón, yute y similares) y del almidón de la crema de manzana durante la fabricación de pectina y en las industrias farmacéuticas y alimentaria.

Las proteasas comprenden proteinasas y peptidasas que se utilizan en el desengomado de artículos de seda, en el pelado y curtido o preparación de cuerpos, en la fabricación de cola líquida, como aditivo de detergentes, como agente de maduración de quesos y en la industria panadera.

#### **2.1.4 Reproducción**

La reproducción de los hongos se produce por la formación de esporas, que son células uninucleadas o multinucleadas destinadas a la diseminación y propagación de la especie a distancia.

Las esporas de los hongos tiene importancia por diversas razones principalmente les permiten sobrevivir a condiciones de estrés ambiental como la escasez de nutrientes y las temperaturas extremas. Debido a su peso y tamaño pueden permanecer en el aire por largos periodos, por ello colaboran en la propagación y explican por qué los hongos presentan una distribución tan alta comparándolos con otros microorganismos.

Los hongos se reproducen por medio de procesos asexuales, mediante la formación de esporas asexuales o a través de esporas sexuales, la gran variedad de tamaño, forma, color y número de estas son útiles en la identificación de las distintas especies de hongos.

La reproducción sexual implica la fusión de núcleos compatibles entre sí, las especies homotálicas se autofecundan produciendo gametos en el mismo micelio. Las especies heterotálicas requieren de un cruzamiento de micelios diferentes pero que sean sexualmente compatibles para comenzar la producción de esporas.

Por su origen las esporas se clasifican en:

**Esporas sexuales:**

**a) Oosporas:** Se forman de la unión de dos gametangios (Oomycetes).

**b) Zigospora:** Unión de dos hifas sin diferenciación morfológica.

**c) Ascosporas:** Nacen de un ascocarpo que tienen forma de saco son endógenas.

**d) Basidiosporas:** Son exógenas, se forman en el basidio.

La reproducción asexual se lleva a cabo de la siguiente manera:

Una célula puede experimentar mitosis y dividirse en 2 células hijas, por partición en el centro y formación de una nueva pared celular o llevarse a cabo junto con la gemación de la célula hija, lo cual es muy común en levaduras. La forma más común es la producción de esporas, que ocurre en un hongo individual mediante mitosis y posterior división celular [44]. Existen diferentes tipos de esporas asexuales, con sus propios nombres y características [6,53].

## **Esporas Asexuales:**

**a) Talosporas:** derivadas del micelio, se pueden dividir en:

**a.1 Artrospora:** Se forman por la fragmentación del micelio, tienen forma rectangular y doble pared. Ejemplo (*Geotrichum*.)

**a.2 Blastosporas:** Se forman por gemación de una célula progenitora. Ejemplo (*Candida*.)

**a.3 Dictosporas:** Esporas multicelulares con septos irregulares. Ejemplo (*Alternaria*.)

**a.4 Clamidosporas:** Se forman por ensanchamiento de la hifa, pueden ser terminales, laterales, e intercalares. Ejemplo (*Candida* y la mayoría de los hongos en estadios jóvenes.)

**b) Conidias:** Esporas producidas por diferenciación del micelio en estructuras especializadas, llamadas conidióforos.

**c) Esporangiosporas:** Esporas endógenas, producidas en estructuras especializadas llamadas esporangios.

La morfología de las estructuras de reproducción asexual es suficientemente característica y específica como para permitir identificar morfológicamente un gran número de hongos filamentosos y dimórficos de interés en medicina.

### **2.1.5 Clasificación de los Hongos**

Dentro del superreino Eucarionte, los hongos pertenecen al reino Fungi, separados de los reinos *Animalia* y *Plantae*; comprende varias familias o *Phylum* los cuales son conocidos como hongos de manera estricta [32], describiéndolos a continuación.

- I. **Ascomycota:** Se reproducen sexualmente mediante ascosporas, tienen pared celular laminar y sus septos son sencillos con uno o varios poros. Es el *Phylum* que actualmente posee mayor importancia médica, entre los géneros de importancia médica en este *Phylum* se encuentran *Candida*, *Sporothrix*, *Fonsecaea*, *Aspergillus*, *Histoplasma* entre otros.

- II. **Basidiomycota:** Se reproducen sexualmente, comprende a los macromicetos y muchos micromicetos, un ejemplo de agente patógeno es la levadura *Cryptococcus neoformans*.
- III. **Zygomycota:** Este grupo comprende a hongos con micelio cenocítico, solo algunos lo poseen septado. Se reproducen asexualmente mediante diferentes formas de conidias y esporangioesporas y sexualmente mediante zigosporas. Poseen 2 grupos de gran importancia médica: los mucorales (*Absidia*, *Rhizopus*) y Entomophtorales (*Basidiobolus*, *Conidiobolus*).
- IV. **Chytridiomycota:** Este grupo comprende organismos unicelulares y su reproducción es llevada a cabo mediante conidias flageladas, su pared celular está compuesta de quitina. No se conoce ninguna especie patógena para el hombre.

Dado que la clasificación de los hongos se basa fundamentalmente en características morfológicas y puesto que la morfología de la fase asexuada (imperfecta o anamorfa) difiere considerablemente de la fase sexuada (perfecta o teleomorfa), la clasificación de los hongos está llena de controversias. Por otro lado con la incorporación de las técnicas de biología molecular, constantemente se están describiendo nuevas especies y reclasificando las ya existentes [34, 52].

## 2.2 Micosis

Las micosis son enfermedades producidas por hongos microscópicos, que se multiplican en la superficie de la piel y en los órganos. Requieren un tratamiento largo y las recaídas son frecuentes [45].

### 2.2.1 Generalidades de las micosis

El termino micosis deriva del griego *μυκος*, “hongo” y el sufijo *sis* que significa “estado irregular” o “enfermedad” junto con la unión de la letra “o”. En español se define como “una infección producida por hongos en algún lugar del organismo” [36].

Existen dos tipos de hongos microscópicos: las levaduras y los hongos filamentosos. Algunos están presentes normalmente en la boca, la piel, el intestino y la vagina, y son

inofensivos. Sólo cuando se multiplican de forma considerable dan lugar a alteraciones, conocidas con el nombre de micosis.

Las infecciones por hongos son más frecuentes en las personas que padecen algún tipo de deficiencia del sistema defensivo inmunitario (inmunodeficiencia). Recientemente, con el avance de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA), está produciéndose un incremento en la prevalencia de micosis, que pueden afectar a cualquier localización, aunque en estos pacientes suele ser neurológica (meningitis), digestiva (de la boca y del esófago) y respiratoria (pulmonar) [45].

Dentro de las micosis oportunistas más comunes se encuentra la candidiasis la cual es producida por un hongo llamado *Candida* (generalmente del género *albicans*). Es una levadura que se desarrolla de forma natural en la boca, el tubo digestivo y las vías genitales. El hongo prolifera durante los tratamientos antibióticos o cuando la resistencia del organismo infectado está disminuida. También puede multiplicarse con ocasión de un cambio hormonal (embarazo o ingestión de píldoras anticonceptivas, con estrógenos y progesterona).

### **2.2.2 Clasificación de las micosis**

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a las micosis en Superficiales, Subcutáneas, Sistémicas y Oportunistas. Sin embargo esta clasificación no es rigorista puesto que algunas micosis pueden incluirse en más de un tipo de los antes mencionados y tiene que ver con distintos factores inmunitarios o externos al organismo. Un claro ejemplo de ello son las dermatofitosis (generalmente las superficiales) que al encontrarse en un organismo inmunosuprimido puede llegar a ocasionar un granuloma o incluso un micetoma originando así una micosis subcutánea [30].

Integrando la clasificación de la OMS y la tradicionalmente utilizada, los tipos de micosis y las características más importantes son:

- **Superficiales** o también llamadas dermatomicosis, son aquellas en las que el hongo solo invade las capas externas de la piel, pelo y uñas.

- **Subcutáneas:** son aquellas que se adquieren por implantación, generalmente son originadas por la introducción del hongo a través de un traumatismo en la piel, pueden afectar la dermis, tejido subcutáneo e incluso musculo y huesos. Algunos ejemplos comunes son: Esporotricosis, Micetoma y Cromomicosis.
- **Sistémicas:** se produce una infección a nivel de órganos internos (pulmones, intestino, cerebro, etc.) y en muchas ocasiones una diseminación hematógica, generalmente la vía de entrada es la inhalación e incluso a través de la piel. Algunos ejemplos son: Histoplasmosis, Coccidioidomicosis y Blastomicosis.
- **Oportunistas:** se desarrollan principalmente en pacientes inmunodeprimidos con infección de VIH, neoplasias, prematuridad, etc. Las vías de entrada son por inhalación y autoinoculación al pertenecer a la biota normal del organismo, ejemplo de estas son la Candidiasis y la Criptococosis y la Aspergilosis.
- **Pseudomicosis:** son producidas por microorganismos que anteriormente se consideraban como hongos, los principales ejemplos son las bacterias del género *Actinomyces* y algas como la *Prototheca*.

### 2.2.3 Factores de patogenicidad

Los hongos deben superar diferentes barreras físicas y químicas en el huésped para ocasionar un daño y sobrevivir. Para vencer estas barreras los hongos han desarrollado diversos factores y mecanismos para causar un daño al hospedero. Un claro ejemplo podría ser la producción de enzimas en su metabolismo, en respuesta al medio en que se desarrollan como lo podría ser la piel, ejemplos son las queratinasas producidas por los dermatofitos, que degradan la queratina de la piel, pelo y uñas.

Un claro ejemplo de esto sería el dimorfismo que es la capacidad para cambiar de morfología dependiendo de las condiciones en que se desarrolle el hongo tanto en el hospedero como *in-vitro*, es necesaria en ciertas especies para resistir a ciertas condiciones adversas que encuentra en el huésped. Por ejemplo, *Candida albicans* puede adquirir la forma de pseudofilamentos o filamentos verdaderos en los tejidos infectados de manera crónica.

Bajo condiciones específicas de nutrientes y temperatura, se puede obtener *in-vitro* la forma parasitaria de casi cualquier hongo patógeno. Tomando en cuenta que la mayoría de las especies patógenas para el humano tiene la capacidad de desarrollarse a la temperatura corporal e incluso un poco mayor [36].

#### **2.2.4 Formas de transmisión**

Las micosis se pueden transmitir de diferentes maneras:

- ✓ Contacto directo o mediante fómites
- ✓ Penetración a través de un traumatismo
- ✓ Inhalación
- ✓ Iatrogenia

Generalmente las micosis oportunistas ocurren a causa de hongos pertenecientes a la flora normal del organismo, los cuales viven en equilibrio en distintos sitios como la piel, mucosas e incluso en órganos o vísceras como el intestino.

Para que estos se conviertan en patógenos deben de ser “activados” por la modificación de su microambiente que altere su equilibrio lo cual hace propicio su crecimiento masivo [34, 36].

#### **2.2.5 Mecanismos de defensa del organismo contra los hongos**

Los mecanismos inmunológicos de defensa contra los hongos son muy similares a los usados por el organismo contra otros agentes como las bacterias. Con el paso de la evolución se ha desarrollado un sistema de defensa muy complejo constituido por mecanismos inespecíficos o naturales y mecanismos específicos o adquiridos para protegerse contra las infecciones.

Las levaduras del genero *Candida* son las que más se han estudiado inmunológicamente hablando dentro del área de micología, ya que las infecciones producidas por estas levaduras se han incrementado en número debido a enfermedades inmunosupresoras [36].

El contacto con *Candida* en mucosas y el organismo en general se da desde el nacimiento, por lo tanto son consideradas como agentes pertenecientes a la biota normal y se ha discutido mucho sobre los mecanismos del sistema inmune contra las infecciones por *Candida* [33].

*C. albicans* posee 2 tipos de antígeno identificados como A y B compuestos por un polisacárido de N-acetil glucosamina el cual se utiliza en la prueba de intradermorreacción (Candidina). El antígeno B se considera menos virulento y predomina en pacientes con SIDA.

Los linfocitos cumplen una función importante en la defensa ya que Th1 liberan citosinas que activan macrófagos y neutrófilos de acción Candidicida; y la fagocitosis por polimorfonucleares (PMN), constituye uno de los mecanismos más importantes contra la invasión de hongos. Incluso los PMN secretan una proteína muy rica en calcio, la calcoproteína, la cual posee gran actividad Candidastática [49].

La inmunidad adquirida es específica y aparece como respuesta inducida por la infección, puede ser mediada por tanto por anticuerpos (humoral) como por células (celular) y son producidos acorde al parásito invasor cuando la inmunidad inespecífica no es suficiente para eliminar el agente infeccioso.

La falta de este mecanismo se manifiesta de manera importante en pacientes inmunodeprimidos o con deficiencias congénitas de la inmunidad celular, evolucionando generalmente a una micosis invasiva [41].

## **2.3 Candidiasis**

La candidiasis o candidosis es una infección fúngica (micosis) causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*, de la cual *Candida albicans* es la más común [29]. Estos microorganismos pueden infectar cualquier tejido, como la piel y diversos órganos internos y producir así una infección sistémica. Las formas más comunes de infección son las mucocutáneas ya que son las más frecuentes mientras que las sistémicas son de evolución tanto aguda como crónica y generalmente son más severas [44].

Los agentes patógenos son levaduras (el estado anamorfo) del género *Candida* pertenecientes al *Phylum Ascomycotina*. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos.

### 2.3.1 Clasificación taxonómica de las Levaduras del genero *Candida*

**Clase** *Ascomycetes*

**Subclase** *Blastomycetidia*

**Familia** *Saccharomycetes*

**Orden** *Cryptococcal*

**Género** *Candida*

Hay alrededor de 200 especies de Levaduras del género *Candida* de las cuales 58 aproximadamente son oportunistas en el ser humano y en animales, sólo unas pocas son conocidas por causar infecciones en seres humanos [45].

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen principalmente a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, en la Tabla 2.1 se puede observar las especies más frecuentes del género *Candida* que causan algún tipo de Infección Nosocomial.

**Tabla 2.1** Especies más frecuentes del género *Candida* en Infecciones Nosocomiales. (Vazquez y Sobel. 2011).

Especies patógenas de <i>Candida</i>	
Especie	Frecuencia
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei</i>	~1%
<i>C. guilliermondii</i>	~1%
<i>C. lusitaniae</i>	~1%
<i>C. dubliniensis</i>	~1%

### 2.3.2 Características generales de las levaduras del género *Candida*

*Candida spp.*, son levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2-6 x 3-9 µm que se reproducen por gemación múltiple (blastosporas). A excepción de *Candida glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar pseudomicelios; *Candida albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas.

El género *Candida* es ureasa negativo, no forma capsula, pigmentos ni almidón, su capacidad fermentativa la hace distinguible de la mayoría de especies de este género, solo algunas tiene metabolismo oxidativo

Diversas especies de *Candida* forman parte de la flora intestinal en mamíferos así como de mucosas, vagina y piel en el humano, colonizándolo desde los primeros días del el nacimiento, pero en condiciones extremas como el pH del estómago no es posible encontrar estas levaduras de manera normal.

### 2.3.3 Formas clínicas de la Candidiasis

Las candidiasis se han clasificado de diferentes maneras. En este trabajo se clasificaran de acuerdo a su nivel de afección a los diferentes tejidos.

#### **Candidiasis tegumentarias y Mucosas no profundas**

**Bucal:** Es la forma más frecuente y predomina en los recién nacidos y ancianos; localizada en lengua, carrillos y paladar se caracteriza por una capa blanca, adherente y membranosa, de bordes difusos y dispuesta sobre una base eritematosa, cuyo síntoma es el dolor. La membrana blanca es el conjunto de células epiteliales descamadas, fibrina, leucocitos, pseudohifas y levaduras unidos al epitelio inflamado. Los pacientes refieren pérdida de la sensación gustativa, ardor y disfagia alta. También es conocida como algodoncillo o muguet. (Ver Figura 2.3).

Ocurre ocasionalmente en pacientes inmunocompetentes como los recién nacidos y usuarios de protectores dentales, pero es más común en casos de tratamiento antibiótico reciente, administración de esteroides inhalados o sistémicos, cáncer y SIDA [33].

**Vulvovaginitis:** Esta forma se relaciona con el ciclo menstrual, es una infección frecuente en mujeres embarazadas, diabetes y tratamientos prolongados con antibióticos. La mucosa vaginal y la vulva presentan eritema intenso que puede extenderse a pliegues inguinales y periné, en la periferia de las lesiones cutáneas se observan lesiones satélites y generalmente se presenta dispareunia y leucorrea.

Esta infección es un problema ginecológico más común y es considerado de transmisión sexual, es posible encontrarlo hasta en un 25% de las mujeres asintomáticas. El diagnóstico se establece mediante citología cervicovaginal y/o cultivo [50].

Se piensa que la incidencia de vulvovaginitis por especies de *Candida* no-*albicans* ha aumentado por el tratamiento con dosis única, además de bajas dosis de mantención y automedicación. (Ver Figura 2.4).



**Figura. 2.3** Candidiasis bucal



**Figura 2.4** Vulvovaginitis

**Candidiasis Intertriginosa:** La candidiasis intertriginosa es una infección la cual predomina en individuos obesos, cualquier pliegue puede estar afectado, se caracteriza por placas eritematosas, maceración, descamación fina, fisuras, lesiones satélites (pústulas, pápulas o vesículas). En caso de afectarse los espacios interdigitales, el perineo, la zona inguinal, axilas, zona submamaria y glúteos, el signo principal es la maceración intensa, con escamas gruesas y blancas. (Ver Figura 2.5)

**Candidosis del área del pañal:** Es un padecimiento generalmente secundario a una dermatitis por contacto, al permanecer húmeda la zona por el contacto con la orina al no haber un cambio constante del pañal. Se caracteriza por placas eritematosas, descamación, algunas veces áreas denudadas, acompañadas de pápulas o pústulas satélites. Suele haber infección mixta por bacterias. (Ver Figura 2.6).



**Figura. 2.5** Candidiasis Intertriginosa

**Figura. 2.6** Candidiasis en el área del pañal.

**Oniquia y/o Paroniquia:** Es una infección a nivel de uñas de las manos o pies presentando lesiones en la base de estas provocando eritema, inflamación y dolor intenso. La uña se torna color café o estriada y es frecuente en personas que desarrollan labores que originan maceración de sus dedos (ejemplo las lavanderas). A diferencia de las dermatofitosis, Candida ataca a la uña de la zona de la base hacia su extremo. (Ver Figura. 2.7).



**Figura. 2.7** Oniquia y/o Paroniquia

**Candidiasis mucocutánea generalizada:** Se presenta en pacientes diabéticos y especialmente en niños con inmunidad celular muy deprimida o con problemas genéticos. Esta infección se puede diseminar ampliamente afectando la piel, uñas, boca, esófago, vulva, vagina, glánde incluso el estómago al producir lesiones granulomatosas cutáneas. Aunque no presentan tendencia a diseminarse si no que se encuentra localizada en cualquiera de estas zonas. Son de difícil tratamiento y se pueden volver crónicas de por vida [27].

**Candidiasis granulomatosa:** Es muy poco frecuente y termina presentándose como una candidiasis superficial que al evolucionar se profundiza, se presenta en personas con bajas o nulas defensas y son de difícil tratamiento [34].

### **Candidiasis a nivel de vísceras**

**Endocarditis candidiósica:** La endocarditis es una patología que va en aumento, generalmente se presenta en pacientes que reciben nutrición parental por infección de las válvulas cardíacas o después de la cirugía abierta de corazón. La drogadicción parenteral entre estos enfermos ha provocado un incremento de la endocarditis infecciosa por *Candida*.

Las manifestaciones clínicas son muy similares a la endocarditis bacteriana: fiebre, insuficiencia de las válvulas, soplo cardíaco, insuficiencia cardíaca derecha y tromboembolismo pulmonar. Aproximadamente el 50% de los pacientes resultan con hemocultivos positivos. La ecocardiografía bidimensional y transesofágica permite el reconocimiento de las vegetaciones que, cuando son de gran tamaño, incrementan la sospecha de endocarditis fúngica.

**Candidiasis esófago-gastrointestinal:** La candidiasis esofágica es la causa más común de esofagitis en los pacientes infectados por el VIH y en los pacientes en condiciones de inmunosupresión como problemas mieloproliferativos. El estómago, esófago, colon e intestino delgado son los órganos más afectados. En los casos sintomáticos se presenta disfagia, odinofagia, náuseas, vómito, hematemesis y dolor retroesternal. Mediante

endoscopía se observan placas blanquecinas difusas o focales asociadas a una mucosa hiperémica y friable, así como exulceraciones bien circunscritas; pero hay casos sin síntomas, en los que sólo la endoscopía muestra lesiones.

La radiografía contrastada de esófago presenta defectos de relleno, ocasionados por las múltiples ulceraciones superficiales de la mucosa. Su aspecto es muy característico, llamado esófago en empedrado, aunque no es patognomónico. Los hongos del género *Candida* pueden complicar las lesiones esofágicas de otro origen como las aftas, las herpéticas y las producidas por Citomegalovirus (CMV) [45].

**Candidiasis broncopulmonar:** La afección pulmonar generalmente es secundaria a una diseminación sanguínea ya que es rara como infección primaria. Se caracteriza por presentar un cuadro de bronquitis y fiebre en la mayoría de los casos, la cual puede o no cursar con tos productiva en la cual hay expectoración mucóide e incluso hemorrágica, pudiendo producir pleuritis. La forma pulmonar es precedida principalmente por candidemia y se presenta como infiltrados nodulares; el diagnóstico se puede hacer con el estudio de una biopsia [25].

**Candidiasis del tracto urinario:** Dentro de las infecciones del tracto urinario, *Candida* es una de las causas de este tipo de infecciones. La afección renal es por vía hematológica es decir a partir de un foco primario gastrointestinal. Puede causar abscesos perinefríticos, con daño a la corteza y finalmente obstrucción renal.

Es frecuente que curse con pielonefritis y fungemia secundaria, la función renal se puede deteriorar y el material fúngico acumulado en la pelvis renal causa obstrucción del sistema, con consecuente anuria y falla renal. En la cistitis los principales síntomas son la urgencia urinaria, disuria y hematuria. La uretritis por *Candida* es una entidad muy rara e incluye sensación de “quemadura” y prurito, con descargas mucoides. En mujeres se asocia a vaginitis por *Candida*, esta infección puede llegar a ser común en pacientes diabéticos [25].

**Candidiasis meningoencefálica:** La meningitis por *Candida* se observa como consecuencia de una diseminación hematológica, en ocasiones se puede observar solamente lesión a

nivel de las meninges. Afecta a las meninges y al parénquima con formación de microabscesos, abscesos parenquimatosos, vasculitis granulomatosa y meningitis. Aunque cualquier persona puede presentar meningitis micótica, aquellas con sistemas inmunitarios débiles, tienen un riesgo más alto [54].

**Peritonitis:** Es la complicación que se presenta en el 3% al 10% en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria, y en pacientes con cirugía de intestino, especialmente es secundaria a perforación de úlcera duodenal. En la mayoría de los casos la peritonitis es causada por *C. albicans*, aunque se ha observado una tendencia mundial al aumento de las especies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* [25].

**Candidiasis Ocular:** La infección se da por diseminación hematológica, o secundaria a la inoculación directa traumática o posterior a cirugía. En la endoftalmitis, los hallazgos en el fondo de ojo son lesiones blancas, algodonosas, que se extienden al humor vítreo. También se presentan dolor ocular, visión borrosa, escotomas. Si no se administra tratamiento, deja ciega [25].

### **Candidiasis diseminada**

Este concepto implica distintas manifestaciones de la enfermedad las cuales varían en cuanto a sus manifestaciones clínicas, tratamiento y pronósticos. La candidemia se observa en pacientes tanto neutropénicos como los que no lo son, pero principalmente se observa en personas con terapias con corticoesteroides, citotóxicos, con cirugías cardiovasculares, trasplantes o con cáncer. Presentan fiebre, escalofríos e hipotensión arterial con frecuencia y los hemocultivos son positivos, responden favorablemente al tratamiento temprano.

La candidiasis diseminada aguda es la forma fulminante, en estos pacientes se observan fiebres de manera frecuente así como lesiones cutáneas (observadas en pacientes neutropénicos) y endoftalmitis en el 30% de pacientes aproximadamente. Las complicaciones más comunes son la meningitis, abscesos, endocarditis y sobre todo la mala respuesta a fármacos de amplio espectro [36, 41].

### **2.3.4 Epidemiología**

La distribución geográfica de infección por *Candida* es universal, siendo la micosis con mayor incidencia en el mundo. Más del 70 % de esta infección es producida por *Candida albicans*.

La importancia de esta infección radica en la alta prevalencia y en el gasto que representa la atención a este padecimiento, sobre todo en casos de infecciones nosocomiales, además de su alta tasa de mortalidad que va en aumento año con año, principalmente en pacientes comprometidos inmunológicamente.

Las candidiasis específicamente las sistémicas son infecciones con una mortalidad elevada y una incidencia que ha ido aumentando año con año, siendo las levaduras del género *Candida* la cuarta causa nosocomial más común en infecciones del torrente sanguíneo, sobre todo con cuentas  $<200$  de linfocitos  $CD4^+$  ocasionando el 10% de infecciones sanguíneas y el 25 % del tracto urinario [23].

### **2.3.5 Factores predisponentes**

Dado que *Candida* es un hongo saprofito, para que pueda producir infección necesita de factores predisponentes que reduzcan la barrera de protección ya sea epidérmica o sistémica. Los factores físicos como el calor, la humedad y la fricción pueden ocasionar infecciones de esta clase por esto son frecuentes en personas obesas, en personas que utilizan ropa ajustada y sin ventilación.

Otro tipo de factores que pueden ocasionar la entrada a un huésped susceptible o provocarle esta condición, son la terapia antibiótica prolongada la cual irrita las mucosas (suprimiendo la flora bacteriana del huésped y aumentando el oportunismo), los procedimientos quirúrgicos como la introducción de catéteres los cuales pueden estar contaminados provocando la entrada de patógeno por la acción traumática del procedimiento.

Las endocrinopatías como la diabetes, así como los déficits inmunitarios, sean congénitos o adquiridos, los tratamientos con inmunosupresores locales o sistémicos como los corticoides son parte de los factores más importantes para ocasionar el oportunismo por agentes como *Candida*, diseminándose a diferentes órganos y provocando una candidemia a veces mortal en la mayoría de los casos. Sin duda la infección por VIH es el factor predisponente más importante para adquirir esta infección, ya que los mecanismos de defensa se encuentran suprimidos sin poder evitar la colonización pudiendo diseminarse rápidamente [50].

### **2.3.6 Mecanismos de infección relación huésped-parásito.**

Los hongos del género *Candida* son integrantes normales de la biota corporal humana, su homeostasis es compleja y depende de muchos factores; entre ellos, la inmunidad mediada por células desempeña un papel destacado ya que la asociación “linfocitos CD4-macrófago” ejerce un poder de vigilancia y su déficit redundante en una mayor facilidad de *Candida* para adherirse a las células epiteliales. La frecuencia y gravedad de las infecciones dependen, sobre todo, del nivel de células CD4 en sangre. Las candidiasis son evidentes en enfermos con recuentos inferiores a 200 linfocitos CD4<sup>+</sup>. Debe tenerse en cuenta que las mananas y las mananoproteínas de la pared celular de *Candida* son activadoras de las células CD8 y deprimen la actividad de las CD4, potenciando el efecto inmunodepresor del VIH. Por esta razón, en pacientes VIH positivos, se ha propuesto la administración de tratamientos antifúngicos durante lapsos prolongados a fin de reducir el nivel de antígenos libres en sangre y tejidos, evitando un deterioro mayor de la inmunidad. La preservación de la función fagocitaria de los neutrófilos en los pacientes VIH positivos, así como la buena producción de anticuerpos contra el antígeno de 47 KDa de *Candida*, reducen la frecuencia de candidiasis diseminadas en condiciones habituales [55].

### 2.3.7 Factores de virulencia

El principal mecanismo de patogenicidad es la adherencia. *Candida albicans* se adhiere mejor que las especies no-*albicans*. *Candida* se adhiere de igual forma a las células descamativas del epitelio oral y vaginal. Existen diferencias en la receptividad del epitelio vaginal, dependiendo del hospedero. La germinación de *Candida* favorece la colonización y facilita la invasión tisular.

Se han identificado enzimas proteolíticas, toxinas y fosfolipasas asociadas a virulencia. Además se ha identificado el cambio en la morfología de la colonia o "switch fenotípico" como mecanismo de patogenicidad. Patogénesis: *Candida* accede al lumen vaginal desde la zona perianal. Es un microorganismo comensal que, frente a cambios ambientales, puede transformarse en patógeno.

## 2.4 Diagnóstico

Las levaduras del género *Candida* son relativamente fáciles de identificar, a pesar de esto la dificultad radica en saber si se trata de un agente causal real de la infección o esta se encuentra como comensal. Para esto es importante la adecuada toma de muestra, que puede ser: muestras de piel y uñas, de mucosas o exudados, esputo, sangre y líquido cefalorraquídeo principalmente.

Aunque los síntomas se presenten de manera clásica, el diagnóstico no puede realizarse sólo con la historia clínica y el examen físico. Se requiere la correcta identificación del agente causal en el laboratorio. La muestra debe dividirse para ser utilizada tanto para el examen directo (fresco) como para el cultivo, el primero es útil para orientar sobre la etiología de la infección, el cultivo puede carecer de significado si el examen en fresco no contiene cantidad importante de levaduras, pero si estas se encuentran en una gran cantidad o incluso formando pseudomicelio nos podría indicar que se trata de una verdadera candidiasis; y en el caso del aislamiento en sangre o LCR un cultivo positivo es definitivamente diagnóstico [38].

### **2.4.1 Toma de muestra**

Para la toma de muestra los instrumentos más usados son espejos, hisopos, portaobjetos medios de cultivo para el correcto aislamiento, los cuales deben ser estériles o nuevos. No es necesario utilizar medio de transporte ya que la muestra se propaga ahí misma, todos los instrumentos se deben de utilizar en las condiciones más asépticas posibles.

En casos de descamación de piel y uñas, la toma de muestra es similar que en las tiñas, limpiando la zona con alcohol al 70%, raspando el borde de la descamación o la uña con bisturí depositando la muestra en una caja Petri estéril para su estudio.

En caso de cualquier tipo de exudados, incluyendo ocular, ótico, vaginal, oral y de lesiones supurativas, la muestra se toma directamente con un hisopo estéril con previa limpieza con solución salina y agua en caso de la boca, la muestra obtenida se puede inocular directamente en el medio de un cultivo, preferentemente en agar gelosa sangre, aunque también la muestra se puede inocular en agar EMB, agar Mc Conkey, Casman entre otros [51].

En abscesos y LCR, la toma se realiza por punción en la zona y se transporta al laboratorio ya sea en la misma jeringa o bien en un contenedor estéril. Las biopsias se transportan en un tubo estéril que contenga solución salina para evitar la desecación de la muestra [52].

### **2.4.2 Identificación preliminar en el laboratorio**

Para la identificación por microscopía óptica, un raspado o frotis de la zona afectada se coloca en un portaobjetos de un microscopio. Luego se le añade a la muestra una sola gota de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%. El KOH disuelve las células cutáneas pero deja las células *Candida* intactas, permitiendo la visualización de pseudohifas y las células de la levadura en ciernes típico de muchas especies de *Candida*. La identificación de las levaduras de importancia médica se basa en su morfología, incluyendo estructuras tales como: cápsula, tubo germinativo, clamidosporas, artrosporas, blastosporas, pseudohifas, hifas, ascosporas y basidiosporas, etc.

Para mejorar la observación se puede realizar tinción, para buscar la fase parasitaria de la levadura, entre las tinciones más comunes se encuentran el azul de algodón-lactofenol, blanco de calcoflúor y la tinción de Gram que es la más fácil, rápida y económica además de confiable.

Las especies de *Candida* al invadir tejidos son capaces de formar pseudomicelios los cuales se distinguen por no formar septos más en que en las ramificaciones, la excepción es *C. glabrata* la cual no produce ningún tipo de filamento [45].

En la imagen 2.8 se muestra la preparación en fresco de un material biológico, con KOH al 10%, esta preparación ayuda a realizar una mejor observación microscópica. Mientras que en la imagen 2.9 se puede observar levadura teñidas con Gram, dentro de la observación microscópica se puede encontrar que más de 4 levaduras por campo se consideran como estado patológico.



**Figura. 2.8** Examen directo en fresco de orina, de cualquier material biológico mencionado, agregando KOH al 10%.



**Figura. 2.9** Frotis de cualquiera de los productos biológicos mencionados, teñidos con Gram.

### 2.4.3 Cultivo

La muestra debe ser sometida a cultivo tanto para aislar el hongo como para identificar la especie, tratándose de *Candida*, la observación directa es orientativa para llevar a cabo cultivos en medios tanto enriquecidos como selectivos que se describen a continuación.

El aislamiento primario se puede realizar en medios de cultivo sin agentes bacterianos como el agar Sabouraud o el agar PDA, para aislar cualquier clase de hongos que pudieran

existir en la muestra, el medio gelosa sangre es también importante ya que permite el óptimo crecimiento de todas las especies de *Candida* (Ver Figura. 2.10).

En los medios de cultivo como **PDA o Sabouraud** las características de las colonias de *Candida* son similares presentan color blanco, poco elevadas y húmedas, con bordes definidos y presentan un olor característico a levadura. En agar gelosa sangre las colonias de levaduras presentan ligeras proyecciones en los bordes llamados “pies”; generalmente el crecimiento se da a las 72 horas como máximo en un rango de temperatura de 27 – 38°C [40].



**Figura. 2.10** Cultivo en agar dextrosa Sabouraud.



**Figura. 11** Medio para Hemocultivo, marca comercial MDM.

El **hemocultivo** se realiza en casos de candidiasis diseminada o invasiva a vísceras como la endocarditis, se inocula la muestra sanguínea en un medio de cultivo enriquecido en caldo (generalmente en BHI) incubando 24 horas para después ser transferido a una placa de agar gelosa sangre para comprobar el crecimiento del microorganismo causante de la infección. El problema radica en el tiempo que tarda la obtención del resultado, ya que generalmente se requiere que este sea rápido, puesto que las formas diseminadas evolucionan rápidamente, además el hemocultivo no es 100% confiable, ya que la muestra se pudo haber tomado cuando el paciente estaba en pico febril, y por lo tanto puede ocurrir que no haya crecimiento de ningún microorganismo, por lo cual el médico

se debe de apoyar en el diagnóstico presuntivo basado en los síntomas del paciente, pudiendo iniciar inclusive con algún tratamiento de amplio espectro [33]. (Ver figura 2.11).

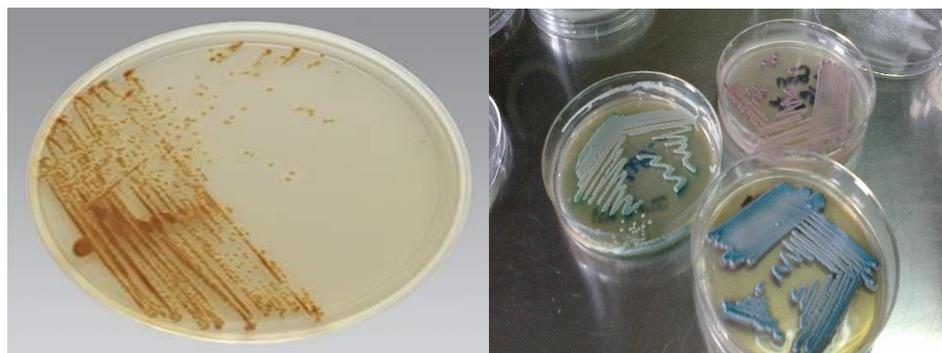
Los medios de cultivo suplementados con antibióticos como el agar Mycobiotic (cloranfenicol + cicloheximida) pueden ser usados para el primoaislamiento, pero preferentemente deben ser inoculados a la par de un medio sin antibióticos ya que la cicloheximida puede inhibir el crecimiento de unas especies de *Candida* como *C. tropicalis*, *C. Krusei* y *C. parapsilosis*.

Existen medios que se utilizan como selectivos y diferenciales para el género *Candida* gracias a las propiedades que presentan las colonias aisladas. El **agar Biggy** (Nickerson), compuesto a base de citratos (los cuales inhiben la flora bacteriana). Y sulfitos los cuales son reducidos a sulfuros, esta reacción produce colonias con tonalidades café claro u oscuras, lo cual las hace fácilmente distinguibles de otras levaduras no *Candida*. Es un excelente medio de primoaislamiento pero se necesitan pruebas adicionales para identificar la especie ya que no distingue una de otra [12].

En los últimos años se ha facilitado el estudio de las levaduras, sobre todo las de mayor relevancia clínica, favoreciendo la detección de infecciones mixtas, debido a la introducción de medios de cultivo **cromógenos** que permiten el aislamiento y la identificación presuntiva simultánea al generarse colonias con diferentes colores y texturas para las diferentes especies de *Candida*. Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24 a 48 h.

El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos. El medio CHROMagar-*Candida*, permite el desarrollo de las especies de *Candida*, formando colonias de una variedad de colores de acuerdo a su especie: *C. albicans* (verde claro), *C. stellatoidea* (verde oscuro), *C. tropicalis* (azul), *C. Krusei* (rosa pálido) etc. El medio tiene una eficacia

por encima del 90% considerándose altamente confiable para la práctica diaria. Existen diversas marcas comerciales, como por ejemplo: *Albicans* ID, y *Candida* ID-bioMérieux, Francia-, CHROMagar *Candida* –CHROMagar Company, Francia, etc [55].



**Figura. 2.12** Crecimiento de *C. albicans* en agar Biggy (Nickerson).

**Figura. 2.13** diversas colonias de *Candida* en medio CHROMagar-

#### 2.4.4 Pruebas adicionales en la identificación del laboratorio

La confirmación del diagnóstico de Candidiasis se basa en la integración de distintos métodos, a pesar de que el cultivo ha sido perfeccionado en sus técnicas y los medios utilizados generalmente se requieren de pruebas complementarias para poder así identificar correctamente al agente causal de dicha infección y confirmar así el diagnóstico.

##### **Prueba de tubo germinativo.**

Una identificación rápida y preventiva del género *Candida*, se basa en la formación de tubo germinativo (prueba de 3-4 horas) y producción de clamidosporas. Esta prueba tiene un alto grado de confiabilidad si se realiza correctamente. Se realiza en suero humano principalmente, la cepa se incuba en 0.5 ml de este durante 3-4 horas a 37°C, después se realiza una observación en fresco o con alguna tinción para corroborar. (Ver Figura 2.14).

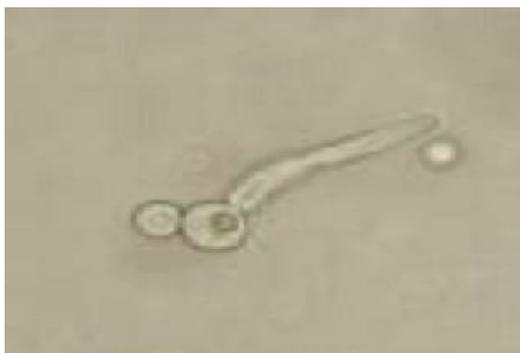
Las especies que pueden generar tubos germinativos positivos a las 4 horas de incubación son *C. albicans* y *C. stellatoidea*; en distintas especies de estas se pueden dar falsos

positivos cuando se incuban por más tiempo de las 4 horas de incubación. *C. glabrata* no es capaz de generar un tubo germinativo positivo en ninguna condición [34, 36].

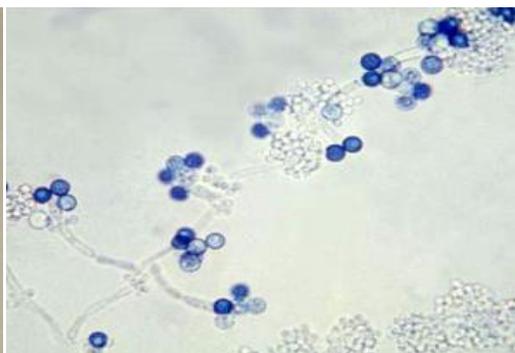
### **Producción de Clamidoconidias y Pseudomicelio.**

Esta prueba es llevada a cabo en medios de cultivo “pobres” en nutrientes y en condiciones tensas para las levaduras como el agar hecho a base de harina de maíz (más 1% de un agente tensoactivo como el Tween 80), el medio CORN-MEAL es el más utilizado para realizar esta prueba. Se siembra por estría la levadura a estudiar, colocando un cubreobjetos sobre la estría, se incuba de 25-28°C durante 72hrs, posterior a la incubación la caja se coloca sobre la platina del microscopio y se observa a 40X. La mayoría de las especies se observa formando pseudomicelio largo y ramificado (Ver Figura 2.15), a excepción de *C. glabrata*.

La especie de *C. albicans* se encuentra formando clamidoconidias, *C. stellatoidea* también llega a formar clamidoconidias múltiples, por lo que esta prueba es útil para identificar estas 2 especies, pero al igual que en el tubo germinativo se requieren pruebas más sensibles para cada una de ellas [45].



**Figura. 2.14** Tubo germinativo positivo



**Figura. 15** Cultivo agar harina de maíz con Tween 80.

### **2.4.5 Pruebas bioquímicas para la identificación de las diferentes especies de levaduras.**

La identificación de los hongos levaduriformes se basa en el estudio de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas obtenidas en el cultivo junto con los patrones bioquímicos de asimilación de azúcares. Estos métodos requieren de uno o más días para su correcta interpretación, porque emplean colonias previamente aisladas que retrasan esta identificación [46].

Para una completa identificación se emplean también pruebas de fisiología como fermentación y asimilación de carbohidratos (Zimograma y Auxonograma). Estas pruebas se realizan para identificar la cepa a nivel de especie, estas son ideales para la identificación correcta ya que disminuye el porcentaje de resultados cruzados en donde no se puede distinguir una especie de otra, estas pruebas se describen a continuación:

#### **Zimograma o test de fermentación de azúcares**

Se realiza en un medio de cultivo líquido (medio de Wickerham) implementando con una solución de un solo carbohidrato los cuales pueden ser: dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, trehalosa, entre 1-5%, incubando a 25°C, de 24-48 horas. La fermentación de carbohidratos se detecta mediante el cambio de pH, si vira el indicador, se produce ácido y la producción de gas CO<sub>2</sub> se observa en una campana de Durham [22].

#### **Auxonograma o asimilación de carbohidratos**

El fundamento de esta prueba está basado en la asimilación de carbohidratos en presencia de O<sub>2</sub>, se observa que carbohidrato puede utilizar una levadura como única fuente de carbono.

En uno de los métodos para esta prueba se utiliza un medio base sin azúcares con discos impregnados con el carbohidrato. Se forma halo si la cepa estudiada asimila el azúcar.

En otro método usado, se realiza en un medio de cultivo peptonado con el carbohidrato a estudiar incubando a 25°C, el crecimiento en el tubo significa un resultado positivo [22].

Actualmente en el mercado hay diferentes métodos comerciales para estas pruebas los cuales reducen tiempo y costos en la identificación de las distintas especies de *Candida*, con un alto porcentaje de precisión (>90%), lo cual facilita el diagnóstico. Los sistemas más comunes son: API 20C, API-Yeast-Ident y Uni-Yeast Tek System.

#### **2.4.6 Pruebas inmunológicas**

La intradermorreacción con candidina tiene su mayor utilidad en el seguimiento clínico del paciente y su pronóstico. Por el papel comensal de *Candida* existe un gran porcentaje de personas positivas a la prueba.

Las pruebas serológicas (DID, CIEF, IFI, RFC, APL, ELISA) se utilizan en candidosis sistémica y granulomatosa. Algunas pruebas pueden emplearse tanto para la búsqueda de anticuerpos como de antígenos. En el mercado se encuentra a la venta el Ensayo Inmunoenzimático Platelia™*Candida* con muy buena sensibilidad y especificidad que identifica antígeno manana-circulante de *Candida spp.*, ó anticuerpos contra esas mananas.

#### **2.4.7 Tratamiento**

El tratamiento dependerá de distintos factores como por ejemplo la localización de la infección, es decir si es superficial o sistémica, también dependerá de la especie y sensibilidad de esta a los distintos antifúngicos que se pueden utilizar; esto es lo ideal en casos de infecciones que comprometen la vida de los pacientes, en muchos casos, como la identificación en el laboratorio tarda, el tratamiento de inicio se realiza con antifúngicos de amplio espectro así hasta conocer el verdadero agente causal.

Aunque en muchos casos de Candidiasis es de mucha importancia que la identificación se realice a nivel de especie ya que esta información es utilizada tanto en epidemiología como de orientación en el tratamiento, por ejemplo *C. albicans* es sensible a los azoles mientras que *C. glabrata* presenta resistencia general a estos antifúngicos especialmente al Fluconazol [35].

### **Tratamiento para candidiasis superficiales**

Algunas infecciones de este tipo son muy fáciles de tratar basta con corregir el pH de la piel, por ejemplo: se puede utilizar vinagre blanco diluido, este puede utilizar en casos de lavados vaginales y en candidiasis del área del pañal, también se puede utilizar una solución saturada de bicarbonato de sodio, dependiendo del pH.

Para este tipo de candidiasis los fármacos más utilizados son los derivados poliénicos y los azoles en especial los imidazoles [26].

### **Tratamiento para candidiasis sistémicas**

El uso constante de las modernas tecnologías como catéteres intravasculares, es un factor de riesgo importante para los casos de candidiasis diseminada, por lo que se deben de cambiar las vías intravenosas una vez que se confirme que el paciente tiene infección por *Candida*. La duración de los tratamientos es de 2 semanas aproximadamente [33].

Entre los fármacos más utilizados para tratar a las candidiasis sistémicas están: la anfotericina B, la caspofungina, los fármacos azólicos especialmente los triazoles los fármacos de este grupo más utilizados son: Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Voriconazol y Posaconazol [27].

Es necesario corregir y controlar los factores de riesgo de la infección. Las medidas preventivas pueden ser varias entre ellas está el empleo de antifúngicos de amplio espectro para prevenir futuras resistencias a algún tipo de antimicótico [12].

### **2.4.8 Antimicóticos y el Embarazo**

Las Normas Federales para la Prevención de Infecciones Oportunistas incluyen recomendaciones acerca del uso de los medicamentos antimicóticos (contra los hongos) durante el embarazo. En pocas palabras, recomiendan que los medicamentos de la familia de los "azoles" (incluyendo el fluconazol, el itraconazol y el ketoconazol) no se empiecen a tomar durante el embarazo. Las Normas recomiendan también que dichos medicamentos

sean suspendidos si la mujer queda embarazada y que las mujeres que toman estos medicamentos utilicen medios eficaces para el control de la natalidad.

En estudios hechos sobre animales; cuando se administran dosis elevadas en ratas gestantes (40 mg/kg/día o más) y en ratones (80 mg/kg/día o más), el itraconazol ha demostrado un aumento en la incidencia de anormalidades fetales y ha producido efectos adversos en el embrión. No existen estudios disponibles sobre el uso de itraconazol en mujeres embarazadas, y se presume que riesgos similares se aplican para el uso de los otros medicamentos orales de la familia de los "azoles" [56].

## **2.5 Agentes antifúngicos**

La búsqueda de sustancias con propiedades antifúngicas data de muchos años atrás, desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasoras, las cuales han aumentado sustancialmente en las últimas décadas en relación con la aparición de la epidemia del SIDA, el uso de quimioterapia intensiva en pacientes con cáncer, el uso de fármacos antirrechazo en pacientes receptores de trasplante y la mayor utilización de dispositivos intravasculares [1].

Los antifúngicos o antimicóticos son moléculas que ayudan a luchar contra los hongos actuando a distintos niveles en la célula fúngica, ya sea una hifa o una levadura, provocando alteraciones en su estructura e inhibiendo su desarrollo o viabilidad mediante los mecanismos de acción propios de cada fármaco, de estos mecanismos va a depender su efectividad y hasta cierto grado los efectos que puede provocar en el huésped ya que en ciertas rutas metabólicas a las que actúan estos fármacos, son similares en las células de los mamíferos como el humano. [14].

El uso de sustancias con propiedades antifúngicas data de muchos años atrás, en el pasado se utilizaban sustancias como hidróxido de potasio, tintura de Veratrum, hollín de madera, azufre, mercurio, acetato de cobre, yoduros, etc. Tiempo después se comenzaron a utilizar tratamientos dirigidos específicamente al agente infeccioso como antisépticos tópicos, que incluso algunos de esos se utilizan en la actualidad como son: violeta de

genciana, permanganato potásico, tintura de yodo, solución yodo-yodurada de lugol, entre otros.

En el siglo XX se descubrieron nuevos antimicóticos efectivos, ejemplos de este tipo son: la Nistatina, anfotericina B, flucitosina, ketoconazol fluconazol y el itraconazol respectivamente, así como mejoras en las formulaciones de antifúngicos más antiguos. En la actualidad se encuentran varios fármacos nuevos en estudio los cuales cuentan con propiedades antifúngicas, se están investigando nuevos grupos que pueden traer consigo la síntesis de más y mejores antifúngicos.

### 2.5.1 Mecanismos de acción de algunos antifúngicos de uso terapéutico

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los mecanismos de acción de los diferentes fármacos antifúngicos dependen del lugar en el que actúen dentro de la célula fúngica (Ver figura 2.16), lo cual está estrechamente relacionado con la estructura química de dicho fármaco [14].

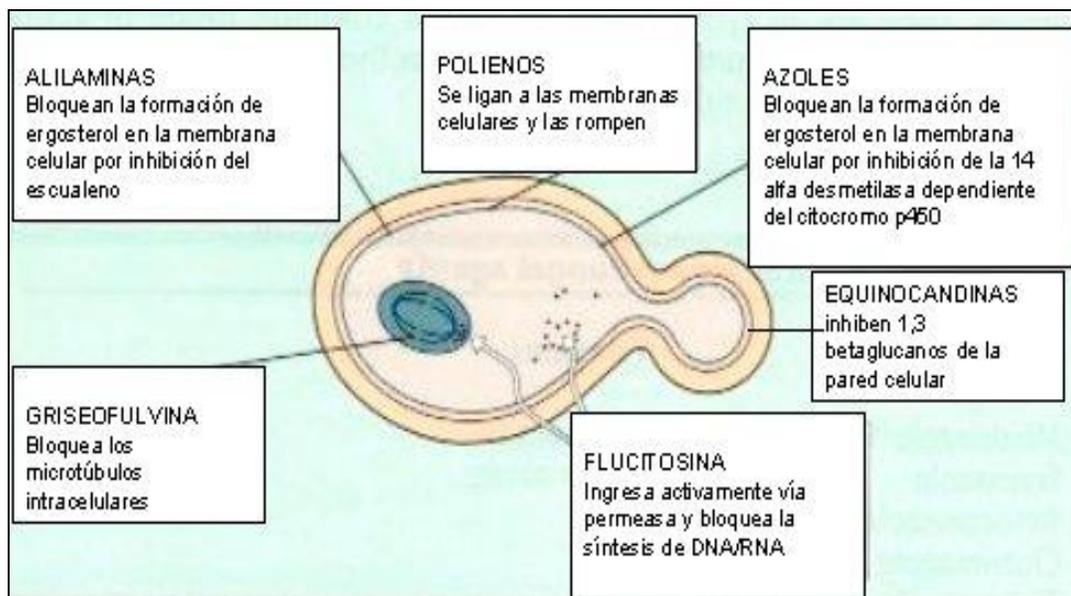


Figura. 2.16 Mecanismo de acción de los principales grupos de antifúngicos

## 2.5.2 Clasificación de los fármacos antifúngicos

Los fármacos antifúngicos incluyen una amplia variedad de sustancias con diversas estructuras químicas y distintos mecanismos de acción. La clasificación se puede realizar según criterios convencionales que atienden a su estructura, origen, espectro de acción y de acuerdo con el sitio de acción en el hongo [1, 9].

En las tablas 2.2 y 2.3 se puede observar de manera sintetizada la Clasificación de los antifúngicos de acuerdo a su estructura y la Clasificación de estos de acuerdo a su sitio de acción en el hongo, lo cual nos sirve como una introducción y así tener un bosquejo más claro de los compuestos pertenecientes a cada grupo y de los sitios de acción de cada uno de ellos.

**Tabla.2.2** Clasificación de los antifúngicos por su estructura

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

**Tabla. 2.3** Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo

<b>Antifúngicos interactuando en pared celular</b>	Lipopéptidos
<b>Antifúngicos interactuando en membrana celular</b>	Polienos, azoles, alilaminas
<b>Antifúngicos interactuando en núcleo</b>	Pirimidinas fluoradas

A continuación se describen los grupos de fármacos antifúngicos más utilizados en el tratamiento de infecciones por hongos descritas previamente, con un enfoque especial al grupo de los azoles, específicamente los triazoles los cuales fueron el objeto de estudio de este trabajo.

### **2.5.3 Polienos**

Comprende un conjunto de más de 50 antibióticos naturales resultado del antagonismo entre actinomicetos y hongos del género *Streptomyces*. Su estructura es a base de un anillo de 26 hasta 38 carbonos con un radical que puede ser un éster o una lactona interna y se clasifican en base al número de enlaces insaturados (con 7 haptenos, con 4 tetraenos etc.). Los polienos más importantes en micología son la Nistatina, natamicina y la anfotericina B.

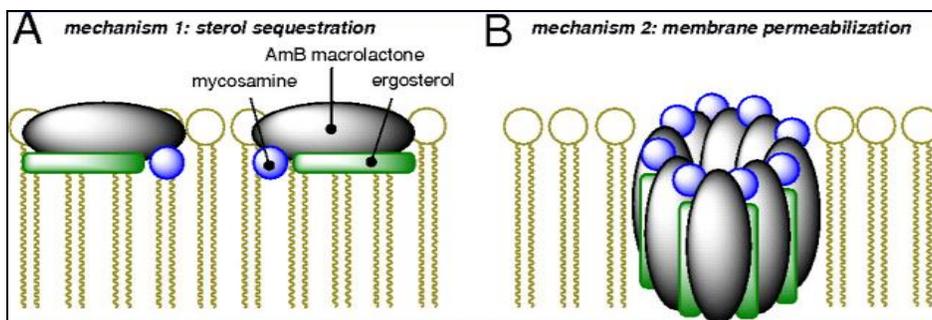
#### **Mecanismo de acción**

Este grupo actúa a nivel de la membrana fúngica y su sistema endomembranoso. El derivado poliénico tiene la capacidad de adherirse a los esteroides en particular se unen al ergosterol permitiendo la formación de poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causando lisis y muerte celular [35].

Los fármacos polienicos son de amplio espectro y hay tanto fungistáticos como fungicidas. Son utilizados para infecciones por hongos levaduriformes como *Candida* y *Cryptococcus*, así como para hongos dimorficos como *S. schenckii*. Su actividad contra los dermatofitos se alcanza a dosis toxicas clínicamente.

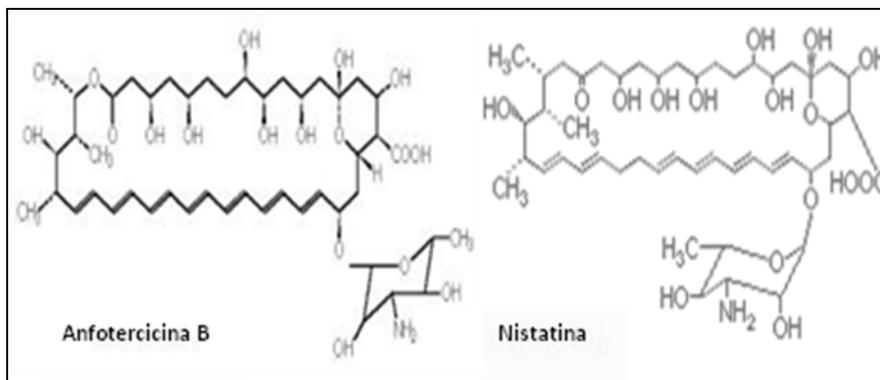
A pesar del incremento en la producción de Fármacos azólicos la Anfotericina B sigue siendo el antimicótico más importante debido a su amplio espectro y bajas tasas de resistencia.

En la figura 2.17 se observa la imagen gráfica del mecanismo de reacción de la anfotericina B.



**Figura. 2.17** Mecanismo de Acción de la anfotericina B

A pesar en el incremento de la producción de fármacos azólicos, la Anfotericina B sigue siendo el antimicótico más importante debido a su amplio espectro y a sus bajas tasas de resistencia. En la figura 2.18 se muestran los principales fármacos antifúngicos pertenecientes al grupo de los polienos.



**Figura. 2.18** Polienos

## 2.5.4 Alilaminas

Estos compuestos son de origen sintético, su estructura comprende 2 bencenos (naftaleno) y una alilamina. Los compuestos más importantes de este grupo para tratar infecciones por hongos son Naftifina y la Terbinafina. Estos fármacos tienen buena

respuesta contra los dermatofitos y una buena respuesta in-vitro contra *Candida* y *Malassezia*. Utilizado principalmente en tiñas y onicomicosis dermatofítica y en esporotricosis [35].

### Mecanismo de acción

Dentro de su mecanismo de acción trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol, produciendo membranas defectuosas con mala estructura, sin embargo este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol. Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno-epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo [9].

En general las alilaminas en tienen buena tolerancia al tratamiento por parte del organismo, en algunos casos se pueden dar efectos colaterales si su uso es prolongado.

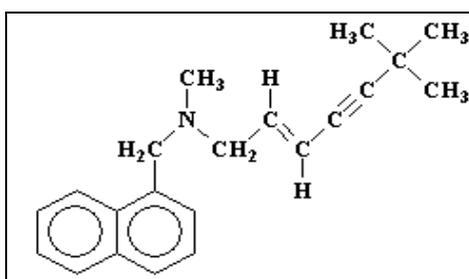


Figura. 2.19 Estructura de la Terbinafina

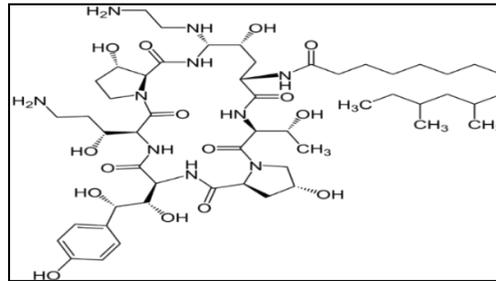
### 2.5.5 Equinocandinas

Las equinocandinas son de origen natural obtenidas de hongos como *Aspergillus nidulans* var *echinulatus* (de ahí el nombre de equinocandinas) actúan a nivel celular del hongo y no de su membrana su estructura comprende a heptapéptidos cíclicos. Las equinocandinas más importantes son Anidulafungina, Micafungina y Caspofungina [20].

## Mecanismo de acción

Estas moléculas son fungicidas y actúan inhibiendo la síntesis del 1,3- $\beta$ -glucano el cual es el principal componente de la pared celular de las especies de *Candida* y *Pneumocystis* por lo tanto su espectro se reduce a estos microorganismos [42].

Estos compuestos son muy utilizados en casos de Candidiasis pero es necesario conocer la especie involucrada ya que la dosificación varía de acuerdo a el agente aislado por ejemplo: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. Kruzei* son más sensibles a estos compuestos en dosis menores que *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi* y *C. lusitaniae*.



**Figura. 2.20** Estructura de la Caspofungina.

Algunos efectos adversos que pueden provocar este tipo de fármacos son hipersensibilidad y algunos efectos a largo plazo como vómitos, estreñimiento, náuseas y elevación de las enzimas hepáticas [20, 45].

### 2.5.6 Fluoropirimidas

Las fluoropirimidas inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y el fármaco más representativo de este grupo es la 5-fluorocitosina la cual es una pirimidina fluorada de origen sintético. La 5-fluorocitosina es un fungistático y fungicida in-vitro actúa a través de la conjugación de una serie de enzimas hasta formar un antimetabolito que interfiere con la síntesis del ARN fúngico impidiendo la correcta formación de proteínas y hasta cierto grado la replicación del ADN [35].

### **Mecanismo de acción**

La 5-fluorocitosina puede entrar en la membrana fúngica gracias a la enzima citosina permeasa, que no está presente en la célula de mamíferos, por eso es específica. Al entrar en el núcleo de la célula, esta molécula sufre modificaciones y va hacia la síntesis de ARN, pero origina 5-fluorouridina-trifosfato, o sea, genera un ARN mutante, que va a afectar la síntesis proteica, función esencial en las células. Por otra parte, puede inhibir la enzima que permite el paso de uridina a timidina, o timidilato sintetasa, porque el ADN está constituido por timidina y no por uracilo, lo que también afecta la síntesis de ADN.

Al ser un fármaco con pocos efectos tóxicos no posee muchas contraindicaciones solo se presentan casos ocasionales de daño hepático, náusea, y vómito. No es recomendable administrarse durante el embarazo o la lactancia [39].

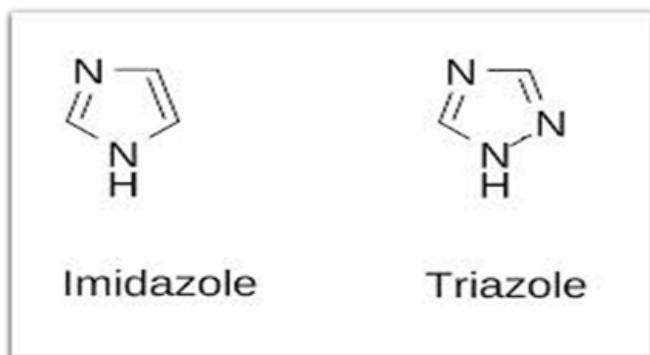
### **2.5.7 Azoles**

Los azoles son un grupo de fármacos los cuales fueron descritos desde la década de los 40's y su mecanismo de acción fue detallado hasta la década de los 50's, pero fue hasta la década de los años 70's que se comenzaron a utilizar de manera terapéutica con altas expectativas en cuanto a su espectro y actividad ya que se utilizaban de manera prácticamente empírica (benzimidazol). Se fue comprobando su perfil de tolerancia relativa lo cual hasta en nuestros días les ha otorgado un lugar privilegiado en lo que se refiere a la elección en el tratamiento de las enfermedades micóticas [20].

### **Estructura**

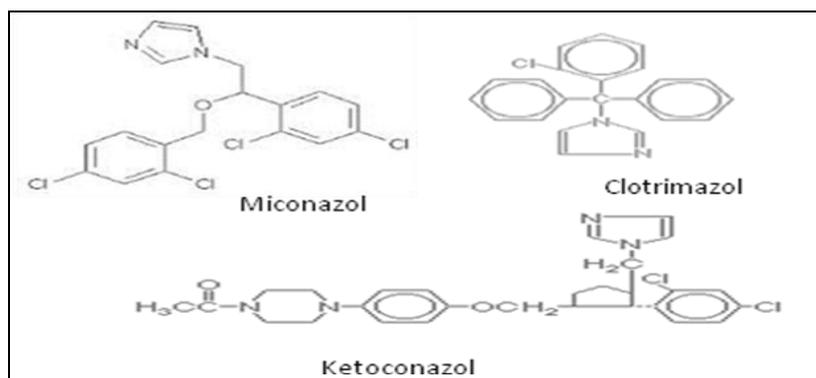
Es la familia de antifúngicos más utilizada y estudiada. Los azoles son un grupo de heterociclos que derivan del pirrol por sustitución de uno de los grupos =CH por un átomo de nitrógeno y se dividen estructuralmente en su anillo base como Imidazoles y Triazoles unidos mediante un enlace C-N a otros anillos aromáticos o radicales. Los anillos azólicos son los que condicionan sus propiedades fisicoquímicas y por consiguiente sus parámetros como toxicidad, índice terapéutico, espectro y sobre todo comportamiento

farmacocinético. Los imidazoles más representativos son el Miconazol, Clotrimazol, y Ketoconazol; y los triazoles más importantes son Itraconazol, Fluconazol, Voriconazol y Posaconazol [52].



**Figura. 2.21** Estructura Química de los Imidazoles y Triazoles.

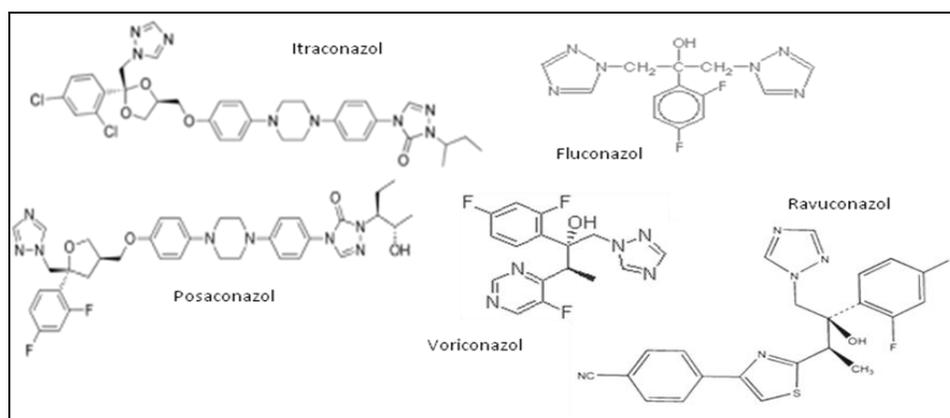
Los imidazoles fueron los primeros en ser utilizados para fines terapéuticos pero se comprobó que tanto el Miconazol, como el Clotrimazol poseían perfiles farmacocinéticos desfavorables para el organismo y se limitó su uso solo por vía tópica con la excepción del Ketoconazol que fue el único imidazol que cumplió los parámetros para ser utilizado por vía sistémica.



**Figura. 2.22** Imidazoles

Los triazoles fueron introducidos como moléculas con mejores espectros de acción y con mayores perfiles de seguridad tales como el Itraconazol y el Fluconazol (un bis-triazol), que han marcado la ruta para la síntesis de nuevas moléculas, ya que el Voriconazol es similar en estructura al Fluconazol y el Posaconazol lo es con el Itraconazol [18]. Los fármacos de este grupo (triazoles) son los que más se utilizan hoy en día para tratar las infecciones micóticas sistémicas.

Desde sus inicios este grupo de fármacos comenzó a llamar la atención por ser de amplio espectro, con excelente actividad para casi todos los dermatofitos y para las diferentes especies de *Candida* tales como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*. *Aspergillus sp*, *Fusarium* y *Sporothrix Schenckii* presentan susceptibilidad intermedia, en los casos de *C. Krusei* y algunos agentes causantes de mucormicosis los cuales son considerados resistentes a la mayoría de los compuestos azólicos de este grupo, a excepción del Posaconazol con el cual se han evaluado in-vitro obteniendo buenos resultados.



**Figura. 2.23** Triazoles

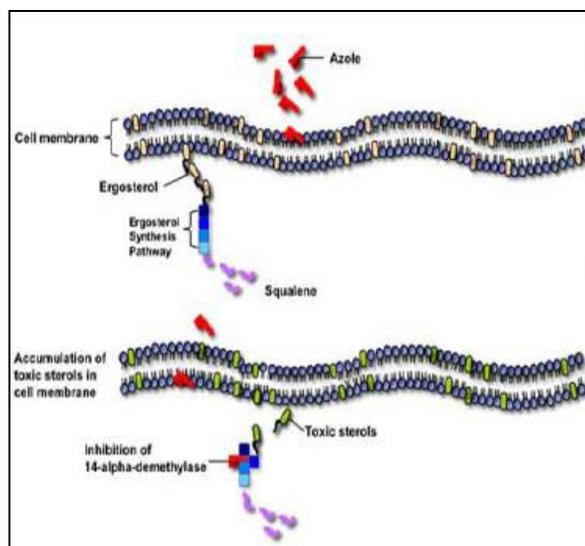
### Mecanismo de acción de los azoles

Tanto los imidazoles como los triazoles actúan inhibiendo a la enzima 14- $\alpha$ -desmetilasa del Lanosterol, dependiente del Citocromo P-450-oxidasa alterando así la síntesis del

ergosterol en la membrana celular Inclusive en algunos casos se inhibe la acción de la enzima C-22-desnaturasa, la cual actúa en el siguiente paso de la síntesis del ergosterol.

Con la síntesis del ergosterol disminuida se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, la permeabilidad de la membrana se ve alterada y defectuosa, disminuyendo así la cantidad de proteínas ligadas a ella e implicadas en la formación de la pared celular llevando a un acumulo de metabolitos tóxicos (peróxidos) lo cual conduce a un daño intracelular y la posterior muerte de la célula [14].

A nivel molecular el principal punto de actuación lo constituye el citocromo P-450 Erg 11, que cataliza la oxidación y posterior pérdida del grupo 14- $\alpha$ -metilo del lanosterol (actividad P-450-monooxigenasa). Esta proteína contiene protoporfirina férrica localizada en el sitio activo de la misma, los antifúngicos se fijan al átomo de hierro con el nitrógeno ya sea del imidazol o del triazol; por lo tanto la interacción entre la molécula azólica y la del citocromo P-450 será la que determine la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento del hongo. El sitio activo mencionado previamente difiere en la localización de las distintas especies de hongos y es muy similar a las monooxigenasas de los mamíferos [35].



**Figura. 2.24** Mecanismo de los Compuestos Azólicos

## **Uso sistémico y metabolismo de los compuestos azolicos**

Como se mencionó anteriormente el único imidazol utilizado vía sistémica y para el tratamiento de micosis profundas es el Ketoconazol ya que el clotrimazol causa daño hepático y el miconazol poseía mala absorción oral teniendo que utilizarlo por vía parenteral con un solvente también causante de varios efectos adversos [43].

Los azoles que poseen escasa solubilidad son Ketoconazol, Itraconazol y Posaconazol, siendo su absorción dependiente del pH gástrico por lo que el uso combinado con inhibidores de la bomba de protones y antihistamínicos H<sub>2</sub> reduce esta propiedad. Por el contrario el Fluconazol y Voriconazol, los cuales son hidrosolubles presentan excelente biodisponibilidad sin que haya interferencias por alimentos o por valores de pH.

Todos los azoles tienen afinidad en distinto grado por las proteínas plasmáticas, marcando así su paso por las diferentes barreras biológicas del organismo.

## **Interacciones y efectos adversos**

Los azoles debido a su mecanismo de acción presentan interacciones con fármacos que se metabolizan por la vía del citocromo P-450, dado que inhiben este complejo enzimático retardando el metabolismo de los otros fármacos modificando por consiguiente su farmacocinética.

También debido a la afinidad hacia proteínas plasmáticas se debe tener cuidado el administrarlos junto con fármacos inmunomoduladores, anticonvulsivantes, anticoagulantes etc. Ya que estos pueden incrementarse en el plasma en forma libre teniendo resultados contrarios a los esperados o incluso nulos.

Los fármacos azolicos generalmente son bien tolerados por el organismo, inclusive más que la anfotericina B, los efectos adversos más documentados son referentes a malestares gastrointestinales como vómitos, dolor y alteración del ritmo intestinal, es posible presentar episodios de cefalea, mareos, así como elevaciones transitorias de las enzimas hepáticas cuando se usan prolongadamente.

## 2.5.8 Resistencia

En los últimos años, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, lo cual es atribuible a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria o secundaria [50]. Existen diferentes tipos de Resistencia entre los cuales se encuentran:

**Resistencia Intrínseca:** en este tipo ningún miembro de la especie es sensible a un antifúngico (insensibilidad a la droga).

**Resistencia Primaria:** una cepa perteneciente a una especie normalmente sensible al antifúngico, posee una resistencia natural al mismo sin necesidad de haber estado en contacto con el compuesto.

**Resistencia Secundaria:** una cepa previamente sensible adquiere resistencia al antifúngico tras haber entrado en contacto con este.

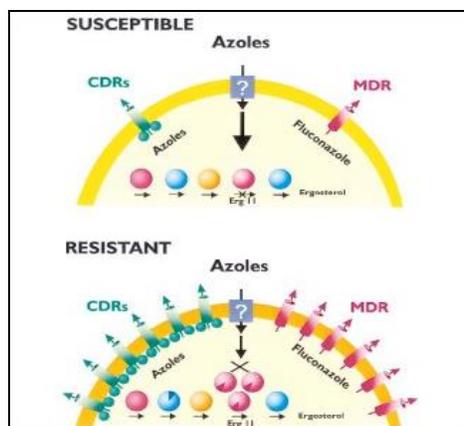
### **Resistencia a los Azoles**

El hecho de ser fungistático se relaciona directamente con la capacidad de desarrollar resistencia secundaria, porque siempre quedan poblaciones que no mueren con el fármaco y comienzan a generar mecanismos para defenderse de este fármaco. En cuanto a los mecanismos de resistencia, el gen ERG11 codifica para la enzima blanco de los azoles; por tanto, uno de los mecanismos de resistencia del hongo es mutar este gen. No se trata forzosamente de mutaciones por estar en contacto con el fármaco; se sabe que ciertas poblaciones de *Candida albicans* normalmente van sufriendo cambios, pero cuando surge una presión de selección, estos cambios se aceleran y surgen algunas poblaciones que se defienden mejor contra el agente.

Otro mecanismo de defensa consiste en modificar la diana mediante alteraciones genéticas que aumentan la expresión del gen o lo amplifican, o efectúan conversión o recombinación mitótica, que son mecanismos más complejos, pero lo importante es que pueden aumentar la producción del lanosterol y competir con el antimicótico.

Además, en todas las células eucariontes y bacterias existen transportadores o bombas de flujo, que son proteínas relativamente conservadas en todas las especies y, frente a determinados tóxicos, son capaces de expulsarlos al exterior de las células (Ej: existe una bomba de expulsión de azoles). Estas estructuras se encontraron al analizar células de pacientes que no respondían a quimioterapia y se determinó que pertenecen al grupo de transportadores ABCT, codificados por los genes CDR. El gen MDR1 codifica para una proteína de la familia de los facilitadores principales, un tipo de bomba que aparece en la membrana celular.

Para que las mutaciones causen resistencia, tienen que ocurrir en sitios activos de la enzima, es decir, en los sitios de unión con el antimicótico; constituyen las llamadas mutaciones hot (calientes), que ocurren donde se produce el efecto in vitro. Por otra parte, para determinar si un gen se expresaba más, se midió el ARN mensajero del gen de las bombas de flujo o del ERG11, usando como control ARN ribosomal, que siempre se está expresando en una cantidad constante; se vio que, en algunas cepas cuya concentración inhibitoria mínima estaba aumentada, se sintetizaba más ARN mensajero para estos genes.



**Figura. 2.25** Modelo de resistencia secundaria a azoles (*Clin Microbiol Rev*, 1998; 11: 382-402).

En el modelo de resistencia secundaria que se ve en la Figura 2.31 se observa que el fármaco azólico entra en la célula y un número reducido de bombas lo exportan hacia

afuera, pero el fármaco logra llegar a la enzima blanco, la 14- $\alpha$ -lanesterol desmetilasa. Cuando la administración del tóxico es constante, el hongo sintetiza más ARN mensajero, se sobreexpresan las bombas y comienza a expulsar la droga hacia afuera, pero además puede mutar el ERG11; en distintos estudios se ha tratado de ver cuál es el mecanismo determinante, y no se ha logrado observar predominancia de alguno; en general, todos están funcionando.

### **Recomendaciones para el uso de los fármacos antifúngicos**

El principal problema de los antifúngicos, al igual que los antibióticos, es la gran posibilidad de aparición de resistencias a los mismos por parte de los pacientes objeto de su uso. Por ello en la mayoría de los hospitales se elaboran protocolos y guías de uso de antifúngicos con la doble finalidad de curar la enfermedad lo antes posible y evitar la aparición de nuevas resistencias. De igual manera, y como norma general, la mayoría de los organismos estatales responsables del control de los medicamentos de uso humano tienen elaboradas guías de prescripción en antibioticoterapia. El uso racional de los antifúngicos, y de los antibióticos en general, es una responsabilidad de todos.

## **2.6 Pruebas de sensibilidad a antifúngicos**

El aumento creciente de infecciones fúngicas y la aparición de resistencia a los antimicóticos, han hecho necesario el desarrollo de métodos estandarizados para la determinación de la susceptibilidad antifúngica. Tales métodos deben ser reproducibles y adaptables a un laboratorio asistencial, de manera que permitan la detección de resistencia "*in vitro*", la cual, en la mayoría de los casos, suele correlacionarse con una evolución clínica desfavorable. Tanto el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), como el European Committee for Antimicrobial Susceptibility (EUCAST) Testing han desarrollado guías para la medición estandarizada de la sensibilidad de varias especies de hongos a los antimicóticos actuales [31].

En la actualidad, la emergencia de resistencia antimicótica se debe, principalmente, al reciente aumento de especies con resistencia natural y a la selección de cepas resistentes

durante la terapia antimicótica. Para enfrentar este reto es necesario entender los mecanismos de resistencia antifúngica, además de realizar el aislamiento microbiológico de los microorganismos patógenos, junto con pruebas de sensibilidad antifúngica.

Tiempo atrás las pruebas de sensibilidad no estaban justificadas debido a las pocas opciones terapéuticas que existían en aquel entonces, a medida que se iban introduciendo en el mercado nuevos fármacos se volvió necesaria la realización de estas pruebas con el fin de comparar las distintas actividades de los mismos y detectar posibles apariciones de resistencia.

El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI antes NCCLS), realizó un estudio en 1985 donde cuestiono a los distintos laboratorios si realizaban pruebas de susceptibilidad antifúngica y de ser así cómo es que las realizaban, los resultados arrojaron que pocos laboratorios las realizaban y su metodología variaba en muchos aspectos. En 1992 se publicó en Estados Unidos el primer documento estándar internacional para susceptibilidad de levaduras basado en un método de macrodilución en caldo (adaptado posteriormente a microdilución). Este documento (denominado M27-A) fue aprobado en 1997 para estudiar especies de *Candida*, hongos filamentosos y en determinados puntos de corte permite medir las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) (definida como concentración mínima de un antimicótico expresada en g/ml, que inhibirá o reducirá el crecimiento de un moho o levadura in vitro de las principales especies de levaduras oportunistas [*Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*]). En 2008 se publicó el documento M27-A3, en el que se incluyen valores de CMI de Voriconazol, Ravuconazol y Posaconazol para cepas de Control de Calidad. Para facilitar la realización de pruebas de susceptibilidad en los laboratorios clínicos en el año 2003 el comité estandarizó el método de difusión en disco (documento M44-P) que fue aprobado en 2004 (M44-A).

Cabe destacar que en 2003 aparecieron otra clase de estándares tratando de mejorarlos dados anteriormente por el CLSI siendo los más importantes los publicados por un

estándar europeo llamado EUCAST, Ambos estándares, tienen una alta reproducibilidad intra e interlaboratorio y diferencian poblaciones con CIM's bajas y altas. Este trabajo fue basado en los estándares propuestos por el CLSI [2].

### **2.6.1 Documento M44–A método de difusión en placa**

Las pruebas en medio sólido y en especial las de difusión son simples de realizar y los resultados se obtienen de forma rápida, siendo, en teoría, muy fáciles de interpretar. Sin embargo, en este punto hay que ser muy estrictos, pues si las técnicas no se realizan siguiendo rigurosamente las instrucciones sugeridas por los fabricantes, es posible que se obtengan resultados erróneos.

El principio de este método se fundamenta en colocar un disco impregnado con el fármaco a evaluar sobre una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo problema, el fármaco se difunde de manera radical a través del agar, produciendo un gradiente de concentración del fármaco. Si el antifúngico en cuestión inhibe el crecimiento del microorganismo se observara un halo alrededor del disco, cuanto mayor sea el diámetro del anillo mayor será la susceptibilidad del microorganismo.

El diámetro del anillo dependerá de factores como la concentración inicial del antifúngico, de su solubilidad, y su velocidad de difusión a través del agar, por lo tanto este método no es útil para comparar directamente la eficacia de 2 antifúngicos distintos [53]. En este método se recomienda el uso de Agar Mueller-Hinton con 2% glucosa y 0,5 µg/ml Azul de Metileno (pH 7.2-7.4). La utilización del azul de metileno disperso en la superficie de la placa mejora los límites de la zona de inhibición y facilitar la lectura.

Para la preparación del inóculo se parte de un cultivo de 24 h, en Agar Sabouraud dextrosa a 35 (± 2° C), de este cultivo, se tocan cinco colonias y se suspenden en 5 ml de solución salina estéril (8.5 g/L NaCl; 0.85%). El resultado de la suspensión se homogeneiza durante

15 segundos, y su turbidez se ajusta a 0,5 de la escala McFarland o midiendo en el espectro a 530 nm esta solución es equivalente a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

Se sumerge un hisopo de algodón estéril en el inóculo. El exceso de líquido es eliminado girando el hisopo varias veces contra las paredes interiores del tubo. El inóculo se extiende por toda la superficie de la placa 3 veces seguidas. En cada repetición, se gira la placa 60°, de forma que se asegure la distribución uniforme del inóculo. Se deja secar 5 minutos y se colocan los discos de antifúngico a evaluar con la ayuda de unas pinzas estériles, se incuba a 35°C durante 24 horas en el caso de *Candida* y se miden los diámetros de la zona de inhibición en mm y se evalúan en comparación con los estándares ya definidos. Si a las 24 horas no hay suficiente crecimiento se puede leer a las 48 horas, *C. glabrata* y *C. krusei* pueden necesitar 48 horas de incubación [5].

### **Interpretación de resultados**

Con el método de difusión no se puede determinar una CIM ya que únicamente se mide el diámetro del halo de inhibición. Por tanto, se establecieron las siguientes categorías:

Sensible, Intermedio/Sensible dependiente de dosis, Moderadamente sensible, Resistente

Estas categorías están basadas en los puntos de corte que se establecieron mediante el método de dilución en caldo, las concentraciones séricas que el antibiótico alcanza en suero y la distribución de las CIMs para la especie estudiada.

### **2.6.2 Métodos comerciales**

#### **Método Sensititre Yeast One Y09**

El método comercial cuyo formato se asemeja más a la metodología del CLSI es el Sensititre® YeastOne (TREK Diagnostic Systems). Ha sido aprobado por la FDA y se basa en la microdilución en caldo, pero con un sustrato cromogénico para facilitar la interpretación de la CIM. El medio utilizado es el RPMI (MOPS) + 1,5% glucosa, pH 7±0,1, Indicador colorimétrico (Alamar Blue), el Inóculo  $1,5 - 8 \times 10^3$  UFC/ml, se incuba a 35 °C

durante 24 horas. La lectura se hace mediante el cambio de color (rosa ® azul) y no por turbidez.



**Figura. 2.26** Placa del método Sensitre® YeastOne. Hay un vire del color azul al color rosa dependiendo si hay crecimiento o inhibición de la levadura.

### **Vitek 2 yeast susceptibility test (bioMerieux, Inc.)**

Actualmente se encuentra disponible en el mercado un método automatizado para determinar la CIM, Vitek 2® (Biomérieux), que utiliza una lectura espectrofotométrica, lo cual facilita la lectura de la CIM. Tiene la ventaja de encontrarse acoplado a la identificación de levaduras. Un estudio multicéntrico reveló un alto nivel de reproducibilidad de los resultados y una concordancia de 93,7 a 97,9% con el método de dilución en caldo. Además, los resultados pueden obtenerse a partir de las 10 hasta las 26 horas de incubación.

Este método tiene una Concordancia con Sensitre de 91-97% para AnfB, 5FC, ITZ y 82% para FZ. En general concordancia más baja para azoles que Sensitre. Es un equipo completamente automatizado. Confiable para 5FC y voriconazol en *Candida* spp. Cautela en *C. glabrata* y Fluconazol.

### **Método del e-test**

Es uno de los métodos más utilizados debido a su fácil implementación y lectura. Actualmente se encuentra aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para susceptibilidad in vitro de *Candida* spp contra fluconazol e itraconazol. Involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, lo cual permite

determinar la CIM. Luego, la placa se incuba a 37 °C por 24-48 hrs y se genera una elipse de inhibición que permite obtener la CIM a partir del punto de intersección entre la zona de inhibición y la escala de valores de CMI en la tira. Este método se ha utilizado en levaduras y en hongos filamentosos y mide la CIM a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, fluocitosina, voriconazol, posaconazol y caspofungina.

### **2.6.3 Pruebas de sensibilidad por dilución**

Constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad in vitro, tanto de levaduras (M27-A3) como de hongos filamentosos (M38-A2) y miden CIM a distintos fármacos antifúngicos, como anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como voriconazol, posaconazol y ravuconazol.

Se pueden realizar en formas tanto de macrodilución (en tubo) como de microdilución (en placa 96 pozos). Las condiciones son similares en cualquiera de las 2 formas y solo varían en cuanto a tiempos de lectura. El medio de cultivo óptimo para estas pruebas es el RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Sigma Aldrich) ajustado a un pH de 7.0 + 0.1 y con 0.2% de glucosa.

### **2.6.4 Métodos de dilución en caldo para levaduras (M27-A3)**

En los antifúngicos solubles en agua (Fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina) se debe preparar una solución, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración al menos 10 veces superior a la concentración más alta de antifúngico. En los antifúngico insolubles en agua (anfotericina B, anidulafungina, itraconazol, ketoconazol, posaconazol, ravuconazol, voriconazol) se pesan para obtener una concentración 100 veces superior a la concentración final utilizando como diluyente Dimetil Sulfóxido (DMSO).

Se recomienda seguir el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua. Para el caso de los antifúngicos solubles en agua las concentraciones a ensayar están comprendidas entre 64 y 0.12  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la final, usando el medio RPMI-1640 como diluyente. Seguidamente se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128  $\mu\text{g/ml}$  a 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ). A los tubos controles de esterilidad y crecimiento se les adiciona solamente 5 ml de medio RPMI, al de crecimiento se le adiciona el inóculo sin agente antifúngico.

En el caso de antifúngicos insolubles en agua se realizan las mismas diluciones seriadas para obtener concentraciones a ensayar entre 16-0,03  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de la solución madre se preparan las soluciones con una concentración 100 veces mayor a la final deseada pero utilizando DMSO como diluyente.

Seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100  $\mu\text{l}$  de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32  $\mu\text{g/ml}$  - 0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) y la de DMSO, 2%. El tubo de control estéril contiene 5 ml de RPMI-1640 y el tubo de control de crecimiento contiene 4.9 ml de RPMI más 0.1ml de DMSO, ambos sin contener el antifúngico a evaluar.

En ambos casos las soluciones comprenden un total de 10 tubos de los cuales se incorporan 100 $\mu\text{l}$  de cada uno de estos a los pocillos de la placa del 2-11 de manera decreciente, ilustrado en la figura de abajo. En los pozos 1 y 12 se colocan los controles de esterilidad y crecimiento respectivamente.

Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convenientemente con una bolsa de plástico o con papel de estaño, para evitar la evaporación, y se congelan a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o bien a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso y tendrán la misma fecha de caducidad que el fármaco a evaluar.

### **Preparación del inóculo**

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

### **Inóculo para *Candida* spp.**

Se prepara tocando con el asa de cultivo de 2 a 5 colonias de 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina.

Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$ ). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de  $0,5 \times 10^3$  -  $2,5 \times 10^3$  [19].

### **Inoculación, incubación y lectura de la placa**

La placa debe encontrarse a temperatura ambiente, descongelada en caso de haberlo estado previamente, se inoculan con 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12. La columna nº 1 que contiene 200  $\mu\text{l}$  de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. También sirve para leer la absorbancia del medio. La columna nº 12 no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos. Las placas se incuban a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

### **Control de pureza del cultivo**

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

### **Lectura Visual**

La lectura se realiza de manera visual con la ayuda de un espejo invertido:

- Azoles, Equinocandinas y 5-fluorocitosina (fungistáticos); la CMI es la concentración más baja del antifúngico que produzca una inhibición en el crecimiento de la levadura > 50% comparado con el control de crecimiento.
- Anfotericina B (fungicida); la CMI es la concentración más baja del antifúngico que inhibe totalmente el crecimiento de la levadura comparado con el control de crecimiento.

### **Lectura espectrofotométrica**

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

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

### **2.6.5 Método de macrodilución**

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

solubles como insolubles en agua se realizan igual que en el método de microdilución y se reparten en alícuotas de 0.1 ml y se diluyen 1:10 añadiendo a cada tubo 0.9 ml de RPMI previamente inoculado.

Para el método de macrodilución el inóculo se prepara realizando una suspensión de la misma manera pero la dilución de la solución inicial será de 1:200 en medio RPMI (concentración final  $0.5 \times 10^3$ - $2.5 \times 10^3$  UFC/ml), la cual se utiliza para inocular los tubos.

La inoculación se realiza a 35°C y la lectura se hace visualmente a las 24 horas comparando la turbidez de los tubos con la del control de crecimiento (0.2 ml del tubo control más 0.8 ml de RPMI inoculado). La CMI de los azoles, 5-fluorocitosina y equinocandinas es la concentración a la que se produce una inhibición > 80% y de la Anfotericina B la concentración a la cual se inhibe el crecimiento al 100% respecto al control [19].

### **2.6.6 Consideraciones especiales**

Los fármacos a evaluar deberán ser sustancias valoradas por los laboratorios productores, en caso de no poseerlos se utiliza un preparado comercial para la administración intravenosa. La lectura de las CMI en los azoles suele ser una fuente de variabilidad tanto intra como interlaboratorios en ocasiones es complicada ya que se mantiene cierto crecimiento en las concentraciones superiores a las CMI's es a lo que se le llama "cola de crecimiento" (Trailing) y generalmente se presenta en especies del género *Candida*.

### **2.6.7 Puntos de corte para determinar sensibilidad en *Candida***

Dentro de la tabla 2.4 se reportan los puntos de corte establecidos por el CLSI en los documentos M27-A3 para levaduras del género *Candida* mostrando algunos de los principales antifúngicos utilizados en el tratamiento de las micosis.

**Tabla. 2.4** Determinación de puntos de Corte para *Candida spp.*

Intervalo de las CMI's ( $\mu\text{g/ml}$ ) en <i>Candida</i>			
Antifúngico	S	SDD	R
Fluconazol	$\leq 8$	16-32	$\geq 64$
Itraconazol	$\leq 0,12$	0,25-0,5	$\geq 1$
5-fluorocitosina	$\leq 4$	-----	$\geq 32$
Voriconazol	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Equinocandinas	$\leq 2$	-----	$\geq 2$

Los casos específicos de *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* poseen rangos de CMI's establecidas por el CLSI para Itraconazol dentro de los cuales se denominan como sensibles (S), o resistentes (R) los cuales son:

C. parapsilosis 0.12 – 0.5  $\mu\text{g/ml}$

C. krusei 0.12 – 1  $\mu\text{g/ml}$

### Interpretación de los resultados

Un valor de CIM sin una correlación clínica tiene poco valor. En el caso de las infecciones fúngicas, los factores del hospedero juegan un papel muy importante en la respuesta a tratamiento. Por otra parte, la susceptibilidad in vitro no siempre predice el éxito del tratamiento y no siempre la resistencia in vitro se asocia a falla en el tratamiento. Esto ha dificultado el establecimiento de puntos de corte.

### Recomendaciones para el estudio de susceptibilidad antifúngica

La realización de estas pruebas tiene indicaciones precisas:

- Efectuar estudios de vigilancia epidemiológica que permitan conocer los perfiles de susceptibilidad y resistencia de cepas clínicas, aisladas principalmente de infecciones invasoras en un país o zona geográfica.

- Determinar el nivel de resistencia frente a nuevos compuestos con actividad antifúngica.
- Predecir la respuesta clínica y optimizar la terapia de pacientes hospitalizados que no responden al tratamiento, que presentan infecciones fúngicas invasoras o en los que se aíslan cepas con alta tasa de resistencia a fármacos antifúngicos (Ej. *C. glabrata* y fluconazol).

# Capítulo 3: Parte Experimental

## 3.1 Hipótesis

Los triazoles al igual que los imidazoles poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas especies de levaduras del género *Candida*. Si los 5 compuestos a evaluar son sometidos al procedimiento estándar propuesto por el CLSI en las pruebas de susceptibilidad “*in vitro*” por microdilución, y al ser derivados del triazol deberán actuar como antifúngicos e inhibir el crecimiento micológico bajo condiciones determinadas.

## 3.2 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica “*in-vitro*” de 5 derivados de triazol empleando las técnicas de microdilución en placa propuesto por el CLSI documentos M27-A3 para levaduras del género *Candida* y determinar su Concentración Mínima Inhibitoria.

### 3.2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente las levaduras provenientes de los hospitales de Toluca.
- Determinar la concentración Mínima Inhibitoria de los 5 compuestos derivados del triazol.
- Determinar la incidencia de levaduras resistentes, *Candida albicans* y otras especies
- Determinar si alguna especie de *Candida* presenta resistencia a alguno de los 4 compuestos o si cualquiera de estos presenta mejor susceptibilidad comparada con el control Itraconazol.

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Identificación y mantenimiento de las Cepas en Estudio

Se utilizaron 100 cepas de levaduras pertenecientes al género *Candida* y diversas especies como *albicans*, *kruzei*, *glabrata*, *guilliermondi*, *parapsilosis* y *tropicalis* usando como cepa control *Candida albicans* ATCC-10231, dichas cepas pertenecientes al Laboratorio 9 de Microbiología de la Facultad de Química de la UAEM.

Estas cepas fueron obtenidas de pacientes asociados a infecciones nosocomiales, durante su estadía en los principales Hospitales de Toluca.

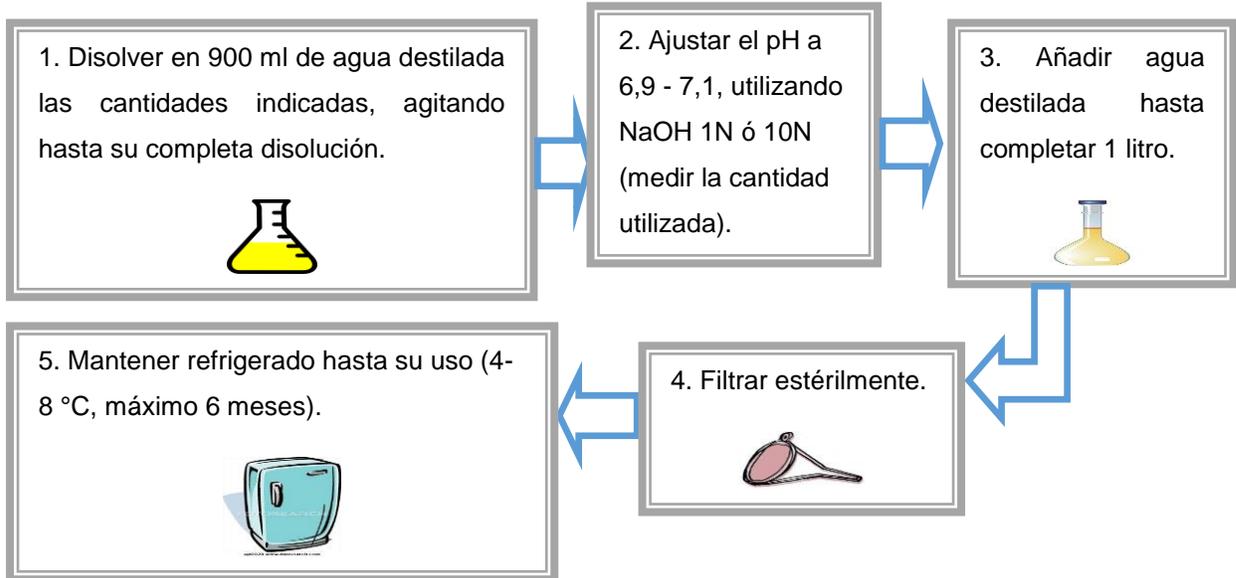
Las cepas de Levaduras fueron propagadas y aisladas en medio Sabouraud, una vez aisladas también se realizó el cultivo en el medio CHOMagar (BD DIBICO) para dar una orientación presuntiva sobre la especie de la levadura implicada y apoyar en la correcta identificación de la especie mediante el vire de color, y el crecimiento y textura de cada una de las especies de *Candida*, obteniendo resultados altamente confiables; posteriormente se realizó el tubo germinativo para diferenciar entre positivo y negativo a *Candida albicans*. Algunas cepas las cuales estaban pendientes de identificar, se les realizaron pruebas como zimograma y auxonograma, para poder identificarlas a nivel especie.

#### 3.3.2 Preparación del medio de cultivo RPMI-1640

##### Componentes del medio

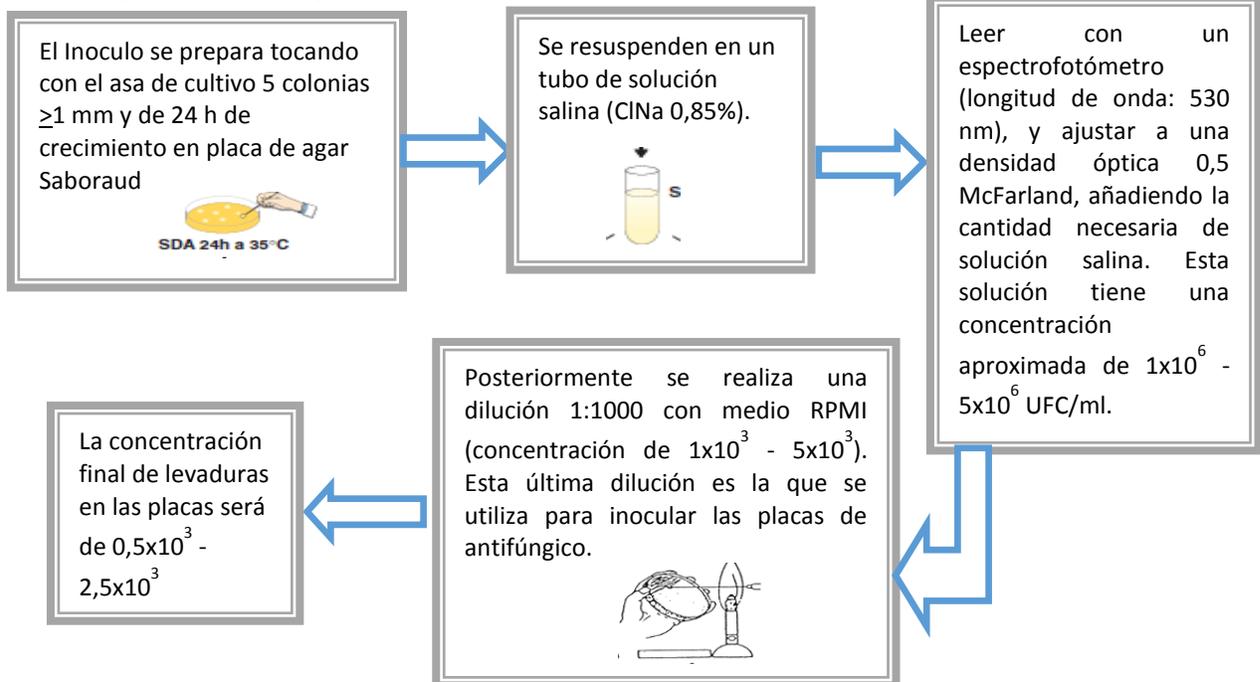
RPMI 1640 . . . . .	10,40 g
Tampón MOPS. . . . .	34,53 g
Agua destilada. . . . .	1000 ml

### 3.3.3 Preparación del medio RPMI-1640.

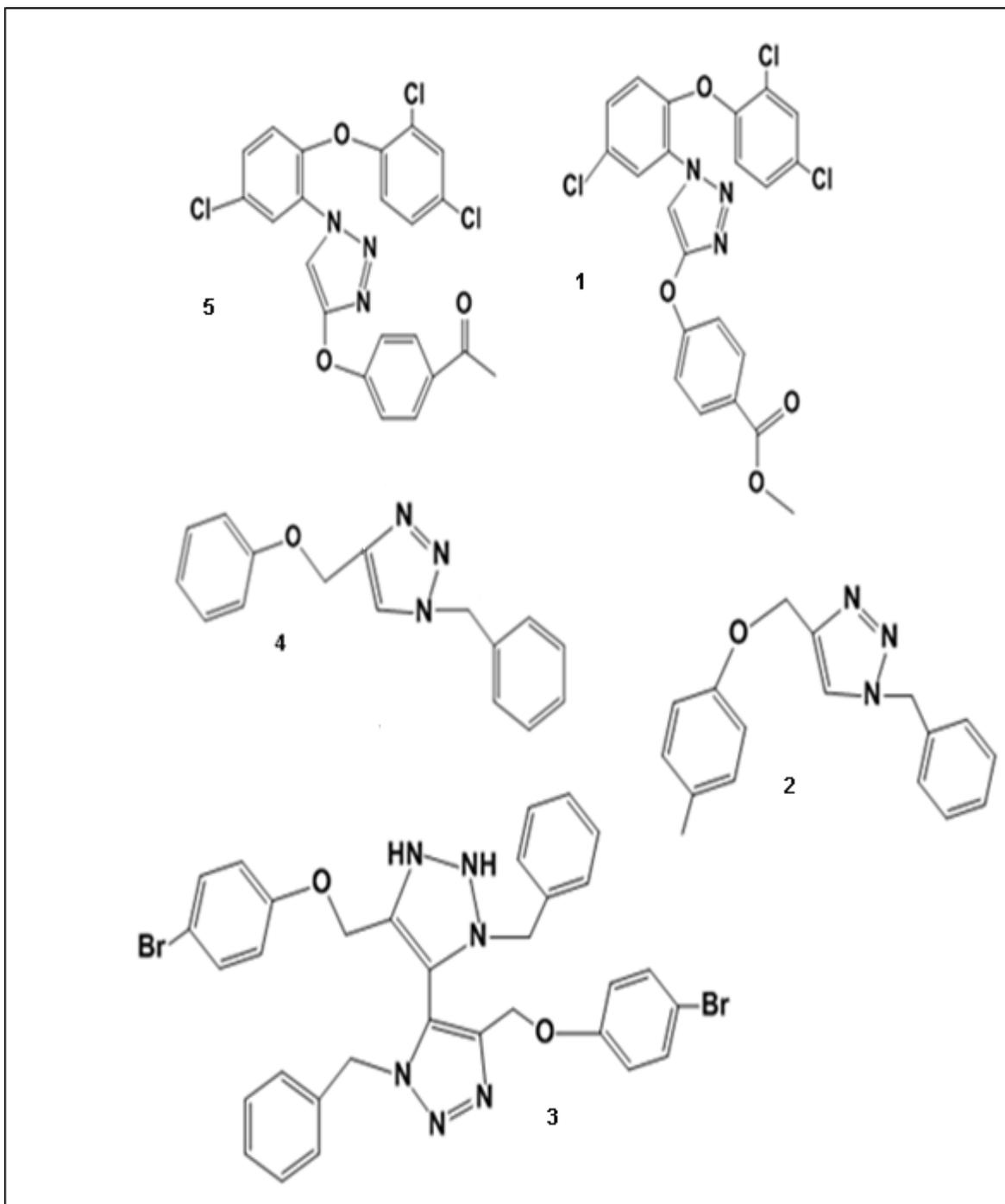


### 3.3.4 Preparación del Inoculo

#### Inoculo para *Candida spp.*



### 3.3.5 Compuestos evaluados obtenidos en el CCIQS- UAEMex

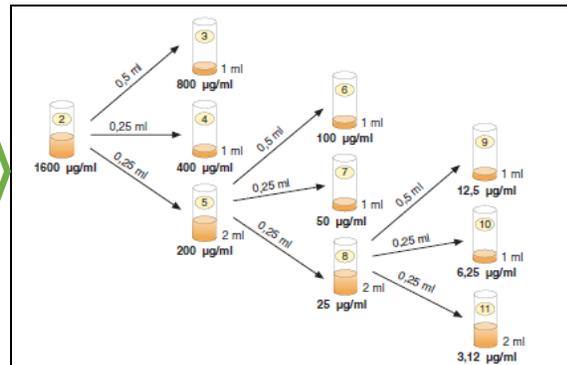


**Figura. 3.1** Compuestos sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica por el Dr. Erick Cuevas Yáñez y Cols. En el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable de la UAEMex (CCIQS).

### 3.3.6 Preparación de la solución madre y diluciones de los antifúngicos

Los derivados de triazol evaluados son insolubles en agua por lo cual se siguió la metodología del CLSI documento M27-A3 para antifúngicos insolubles en agua, utilizando Dimetil Sulfoxido (DMSO) como disolvente.

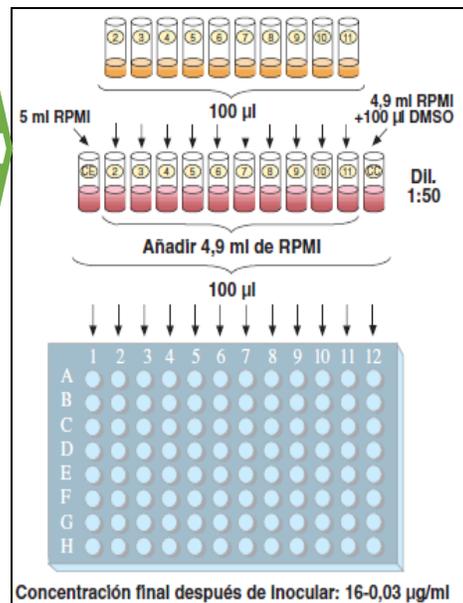
1. La solución madre se prepara, pesando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1,600 µg/ml y se disuelve en dimetil sulfoxido (DMSO). Se reparte en alícuotas de 1,1 ml y se realiza la dilución doble seriada según la metodología del CLSI.



Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración final	Tubo
No. 2	1600 µg/ml	0.5 ml	0.5 ml de DMSO	800 µg/ml	No. 3
No. 2	1600 µg/ml	0.25 ml	0.75 ml de DMSO	400 µg/ml	No. 4
No. 2	1600 µg/ml	0.25 ml	1.75 ml de DMSO	200 µg/ml	No. 5
No. 5	200 µg/ml	0.5 ml	0.5 ml de DMSO	100 µg/ml	No. 6
No. 5	200 µg/ml	0.25 ml	0.75 ml de DMSO	50 µg/ml	No. 7
No. 5	200 µg/ml	0.25 ml	1.75 ml de DMSO	25 µg/ml	No. 8
No. 8	25 µg/ml	0.5 ml	0.5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	No. 9
No. 8	25 µg/ml	0.25 ml	0.75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	No. 10
No. 8	25 µg/ml	0.25 ml	1.75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	No. 11

2. seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfiere a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, posteriormente se inocula 100µl de cada tubo en las placas de manera decreciente es decir, del contenido del tubo nº 2 se toman 100 µl y se llenan los pocillos de la columna nº 2, se puede utilizar una pipeta multicanal y así llenar los pocillos (2A - 2H), y así hasta el tubo No. 11).

Los pocillos de la columna nº 12 se llenan con 100 µl de RPMI + DMSO. Los pocillos de la columna nº 1 se llenan con 200 µl de RPMI (control de esterilidad). Las placas se congelan hasta el momento de su uso.



### 3.3.7 Incubación y Lectura de las placas

El día del ensayo se descongelan las placas de antifúngico en la cual cada pocillo tiene 100µl, se prepara el inóculo de la levadura como se especifica en el apartado 3.3 y se inoculan con 100µl de este, posteriormente se incuban las placas a 35°C durante 24 horas.

La lectura se puede hacer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), también puede leerse a 490 y 530 nm ya que la CMI no varía.

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

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

## Capítulo 4: Resultados y Discusión

Se utilizaron 100 cepas de levaduras del género *Candida* debidamente identificadas hasta nivel especie y se realizaron las pruebas de sensibilidad in-vitro bajo la metodología descrita anteriormente. Las cepas incluidas en el estudio fueron: *C. albicans* (68), *C. tropicalis* (11), *C. glabrata* (5), *C. parapsilosis* (9), *C. guilliermondi* (4), *C. krusei* (3), y como control la cepa *Candida albicans* ATCC 10231.

Cada una de las cepas de fueron evaluadas con los 5 compuestos derivados del triazol; así como, el control itraconazol. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas de acuerdo con los criterios establecidos recientemente por el CLSI donde se recomienda que la lectura se realice a las 48 horas; no obstante a las 24 horas los resultados mostraron una buena definición en la lectura tanto espectrofotométrica como visual sin manifestar cambios después de ese tiempo, lo que permite definir la confiabilidad y mejorar la correlación clínica para no realizar lecturas equivocadas a causa del fenómeno del “trailing” lo cual en su defecto incrementaría la CMI.

### 4.1 Resultados de las pruebas de sensibilidad para *Candida*

En las tablas siguientes (4.1-4.5), se muestran las CMI's obtenidas de las 100 cepas de levaduras frente a los 5 compuestos evaluados, así como al Itraconazol. La lectura espectrofotométrica se realizó a 490 nm después de 24 horas de Incubación.

Las cepas marcadas con un asterisco son las cepas que en las que dentro de su morfología presentaban un aspecto de aterciopelado y se puede observar que dichas cepas tienen CMI mayores en comparación con las demás especies de levaduras inclusive frente al Itraconazol.

En la tabla 4.1 se muestran cepas de levaduras frente a los 5 compuestos así como al Itraconazol, en esta tabla se encuentra reportado la sensibilidad de la cepa control *Candida albicans* ATCC-10231

**Tabla 4.1 Determinación de las CMI's de *Candida* a las 24 horas (en µg/ml)**

Cepa	<i>Candida albicans</i>																			
	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13	14	15	16	17	18	19
C. 1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.25	0.5	.062	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
C. 2	0.25	0.5	0.5	1.0	0.25	1.0	0.25	0.5	0.25	0.5	1.0	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5
C. 3	0.5	0.25	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	0.25	0.5	0.25	0.5	1.0	0.25	0.5	1.0
C. 4	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25	0.5
C. 5	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.5	0.12	0.25	0.25	0.5	0.5	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	.062	0.12	0.12
ITZ	.062	.062	.062	0.12	.062	0.25	.062	.062	.062	.062	0.5	.062	.062	0.12	.062	0.12	.062	0.12	.062	0.12

\*Cepas que presentaban dentro de su morfología macroscópica colonias con aspecto aterciopelado. C=Compuesto

**Tabla 4.2 Determinación de las CMI's de *Candida* a las 24 horas (en µg/ml)**

Cepa	<i>Candida albicans</i>																			
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37*	38	39
C. 1	0.5	0.12	0.25	0.12	.062	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.5	0.5	0.25
C. 2	0.5	0.5	1.0	1.0	0.25	0.5	0.5	2.0	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	1.0	0.5
C. 3	0.5	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.5	0.25	0.5	0.5	1.0	0.25	0.25	1.0	0.5	0.5	1.0	2.0	1.0	0.5
C. 4	1.0	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25
C. 5	0.25	0.25	0.12	0.25	0.12	0.5	0.12	0.25	.062	0.12	1.0	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.25	0.5	0.12
ITZ	0.5	0.12	0.12	0.12	.062	0.12	.062	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	.062	0.12	0.12	0.12	0.12

\* Cepas que presentaban dentro de su morfología macroscópica colonias con aspecto aterciopelado. C=Compuesto

**Tabla 4.3 Determinación de las CMI's de *Candida* a las 24 horas (en µg/ml)**

Cepa	<i>Candida albicans</i>																			
	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49*	50*	51	52	53	54	55	56	57	58	59
C. 1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.25	0.25	0.25	0.12	0.25	0.5	0.12	0.12
C. 2	0.25	0.5	1.0	0.5	0.25	0.5	0.5	2.0	0.5	1.0	2.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	1.0	0.5	1.0	0.5
C. 3	0.5	1.0	1.0	0.25	0.5	1.0	0.5	0.25	0.5	2.0	1.0	0.25	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	2.0	1.0	0.12
C. 4	0.25	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	1.0
C. 5	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.25	0.5	0.25
ITZ	0.12	0.12	0.12	0.12	.062	0.12	0.12	0.25	0.25	0.5	0.25	0.12	0.25	0.12	0.12	.062	0.12	0.12	0.25	0.12

**Tabla 4.4 Determinación de las CMI's de *Candida* a las 24 horas (en µg/ml)**

Cepa C	<i>Candida albicans</i>									<i>Candida tropicalis</i>										
	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
C. 1	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
C. 2	0.5	0.5	0.5	2.0	1.0	1.0	2.0	0.5	0.5	0.12	0.5	0.5	2.0	0.12	0.5	0.25	0.5	0.5	1.0	0.5
C. 3	0.5	1.0	0.5	0.25	0.5	2.0	1.0	0.25	1.0	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
C. 4	0.5	0.5	0.5	1.0	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25
C. 5	0.12	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.25	0.25	0.25	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12
ITZ	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	0.5	0.25	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.062	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12

\* Cepas que presentaban dentro de su morfología macroscópica colonias con aspecto aterciopelado. C=Compuesto

**Tabla 4.5 Determinación de las CMI's de *Candida* a las 24 horas (en µg/ml)**

Cepa C	<i>C. glabrata</i>				<i>C. parapsilosis</i>									<i>C. guilliermondi</i>				<i>C. kruzei</i>			
	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
C. 1	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25	.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25	0.25	0.25	0.12
C. 2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.25	1.0	0.5	0.25	0.5	1.0	0.5	0.5
C. 3	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25	0.25	0.12	0.5	1.0	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
C. 4	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25
C. 5	0.12	0.25	0.12	0.25	0.5	0.12	0.12	.25	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25	0.5	0.12	0.5	0.25	0.12	0.25
ITZ	0.12	0.12	0.12	0.25	0.25	0.12	0.12	.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25	0.12	0.12	0.25

## 4.2 Promedios de la CMI por especie

En la tabla 4.6 se reportan los promedios de las CMI's por especie de las levaduras del género *Candida*, cabe destacar que los promedios del compuesto 1 y del compuesto 5 se asemejan en algunas especies de *Candida*, a los reportados del control Itraconazol, lo cual nos indica que dichos compuestos se encuentran dentro de los estándares de sensibilidad (S) y sensibilidad dependiente de la dosis (SDD), aceptables por el CLSI documentos M27-A3.

**Tabla 4.6 Promedio de las CMI's por especie de *Candida* ( $\mu\text{g/ml}$ )**

Cepa \ Compuesto	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondi</i>	<i>C. Krusei</i>
Compuesto 1	0.16	0.12	0.17	0.16	0.18	0.2
Compuesto 2	0.69	0.59	0.45	0.36	0.75	0.66
Compuesto 3	0.67	0.45	0.6	0.34	0.56	0.5
Compuesto 4	0.42	0.40	0.40	0.5	0.43	0.25
Compuesto 5	0.24	0.17	0.24	0.16	0.24	0.16
Itraconazol	0.14	0.12	0.14	0.13	0.18	0.16

En la tabla 4.7 se reporta la sensibilidad (S) y sensibilidad dependiente de la dosis (SDD) de las levaduras del genero *Candida* de acuerdo al promedio de las CMI's de cada especie de levaduras, cabe resaltar que de acuerdo a los promedios ninguna especie es resistente a algún compuesto evaluado.

**Tabla. 4.7 Promedio de la sensibilidad por especie de *Candida***

Cepa \ Compuesto	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondi</i>	<i>C. Krusei</i>
Compuesto 1	S	S	S	S	S	S
Compuesto 2	SDD	SDD	SDD	S	SDD	S
Compuesto 3	SDD	SDD	SDD	S	SDD	S
Compuesto 4	SDD	SDD	SDD	S	SDD	S
Compuesto 5	S	S	S	S	S	S
Itraconazol	S	S	S	S	S	S

S=Sensible; SDD=Sensible dependiente de la dosis; R=Resistente

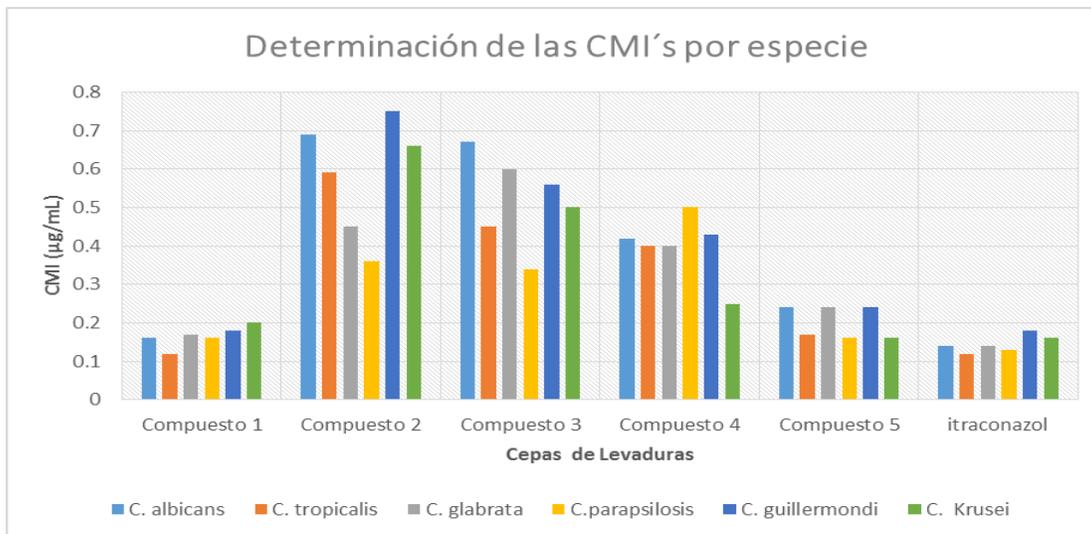
En la tabla 4.8 se muestran los limites Inferior y Superior de los valores de CMI obtenidos por las diferentes especies de levaduras del genero *Candida*, en algunos compuestos se pueden ver que los rangos son cercanos, por otro lado hay rangos que son más amplios que van  $0.12\mu\text{g/ml}$  a  $2\mu\text{g/ml}$ , como lo es el caso del compuesto 3 frente a *Candida albicans*.

Tabla. 4.8 Límites Inferior y Superior de CMI's por especie de *Candida*

Cepa Compuesto	<i>C. Albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. guilliermondi</i>		<i>C. Krusei</i>	
	Compuesto 1	0.062	0.5	0.12	0.12	0.12	0.25	0.12	0.25	0.12	0.25	0.12
Compuesto 2	0.25	2	0.12	2	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	1	0.5	1
Compuesto 3	0.12	2	0.25	0.5	0.5	1	0.12	0.5	0.25	1	0.5	0.5
Compuesto 4	0.25	1	0.2	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25
Compuesto 5	0.062	1	0.12	0.25	0.12	0.5	0.12	0.25	0.12	0.5	0.12	0.25
Itraconazol	0.062	0.5	0.062	0.25	0.12	0.25	0.12	0.25	0.12	0.25	0.12	0.25

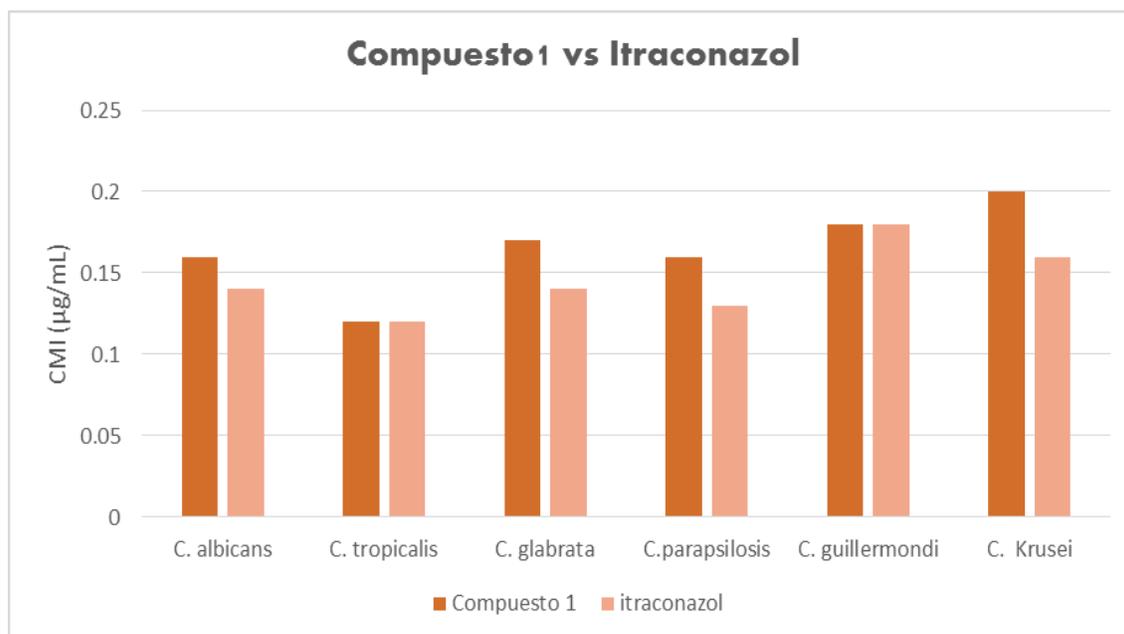
## 4.5 Análisis de resultados

Los 5 compuestos evaluados presentan sensibilidad (S) y sensibilidad dependiente de la dosis (SDD) conforme los criterios establecidos por el CLSI, las moléculas que presentan mejor actividad son los compuestos 1 y 5 obteniendo CMI's en casos particulares semejantes o cercanos al Itraconazol, las moléculas 2, 3 y 4 también tenían actividad biológica pero esta no fue tan buena en comparación con los compuestos 1 y 5; al comparar CMI's se llega a la conclusión de que la mejor molécula evaluada es el compuesto 1 al tener mejor actividad biológica que los demás sustancias, teniendo un efecto similar y en algunos casos mejor que el Itraconazol.



**Gráfica. 4.1** Representación de las CMI's determinadas por especie

En la gráfica 4.1 se muestran las diferentes CMI's obtenidas mediante los métodos de Sensibilidad propuestos por el CLSI, de cada una de las especies de levaduras, es interesante que las moléculas 1 y 5 derivados triazolicos tienen mejor actividad que los demás compuestos comparándolos con el Itraconazol.

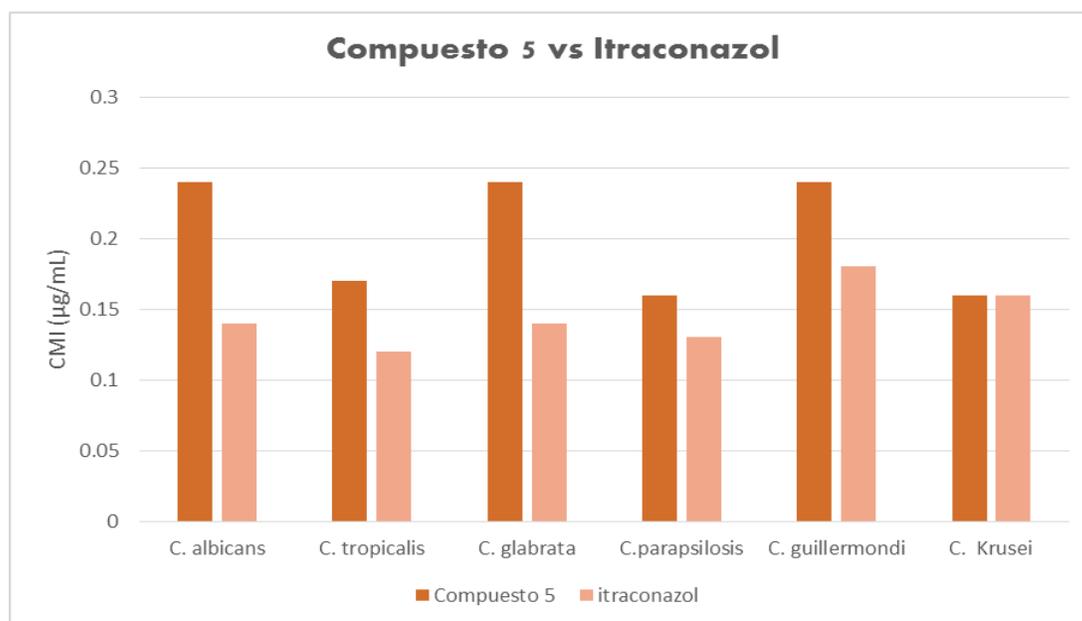


**Gráfica. 4.2** Comparación del Compuesto 1 frente al Control Itraconazol

Es importante determinar cuál de los compuestos evaluados tiene una actividad similar al Itraconazol, y revisar cuáles son sus puntos de corte para comprobar si determinadas cepas de levaduras obtenidas de pacientes (sanos, diabéticos, multitratados etc.), son sensibles o resistentes a este tipo de compuestos triazólicos.

En la gráfica 4.2 se muestra que el Compuesto 1, tiene buena actividad y en algunas especies de *Candida* como *C. tropicalis* y *C. guilliermondi* similar al control Itraconazol. Mientras especies de levaduras como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, la actividad del compuesto 1 es significativamente cercana a la actividad del control Itraconazol.

En las tablas anteriores podemos apreciar que el Compuesto 1 tiene una CMI en promedio de 0.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la mayoría de las especies de, lo cual indica que el compuesto evaluado es bueno y se encuentra dentro de los rangos de sensibilidad *in-vitro* reportado en el CLSI para levaduras, por lo que sigue siendo similar en cuanto a efectividad comparado con el Control Itraconazol.



**Gráfica. 4.3** Comparación del Compuesto 5 frente al Control Itraconazol

En la gráfica 4.3 se muestra que el compuesto 5 posee buena actividad antifúngica y que la mayoría de las CMI's obtenidas por este compuesto se encuentran dentro de los rangos de sensibilidad marcados por el CLSI, es decir no pasan de 0.24 aunque sus rangos sean más amplios; en la mayoría de los casos siguen siendo sensibles, pero por otro lado estos rangos se acercan más a los puntos de corte donde se encuentra el rango de la sensibilidad dependiente de la dosis como lo es la CMI de 0.25 µg/ml reportada por el CLSI.

En la gráfica 4.3 se muestra que la actividad del compuesto 5 es cercana al Itraconazol en *C. parapsilosis* y *C. Krusei*, en las demás especies de levaduras se determinó que la sensibilidad de estas dependerá de la dosis del compuesto que se administre.

Todas las cepas evaluadas a excepción del control *Candida albicans* ATCC-10231, fueron provenientes de muestras clínicas principalmente asociadas a pacientes con Infección Nosocomial, lo cual nos puede dar una amplia perspectiva de cómo pueden comportarse las levaduras del género *Candida* en la práctica clínica, por lo que las cepas resistentes no deben descartarse del todo ya que estas tienen más probabilidad de aparecer en pacientes comprometidos inmunológicamente.

## 4.6 Discusión de Resultados

Con los resultados obtenidos en las pruebas para las distintas especies de *Candida* se puede observar que el comportamiento es característico en cada especie para cada uno de los compuestos problema comparados con el control Itraconazol, el cual cumplió con los rangos de CMI para estas especies de *Candida*, aplicando la metodología estándar propuesta por el CLSI documentos M27-A3, y poder así predecir el comportamiento de estas nuevas moléculas en desarrollo, precediendo que el diseño de su síntesis va por buen camino ya que se puede apreciar notoriamente que el compuesto 1 y el compuesto 5 tienen buena actividad antifúngica frente al Itraconazol.

Los compuestos 1 y 5 presentaron buenos resultados de CMI en comparación a las demás moléculas evaluadas ya que, en las 6 especies estudiadas de levaduras las CMI's se

encontraron dentro de los rangos de sensibilidad (S) establecidos por el CLSI, al comparar las moléculas 1 y 5 en cuanto a efectividad frente al itraconazol, el mejor de estos compuestos fue el 1 ya este presentaba CMI's cercanas y en algunos casos similar al itraconazol, mientras que el compuesto 5 presentaba CMI's más amplias acercándose a una Sensibilidad dependiente de la dosis (SDD) en *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. guilliermondi*. (ver tabla 4.6).

Las moléculas 2, 3 y 4 fueron sensibles (S) a una especie y sensible dependiente de la dosis administrada (SDD) en las demás especies de levaduras. Lo cual indica que el compuesto 1 y en algunos casos el compuesto 5 pueden llegar a ser tan buenos como un fármaco comercial aplicándolos a una correcta dosis terapéutica, no sin antes haber hecho estudios previos de toxicidad, farmacocinética, farmacodinamia, entre otros.

Los compuestos 1 y 5 al ser derivados del triazol presentan cierta similitud al Itraconazol en su estructura, es interesante que estas moléculas presenten dentro de sus grupos funcionales la presencia de un halógeno como lo es en este caso el Cloro (Cl), debido a esto, se podría plantear un posible mecanismo para estos compuestos; su acción será semejante a la de los azoles [14], inhibiendo la síntesis del ergosterol, liberando el halógeno y estableciendo puntos de reconocimiento sobre la membrana celular del hongo, aumentando la permeabilidad de esta y ocasionando la inmediata destrucción de este.

Según Carrillo Muñoz et al. (2001). durante la revisión de la actividad biológica de nuevas estructuras describe que el hallazgo de nuevas moléculas antifúngicas requiere un conocimiento exhaustivo de las dianas potenciales para minimizar el riesgo tanto de los efectos adversos como de las resistencias. La ausencia de actividad de dichas moléculas estaría explicada por la falta de dianas en las células, la modificación de esas dianas o bien la inestabilidad del antifúngico a las mismas, la destrucción activa o bien la expulsión del antifúngico.

Las cepas que están marcadas con asterisco (\*) dentro de las tablas (4.1-4.5), fueron las que mostraron un cambio en su morfología, mientras que frente a los compuestos como 2, 3 y 4 presentaban una notable resistencia, o en su defecto dependencia de una mayor dosis de dicho compuesto; la resistencia de algunas cepas de levaduras hacia algunos de los compuestos puede estar asociado con la morfología de las colonias de levaduras que después de 3 o 4 días comenzaban a tener un aspecto aterciopelado, este comportamiento puede asociarse a factores de virulencia, al provenir de paciente multitratados y presentar resistencia a más fármacos.

No se ha establecido correlación entre la sensibilidad *in-vitro* y la respuesta clínica, así como no se han publicado puntos de corte interpretativos que puedan orientar al clínico sobre la resistencia o sensibilidad de un hongo a determinado medicamento; aun cuando las CMI's no predicen la respuesta clínica, la presencia de microorganismos resistentes puede ser un factor indicador de falla en el tratamiento instaurado.

Un valor de CIM sin una correlación clínica tiene poco valor. En el caso de las infecciones fúngicas, los factores del hospedero juegan un papel muy importante en la respuesta al tratamiento. Por otra parte, la susceptibilidad *in-vitro* no siempre predice el éxito del tratamiento y no siempre la resistencia *in vitro* se asocia a falla en el tratamiento. Esto ha dificultado el establecimiento de puntos de corte.

El desarrollo de métodos estandarizados constituye un gran avance en la terapia de infecciones fúngicas sobre todo aquellas que comprometen la vida de un paciente. En la actualidad están reportados ya los puntos de corte para varios antifúngicos de uso terapéutico, y para levaduras aisladas de pacientes multitratados generalmente pacientes inmunosuprimidos.

Es necesario seguir a detalle la metodología propuesta por el método estandarizado, en este caso la del CLSI, ya que algunas veces en esta prueba pueden verse afectada la

determinación de una correcta CMI por detalles como el tamaño del inóculo, el tiempo y la temperatura de incubación, medio de cultivo preparado adecuadamente en este caso RPMI-1640 ya que es un medio que proporciona un óptimo crecimiento para las cepas a probar, al que no presentar interferencia con los agentes antifúngicos a evaluar.

Considerando el alto impacto en términos de morbi-mortalidad que implican este tipo de infecciones, es fundamental la creación de programas de vigilancia epidemiológica en los distintos centros hospitalarios, que permitan tener el registro de cómo han ido evolucionando este tipo de enfermedades y también poder conocer los tratamientos que hayan experimentado mayor fracaso terapéutico.

## Capítulo 5: Conclusiones

Las moléculas de triazoles de nueva síntesis muestran una buena actividad biológica como antifúngico.

Las Infecciones Nosocomiales continúan siendo un problema de salud pública, que requiere para su control establecer acciones en los programas transversales que involucren a todas las instituciones e incluyan al personal de salud.

Uno de los principales factores de riesgo en la aparición de las Infecciones Nosocomiales es el uso prolongado de dispositivos invasivos (catéter central, urinario, entre otros), y el mantenimiento no adecuado de dichos dispositivos.

Es necesario el uso constante de técnicas de microdilución en la práctica hospitalaria para determinar la sensibilidad "*in vitro*" de diversos fármacos antifúngicos y así tener una mejor correlación de los datos obtenidos en el laboratorio con la evolución clínica de los pacientes.

## 5.1 Recomendaciones

Los estudios a futuro se deben encaminar hacia establecer y validar los puntos de corte para todos los antifúngicos disponibles en el mercado ya que así como la síntesis de nuevos fármacos progresa, también se puede incrementar la aparición de nuevas resistencias hacia dichos agentes antifúngicos.

A pesar de que estos 5 compuestos han demostrado buena efectividad biológica *“in vitro”*, en las cepas de *Candida* provenientes de infecciones nosocomiales, aun no pueden ser utilizados en la terapia antifúngica por lo que se sugiere llevar a cabo estudios *“in vivo”* orientados a determinar la toxicidad, farmacocinética, farmacodinamia de los compuestos para determinar si son aptos para el uso como agente terapéutico

## Bibliografía

- [1] Arenas, E. (2005). Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. *Rev Ciencia y Trabajo*. 15(1):52-67.
- [2] Bossche, H. (1997). Mecanismos de resistencia Antifúngica. *Rev Iberoamericana de Micología*. 14:44-49.
- [3] Cardo, D., Dennehy, P.H., & Halverson, P. (2010). Moving toward elimination of healthcare-associated infections: A call to action. *Revisión. Journal Infect* 38: 671-679.
- [4] Carrillo-Muñoz, A. J., & Tur, C. (1997). Resistencia In vitro al Fluconazol e Itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida spp* y *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14, 50-54.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Reference Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast; Approved document M44-A2 (2da ed, Vol.29 No. 17). Pennsylvania, USA: PA Wayne: CLSI.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard document M27-A3 (3a ed., Vol. 28 no. 14). Pennsylvania, USA: PA Wayne: CLSI.
- [7] Cortéz, J. (2006) Impacto de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en pacientes con cáncer. *Revisión. Revista Colombia Cancerología*. 10 (3): 183-196.
- [8] Cuenca, M. & Rodríguez J. (2002) ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?. *Revisión. Revista Iberoamericana de Micología*. 19: 133-138.
- [9] Diomedí, A. (2004). Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Rev Chilena Infectol*; 21(2):89-101.
- [10] Duarte, C., Pulido, N., Rivas, P. & Cols (2010). Comparación de Métodos de Microdilución CLSI M27-A2 y EUCAST en aislamientos de *Candida spp*. en pacientes con cáncer. *Revisión. Revista Infection*. 14: 107-115.
- [11] Gadea, I., Cuenca-Estrella M, Martín E. (2007). Microbiological procedures for diagnosing mycoses and for antifungal susceptibility testing. *Enferm Infecc Microbiol Clinical*. 25(5):336-340.
- [12] Gadea, I., Cuenca-Estrella M.(2004). Guidelines for fungal diagnoses and antifungal sensitivity studies. *Enferm Infecc Microbiol Clinical*. 22(1):32-9.

- [13] Gobernado, M. (2005). Betalactamasas de espectro extendido en aumento. Revisión. Revista española de quimioterapia. 18 (2): 115-117.
- [14] Gregori, V. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm 39(2).
- [15] Groll, A., Kolve, H. (2004). Antifungal agents: in vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
- [16] Haley, R., Quade, D. (1980). Project Study on the efficacy of nosocomial infection control (SENIC Project). American Journal of Epidemiology, Vol 111, Issue 5 472-485.
- [17] Hernández, H., Córdova, E., Manzano, P., López, R. (2003). Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. En Salud Pública Méx. Vol. 45(6):455-460.
- [18] Johnson, E.M., Szekely, A., Warnock, D.W. (1998). *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. J Antimicrob Chemother: 42:741-5.
- [19] Lacasa, E. & Mazuelos, E. (2007). Metodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A, M44-A). Revista Iberoamericana de Micología. 15:1-17.
- [20] Leshner, J. (2003). Antimicrobial drugs. Journal. L. Bologna, Dermatology.
- [21] Manzano, P. Méndez, L. Hernández, F. ( 2008). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. Gac Méd Méx Vol. 144 No. 1.
- [22] Marx, R.E. (2003). " Oral and maxillofacial pathology : a rationale for diagnosis and treatment", Quintessence Publishing, Chicago, USA.
- [23] Olivares, L.R. (2005). Organismos Emergentes y resurgentes en micología médica. México: Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Medicina de la UNAM.
- [24] Rex , J. H., Pfaller, M. A., Walsh, T. J., Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., et al. (2001). Antifungal susceptibility testing: practicaspects and current challenges. Clin Microbiol Rev; 14: 643-58.
- [25] Rex, J., Pappas, P.G., (2003). "Guidelines for treatment of candidiasis". IDSA Guidelines.
- [26] Sanabria, A., Bonifaz, A. & Saúl, A. (1990). Terbinafina en el tratamiento de las micosis superficiales. Rev. Méx. de Dermatología, 34 (3): 189-198.
- [27] Vázquez, J.A., Sobel, J.D. (2002). Mucosal Candidiasis. Infect Dis Clin N Am. 16: 793-820.

- [28] Viudes, A., Gobernado, M. (2002). Correlación entre las pruebas de sensibilidad in vitro a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con Candidiasis y Criptococosis. *Revista Española de Quimioterapia*, 15(1).
- [29] Walsh, T.J., Dixon, D.M. (1996). «Deep Mycoses». En Baron S et al. eds.. *Baron's Medical Microbiology* (4th edición). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- [30] WHO. (2005). Guidelines for the diagnostics, prevention and control of dermatophytosis.
- [31] Zapata, F. Cardona, N. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med* 26(1): 71-83.
- [32] Arenas, R. (2011). *Micología Medica Ilustrada* (4ta ed.). Mexico Mc Graw Hill.
- [33] Betts, R. F. & Cols. (2004). *Enfermedades Infecciosas* (1ª ed.). Madrid España: Marbán.
- [34] Bonifaz, A. (2010). *Microbiología Medica Basica*. (3ª ed.). Mexico Mc Graw Hill.
- [35] Brunton, L. L., Lazo, J.S. & Parker, K.L. (2008). Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México. Mc Graw Hill.
- [36] Castrejon, O. V. (2009). *Introducción a la Micología Médica*. Mexico D.F. Mendez Editores.
- [37] Catalan, M. & Montejo J.C. (2006) *Farmacos Antifúngicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. Revisión*. *R Iberoamericana de Micología* 23: 39-49.
- [38] Davise, H.L (2002). *Medical Important fungi, a guide to Identification*.
- [39] Fernández, L. & Moreno, A. (2010). *Farmacología Básica y Clínica*.
- [40] Henry, J.B. (2010). *Laboratorio en el Diagnostico Clínico*. Madrid Marban.
- [41] Huerta, E.R., Cepeda, L.A. (2008). *Patología General e Inmunología*. México D.F. Editorial Trillas.
- [42] Katzung, B. G. (2005). *Farmacología Basica y Clínica*. México. El manual moderno.
- [43] Levine, H. (1985). *Introducción a los Imidazoles antimicóticos*. Pág. 45. Doyma.
- [44] Martínez, R. L. (2009). *Principios de Micología Médica* (1ª ed.). México. Mendez Editores.
- [45] Murray, P.R. (2007). *Micología*. En P.R. Murray, *Microbiología Medica* (5ta ed). 681-788. Editorial Madrid España: Elsevier.
- [46] Negroni, M. (2009) *Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica*. (2ª ed.) Editorial Médica Panamericana.

- [47] Prats, G. (2005). Microbiología Clínica. (1ª ed.). Madrid. Editorial Médica Panamericana.
- [48] Quindós, G. (2002). Principios de Micología Medica (1ª ed.). Mexico: Mendez Editores.
- [49] Rojas, O. (2001). Inmunología de memoria (2ª ed.). México D.F. Panamericana.
- [50] Tamayo, R.P., Cordella, L. (2007). Principios de Patología. (4ª ed.). Mexico D.F. Panamericana.
- [51] Tangarife, V.C. (2012). Identificación de dermatofitos.
- [52] Vilata, J.j. (2006). Micosis Cutáneas. Madrid España. Editorial Médica Panamericana.
- [53] Willey, J. M., Sherwood, L.M., & Woolverton, C.J. (2009). Microbiología de Prescott, Harley y Klein (7ª ed.). España: Mc Graw-Hill.
- [54] Centro para el control y prevención de enfermedades/ meningitis por hongos (CDC) en: <http://www.cdc.gov/meningitis/fungal-sp.html>
- [55] <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
- [56] International Code of Botanical Nomenclature. Königstein. 2000. ISBN 3-904144-22-7.
- [57] MEDICIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES EN HOSPITALES GENERALES DE LAS PRINCIPALES INSTITUCIONES PÚBLICAS DE SALUD”. México D.F., 11 de Noviembre, 2011.
- [58] NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.
- [59] Organización Mundial de la Salud. Prevención de las Infecciones Nosocomiales. Guía Práctica. 2003.

# Apéndice A

## Agar Dextrosa Saboraud

El agar Sabouraud es el tipo de medio de cultivo universal en la identificación de Hongos. Fue utilizado por primera vez por Raymond Sabouraud en 1892.

Composición:

Dextrosa	<b>40,0 g</b>
Peptona de Caseína	5,0 g
Digerido Pancreático de tejido animal	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1L

pH 5.6 ± 0.2

Para preparar el agar Sabouraud adicionado con antibiótico, se le agregan a esta base, disueltos en 10ml de acetona, 0.5g de cloranfenicol, o 0.5g de cicloheximida (actidone), o ambos. Se dispone de medios ya preparados como el Mycosel o el Mycobiotic-agar, los cuales evitan el crecimiento de bacterias y hongos saprofitos.

## Agar BiGGY BD (Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar)

Es un medio de diferenciación parcialmente selectivo para el aislamiento y la diferenciación de las especies de Candida a partir de muestras clínicas.

BiGGY Agar es una modificación del medio Nickerson, durante el estudio de la reducción de sulfito de las especies de Candida, Nickerson detectó niveles diferentes de esta capacidad entre las especies de Candida. Describió este medio para el aislamiento de Candida albicans, que puede diferenciarse de otras especies de Candida por el color y la morfología de las colonias.

En BD BiGGY Agar, el extracto de levadura y la glucosa proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de levaduras. La glicina es un nutriente adicional, pero también inhibe muchas especies bacterianas en la alta concentración utilizada en este

medio. Las especies de *Candida* reducen la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, mediante un proceso de reducción de sustrato. El bismuto y el sulfuro se combinan en un precipitado de color amarronado a negro que tiñe las colonias y puede difundirse en el medio. Asimismo, los compuestos de bismuto y azufre inhiben numerosas bacterias.

#### Composición

Citrato de amonio y bismuto	<b>5,0 g</b>
Sulfito sódico	3,0 g
Glucosa	10,0 g
Glicina	10,0 ml
Extracto de levadura	1,0 g
Agar	16,0 g

pH 6,8 ± 0,2

#### Agar CORN-MEAL

Para la producción de clamidoconidias en cepas de *Candida albicans*

#### Composición

Carelac*	<b>14,0 g</b>
Agar	10,0 g
Agua destilada	1L

\*El Carelac es un producto comercial que contiene harina de maíz, trigo, arroz, cebada, avena y extracto de malta.

#### Medio para zimograma

Peptona	<b>10,0 g</b>
NaCl	5,0 g
NaOH	1,0 ml
Carbohidratos	20,0 g
Agua destilada	1L

Esterilizar a 10 lb por 15 minutos

## Medio CHROM-agar *Candida*

BD CHROMagar *Candida* Medium es un medio para el aislamiento y la identificación de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de muestras clínicas. Inhibe el crecimiento de bacterias y también puede utilizarse como medio de aislamiento selectivo para otras especies de levaduras y para hongos filamentosos.

BD CHROMagar *Candida* Medium es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida* [Torulopsis] *glabrata* y otras especies). Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias.

Peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes en BD CHROMagar *Candida*. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de confirmación. El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos.

CHROMagar *Candida* Medium fue desarrollado por A. Rambach y lo distribuye BD Diagnostic Systems bajo acuerdo de licencia con CHROMagar, París, Francia.

### Composición

Cromopeptona	<b>10,0 g</b>
Glucosa	20,0 g
Mezcla cromógena	2,0 g
Cloranfenicol	0,5 g
Agar	15,0 g

pH 6,0 ± 0,3

## Control de calidad del usuario

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes. Incubar las placas en atmósfera aerobia durante 20 – 48 h a  $35 \pm 2$  °C. Tener en cuenta que se requiere una incubación de 42 horas, para que las colonias desarrollen por completo el color.

Cepas	BD CHROMagar Candida Medium
Candida albicans ATCC 60193	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
Candida albicans ATCC 10231	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
Candida krusei ATCC 34135	Crecimiento de bueno a excelente; colonias grandes y planas, de color de rosado claro a rosa, con un borde blancuzco
Candida tropicalis ATCC 1369	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante
Candida tropicalis ATCC 9968	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color gris azulado, con o sin halos de color violeta
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Inhibición de parcial a completa
Sin inocular	De incoloro a beige claro, transparentes

## Procedimiento de analisis

Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa. Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 20 – 48 h en posición invertida. Se requiere una incubación de 42 para que se desarrolle por completo el color de las colonias Candida. Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.

## Resultados

Después de la incubación, las placas de las muestras con hongos presentarán crecimiento. Se recomienda efectuar la lectura de las placas sobre un fondo blanco. Si están presentes especies de Candida, las colonias presentarán un color verde de claro a mediano (*C. albicans*), rosado claro a rosa con un borde blancuzco (*C. krusei*) o bien azul verdoso a azul metálico con o sin halos violetas (*C. tropicalis*). Otras especies de Candida y otras

levaduras presentan un color malva de claro a oscuro (rosado a violeta) o, si no se utilizan sustratos cromógenos, presentarán su color natural de colonias (de crema a blanco).

Los datos de estudios diversos indican que no es necesario realizar pruebas de identificación adicionales para *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

### Medio RPMI-1640

El medio RPMI-1640 es el medio que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio. La variedad utilizada en pruebas de sensibilidad en antifúngicos es el complementado con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado con Ácido Morfolino Propano Sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustando a pH 7±0,1 y con 0.2% de glucosa.

<b>COMPONENTES DEL MEDIO RPMI-1640</b>			
Componente	g/L	Componente	g/L
Arginina	0.200	Biotina	0.0002
Asparagina	0.050	D-pantotenico	0.00025
Acido aspártico	0.020	Cloruro de colina	0.003
Cistina	0.0652	Ácido fólico	0.001
Acido glutámico	0.020	Mio-inositol	0.035
Glutamina	0.300	Niacinamida	0.001
Glicina	0.010	PABA	0.001
Histidina	0.015	Piridoxina	0.001
Hidroxi-prolina	0.020	Riboflavina	0.0002
			0.000005
Isoleucina	0.050	Tiamina-HCl	0.001
Leucina	0.050	Vitamina V <sub>12</sub>	0.000005
Lisina	0.040	Nitrato de calcio	0.100
Metionina	0.015	Cloruro de potasio	0.400
Fenilalanina	0.015	Sulfato de magnesio anhidro	0.04884
Prolina	0.020	Cloruro de sodio	6.000
Serina	0.030	Fosfato de sodio dibásico	0.800
Treonina	0.020	D-glucosa	2.000
Triptófano	0.005	Glutati3n reducido	0.001
Tirosina	0.02883	Rojo de fenol	0.0053
Valina	0.020		

## Pruebas bioquímicas fermentación y asimilación de carbohidratos

Para el zimograma, se utiliza una serie de tubos conteniendo 4ml de medio base Wickerham con indicador y 1ml de los azúcares a probar al 6% (dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa y trehalosa) y una campana de Durham como indicador de la producción de gas, se inocula con dos gotas de suspensión y se incuban a 28°C, se deben hacer lecturas cada 24 hrs.

La prueba de asimilación, se lleva a cabo como el zimograma, solo que los tubos no contienen campana ni indicador, los carbohidratos que se emplean son la dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, inositol, xilosa, rafinosa, trehalosa, dulcitol.

## Pruebas bioquímicas para la identificación de *Candida*

<b>Auxonograma (asimilación) y Zimograma (fermentación)</b>								
Especie	<i>C. albicans</i>	<i>C. Stellatoidea</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. guilliermondi</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	
ASIMILACIÓN	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
	Maltosa	+	+	+	+	+	0	0
	Sacarosa	V	V	+	+	+	0	0
	Lactosa	0	0	0	0	0	0	0
	Galactosa	+	+	+	+	+	0	V
	Melibiosa	0	0	0	0	+	0	0
	Celobiosa	0	0	+	0	+	0	0
	Inositol	0	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	+	0	+	+	+	0	0
	Rafinosa	0	0	0	0	+	0	0
	Trehalosa	+	0	+	+	+	+	0
	Dulcitol	0	0	0	0	+	0	0
FERMENTACIÓN	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
	Maltosa	+	+	+	0	0	0	0
	Sacarosa	0	0	+	0	+	0	0
	Lactosa	0	0	0	0	0	0	0
	Galactosa	V	V	+	V	+	0	0
	Trehalosa	V	V	+	0	+	+	0

## Apéndice B

### Tinciones para hongos

<b>Tinciones para Hongos</b>			
Método de tinción	Tinción de elementos fúngicos	Tinción de fondo de preparación	Comentarios
<b>Blanco de Calcoflúor</b>	Tiñe la quitina de la pared celular de los hongos, fluorescente	Oscuro	Requiere microscopio de fluorescencia.
<b>Gram</b>	Los hongos retienen el cristal violeta y se tiñen de azul	Rosa	No específica para hongos
<b>Giemsa</b>	Tiñe los hongos de color azul púrpura	Rosa púrpura	No es específica para hongos. Tinción que diferencia material acidófilo de basófilo.
<b>PAS Ácido peryódico-Schiff</b>	Tiñe las levaduras y las hifas de color rosa fuerte a púrpura	Anaranjado o verde	Detección de hongos, especialmente en tejidos
<b>Gomori-Grocott Metenaima-nitrato de plata</b>	Tiñe la pared celular de los hongos de marrón o negro	Verde	Detección de hongos en frotis y cortes histológicos.

### Características principales de las especies de *Candida* frecuentes

<b>Características de las especies de <i>Candida</i> más frecuentes.</b>						
Especies	Crecimiento a 37°C	Crecimiento con cicloheximida	Tubo germinativo	Clamidospora	Hifas verdaderas y pseudohifas	Ureasa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	0
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	+	+	+	0
<i>C. tropicalis</i>	+	0 <sup>v</sup>	0	0	+	0
<i>C. parapsilosis</i>	+	0	0	0	+	0
<i>C. lusitanae</i>	+	0	0	0	+	0
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	0	0	+	0
<i>C. kefir</i>	+	+	0	0	+	0
<i>C. zeylanoides</i>	0 <sup>v</sup>	0	0	0	+	0
<i>C. famata</i>	+	V	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	+	0	0	0	0	0
<i>C. Krusei</i>	+	0	0	0	+	+ <sup>v</sup>
<i>C. lipolytica</i>	+	+	0	0	+	+

+: positivo 0:negativo v:variable

# Apéndice C

## Parámetros Farmacocinéticos de los Principales Antifúngicos

Nombre	Mecanismo de acción	Administración	Espectro	Farmacocinética	Metabolismo
<b>Anfotericina B</b>	Unión a la membrana celular originando destrucción metabólica y muerte.	Tópica Oral Intravenosa	Micosis profundas y subcutáneas	No se absorbe en la piel y mucosas, absorción mínima gastrointestinal.	Se metaboliza en el hígado, no se conocen bien los metabolitos.
<b>Griseofulvina</b>	Se une a proteínas microtubulares inhibiendo la mitosis.	Oral	Dermatofitos	Se absorbe por vía gastrointestinal.	Se metaboliza en el hígado a 6-metilgriseofulvina
<b>Nistatina</b>	Incrementa la permeabilidad de la membrana a unirse a esteroides	Oral y tópica en mucosa, puede usarse en aerosol	Candidiasis superficial y mucosas	Absorción prácticamente nula por vía oral y en piel.	-----
<b>Ketoconazol</b>	Interfiere en la biosíntesis del ergosterol	Tópica y oral	Micosis profundas, candidiasis, criptococosis	Buena absorción G.I.	Se metaboliza en el hígado sus metabolitos se excretan por bilis y orina.
<b>Miconazol</b>		Oral y parenteral		Absorción oral, unión fuerte a proteínas	
<b>Fluconazol</b>				Absorción oral rápida y completa	
<b>Itraconazol</b>	Interfiere con el citocromo p-450 lo que provoca depresión del ergosterol.	Oral Intravenosa	Micosis profundas, candidiasis, esporotricosis y pitiriasis.	Absorción oral 50% puede durar hasta 6 meses en uñas, nuevas formas parenterales	Degradado en el hígado por múltiples metabolitos, y estos metabolitos se excretan por bilis
<b>5-fluorocitosina</b>	Se incorpora al ARN del hongo, provoca inhibición de la Síntesis de ADN	Oral Intravenosa	Candidiasis, Cromomicosis y Criptococosis	Absorción oral 90% y rápida, se elimina por el riñón	No se metaboliza
<b>Terbinafina</b>	Inhibe la síntesis del ergosterol (fungicida)	Oral Tópica	Dermatofitosis, candidiasis e histoplasma	Se absorbe bien por el tracto G.I	Se metaboliza en el hígado y se excreta por orina
<b>Yoduro de Potasio</b>	Inmunoestimulante	Oral	Esporotricosis, aspergilosis	Desconocido	Desconocido