

**IPK**  
**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL 'PEDRO KOURÍ'**

**Candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y  
casos SIDA:  
Aspectos clínicos, micológicos y terapéuticos en Puebla,  
México.**

**Autora: Dra. Luz Marina Prieto Santa Anna, MD. MSc.**

**Tutor: Prof. Nereyda Cantelar de Francisco. MD. DrC  
Prof. Julián Manzur Katrib. MD. DrC**

**Asesor: Prof. Gerardo Martínez Machín. MD**

**Tesis presentada en opción al grado de  
Doctor en Ciencias Médicas**

**Ciudad de La Habana, 2007**

***Cuando se nos otorga la enseñanza se debe percibir como un valioso regalo y no como una dura tarea, aquí esta la diferencia de lo trascendente.***

***Albert Einstein.***

**DEDICATORIA:**

***Para Mi Madre Profra. Mariluz Santa Anna (†)***

***Por tu inmenso cariño de siempre, por enseñarme que la vida se logra luchando.***

***Tu recuerdo siempre estará en mi existencia. Mil gracias.***

***Para mi esposo Dr Bonfilio Lazcano y mis dos hijos Bony y Mely mis dos grandes tesoros, por entender mi ausencia mientras enfrentaba este trabajo.***

***Gracias por colaborar a lograr este sueño.***

***No pienso en el futuro, pues llegará en su momento.***

***Albert Einstein.***

## AGRADECIMIENTO

Al culminar este trabajo doy mi profundo agradecimiento al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" por permitirme una vez más ser uno de sus alumnos cuyas enseñanzas y experiencias estarán siempre presentes en el desempeño diario de mi profesión y en la atención a cada uno de mis pacientes.

A la Dra. Aida Jaime (†) mi inolvidable maestra, por motivarnos a conocer una medicina integral en la que los valores y la calidad humana van por encima de la razón social.

Por entusiasrnarnos a conocer un país inolvidable CUBA y por creer en nosotros.

Siempre estará en nuestros corazones.

A los pacientes del Centro de Información de SIDA que participaron en el estudio, que a pesar de la angustia por su enfermedad, peso el optimismo y el entusiasmo por nuevas opciones terapéuticas para mitigar sus malestares, para ellos mi agradecimiento eterno donde quiera que estén.

A la Dra. Norma Márquez y Dra. Edna Ramos, por compartir sus experiencias en el tema y tantos años en el seguimiento de los enfermos con SIDA.

Mil gracias por su valioso apoyo, por la confianza en este trabajo y por su amistad de siempre.

A la Dra. Nereyda Cantrelar, mi querida Profesora, por transmitirme su fortaleza y don de lucha en cada momento.

Le agradezco eternamente su apoyo, sus sabios consejos y el empeño para emprender este proyecto.

Al Dr. Gerardo Martínez Machín, por su paciencia, dedicación y sacrificio brindado en cada paso de este trabajo.

Nunca olvidaré tu apoyo y amistad incondicional ante las penurias y sinsabores pasadas para lograr este objetivo, te lo agradezco de todo corazón.

Al departamento de Micología del IPK, de manera especial al Dr. Carlos Fernández, Dra. María Teresa Illnait y al Lic. Luis Enrique Jerez, por su apoyo desmedido y sus sabios consejos, mi agradecimiento.

Al Dr. Julián Manzur por su apoyo y ayuda incondicional.

A Maribel mi fiel amiga por su lealtad y disponibilidad de siempre, todo mi cariño y agradecimiento.

A Yadira, Armando, Bárbara y Lázaro por su amistad de siempre y por su apoyo incondicional en cada momento, a todos gracias por su oportuna ayuda.

A todo el personal del IPK y de CISIDA que de una u otra manera han colaborado en el satisfactorio desenlace de esta investigación, por aceptarme en ser uno más de su equipo, mi agradecimiento.

A Gerardo, Mayra, Marisela, Jorge, Daisy, Viñas, Isabel, Manresa, Sonia y Simón, por darme un espacio en sus vidas y en sus casas, permitiéndome lograr este añorado sueño. Gracias amigos, estoy en deuda con ustedes.

A mis padres con inmenso cariño, gracias por darme la oportunidad de vivir.

A mi esposo y a mis hijos por su amor y apoyo de siempre. Gracias por permitirme se parte de ustedes.

***La imaginación suele ser tan importante como el conocimiento.***

***Albert Einstein.***

**CAPITULO I. INTRODUCCIÓN**

- I. 1 Hipótesis
- I. 2 Objetivos
- I. 3 Novedad científica
- I. 4 Valor teórico
- I. 5 Valor práctico

**CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

- II. 1. Candidiasis
  - II. 1.1 Definición
  - II. 1.2 Sinonimia
  - II. 1.3 Epidemiología
  - II. 1.4 Etiología
  - II. 1.5 Taxonomía
  - II. 1.6 Estudio Micológico
  - II. 1.7 Patogenia
  - II. 1.8 Cuadros clínicos
  - II. 1.9 Candidiasis oral- VIH
  - II. 1.10 Diagnóstico
  - II. 1.11 Tratamiento
- II. 2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro*
- II. 3 Antifúngicos.
  - II. 3.1 Antifúngicos poliènicos
  - II. 3.2 Antifúngicos azòlicos
  - II. 3.3 Nuevos Antifúngicos triazòlicos
  - II. 3.4 Equinocandinas
- II. 4 Antimicóticos incluidos en el estudio
  - II. 4.1 Nistatina
  - II. 4.2 Clotrimazol
  - II. 4.3 Ketoconazol
  - II. 4.4 Itraconazol

**CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS**

- III. 1 Tipo de Estudio
- III. 2 Universo de estudio
- III. 3 Criterios para entregar el estudio
  - III. 3.1 Criterios de inclusión
  - III. 3.2 Criterios de exclusión
- III. 4 Limitaciones del estudio
- III. 5 Evaluación inicial de los pacientes
  - III. 5.1 Formas clínicas
  - III. 5.2 Extensión de las lesiones
  - III. 5.3 Estudio microbiológico
  - III. 5.4 Tratamientos
    - III. 5.4.1 Esquemas de tratamientos tópicos
    - III. 5.4.2 Esquemas de tratamientos sistémicos
- III. 6 Evaluación final de los pacientes
  - III. 6.1 Criterios de evolución clínica
- III. 7 Curación clínica
- III. 8 Curación micológica

- III. 9 Fracaso terapéutico
- III. 10 Estudios micológicos
- III. 10.1 Identificación fenotípica
- III. 10.1.1 Cepas estudiadas
- III. 10.1.2 Pruebas morfológicas
- III. 10.1.2.1 Tubo germinativo
- III. 10.1.2.2 Filamentación en Agar harina de maíz con Tween80
- III. 10.1.3 Pruebas fisiológicas
- III. 10.1.3.1 Termotolerancia a 45° C
- III. 10.1.3.2. Auxanograma
- III. 11 Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria(CMI)
- III. 11.1 Cepas estudiadas
- III. 11.2 Preparación de la solución madre de los antifúngicos
- III. 11.3 Preparación del inóculo
- III. 11.4 Inoculación de las placas.
- III. 11.5 Incubación
- III. 11.6 Lectura e interpretación de los resultados
- III. 11.12 Análisis estadístico
- III. 11.13 Ética de la investigación

#### **CAPITULO IV. RESULTADOS**

- IV.1 Aspectos clínicos, microbiológicos y terapéuticos
- IV.2 Estudios de susceptibilidad *in vitro*

#### **CAPITULO V. DISCUSION**

- V.1 Aspectos clínicos, microbiológicos y terapéuticos
- V.2 Estudios de susceptibilidad *in vitro*

#### **CAPITULO VI. CONCLUSIONES**

#### **CAPITULO VII. RECOMENDACIONES**

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

#### **ANEXOS**

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- **ARMm** Acido ribonuclèico mensajero.
- **CISIDA:** Centro de informaci3n de SIDA.
- **CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute.
- **CMI:** Concentraci3n M3nima Inhibitoria.
- **CM<sub>150</sub>** Concentraci3n M3nima Inhibitoria capaz de inhibir el 50 % de las cepas.
  
- **CM<sub>190</sub>** Concentraci3n M3nima Inhibitoria capaz de inhibir el 90 % de las cepas.
  
- **DMSO:** Dimetilsulf3xido.
- **IPK:** Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kour3".
- **ISHAM:** International Society of Human and Animal Mycoses.
- **LCR:** L3quido Cefalorraquideo.
- **mg** miligramo
- **MG** Media geom3trica.
- **mL** mililitros.
- **MOPS:** Acido Morfolinopropanosulf3nico.
- **NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standars.
- **SDD** Susceptibilidad dependiente de la dosis.
- **SIDA:** S3ndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
- **TARGA:** Terapia Antirretroviral de Gran Actividad.
- **Th1:** Patr3n 1 de citoquinas de c3lulas T cooperadoras.
- **Th2:** Patr3n 2 de citoquinas de c3lulas T cooperadoras.
- **U** Unidad.
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonia.
- **VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana
- **µg** microgramos
- **µL** microlitros
- **°C** Grados cent3grados.



## SÍNTESIS

Se realizó un ensayo clínico terapéutico para cuatro antifúngicos, dos tópicos (clotrimazol y nistatina) y dos sistémicos (ketoconazol e itraconazol), en 97 pacientes VIH+/SIDA, con candidiasis orofaríngea, que acudieron espontáneamente al servicio de CISIDA del estado de Puebla, México. Los grupos, por tipo de tratamiento, fueron homogéneos en edad, sexo, y número de episodios previos. La mayoría de los pacientes presentó la forma clínica pseudomembranosa (93.8%), con episodios asintomáticos y predominio de las lesiones localizadas. La especie *Candida albicans* fue el agente etiológico del 92.1% de los episodios de candidiasis oral, con solo un 7.9% de especies de *Candida* no *albicans*. Los tratamientos fueron exitosos desde el punto de vista clínico, con remisión total de los síntomas y signos o mejoría notable o moderada en el 91.8% de los pacientes no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre los antifúngicos utilizados ( $P > 0.05$ ). El resultado micológico denotó que la mayoría tuvo cultivos negativos al final del tratamiento sin diferencias significativas entre los cuatro grupos ( $P > 0.05$ ). Los estudios de susceptibilidad *in vitro* del total de los aislamientos evaluados, según las normas del CLSI, demostraron bajos porcentajes de cepas resistentes al itraconazol (3.1%) y al ketoconazol (4%), no detectaron cepas resistentes a nistatina y mostraron valores bajos del rango, la media geométrica,  $CMI_{50}$  y  $CMI_{90}$  para la CMI del clotrimazol. Este es el primer estudio de su tipo en el estado de Puebla, México y uno de los pocos desarrollados en ese país que permite recomendar, sobre bases científicas, una mayor utilización de los tratamientos tópicos en ese estado.

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCION.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es en la actualidad la principal enfermedad predisponente para el desarrollo de micosis, fundamentalmente las producidas por hongos levaduriformes. La piel es el órgano que con más frecuencia se afecta en las infecciones por VIH, entre el 70 y el 90% de los casos tienen manifestaciones muco cutáneas, según la mayor parte de las revisiones **(Dilata Corell y Navarro Mira, 2000; Almagro Sánchez et al., 2003)**.

Las lesiones orales que se asocian a esta enfermedad son importantes, puesto que afectan la calidad de vida del paciente y son marcadores útiles de la progresión y de la inmunosupresión de la enfermedad. Las mismas están bien documentadas en los países desarrollados, pero hay pocos informes sobre las lesiones orales en los países en vías de desarrollo **(Ranganathan y Hemlatha, 2006)**.

La epidemiología del VIH relacionada con la enfermedad oral en las naciones desarrolladas se reporta después de las manifestaciones iniciales descritas en 1982. Los estudios de Estados Unidos y de Europa divulgan una frecuencia disminuida en las manifestaciones orales relacionadas con el VIH de 10- 50% después de la introducción de la Terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), aunque no parece muy significativa en la candidiasis oral **(Hodgson y Greespan, 2006)**.

La TARGA revoluciona el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad VIH/SIDA, en la que la supresión de la replicación viral y la reconstitución inmune son las metas prioritarias. Se señala que el predominio de algunas manifestaciones orales, fácilmente perceptibles de VIH/SIDA, disminuyen con la terapia, pero también se sugiere que pueden ser marcadores clínicos útiles de la eficacia de la TARGA y el estado inmunológico. Esto puede ser particularmente útil si su recidiva presagia o acompaña la falta de terapia, así como por ser de un valor potencial en la clínica, especialmente si las determinaciones de cargas virales y los conteos de las células T CD4<sup>+</sup> no están fácilmente disponibles como sucede en muchos países en vías de desarrollo **(Flint et al., 2006)**.

Aunque son significativos los avances en la mejora de la calidad de vida de los pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA, aun persisten desafíos importantes, pues esta infección sigue incrementando su incidencia en la población global. Por ello los profesionales de la salud vinculados a la clínica deben estar capacitados en

las enfermedades orales asociadas al VIH/SIDA para proporcionar las medidas preventivas oportunas y aplicar la terapéutica indicada. También, en los individuos cuyo estatus de infección por el VIH es desconocido las lesiones orales pueden sugerir una infección por este virus y en aquellos que no tienen acceso a la TARGA, la presencia de estas lesiones puede señalar la progresión de la enfermedad **(Resnik, 2006; Harwell y Obaro, 2006)**.

En diversos estudios realizados se señala que las lesiones orales frecuentemente no se asocian con las características sociodemográficas (pobreza, urbanización, hábitos alimentarios) excepto con el tabaquismo y que su presencia en niños, con o sin tratamiento antirretroviral, requiere de investigaciones especiales pues su comportamiento es totalmente diferente al del adulto **(Yang et al., 2006; Hamza, 2006)**.

Entre las enfermedades de origen fúngico en los pacientes inmunodeprimidos, las producidas por *Candida* spp. son las más frecuentes y de temprana instauración. La infección orofaríngea persistente o recurrente por *Candida* está considerada como parte del cuadro prodrómico precoz de la inmunodeficiencia por VIH **(Dilata Corell y Navarro Mira, 2006; Maeve et al., 2005)**.

La candidiasis o candidosis es entonces, la infección micótica más frecuente y la afección oral es su forma clínica de presentación habitual. Clásicamente asociada a la infancia y a la ancianidad, esta afección pasó a ser una enfermedad vinculada al VIH/SIDA desde el primer caso publicado. Se considera que hasta un 90% de de los individuos infectados por VIH sufrirán al menos un episodio de candidiasis orofaríngea **(Aguirre Urizar, 2002; Samaranayake, 2002)**.

La especie más frecuente como agente etiológico de los episodios de candidiasis oral es *Candida albicans*, aunque se han descrito otras especies como son: *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilopsis*, y mas recientemente *Candida dubliniensis* **(Samaranayake, 2002; Kleber et al., 2006)**.

Al igual que en otros pacientes inmunodeprimidos, su implicación patológica está vinculada al deterioro de la inmunidad celular. Esto la convierte en un agente omnipresente en los pacientes con infección por VIH y recuentos bajos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo que obliga al uso repetido de ciclos terapéuticos o a veces a la instauración de quimioprofilaxis prolongadas o indefinidas. Estas dos circunstancias propiciaron la aparición del fenómeno de la resistencia a algunos antifúngicos, que

---

en estos momentos supone el gran reto de esta infección oportunista **(Samaranayake, 2002; Kleber et al., 2006)**.

El tratamiento de esta patología dependerá de las localizaciones de las lesiones, de su extensión, cronicidad y recidivas, y del estado de inmunosupresión del individuo. Los episodios iniciales responden habitualmente a los tratamientos tópicos, sin embargo, a mayor grado de inmunosupresión la candidiasis suele ser refractaria a esta terapia, por lo que es necesario recurrir a tratamiento sistémico con derivados azólicos; ni la dosis ni la duración del tratamiento están definitivamente establecidos ya que se emplean pautas variadas con resultados muy similares **(Torres Lozada et al., 2005; López et al., 2002)**.

Por otra parte, el estado inmunológico del paciente es determinante para el éxito del tratamiento. Se han publicado resultados muy interesantes con el uso de estos medicamentos, reportándose evoluciones favorables, aunque no siempre se alcanza la cura micológica, por lo que las recaídas son también frecuentes **(Sanglard y Odds, 2002; Kishore, 2006)**.

Estudios comparativos demostraron que la estructura y las propiedades farmacológicas de los azoles son similares y que su absorción depende de la acidez gástrica, frecuentemente alterada en los pacientes con SIDA, y que en las infecciones muy avanzadas el tratamiento oral es clínicamente ineficaz, probablemente como resultado del uso de otros medicamentos que reducen la absorción o modifican su metabolismo **(Patel et al., 2006; Pappas et al., 2004)**.

Estos sucesos fortalecen las investigaciones en la terapia antifúngica, desarrollando nuevos y más potentes azoles, tales como voriconazol y posaconazol, sin embargo, a pesar de estos avances la resistencia farmacológica es la principal falla terapéutica entre los pacientes tratados por candidiasis. La resistencia a los antifúngicos azólicos en la mayoría de los casos primaria, secundaria o cruzada parece relacionarse con una menor acumulación intracelular de los azoles, que puede deberse a una entrada reducida o a un aumento de la eliminación de estas moléculas, fenómeno relacionado con un incremento de los niveles de ARNm de un gen transportador, así como a los cambios en los esteroides y fosfolípidos de la membrana del agente causal **(Vander, 1997; Lawrence et al., 2006)**.

Por otra parte, para un número significativo de pacientes el resultado clínico va a depender de sus defensas, así como de la virulencia del patógeno fúngico y de la eficacia de la droga indicada. La decisión de instaurar profilaxis contra un patógeno concreto no debe basarse solamente en la eficacia de los medicamentos disponibles, sino que debe también tomar en consideración la seguridad, el costo, los efectos secundarios, la prevalencia y la resistencia de los mismos (**Sanglard y Odds, 2002; Meletiadis, 2006**).

Los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos ofrecen la posibilidad de tener datos relativamente fiables a la hora de seleccionar el fármaco más adecuado para el tratamiento de las infecciones fúngicas. La resistencia a los antifúngicos puede ser clínica o *in vitro*, siendo la primera consecuencia fundamental del bajo nivel del fármaco en el tejido, debida a una interacción entre los fármacos o al severo grado de inmunodepresión del paciente (**Silva et al., 2002**).

Tomando en consideración, los innumerables problemas de correlación de los estudios de susceptibilidad antifúngica para levaduras en evaluaciones multicéntricas, el actual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) publicó en el 2002 el documento M27-A2 que describe el método estándar de macro y microdilución para determinar la concertación mínima inhibitoria (CMI) y que es el procedimiento más aceptado internacionalmente para los estudios de susceptibilidad *in vitro* para levaduras (**Alexander et al., 2007**).

La aparición de la epidemia del VIH se caracteriza por muchas transiciones. En México se empiezan a notificar los primeros casos de SIDA en 1983, ocupando el décimo tercer lugar a nivel mundial en relación con los casos notificados y el tercero en el continente americano. Desde 1995 a 2006 se han notificado 37,030 personas infectadas por VIH mientras que entre 1983

- 2006 se han reportado 105,170 casos de SIDA, de los cuales 85,078 (81.7%) corresponde a hombres adultos, 16,532 (15.9%) a mujeres adultas, 2,553 (2.4%) a menores de 15 años de ambos sexos y 1,016 (1.0%) con edad desconocida. De estos casos, 31,897(34.2%) se notifican vivos, 61,291(65.8%) muertos y 11,982(11.4%) se desconoce su evolución. Las cinco primeras entidades federativas con mayor número de casos son: Distrito Federal, Estado de México, Veracruz, Jalisco y Puebla (**Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA, 2006**).

En México se ha estudiado poco las percepciones que los trabajadores de la salud tienen de los grupos históricamente estigmatizados y relacionados con la transmisión del VIH. En los estudios de Infante y colaboradores, se encontró que los ejes estructurales del estigma se reproducen hacia grupos vulnerables a la infección del VIH/SIDA, por conceptos estructurales sociales, religiosos, económicos, políticos y morales y no en el plano individual en donde pueden diseñarse e instrumentarse actitudes que limiten el daño ocasionado por el estigma (**Infante et al., 2006**).

Tomando en cuenta todos estos antecedentes, se decidió realizar un estudio prospectivo en Puebla, México teniendo como objetivo conocer los aspectos clínicos, y las especies mas frecuentes involucradas en la etiología de la candidiasis oral en pacientes VIH/SIDA así como conocer la respuesta a tratamientos tópicos y sistémicos, mediante la confirmación microbiológica correlacionada con las pruebas de sensibilidad *in vitro*, para contribuir al diagnostico precoz y certero de la infección, estudiar la correlación de los factores facilitadores en el desarrollo de las manifestaciones clínicas, y evaluar la respuesta terapéutica al emplear los fármacos antifúngicos específicos (**Hariri y Mckenna, 2007; Bassetti et al., 2006**).

### **Situación Problemática:**

Con el objetivo de conocer las características clínicas y microbiológicas asociadas a los episodios de candidiasis oral en los pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA en el estado de Puebla, México se realizó, en coordinación con la secretaria de Salud en el Servicio de CISIDA(Centro de Información de SIDA), un estudio retrospectivo de revisión de historias clínicas en el año 2003.

Tras la revisión de 244 historias clínicas se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

- ▼ La frecuencia de cuadros clínicos sospechosos de ser episodios de candidiasis oral, a los que se indicó tratamiento específico, fue similar a la descrita en otras regiones (más del 85 %).

- 
- ▼ Más del 70 % de los tratamientos indicados, aun en pacientes con su primer episodio de candidiasis oral, fueron de tipo sistémico (ketoconazol, itraconazol y fluconazol) y la única droga utilizada en los tratamientos tópicos fue la nistatina.
  - ▼ No se encontraban descritos los síntomas, los signos ni la forma clínica de presentación.
  - ▼ No se realizaban estudios micológicos por lo que se desconocen las especies de *Candidas* involucradas en la etiología y por consiguiente, no hay datos de su susceptibilidad a los antifúngicos.

Ante esa realidad, en coordinación con el Servicio de CISIDA y con la aprobación de la Secretaria de Salud, se propuso desarrollar un estudio prospectivo, que pudiera brindar información sobre esas interrogantes y para el cual se formuló la siguiente hipótesis



## I.1 HIPÓTESIS

Si las características clínicas de la candidiasis oral en los pacientes VIH/SIDA, las especies de *Candida* involucradas en su etiología y sus patrones de resistencia a los antifúngicos en el Estado de Puebla, México son similares a los reportados internacionalmente, entonces los medicamentos tópicos pudieran brindar una alternativa inicial de tratamiento que disminuya el uso excesivo de los sistémicos alcanzando buenos resultados terapéuticos.

## I.2 OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Contribuir al conocimiento y mejor tratamiento de la candidiasis oral en los pacientes que viven con VIH /SIDA en el estado de Puebla México.

- **Objetivos específicos:**

1. Diagnosticar los síntomas, signos y las formas clínicas de presentación de la candidiasis oral en los pacientes VIH/SIDA que acuden al servicio de CISIDA Puebla, México.
2. Identificar las especies de levaduras involucradas como agentes etiológicos de la candidiasis oral en estos pacientes.
3. Evaluar la respuesta al tratamiento impuesto y comparar los resultados entre los diferentes esquemas de antifúngicos utilizados.
4. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de nistatina, clotrimazol, ketoconazol e itraconazol mediante la metodología del CLSI a las cepas de *Candida* aisladas.
5. Relacionar la respuesta al tratamiento con la susceptibilidad “*in vitro*” a los medicamentos utilizados.

### **I.3 NOVEDAD CIENTÍFICA.**

Esta investigación, constituye el primer trabajo sobre candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA que se desarrolla en el Estado de Puebla, México y uno de los pocos realizados en el país. Brinda la primera información disponible a escala institucional (CISIDA Puebla) sobre las especies de *Candida* involucradas en la etiología de la candidiasis oral así como de sus patrones de susceptibilidad *in vitro* frente a cuatro antifúngicos. Pero sobre todo, demuestra sobre bases científicas, la factibilidad y eficacia para un mejor uso de los tratamientos tópicos, con los consiguientes beneficios que ellos representan.

### **I.4 VALOR TEORICO.**

El valor teórico del presente trabajo radica, en los aportes que brinda al conocimiento de la candidiasis oral asociada al VIH/SIDA en el Estado de Puebla, los cuales trascienden a nivel nacional. Los resultados de esta tesis se han presentado en eventos científicos nacionales e internacionales, se han publicado en revistas científicas y han sido objeto de dos tesis.

Eventos científicos:

- II Reunión Nacional de Micología Médica, Sociedad Mexicana de Micología México D.F 10-12 Octubre (2004).
- III Reunión Nacional de Micología Médica, Sociedad Mexicana de Micología México Guerrero, 13-15 Octubre (2005)
- XVI Congreso Ibero-Latinoamericano de dermatología CILAD Cartagena, Colombia. 16-20 Noviembre (2005) .

Publicaciones.

- Dos publicaciones Revista Cubana Medicina Tropical 2006, 2008 (aceptada).

Tesis de diploma

- Susceptibilidad a intraconazol y ketoconazol de aislamientos orales de *Candida* en pacientes con SIDA
- Susceptibilidad *in vitro* a nistatina de aislamientos bucales de *Candida* en pacientes seropositivos al VIH y enfermos con SIDA.

### **I.5 VALOR PRÁCTICO.**

Se trata de una investigación eminentemente clínica (un ensayo terapéutico) con aspectos microbiológicos que permite conocer, de manera integral la problemática objeto de estudio. Por lo anterior, la aplicación en la práctica de sus resultados pudiera favorecer el manejo terapéutico de los enfermos VIH/SIDA, con candidiasis oral en nuestro estado. Contribuyendo así, de manera directa a disminuir el costo, los efectos adversos, las interacciones medicamentosas y el riesgo de desarrollo de cepas de *Candida* resistentes a los antifúngicos. A la vez favorece reservar los tratamientos sistémicos para los casos que más lo necesiten y permite estructurar una adecuada política del uso de los antifúngicos.

## **CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### II.1 Candidiasis

#### II.1.1 Definición

La candidosis, también llamada candidiasis, es la micosis oportunista más frecuente de los seres humanos siendo un padecimiento cosmopolita de alta morbilidad. Puede presentarse de forma primaria o secundaria, localizada o sistémica y de evolución aguda, subaguda o crónica. Producida por especies del género *Candida*, principalmente *Candida albicans*, debido a que esta levadura forma parte de la microbiota normal de la cavidad bucal, tracto gastrointestinal y la vagina, es considerada una especie endógena y la enfermedad que ocasiona infección oportunista (**Arenas, 2005; Arenas et al., 2006**).

#### II.1.2 Sinonimia

Esta enfermedad se denomina también como moniliasis, muguet, algodoncillo, dermatocandidosis, blastomicosis, términos que han quedado en desuso, siendo candidiasis o candidiasis los aceptados actualmente por la ISHAM (del inglés, International Society of Human and Animal Mycology) (**Odds et al., 1992**).

#### II.1.3 Epidemiología

Es de distribución cosmopolita y la más frecuente de las micosis oportunistas constituyendo un 25% de las micosis superficiales; en 35% afecta las uñas, en 30% la piel y en 20% las mucosas. Afecta cualquier raza, sexo o edad, siendo más frecuente en la 3ª y 4ª décadas y en los extremos de la vida. Representa en promedio 2-3% de la consulta dermatológica (**Arenas, 2005**).

Existen factores de riesgo que condicionan la presencia de candidiasis como: prematurez, anticonceptivos, neoplasias, uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, de corticoides y otros fármacos inmunosupresores, pacientes en unidades de cuidados intensivos, *diabetes mellitus*, prótesis dentales, nutrición parenteral y catéteres, historia de diarreas, obesidad, humedad y maceración y en SIDA se presenta entre 80 a 90% de los enfermos (**Arenas et al., 2006; Coogan et al., 2006**).

En animales domésticos y salvajes se presenta una infección natural digestiva, respiratoria, cutánea o mamaria. En los animales puede ser parte de la microbiota

normal del tubo digestivo como en los cerdos y cabras. En las aves puede formar parte de la biota digestiva y la enfermedad dependerá de la inmunocompetencia afectada por factores ambientales como el estrés y el cautiverio (**Arenas, 2003**).

#### **II.1.4 Etiología**

El género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular y reproducción asexual por gemación (**Diekema, 2002**).

*Candida albicans* es la más patógena y la más frecuente (70-90%), otras se aíslan en menor proporción como: *C.tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, y *C. brumptii* (**Sánchez, 2005**).

#### **II.1.5 Taxonomía**

Los agentes causales son levaduras anascosporadas, cuyo estado anamorfo pertenece a la división *Deuteromycota* y su estado teleomorfo puede ser *Ascomycotina*.. *Candida* es una levadura con capacidad para producir filamentos por lo que en sentido amplio es un hongo dimórfico (**Arenas, 2003**).

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la candidiasis, se encuentran clasificados taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Hongo

División: Deuteromycota

Clase: Blastomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Candida*

Especies: *albicans* (como la más frecuente y virulenta) y otras especies (**Torres Lozada et al., 2005; Arenas, 2003**).

Los cambios recientes en la nomenclatura de estas levaduras se basan en los estudios de biología molecular y el análisis de isoenzimas (**Papas et al., 2003; Almirante, 2005**).

### **II.1.6 Estudio micológico**

En las candidiasis el examen directo se realiza a partir de exudado, esputo, raspado de uñas o centrifugado de orina. Se efectúa con Hidróxido de Potasio, solución de Lugol o fisiológica. También puede realizarse frotis y teñirse con Gram, azul de metileno, PAS, Giemsa o Wright. Se observan abundantes blastosporas redondeadas u ovals de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, pseudohifas o hifas verdaderas **(Arenas, 2003)**.

El cultivo de las especies de *candida* se logra a la temperatura ambiente con los medios habituales utilizados en los laboratorios de micología como el agar glucosado de Sabouraud, el agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximina (Actidione), o en agar extracto de malta. El cultivo debe hacerse a la brevedad posible, luego de obtenerse los especímenes para evitar contaminaciones agregadas. Las colonias suelen aparecer en un lapso de 48-72h después de la siembra cuando son incubadas a 28 ó 37°C en condiciones de aerobiosis pero cuando se trata de subcultivos suelen crecer más rápidamente (24-36h) **(Arenas, 2003; Williams y Lewis, 2000)**.

Otros medios de cultivo en los que puede crecer *C. albicans* son: agar Pagano-Levin, donde las colonias se observan de color crema, Albicans ID (Biomérieux), con colonias de color azul y CHROMagar® Candida (CHROMagar), donde predomina el color verde **(Horvath et al., 2003; Eraso et al., 2006)**.

En contraste con otras especies, *C. albicans* tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas, sobretodo cuando se cultivan en un medio especial como agar harina de maíz con Tween 80; estas estructuras tienen un diámetro de 7 a 8 $\mu\text{m}$  y generalmente se originan en el extremo del pseudomicelio y son una importante característica morfológica en la identificación rápida. Asimismo, tiene la capacidad de producir tubos germinativos (filamentación rápida en suero) cuando las colonias son inoculadas en 0,5 mL de suero de caballo, e incubadas a 37°C observándose los resultados después de 2 a 3 h. **(Arenas et al., 2006; Shepherd, 2002)**.

Para la diferenciación de las diversas especies, dado su parecido macroscópico y micro morfológico se realizan diversos métodos colorimétricos así como pruebas

específicas fisiológicas y bioquímicas, llegando hasta las técnicas de genética molecular (**Bliss et al., 2003; Becker et al., 2007**).

### **II.1.7 Patogenia**

*Candida* se convierte en patógena en condiciones propicias por oportunismo, es una levadura que necesita un huésped con alteraciones inmunitarias para ir más allá de la colonización de los epitelios.

La patogénesis de la candidiasis oral es compleja e implica a diferentes factores y mecanismos de los hongos y del hospedero. La posibilidad de que *Candida* colonice las superficies orales depende tanto de la efectividad de los mecanismos de defensa del hospedero, fenómeno secuencial en pacientes VIH/SIDA, como de la capacidad de adhesión del hongo y de su poder de crecimiento. Aunque, la invasión inicial depende de los mecanismos inmunológicos del hospedero, esta levadura posee características intrínsecas que facilitan su habilidad de causar enfermedad (**Torres Lozada et al., 2005; Martin, 2005**).

El reconocimiento de receptores celulares en el hospedero por *C. albicans* es esencial para su supervivencia. La evolución de este microorganismo de comensal a patógeno es el resultado de su habilidad para colonizar células epiteliales en la mucosa y seleccionar adicionalmente otros atributos que promuevan su invasión. (**Calderone, 2000; Bougnoux, 2006**).

Un mayor entendimiento de la patogénesis de *Candida*, se ha logrado a través de la búsqueda y definición de genes individuales que codifican determinantes de virulencia, así como también de la detección de patrones de expresión genética dentro de las células infectadas. Los factores virulentos que *Candida* expresa incluyen el cambio fenotípico, las adhesinas, el dimorfismo, el cambio de las colonias y la secreción de enzimas hidrolíticas como la aspartil proteinasa y las fosfolipasas (**Torres Lozada et al., 2005; Taylor, 2005**).

La saliva constituye un elemento antifúngico de primer orden ya que tiene una labor de barrido mecánico que dificulta la adhesión del hongo, y un poder antifúngico merced a sus componentes proteicos: lisozimas, lactoferrina, lactoperoxidasas y glucoproteínas. Los anticuerpos anti-*Candida* presentes en la saliva son del tipo IgA secretor y actúan inhibiendo la adherencia de esta levadura de la mucosa oral.

Existe una posible influencia de pH salival sobre el desarrollo de candidiasis oral en pacientes VIH positivos. Dicho desarrollo se asocia a valores ácidos en la saliva,



aumentando la adherencia en las superficies epiteliales *in Vitro* y la presencia de bacterias pueden contribuir a la colonización y proliferación de especies de *Candida* en la cavidad bucal (**Repetigny et al., 2004; Sánchez et al. 2002**).

Múltiples factores del hospedero se han considerado como favorecen la presencia de candidiasis. Algunos son fisiológicos (embarazo y las edades extremas de la vida); los factores externos incluyen la maceración, el uso de prótesis y el traumatismo; otros son iatrogénicos (el uso de antibióticos de amplio espectro, corticoesteroides o catéteres) o la inmunosupresión debida a enfermedades malignas o el SIDA (**Maijala et al., 2007; Regina et al., 2007**).

La adhesión de *Candida*, particularmente *C. albicans*, a las mucosas, constituye un paso inicial en la patogénesis de las infecciones causadas por estas levaduras (**Maza et al., 2001**). En este sentido, se sugiere que en los mecanismos de adherencia están involucradas las interacciones entre los ligandos de *Candida* y los receptores de las células del hospedero.

Varios genes de *C. albicans* se han caracterizado, con respecto a su función como factor virulento: el gen de proteína de pared de hifa que codifica una nanoproteína encontrada en la superficie de las mismas, reducción de la adherencia de células epiteliales de la cavidad oral y disminución de la capacidad de producir daño a las células endoteliales (**Torres Lozada et al., 2005; Bates et al., 2007**).

Los genes *CST20* y *CPP1* codifican para una quinasa y una fosfatasa respectivamente, componentes importantes de la vía que regula la morfogénesis. *C. albicans* secreta enzimas de gran importancia en la patogénesis de la infección ocasionada por la misma, estas suelen activarse a valores bajos de pH. Las proteinasas distorsionan y digieren las membranas de las células hospederas para facilitar la adhesión y la invasión tisular, evadiendo las defensas del hospedero, degradando moléculas como el lactoferril, la lactoperoxidasa, la catepsina y el complemento (**Taylor et al., 2005; Chethrapilly y Thangam, 2006**).

El epitelio oral constituye una barrera primaria contra la invasión, una vez que esta barrera es superada, otros mecanismos inmunes naturales tales como las interleukinas, los factores de crecimiento y los factores que estimulan la colonia de las células epiteliales entran en actividad.

Los estudios realizados han revelado un acoplamiento entre la patogenia de la candidiasis oral y la integridad de la mucosa local asociada con la presencia de citoquinas en el epitelio.

La Interleukina 1 e Interleukina 8 son importantes agentes pro inflamatorios secretados por el epitelio oral en la respuesta fungicida o infección bacteriana, accionando otros inmunosupresores celulares. Más aún, la citosina pro inflamatoria interleukina 1-*b* puede ser activada por las proteinasas, lo que sugiere que éstas tienen un papel de activación y mantenimiento de la inflamación en las superficies epiteliales **(Jayatilake et al., 2007; Fidel, 2006)**.

Por otra parte los linfocitos T cumplen una función importante en la resistencia Th1, libera citocinas que activan los macrófagos y los neutrófilos con acción candidicida. El desarrollo de Th 2 pone de relieve la susceptibilidad a la infección, porque las citocinas que produce inhiben Th 1 y el efecto fagocítico. La fagocitosis y muerte de *Candida* incluye al complemento, los anticuerpos y las citosinas **(Arenas, 2005; Erb-Downward y Noverr 2007)**.

Se demuestra que la hidrofobicidad de la superficie celular está relacionada con la adherencia de blastosporas de *Candida* spp. a las células epiteliales humanas y a los materiales plásticos. Esta propiedad juega un papel importante al aportar interacciones hidrofóbicas que fortalecen la unión inicial de la levadura a la superficie **(De Repentigny et al., 2000)**.

### **II.1.8 Cuadros clínicos.**

Desde comienzos del siglo XX se observa que la candidiasis oral puede presentar distintas manifestaciones clínicas e histopatológicas, diferenciándose entre formas primarias y otras secundarias en las que la infección candidiásica sistémica mucocutánea es una manifestación más. La Candidiasis afecta cualquier tipo de tejido, órgano o sistema, por lo que su espectro clínico es extremadamente diverso. En personas inmunocompetentes cualquier zona del cuerpo que sea húmeda y esté expuesta al ambiente es susceptible a infección **(Aguirre Uriza, 2002; Torres Lozada et al., 2005)**.

Se desconoce el periodo de incubación, pueden ser asintomáticas o se acompañan de sensación de quemadura, sequedad de la boca o sabor metálico.

Según el aspecto, se han descrito diferentes formas clínicas:

- Candidiasis pseudomembranosa o muguet (aguda-crónica). Presenta placas blanquecinas fácilmente desprendibles en un epitelio infiltrado en la forma aguda, se acompaña de dificultad para la deglución y en la crónica suele ser persistente, es más frecuente en paciente SIDA y es refractaria al tratamiento. Puede localizarse en el paladar o en las encías y en los casos graves puede extenderse a la lengua, la faringe o el esófago.
- Candidiasis eritematosa (aguda-crónica). No se forman placas pero la superficie es roja y brillante: la forma crónica y persistente, se acompaña de inflamación y boca ardorosa o glosodinia. La lengua y el paladar pueden estar afectados.
- Candidiasis hiperplásica (leucoplásica). Presenta placas blancas irregulares en la boca, particularmente en los carrillos y no se desprenden fácilmente al raspar. La mucosa se ve atrófica y hay pérdida de las papilas de la lengua.
- Lesiones asociadas (estomatitis protética, queilitis angular, glositis rómbica, queilitis exfoliativa, forma nodular, forma atrófica).

La queilitis propiamente dicha puede tener aspectos atróficos o granulares.

En la forma nodular la lengua y la mucosa tienen aspecto de empedrado, aspecto que se observa en la candidiasis mucocutánea crónica. La glositis rómbica se distingue por la aparición de una placa en forma romboidal en el dorso de la lengua, con pérdidas de las papilas.

- Candidiasis mucocutánea (crónicas). Las lesiones pueden aparecer en piel, mucosas y uñas. Tiende a ser grave y difícil de erradicar, se puede diseminar en pacientes inmunosuprimidos. En boca hay lesiones pseudomembranosas o en placa.

Cuando dos o más de estas formas clínicas aparecen juntas se les denomina candidiasis oral multifocal. La localización en esófago es una consecuencia de la extensión a partir de la cavidad oral; hay estenosis, disfagia, náuseas, vómitos y hemorragia del tubo digestivo. La afección gástrica es excepcional, si hay perforación puede sobrevenir peritonitis. Esta forma crónica y la candidiasis orofaríngea son las formas clínicas más frecuentes en el SIDA (**Arenas et al., 2006; Arenas, 2003; Shimahara, 2007**).

### **II.1.9 Candidiasis oral-VIH**

Desde las primeras descripciones de la enfermedad por el VIH, las manifestaciones orales por candidiasis forman un papel muy importante en el cuadro clínico del padecimiento y son componentes indicativos de su progresión. En algún momento del proceso, en nueve de cada diez pacientes, va a aparecer manifestaciones orales, y en algunas ocasiones estas van a ser el primer signo de enfermedad. En países sin acceso a las cuentas de linfocitos TCD4, la candidiasis oral sigue siendo el marcador disponible del deterioro inmune de un pacientes (**Aguirre Urizar, 2004; De Faría et al., 2005**).

Con el descubrimiento de las nuevas terapias antirretovirales, la presencia de lesiones orales ha disminuido significativamente tanto en frecuencia como en gravedad, aunque en los últimos años se han reportado persistencia de lesiones orales en algunos casos con estas terapias, debido muy probablemente a las reacciones secundarias que producen, que no permiten que el paciente suministre las dosis adecuadas.

Por lo que es fundamental que el profesional de la salud conozca las características clínicas de la candidiasis oral y pueda valorar el deterioro inmune de un paciente para poder instalar tratamiento oportuno (**De Faría et al., 2005; Ceballos et al., 1998; Fernández et al., 2005**).

### **II.1.10 Diagnóstico**

El diagnóstico fundamental de las candidiasis orales es clínico. La demostración citológica o microbiológica de levaduras no es un dato significativo en ausencia de infección clínica sugestiva por este agente. El diagnóstico de laboratorio se basa en la demostración del hongo en las muestras mediante examen directo y el cultivo con la identificación del microorganismo (**Linares y Solís, 2001**).

La realización de frotis y la observación de levaduras es un método fácil de realizar, pero en ocasiones, es poco sensible ya que se precisa de la existencia de un número significativo de estos microorganismos para ser reconocido y poder ser valorado como positivo. La presencia de pseudohifas o hifas más que de blastosporas se asocia con la existencia de infección por *Candida* spp., junto con la presencia de acúmulos de células inflamatorias en los estudios citológicos (**Torres Lozada et al., 2005; Sánchez et al., 2005**).

El cultivo de muestras clínicas es un método diagnóstico muy sensible, pero menos específico, ya que también resulta positivo en los portadores sintomáticos, debido a que *Candida* spp. puede colonizar la cavidad oral. El análisis cuantitativo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de la saliva puede permitir diferenciar los portadores (<400 UFC) y de los infectados (>400 UFC).

Para el diagnóstico diferencial deben de tomarse en cuenta las siguientes entidades clínicas:

Leucoplasia; liquen plano, pénfigo, nevo esponjoso, herpes o aftas bucales.

Y desde el punto de vista microscópico la diferencia se establece con: *Malassezia*, dermatofitos, *Cryptococcus*, *Blastomyces dermatitidis*, *H.capsulatum* (Arenas, 2003). Para distinguir las diferentes especies de *Candida* se emplean distintas pruebas morfológicas, bioquímicas, inmunológicas y moleculares especializadas.

En las pruebas morfológicas pueden ser a su vez macro o microscópicas; en las primeras se toma en cuenta el aspecto de las colonias al crecer en los diferentes medios de cultivo, siendo el agar glucosado de Saboraud con o sin antibiótico el medio por excelencia. Las microscópicas son muy útiles para diferenciar algunas especies, como la prueba de tubo germinativo o Filamentación precoz en la que solo *C.albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales (Linares y Solís, 2001).

Dentro de las pruebas bioquímicas se encuentran los medios cromógenos que están diseñados para el aislamiento y la identificación de algunas especies del género *Candida*, dentro de ellas se encuentran CHROMagar Candida, Cromogen Albicans, Albicans ID2 así como sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C.albicans* en las que a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales se detecta una o dos enzimas (*b*-galactosaminidasa y *L*-prolinaaminopeptidasa) usando sustratos fluorogénicos o cromogénicos (Linares y Solís, 2001).

Existen también dentro de ellas, procedimientos basados en métodos de asimilación de nutrientes como el auxanograma convencional que se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de las levaduras, para su realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas con filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en el agar o bien con discos de papel empapados con el nutriente

no ofreciendo ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, resultando mucho más laboriosas y costosas **(Linares y Solís, 2001)**.

En la actualidad se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes con sistemas semiautomáticos que simplifican tanto su uso como su interpretación, dentro de ellos el sistema API 20C AUX que se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados colocados, que permite identificar un total de 34 especies diferentes haciéndose la lectura de estas con un control de crecimiento lográndose la identificación a partir de un código numérico de un catálogo analítico o por un programa informado, hasta los Automáticos basados en tecnología de fluorescencia y de tarjetas de análisis, donde por medio de un software de análisis y un sistema experto avanzado se recoge la información. Existiendo también técnicas de identificación mediante criterios inmunológicos **(Linares y Solís, 2001)**. **(Pinjon et al., 1998)**.

#### **II.1.11 Tratamiento.**

En el tratamiento siempre deben evaluarse y controlarse los factores predisponentes locales y sistémicos.

El tipo de terapia se elegirá de acuerdo con la gravedad y el estado inmunológico del paciente.

Quindós y colaboradores sugieren que el manejo de la candidiasis se base en 4 pilares básicos:

- Realización de un diagnóstico precoz y certero de la infección.
- Corrección de los factores facilitadores o enfermedades subyacentes.
- Tipo de infección candidósica.
- Empleo de los antifúngicos adecuados valorando el cociente eficacia/toxicidad en cada caso **(Quindós, 2001)**.

Actualmente el arsenal terapéutico disponible contra las micosis orales se basa en los agentes antifúngicos que presentan mecanismos de acción similares, los cuales actúan sobre los esteroides de la membrana celular del hongo o contra las enzimas que regulan la biosíntesis de los ácidos nucleicos. Al ser *Candida* spp. células eucariotas similares a las de los mamíferos, estos fármacos interfieren también las rutas metabólicas de las células humanas, ocasionando una mayor toxicidad que los antibacterianos **(Torres Lozada et al., 2005; Quindós, 2001)**.

Para los casos de candidiasis oral y con pocos factores predisponentes se sugiere el tratamiento inicialmente tópico. Este tratamiento puede ser desde la corrección del pH a base de colutorios de agua con bicarbonato que son eficaces, económicos y fáciles de aplicar. A la aplicación de antimicóticos del grupo de los polienos, siendo la nistatina el medicamento más útil. Últimamente, este producto adquiere más importancia no solo como tratamiento local, sino como profiláctico, recomendándose sobre todo en los pacientes inmunosuprimidos que tienden a presentar cuadros repetitivos de candidiasis **(Dilata Corell y Navarro Mira, 2000; Adnan et al., 2006)**.

Otros antimicóticos tópicos útiles son los imidazoles, fármacos que tienen por lo general buena acción y son muy recomendados, dentro de los más empleados se encuentra el clotrimazol **(Torres Lozada et al., 2005; Linpiyawan et al., 2000)**.

Mientras que la terapia sistémica se recomienda en los casos extremos, crónicos y con factores predisponentes importantes. En general la terapia más utilizada es a base de derivados azólicos, dentro de ellos los más útiles son el ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Hace poco se desarrollaron antifúngicos triazoles de segunda generación como voriconazol, posaconazol ravuconazol y albaconazol. **(Klotz, 2006; Wakiec, 2007)**.

En 1970 se descubrieron las equinocandinas. Después se han estudiado los nuevos derivados semisintéticos: caspofungina, anidulafungina y micafungina que tienen un novedoso mecanismo de acción con excelentes rangos para infecciones candidiásicas graves **(Torres Lozada et al., 2005; Escobar y Zuluaga, 2004)**.

## ***II.2 Pruebas de Susceptibilidad in vitro***

Las infecciones fúngicas han adquirido una gran importancia en las últimas décadas, debido no sólo a su mayor frecuencia de aparición (aumento de pacientes con estado de inmunodepresión avanzada) sino también por su alta morbimortalidad. Paralelamente surgen nuevas especies patógenas, tanto de levaduras como de hongos filamentosos **(Mbuagbaw et al., 2006; Tsuruta et al., 2007)**.

Todas estas circunstancias conducen a los clínicos a incrementar el uso de los antifúngicos y hacerlo con dosis cada vez más elevadas, originando, en muchos casos la selección de cepas resistentes, especialmente a los derivados azólicos. Esto trae como consecuencia la necesidad de investigar nuevas opciones.

La emergencia de resistencia a los antimicóticos ocasiona secuelas de importancia clínica y epidemiológica. Estos factores crean la necesidad de establecer métodos

para la determinación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* estandarizados, reproducibles y con relevancia clínica que, ayuden como guía terapéutica en la toma de decisión, permitan el estudio de nuevos medicamentos y proporcionen un medio para monitorear el desarrollo de resistencia de los estudios epidemiológicos **(Rivas y Quevedo, 2003)**.

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* para los hongos surgieron con décadas de retraso en comparación con las antibacterianas. Una de las razones más importante fue la poca frecuencia de infecciones fúngicas antes de los años ochenta del pasado siglo, así como el número limitado de agentes terapéuticos disponibles, unido al pobre reconocimiento del potencial emergente de resistencia a los mismos **(Arenas et al., 2006; Alexandra, 2005)**.

La estandarización juega un papel importante en la necesidad de evaluar *in vitro* - *in vivo* la eficiencia de un medicamento. Como respuesta a esta necesidad el NCCLS en 1982 establece un subcomité coordinador del trabajo, cuya meta fue desarrollar un método eficaz de referencia para las pruebas de susceptibilidad de levaduras *in vitro* y su correlación con la respuesta clínica. Como resultado, el NCCLS propuso el método de referencia M27-A para levaduras como *Candida* spp., y *Cryptococcus neoformans* **(NCCLS, 2002; Hsueh et al., 2005)**.

Existen diferentes factores que influyen en las pruebas de sensibilidad *in vitro* y entre ellas se encuentran:

El tipo biomorfológico del hongo resulta un factor importante atendiendo a que en el caso de las levaduras es fácil obtener inóculos uniformes, no siendo así para los hongos filamentosos. En los hongos dimórficos es importante conocer cuál es la fase parasitaria para brindar al cultivo las condiciones necesarias. La forma invasiva de las levaduras puede obtenerse y estudiarse fácilmente en el laboratorio, proporcionando así una mejor predicción del comportamiento clínico ante la terapia **(Pfaller et al., 2006; Teixeira et al., 2007)**.

La preparación del inóculo es uno de los primeros puntos a estandarizar. Los métodos turbidimétricos son los más recomendados en el caso de las levaduras, por expresar mejor la concentración de la masa fúngica. Para *Candida* spp. debe realizarse a partir de un cultivo puro de 24 h. De manera general, el tamaño del inóculo condiciona la aparición del efecto fungicida o fungistático de un antifúngico, ya que a medida que se incrementa tiene lugar una elevación de los valores de las CMI **(Swinne et al., 2005)**.



El medio de cultivo empleado debe permitir un buen crecimiento del microorganismo y debe estar libre de potenciadores y antagonistas del antifúngico, por lo que el tipo de antifúngico y su mecanismo de acción condicionan al medio de cultivo, además debe de ser sencillo, económico, de composición definida y permitir una actividad adecuada de todos los antifúngicos, así como presentar un pH estable y permitir un desarrollo adecuado del hongo (**Repetigny et al., 2004; Chethrapilly y Thangam, 2006**).

El pH es una variable que puede interferir tanto en el crecimiento del microorganismo como en el potencial antifúngico de la droga. En la preparación del medio de cultivo debe incluirse un tampón que evite su acidificación como consecuencia de la fermentación de los azúcares presentes. Los tampones más empleados por su inocuidad y capacidad amortiguadora son el ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) y el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (**NCCLS, 2002**).

### ***II.3 Antifúngicos.***

Bajo la denominación general de antifúngicos o antimicóticos se incluye a una variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación de los antifúngicos se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura o característica (polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, derivados de la morfolina, piridona, benzofurano, tiocarbamato), su origen (sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química), su espectro de acción (amplio o restringido), sus mecanismos de acción (fungistáticos o fungicida), su vía de administración o empleo sobre el hospedero(oral, parenteral tópicos o sistémicos), su toxicidad y su selectividad de acción (**Maertens, 2004**).

#### ***II.3.1 Antifúngicos poliénicos.***

Los derivados poliénicos son sustancias antibióticas sintetizadas por diversas especies de *Streptomyces*. Poseen una estructura constituida por un anillo macrólido de carbono con poliinsaturaciones cerrado por un enlace éster. Este grupo comprende cerca de cien compuestos diferentes, que según el número de enlaces se clasifican en heptaenos o tetratenos. Las sustancias más representativas de este grupo son la nistatina y anfotericina B (**Maertens, 2004**).

### **II.3.2 Antifúngicos azólicos**

Los azoles, descubiertos a finales de los años sesenta del siglo XX, son compuestos sintéticos que constituyen el mayor grupo de agentes antifúngicos. Poseen cinco anillos aromáticos que contienen dos o tres moléculas de nitrógeno caracterizándose por su amplio espectro de actividad y por la posibilidad de ser administrados por cualquier vía, (tópica, oral o parenteral). Dentro de los antifúngicos azólicos se distinguen dos grupos: el primero y más numeroso es el de los imidazoles y el segundo, el de los triazoles. La diferencia entre ambos viene determinada por la presencia de los dos o tres átomos de nitrógeno en el anillo azólico de la molécula **(Repetigny et al., 2004)**.

Son fármacos lipófilos que actúan alterando la membrana fúngica inhibiendo la síntesis del principal esteroide fúngico, el ergosterol, siendo menos tóxico para las células del hospedero cuyo principal esteroide es el colesterol **(Tay y Adam, 2005)**.

En las levaduras y mohos los azoles tienen como diana celular común al citocromo p450. Este citocromo, actualmente denominado *ERG11p*, es el producto del gen *ERG11*. El nitrógeno libre del anillo imidazol o triazol de los antifúngicos azólicos se une al hierro del grupo hemo del Erg11p como un sexto ligando y de este modo inhibe la reacción enzimática. La afinidad de estas drogas no sólo depende de dicha interacción, sino que también viene determinada por la sustitución en N-1, la cual es, de hecho, la responsable de la elevada afinidad de estos antifúngicos para su diana **(Tay y Adam, 2005)**.

Cada uno de estos compuestos tiene una farmacocinética característica por lo que su eficacia antifúngica es diferente entre las distintas especies de hongos con relevancia clínica. No obstante, poseen un amplio espectro de actividad siendo eficaces contra *Candida*, *C. neoformans* y hongos dimorfos **(Hsueh et al., 2005; Matsuura et al., 2005)**.

Dentro de los imidazoles se encuentran a: ketoconazol, clotrimazol, miconazol, econazol dentro de los más utilizados y en los triazoles: itraconazol, fluconazol y terconazol **(Hsueh et al., 2005)**.

### **II.3.3 Nuevos antifúngicos triazólicos.**

También conocidos como triazoles de segunda generación, están compuestos por un anillo central azol que contiene 3 átomos de nitrógeno similares a los de primera generación, diferenciándose por la estructura química. Dentro de sus mecanismos

de acción al igual que otros miembros del grupo azol, inhiben la enzima citocromo *P-450* interviniendo en la síntesis del ergosterol.

Se ligan a un nitrógeno libre del anillo azol, inhibiendo la 14 alfa demetilación del lanosterol, llegando a la depleción del ergosterol, lo que finalmente afecta la permeabilidad de la membrana del hongo y los sistemas enzimáticos unidos a la membrana, involucrados en la síntesis de la pared (**Repetigny et al., 2004; Tkacz, 2001**).

La selectividad de los azoles por la enzima *P-450* del hongo está dada por la unión del *N1* del grupo aromático de los azoles con los aminoácidos específicos de la membrana celular del hongo que no están presentes en las proteínas de los mamíferos (**Tkacz, 2001**).

Dentro de ellos se encuentran: voriconazol, posaconazol y ravuconazol.

Las interacciones de los azoles con otros fármacos (antagonistas de receptores de H-2, astemizol, isoniacida, metilprednisolona, rifampicina, benzodiazepinas) pueden presentarse ya sea por medio de la similitud de fórmulas químicas, sitios de acción o por metabolismo, dando como resultado la disminución de las concentraciones en suero de los azoles y por incremento de las concentraciones en el plasma del otro agente suministrado concomitantemente.

La disminución de los azoles en plasma ocurre básicamente por dos mecanismos. El primero es por una disminución del pH gástrico que altera su absorción, por ser altamente lipofílicos. El segundo mecanismo es la vía de inducción de su metabolismo que incrementa el metabolismo hepático de la citocromo *P-450*.

Han sido reconocidos como agentes fungistáticos, pero estudios recientes *in vitro* con los nuevos triazoles e itraconazol han demostrado actividad fungicida.

En modelos animales de *candidiasis* y *aspergillosis* diseminados los tres nuevos medicamentos muestran ser efectivos, así como otros estudios realizados *in vitro* con *Candida* que señalan que la actividad de estos nuevos triazoles superan al fluconazol e itraconazol (**Escobar y Zuluaga, 2004; Frank et al., 2003**).

### ***II.3.4 Equinocandinas***

Debido al papel esencial de la pared celular para la viabilidad de los hongos y a su ausencia en las células de los mamíferos, constituye un sitio blanco de ataque ideal de los antifúngicos, lo que ha motivado el desarrollo de esta nueva clase de

medicamentos. La Equinocandinas son lipopéptidos anfófilicos semisintéticos, con un amplio espectro de acción y un buen perfil de seguridad, dentro de ellas se encuentran: caspofungina, micafungina y anidulafungina **(Keating y Jarvis, 2001)**.

Las tres moléculas tienen una configuración tridimensional, cuyo centro está compuesto por un hexapéptido cíclico y una cadena lateral que le confiere a actividad antifúngica. Actúan en la pared inhibiendo de manera específica y no competitiva el complejo enzimático, uniéndose a una proteína FKSIP interno o externo de la membrana celular.

Son altamente selectivas para *Candida* spp, *Aspergillus* spp y *Pneumocystis jiroveii* (*ante Pneumocystis carinii*).

Estos antifúngicos no muestran resistencia cruzada en las cepas de *Candida* resistentes a anfotericina B y al fluconazol y es muy rara la resistencia heredada en las especies de levaduras susceptibles **(Maertens, 2004; Escobar y Zuluaga, 2004)**.

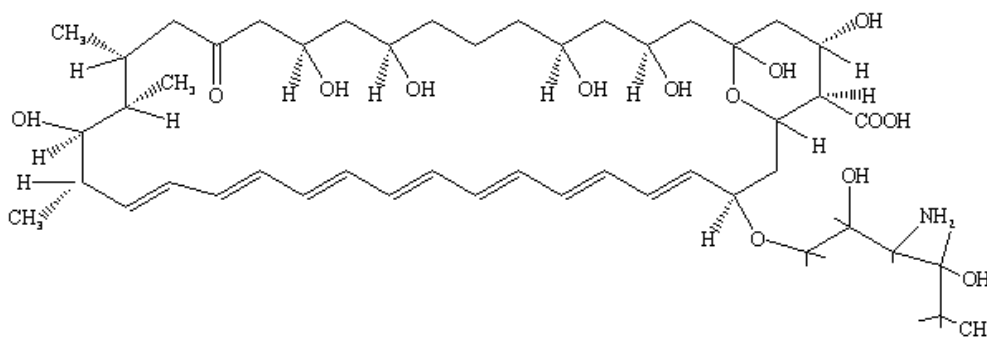
En esta tabla se resumen los fármacos más usados en la terapéutica antimicótica.

Poliénicos	Imidazoles	Triazoles I	Triazoles II	Derivados semi-sintéticos
Nistatina	Ketoconazol	Itraconazol	Voriconazol	Caspofungina
Anfotericina B	Clotrimazol	Fluconazol	Posaconazol	Anidulafungina
	Miconazol	Terconazol	Ravuconazol	Micafungina
	Econazol		Albaconazol	

## **II.4 Antimicóticos incluidos en el estudio**

### **II.4.1 Nistatina**

La nistatina, fue descubierta por Hazen y Brown en 1951 y constituye el primer miembro de esta familia descrita como agente antifúngico contra la *candidiasis*. Es producida por especies de *Streptomyces* tales como *S. noursei* y *S. albulus*. Es un antifúngico del grupo de los macrólidos poliénicos. Sus características estructurales corresponden con los de una molécula de tipo tetraeno, con peso molecular de 926Da y con fórmula química (C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>NO<sub>17</sub>). Presenta una cadena hidrocarbonada de 46 átomos de carbono, 4 enlaces dobles y una micosamina. **(Maestre y Alou, 2001)**.



### Mecanismo de acción

El modo de acción de la nistatina implica la formación de complejos insolubles al fijarse ésta a los esteroides de la membrana celular de los hongos principalmente el ergosterol. Como consecuencia se forman canales iónicos que provocan un aumento de la permeabilidad de las membranas, lo cual da lugar a la pérdida de cationes, en especial potasio y macromoléculas de la célula como los glúcidos y metabolitos con la subsiguiente lisis y muerte celular. Este efecto es reversible cuando el fármaco alcanza pequeñas concentraciones, mientras que con grandes concentraciones la lesión celular es irreversible por lo que no tiene efecto sobre ningún otra parte celular basándose, solamente en su toxicidad selectiva **(Maestre y Alou, 2001)**.

### Farmacocinética

*In vivo* su acción se limita a las superficies donde el fármaco puede estar en contacto directo con las levaduras u otros hongos. No se absorbe de manera importante a partir de la piel, membranas mucosales o las vías gastrointestinales. Casi toda la administración por vía oral se excreta en las heces. No existen concentraciones sanguíneas o tisulares importantes después de la administración oral y es demasiado tóxica para administrarla por vía parenteral **(Almanza, 2007)**.

### Espectro antifúngico

La nistatina tiene actividad fungistática y fungicida. Es activa *in vivo* e *in vitro* frente a un amplio espectro de patógenos fúngicos que incluyen *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* y *Blastomyces*, siendo éstos sensibles a concentraciones del polieno desde 1.5 a 6.5 µg/mL. No es activa frente a bacterias, virus, protozoos ni dermatofitos **(Carrillo-Muñoz y Perman, 1999)**.

## **Efectos adversos**

Los efectos adversos de la nistatina son poco comunes, no obstante pueden producirse irritación oral, náuseas transitorias, vómitos y diarreas después de su administración, efectos que desaparecen al disminuir las dosis. Raramente puede ocurrir irritación de la piel como erupción cutánea y urticaria **(MINSAP, 2006)**.

## **Usos clínicos**

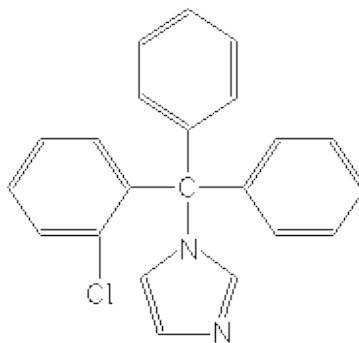
Puede aplicarse en forma tópica a la piel o membranas mucosales (bucal o vaginal) en forma de crema, ungüento, supositorios, suspensión o talcos para la supresión de las infecciones locales por *Candida*. Ha sido administrada por vía oral para la disminución de *Candida* en el intestino de los lactantes muy pequeños o en personas inmunocomprometidas (diabetes sacarina, leucemia, grandes dosis de esteroides, SIDA), en quienes existe la posibilidad de presentarse *candidiasis* diseminada **(Almanza, 2007)**.

## **Nistatina liposomal**

La toxicidad aguda que ocasiona la nistatina convencional tras su administración intravenosa desaconseja esta vía, lo que impide su uso en micosis invasoras. Para evitar este inconveniente se ha desarrollado una presentación liposomal del antifúngico en forma multilamelar que contiene dimiristoil fosfatidilcolina y dimiristoil fosfatidilglicerol. La nueva formulación posee una actividad antifúngica comparable a la nistatina convencional y, en algunos casos, superior. Posee poca toxicidad y logra alcanzar concentraciones plasmáticas superiores a las CMI para la mayoría de levaduras y hongos filamentosos oportunistas. Esta formulación después de haber sido sometida a ensayos clínicos se encuentra actualmente en el mercado para el tratamiento de las micosis sistémicas **(Carrillo-Muñoz y Perman, 1999)**.

### **II.4.2 Clotrimazol**

La primera descripción del clotrimazol fue en 1969, este fármaco es un derivado imidazólico muy útil por su amplio espectro de actividad. Su estructura química es la 1[(2Clorofenil)-difenil- metílico] imidazol **(Escobar y Zuluaga, 2004)**.



### **Mecanismo de acción.**

Inhibe la enzima lanosterol-14a-desmetilasa necesaria para la síntesis del ergosterol el cual es esencial para la estabilidad de la membrana celular fúngica. Como resultado de su acción se altera la permeabilidad de la membrana y finalmente se presenta la citólisis. Su acción según la concentración lo hace que a niveles bajos actúe como fungistático y a títulos altos sea fungicida (**Almanza, 2007; Sádaba et al., 2004**).

### **Farmacocinética**

La biodisponibilidad de absorción es mala, es menor de 0.5% después de aplicarla en la piel intacta, en la vagina es de 3 a 10%, en adultos, una dosis oral diaria de 200 mg. genera cifras plasmáticas de 0.2 a 0.35 µg/mL. La pequeña cantidad que se absorbe es metabolizada en hígado y excretada por bilis.

Se administra por vía tópica y vaginal, siendo especialmente beneficioso para alteraciones fúngicas frecuentes sin complicaciones, principalmente las candidiasis, así como para casos complicados suele utilizarse coadyuvante en tratamientos por vía sistémica (**Almanza, 2007; Hardman, 1996**).

### **Espectro antifúngico**

Por ser de amplio espectro también es muy útil frente a dermatofitos, agentes de eritrasma y algunas bacterias grampositivas, como estafilococos.

### **Efectos adversos:**

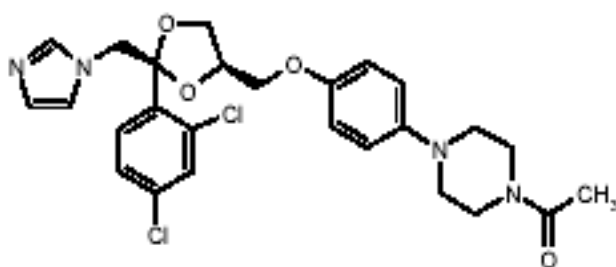
En casos aislados pueden presentarse reacciones locales pasajeras como (**MINSAP, 2006**):

- Prurito.
- Ardor.
- Irritación
- Enrojecimiento de la piel.

- Inflamación.
- Dolor abdominal
- Cefalea.
- Erupciones raramente.

### II.4.3 Ketoconazol

Fue sintetizado en 1977 y se considera el primer azol de amplio espectro que se administra por vía oral. Su estructura química es Cis-1-acetil-4-metofenil-piperazina (**Arenas, 2003; Tay y Adam, 2005**).



Ketoconazol

### Mecanismo de acción

Inhibe la síntesis de ergosterol mediante la interacción con la lanosterol 14 a-desmetilasa, enzima fúngica dependiente del citocromo p450 necesaria para la conversión de lanosterol en ergosterol. La disminución del ergosterol altera la membrana celular, reduciendo la actividad enzimática asociada con ella y aumentando su permeabilidad, lo que provoca la inhibición del crecimiento y de la replicación celular, causando un efecto fungistático (**Almanza, 2007**).

### Farmacocinética

Es una base débil y al ser administrados por vía oral requiere condiciones de acidez para una óptima solubilidad y absorción, y por tanto su biodisponibilidad se reduce en presencia de fármacos que incrementan el pH gástrico, como por ejemplo los antagonistas de los receptores H<sub>2</sub>, los inhibidores de la bomba de protones y la didanosina (**Almanza, 2007**).

Más del 90% circula unido a las proteínas, principalmente albúmina, el 15% se une a los eritrocitos y el 1% permanece libre. Se metaboliza extensamente y los metabolitos inactivos se eliminan por las heces (**Matsuura et al., 2005**).



### **Espectro antifúngico**

Es activo contra la mayoría de los hongos patógenos, incluyendo a los dermatofitos. Se utiliza para el tratamiento de la blastomycosis, histoplasmosis, coccidioidomycosis, pseudoallescheriasis y paracoccidioidomycosis no meníngeas (debido a su pobre penetración al *LCR*). Es útil en las *candidiasis* oral y esofágica, siendo el agente de elección en las *candidiasis* mucocutáneas crónicas; además en la tiña resistente a griseofulvina y también en la pitiriasis versicolor diseminada. No está indicado en la mucormycosis ni en las micosis meníngeas (**Hsueh et al., 2005; MINSAP 2006**).

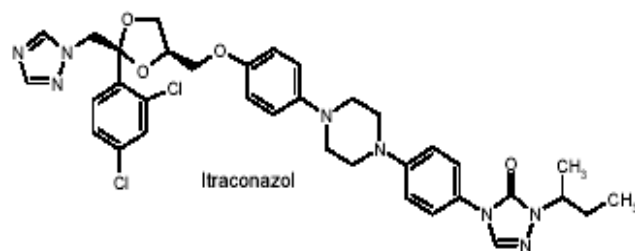
### **Efectos adversos**

- Náuseas
- Anorexia
- Vómitos
- Hepatotoxicidad
- Erupción alérgica
- Caída del cabello.
- Anormalidades endocrinas (por inhibición de la citocromo P450 humana)
- Irregularidades menstruales.
- Ginecomastia y decremento de la libido y potencia sexual (en hombres).
- Disminución del colesterol plasmático.
- Incremento asintomático leve de aminotransferasas

No se recomienda administrar este fármaco a mujeres embarazadas por secretarse en la leche materna tampoco es prudente usarlo en mujeres que amamantan (**MINSAP, 2006**).

#### ***II.4.4 Itraconazol***

Es un derivado triazólico, de amplio espectro de acción, virtualmente activo frente a todos los dermatofitos y levaduras que pueden producir infecciones en piel, uñas, mucosas y órganos profundos (**Almanza, 2007**).



### Mecanismo de acción

El itraconazol, al igual que los derivados azólicos, inhibe la esteroil 14- $\alpha$ desmetilasa en los hongos, que es un sistema de enzimas que depende de citocromo p450 microsomal, por lo cual estos fármacos inhiben la biosíntesis de ergosterol en la membrana citoplásmica y permiten la acumulación de los 14- $\alpha$ -metilesteroles. Estos metilesteroles pueden alterar la disposición íntima (empacamiento) de las cadenas acil fosfolípidos y, con ello, alterar las funciones de algunos sistemas enzimáticos de la membrana como ATPasa y enzimas del sistema del transporte electrónico, resultando en una alteración tanto funcional como estructural de la membrana, así como un efecto tóxico sobre la célula por la acumulación de los esteroides 14 $\alpha$ -metilados **(Mellado *et al.*, 2002)**.

### Farmacocinética

La absorción por vía oral del itraconazol varía entre uno y otro paciente. Disminuye en personas que se encuentran en ayuno o tienen un pH gástrico elevado. Más de 90% del itraconazol se liga a proteínas plasmáticas, y también muestra unión a los tejidos (con excepción del LCR). El itraconazol se metaboliza en el hígado aunque la hepatopatía leve no cambia el catabolismo del medicamento. El hidroxitraconazol, un metabolito biológicamente activo, aparece en la sangre a concentraciones casi del doble del fármaco sin modificaciones. Muchos hongos son igualmente sensibles al fármaco original y al metabolito hidroxilado **(De Beule y Van Gestel, 2001)**.

Las concentraciones de itraconazol disminuyen si se utiliza de modo concomitante fármacos como la rifampicina, la fenilhidantoína y la carbamazepina, así como los medicamentos que disminuyen la acidez estomacal, los antagonistas de receptores H<sub>2</sub> y bloqueadores de las bombas de protones **(Matsuura *et al.*, 2005)**.

### Espectro antifúngico

- Blastomycosis intra o extrapulmonar

- Histoplasmosis (Incluyendo la pulmonar crónica y la diseminada no meníngea)
- Aspergilosis pulmonar y extrapulmonar que no responde a la anfotericina B.

Por vía oral se utiliza para el tratamiento de la tinea unguium (onicomicosis) causadas por dermatofitos y en la profilaxis de infecciones micóticas serias como candidiasis, criptococosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis, en pacientes con infección por VIH (**Hsueh et al., 2005; MINSAP, 2006**). **Efectos adversos**

Los principales efectos adversos que se presentan con el itraconazol son:

- Náuseas (más frecuente)
- Vómitos
- Diarrea
- Dolor abdominal
- Hipocalcemia
- Otros efectos que se presentan, principalmente en pacientes inmunocomprometidos son el rash cutáneo, prurito y urticaria.

Puede ocasionar además, aunque en menor frecuencia, mareo, dolor de cabeza, angioedema, anafilaxia, fatiga e hipertensión y en casos muy raros puede causar hepatotoxicidad (**MINSAP, 2006**).

## **CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***III.1.-Tipo de estudio.***

Se realizó un ensayo clínico terapéutico a ciegas para el evaluador, para cuatro antimicóticos, 2 tópicos y 2 sistémicos, entre marzo del 2003 y junio del 2004 en el Centro de Información, Atención y Capacitación en VIH/ SIDA (CISIDA), del estado de Puebla, México.

#### ***III.2.- Universo de estudio.***

El Universo estuvo constituido por 97 pacientes VIH+/SIDA que cumplieron con los criterios de inclusión y de exclusión definidos para este estudio:

#### ***III.3.- Criterios para integrar el estudio.***

##### **III.3.1.-Criterios de inclusión:**

- Paciente adulto de cualquier sexo, VIH positivo.
- Lesión sugestiva de candidiasis oral.
- Ausencia de tratamiento antimicótico en el mes previo al estudio.
- Ausencia de tratamiento antirretroviral.
- Aceptación, mediante consentimiento informado, a participar. (Anexo 1)

##### **III.3.2.-Criterios de exclusión:**

- Negativa a participar en el estudio.
- Tratamiento específico con antifúngicos en el mes previo al estudio
- Pacientes bajo régimen de tratamiento con antirretrovirales (TARGA)
- Cultivo negativo en el exudado micológico inicial.

#### ***III.4.-Limitaciones del estudio.***

- No se pudieron realizar estudios del estado inmune de los pacientes.
- El ensayo terapéutico no pudo ser doble ciego

#### ***III.5.-Evaluación inicial de los pacientes.***

Todos los pacientes que asistieron espontáneamente a la consulta de pesquizaje y seguimiento de CISIDA en el estado de Puebla, y que dieron su aprobación por escrito para participar en el estudio, fueron interrogados y examinados, por el médico que habitualmente realiza esa actividad, para conocer sobre los síntomas acompañantes, las características y extensión de las lesiones (reflejadas en un

diagrama de la cavidad oral) y la forma clínica de presentación todo lo cual fue recogido en sus historias clínicas en un modelo diseñado para tales propósitos, conjuntamente con otros datos demográficos (Anexo 2).

Las formas clínicas a considerar y la extensión de las lesiones fueron definidas según la clasificación propuesta por Samaranayake y modificada por Axell. (**Axell et al., 1997**).

#### III.5.1.-Formas clínicas:

- Eritematosa
- Pseudomembranosa
- Queilitis angular
- Hipertrófica
- Mixta (combinación de 2 o más de las formas antes referidas)

#### III.5.2.-Extensión de las lesiones:

- Extensas: Más de un sitio afectado o más del 50% del dorso de la lengua
- Localizadas: Un solo sitio afectado o menos de 50% del dorso de la lengua

#### III.5.3.-Estudio microbiológico.

Una vez concluido el examen físico, se procedió a obtener muestras de las lesiones orales mediante hisopado. Se utilizaron hisopos estériles para la colección y el transporte de muestras (BBL™ CultureSwab™ EZ). En todos los casos se emplearon 2 hisopos (uno para examen directo con KOH al 10% y otro para cultivo). Los cultivos se realizaron en placas con Agar Dextrosa de Sabouraud suplementado con cloranfenicol (Anexo 3), que fueron incubadas a 30°C por un periodo no mayor de 5 días.

Todos los aislamientos obtenidos, una vez confirmada su morfología levaduriforme y pureza mediante coloración de Gram, fueron conservados en agua destilada estéril a temperatura ambiente y enviados al Laboratorio de Referencia de Micología, del Instituto de Medicina Tropical (IPK) en La Habana, para su identificación final.

#### III.5.4.-Tratamientos.

A cada paciente se le impuso un esquema de tratamiento al azar para lo cual, se preparó un listado aleatorio. Todos los medicamentos se envasaron en frascos idénticos con las instrucciones en su interior, de manera que el médico de asistencia no pudiera conocer el esquema asignado a cada paciente. Un monitor designado para el estudio, realizó las aclaraciones necesarias a los pacientes, en caso de dudas. El listado de distribución aleatoria quedó en sobre sellado, en poder de la responsable del Servicio de CISIDA hasta que finalizó el estudio.

Los esquemas de tratamiento a comparar (dosis, duración y medicamento) fueron los normados por el Consejo Nacional de México para la prevención y control del SIDA (**CONASIDA, 2000**). Solo el clotrimazol, por no formar parte de los esquemas que normalmente utiliza esa institución, fue incluido basándose en la experiencia reportada en el Instituto Pedro Kourí.

#### III.5.4.1.- Esquemas de tratamientos tópicos.

Nistatina (100, 000 U, tabletas vaginales). Disolver en la boca 2 tab /8h x 14 días.

Clotrimazol (100 mg tabletas vaginales). Disolver en la boca 1 tab/ 12h x 14 días.

#### III.5.4.2.- Esquemas de tratamientos sistémicos:

Ketoconazol (Tabletas de 200 mg) 1 tab. / 12h x 14 días.

Itraconazol (Tabletas de 100 mg) 1 tab. al día x 14 días.

### **III.6.-Evaluación final de los pacientes.**

La totalidad de los pacientes se reevaluaron 4 días después de concluir los esquemas de tratamientos por el mismo clínico que los valoró inicialmente, quien determinó la evolución clínica sobre la base de los siguientes criterios:

#### III.6.1.- Criterios de evolución clínica.

*Cura total.*- Desaparición clínica de todas las lesiones y sintomatología acompañante.

*Notable mejoría.*- Desaparición de los síntomas y de más del 75 % de extensión en las lesiones.

*Moderada mejoría.*- Presencia de algún síntoma asociado, de los descrito inicialmente o menos de un 75% de curación de las lesiones.

*Sin mejoría.*- Cuando no se evidenció mejoría o se agravó el cuadro inicial.

Durante la evaluación final se realizó un nuevo exudado, siguiendo el procedimiento ya descrito, para evaluar la cura micológica.

La distribución final de los pacientes en los grupos de tratamientos fue la siguiente:

Tratamientos tópicos:

Nistatina: 24 pacientes

Clotrimazol: 24 pacientes

Tratamientos sistémicos:

Ketoconazol: 23 pacientes

Itraconazol: 26 pacientes

A los efectos del estudio, se consideró:

**III.7.- Cura clínica.**- Cuando los tratamientos fueron exitosos, con remisión total de los síntomas y signos o mejoría notable o moderada.

**III.8.- Cura micológica.**- Cuando fue negativo, el cultivo del exudado micológico post tratamiento.

**III.9.- Fracaso terapéutico.**- Cuando el cuadro clínico inicial permaneció invariable o se agravó

**III.10.-Estudios micológicos.**

La identificación de las especies se realizó siguiendo el flujo general de identificación establecido en el Laboratorio de Micología del IPK (**Williams y Lewis, 2000**). *C. albicans* se identificó en base a su capacidad de producir tubo germinativo y clamidosporas. Las especies tubo germinativo negativo se identificaron utilizando el sistema API 20 AUX y la diferenciación presuntiva entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se realizó mediante estudios de su potencialidad para crecer a 45 °C y su patrón de asimilación de xilosa y  $\alpha$  metil -D- glucosida en el mismo sistema API (**Pinjon et al., 1998**).

**III.10.1.-Identificación Fenotípica**

**III.10.1.1-Cepas estudiadas:**

El trabajo comprendió la identificación de todos los aislamientos obtenidos antes y después de la aplicación de los tratamientos (97 y 47 cepas respectivamente) (Anexo 4)

**III.10.1.2.-Pruebas morfológicas**

**III.10.1.2.1.- Tubo germinativo (McGinnis, 1998).**



Descripción de la técnica: A partir de un pequeño inóculo, se preparó una suspensión de células en 0.5 mL de suero equino estéril y se incubó a 37 °C durante 2½ - 3 horas. Pasado ese tiempo, se examinó al microscopio óptico entre cubre y portaobjetos, una gota de dicha suspensión.

Controles: *C. albicans* (positivo) y *C. tropicalis* (negativo).

Lectura e interpretación: La prueba se consideró positiva cuando se observó la existencia de levaduras con filamentos de paredes paralelas, sin constricción en su punto de origen y longitud 3-4 veces superior a la de la célula que le dio origen. Se asumió como negativo la observación única de blastosporas.

#### **III.10.1.2.2.- Filamentación en Agar Harina de Maíz con Tween 80 (McGinnis, 1998).**

Descripción de la técnica: Con el asa de inoculación se tomó un fragmento de la colonia, se estrió según el método de Dalmau en una placa de cultivo que contenía Agar Harina de Maíz con Tween 80 (Anexo 3), se le colocó un cubreobjetos estéril y se incubó a 28 °C durante 48 horas.

Controles: Fueron empleadas cepas, previamente identificadas, de *Candida albicans* (positivo) y *Cryptococcus neoformans* (negativo).

Lectura e interpretación: Las placas se observaron al microscopio en busca de clamidoconidios terminales, blastoconidios y pseudomicelio.

#### **III.10.1.3.- Pruebas fisiológicas.**

##### **III.10.1.3.1.- Termotolerancia a 45 °C**

Descripción de la técnica: Las cepas a estudiar se inocularon en placas de Agar Dextrosa de Sabouraud durante 48 horas a 37 °C (Pinjon *et al.*, 1998)

A partir de los cultivos obtenidos se transfirió asépticamente una pequeña porción de una colonia a una nueva placa con un medio de cultivo similar a la anterior y se incubó a 45 °C durante 48 horas.

Controles: Se emplearon cepas de *C.dubliniensis* (negativo) y *C. albicans* (positivo).

Lectura e interpretación: Las cepas que mostraron crecimiento a 45 °C se identificaron como *C. albicans*.

**III.10.1.3.2.-Auxonograma:** Se empleó el sistema comercial API 20C (bioMérieux, Inc, Hazelwood, Mo.) según las recomendaciones del productor

Descripción de la técnica:

Preparación de la cámara de incubación: Se distribuyeron 5 mL de agua destilada estéril entre los pocillos de la parte inferior de la cámara, teniendo en cuenta que el volumen de líquido no sobrepasara los bordes de los mismos.

Preparación del inóculo: A partir de un cultivo joven (18-24 horas) de la levadura a estudiar, se preparó una suspensión en 2 mL de solución salina fisiológica estéril correspondiente al tubo 2 de la escala de McFarland. A partir de esta se transfirieron 100  $\mu$ L a un ampolla de API C Médium.

Inoculación de la galería: Las cúpulas de la galería se llenaron con la suspensión obtenida en el API C Médium, evitando la formación de burbujas y cuidando de crear un nivel horizontal en las mismas. Se tapó la galería y se incubó hasta 72 h. a 28 °C.

Lectura e interpretación: Se realizaron lecturas a las 24, 48 y 72 h. Se consideró una reacción positiva (asimilación del azúcar correspondiente), cuando se observó una turbidez de mayor intensidad que la de la cúpula control (sin sustrato). Las lecturas se anotaron en la hoja de resultados correspondiente, obteniéndose un perfil numérico para cada caso y con ayuda del catálogo analítico del sistema se identificaron las cepas. **(Linares y Solís, 2001)**.

### ***III.11.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).***

Los materiales y métodos empleados, fueron seleccionados según el documento M27-A2 del CLSI (NCCLS, 2002) **(NCCLS, 2002)**, con las modificaciones para el micrométodo **(Pfaller y Yu, 2001)** y otras modificaciones para nistatina. (Anexo 5)

Cepas control: Se utilizaron las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019, recomendadas para el control de calidad en la técnica de microdilución.

Drogas antifúngicas: ketoconazol (Sigma K1003), itraconazol (Sigma I6657) clotrimazol (SIGMA C6019), y nistatina (SIGMA N3503).

Solvente: Dimetilsulfoxido. (DMSO) 99.9% de pureza (Aldrich)

Medio de Cultivo: RPMI 1640 (Sigma R6504) (Anexo 3)

Placas de microtitulación: Placas de estériles de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Costar 3595).

### **III.11.1.-Cepas estudiadas.**

Los antifúngicos utilizados para los estudios de susceptibilidad " *in vitro*," fueron los mismos que se administraron a los pacientes integrando los esquemas terapéuticos.

En primera instancia, se estudió la susceptibilidad "in vitro" de los 94 aislamientos obtenidos de los 47 pacientes que no alcanzaron la cura micológica durante el estudio. (47 cepas pretratamiento y 47 post tratamiento). El total de estos aislamientos se evaluaron "in vitro" frente a las cuatro drogas con el fin de evaluar posible resistencia cruzada entre los azoles y entre los azoles y los polienos.

También, se realizaron estudios de susceptibilidad "in vitro" a los aislamientos obtenidos de los 50 pacientes que alcanzaron la cura micológica al finalizar sus tratamientos. En estos casos, las cepas solo fueron evaluadas "in vitro" frente al antifúngico que se utilizó como tratamiento en el paciente del cual se obtuvo el aislamiento.

### **III.11.2.-Preparación de la solución madre de los antifúngicos.**

Se prepararon soluciones madre para cada uno de los antifúngicos empleados en el estudio, utilizando DMSO como solvente. En todos los casos su concentración fue, al menos, 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a evaluar (3200 µg/mL). Se repartieron alícuotas de trabajo en viales estériles y se congelaron a - 70 °C hasta su utilización.

Preparación de las diluciones de antifúngico y llenado de placas: Se siguió el mismo procedimiento para cada una de los fármacos.

#### **Paso 1.**

- a. Se extrajo uno de los viales con la solución madre del antifúngico a utilizar, conservado a - 70 °C, se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se le asignó el número 1.
- b. Se preparó una serie de nueve viales, enumerados del 2 al 10, con 150µL de DMSO.
- c. Añadir 150µL de la solución madre al vial número 2 y realizar diluciones seriadas 1:2 hasta el vial 10 para obtener una serie de diluciones del antifúngico desde 3200mg/mL hasta 6,25 mg/mL.

#### Paso 2.

- a. Se llenaron 10 tubos con 9,9 mL de RPMI 1640 con doble concentración.
- b. Se añadió 100  $\mu$ L de cada uno de los viales de la serie anterior (Paso 1) a su correspondiente con RPMI (dilución 1:100). Se obtuvo así, una serie con diluciones del antifúngico desde 32mg/mL hasta 0.06mg/mL en medio de cultivo.

#### Paso 3.

- a. En cada columna de una placa de microtitulación, se dispensó 100  $\mu$ L de las correspondientes diluciones del antifúngico antes preparadas. De esta forma se obtuvo un gradiente de concentración desde la columna 1 a la 10, de 32  $\mu$ g/mL hasta 0.06  $\mu$ g/mL.
- b. En cada uno de los pocillos de las columnas 11 y 12 se añadió 100  $\mu$ L del RPMI 1640 con doble concentración y sin droga.

Las placas así preparadas se rotularon y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

#### **III.11.3.-Preparación del inóculo.**

Todas las cepas se transfirieron a placas de Agar glucosado de Sabouraud y se incubaron a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 48-72 h. Posteriormente, se subcultivaron en igual medio de cultivo bajo similares condiciones durante 24 h. A partir del crecimiento obtenido, se tomaron 5 colonias de aproximadamente 1mm de diámetro y se resuspendieron en 5 mL de agua destilada estéril. Se agitó durante 15-20 segundos mediante el empleo de un vortex y se ajustó la turbidez al tubo 0.5 de la escala de McFarland, corroborándose posteriormente mediante el conteo en una cámara de Neubauer ( $1-5 \times 10^6$  ufc/mL). La solución de trabajo se obtuvo, diluyendo la suspensión preparada 1:1000 en agua destilada estéril, mediante diluciones sucesivas 1:50 y 1:20, para alcanzar una concentración equivalente a  $1-5 \times 10^3$  ufc/mL.

#### **III.11.4.-Inoculación de las placas.**

Una vez descongeladas y atemperadas las placas, las mismas se inocularon con 100  $\mu$ L/pozo de las suspensiones celulares previamente preparadas desde la columna 1 hasta la 11 (control de crecimiento). En la columna 12 se añadió 100  $\mu$ L de agua destilada estéril. Cada cepa se aplicó por duplicado, destinando las filas A y

B a las controles por lo que las placas quedaron distribuidas de la siguiente manera (Anexo 6).

Filas A y B: Cepa control.

Filas C y D: Cepa problema No.1.

Filas E y F: Cepa problema No. 2.

Filas G y H: Cepa problema No. 3.

Columna 1- 10 Gradiente de concentración del antifúngico.

Columna 11: (libre de antifúngico): control de crecimiento de la cepa.

Columna 12 (libre de antifúngico e inóculo): control de esterilidad y blanco para la lectura de absorbancia.

### **III.11.5.-Incubación.**

Las placas se taparon, rotularon y colocaron en cámara húmeda. Se incubaron a 35 ° C durante 48 h.

### **III.11.6.-Lectura e interpretación de los resultados.**

Para los azoles, se realizó una lectura visual y lectura espectrofotométrica. La primera se llevó a cabo con la ayuda de un visor de aumento, definiéndose la CMI como la concentración más baja de antifúngico que inhibió el 50% del crecimiento de la levadura, al compararla con el control de crecimiento. Para la nistatina, solo se realizó la lectura visual y se consideró la CMI como la menor concentración del antifúngico que inhibió el 100% del crecimiento de la cepa.

La lectura espectrofotométrica se realizó a 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), previa agitación de los pocillos mediante pipeteo vigoroso hasta lograr homogeneidad en las suspensiones celulares. (**Pfaller *et al.*, 1995; Lozano-Chiu, 1999**).

Para la determinación del 50% de inhibición del crecimiento se empleó la siguiente fórmula: (**Van Eldere *et al.*, 1996**)

$$A \leq A_b + [0,5 \times (A_k - A_b)]$$

Donde: A: Absorbancia.

Ab: Absorbancia del blanco (control sin inóculo y sin droga).

Ak: Absorbancia del control de crecimiento.

Si  $Ab = 0$ , entonces  $A = 0,5 \times Ak$

Se asumieron los criterios de resistencia y sensibilidad aprobados por el CLSI en el 2002 para *Candida spp.* en medio RPMI 1640 como se exponen en el siguiente cuadro:

Criterios	Itraconazol (µg/mL)	Ketoconazol (µg/mL)
Sensible	< 0.125	<0.125
Dosis Dependiente	0.25-0.5	0.25-0.5
Resistente	>1	>1

Al no existir criterios de resistencia y sensibilidad aprobados por el NCCLS para *Candida spp* en medio RPMI1640 frente a nistatina y clotrimazol se asumió para la nistatina el criterio propuesto por Kuriyama *et al.* según el cual, una cepa es resistente cuando crece a una concentración de este antifúngico  $16 \mu\text{g/mL}$  y sensible cuando lo hace concentraciones inferiores a  $16 \mu\text{g/mL}$ . Para el clotrimazol, no existen reportes internacionales con estos criterios y solo se expresan los valores de CMI encontrados, sus rangos y medias geométricas (**Kuriyama *et al.*, 2005**).

### III.12.- Análisis estadístico.

Se utilizó análisis univariado con media aritmética y desviación estándar en variables cuantitativas y el porcentaje en variables categóricas. Se utilizó análisis bivariado para relacionar dos variables entre sí utilizando la prueba de Chi-cuadrado en variables cualitativas. Para comparar más de dos medias aritméticas se utilizó la prueba de Análisis de Varianza de un factor. En ambas se utilizó un nivel de significación del 5%.

Utilizando el programa estadístico EpiInfo versión 5.01, se determinaron las medias geométricas (MG) de los valores de las CMIs obtenidos, el rango, las concentraciones de los antifúngicos capaces de inhibir el 50 y al 90 % de las cepas

---

(CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> respectivamente). Para el itraconazol y el ketoconazol se realizó el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la concordancia entre las lecturas visuales y espectrofotométricas.

### ***III.13.-Ética de la investigación.***

Cada paciente que integró el estudio recibió la información pertinente sobre los propósitos científicos y sociales de la investigación. Predominaron los principios de voluntariedad, beneficencia y confidencialidad en todos los aspectos de la investigación. Los individuos que estuvieron de acuerdo lo conciliaron firmando el documento de consentimiento informado. Los procedimientos diagnósticos y terapéuticos utilizados a lo largo del estudio son los aprobados en las normativas del Consejo Nacional de México para la prevención y control del SIDA (**CONASIDA, 2000**).

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS**



#### IV. RESULTADOS

El total de los pacientes investigado tuvo un promedio de edad de 34.97 años, distribuidos en 21 del sexo femenino y 76 del masculino. De ellos 42 tenían pareja estable. La tendencia sexual predominante fue la heterosexual (56.7%), seguida de la homosexual (24.7%) y la bisexual (18.5%).

En la tabla 1 se presentan las características de los pacientes por grupo de tratamientos:

Tabla 1 Características de los pacientes por tipo de tratamiento realizado.					
Características	Grupos de tratamientos				Prueba ANOVA y Chi-cuadrado
	Tópicos		Sistémicos		
	Nista- tina n = 24	Clotrima- zol n = 24	Ketoco- nazol n = 23	Itraco- nazol n = 26	
<b>Edad</b>					
• Promedio	35.79	35.67	34.52	34.77	F = 0.0813; p > 0.05
• Desviación Estándar	13.240	12.737	9.125	7.665	
• Mínimo	23	20	23	22	
• Máximo	82	68	51	50	
<b>Sexo</b>					
• Masculino %	70.8	87.5	73.9	80.8	X <sup>2</sup> = 2.341; p > 0.05
• Femenino %	29.2	12.5	26.1	19.2	
<b>Episodio de Candidiasis al recibir el tratamiento</b>					
• Primer episodio %	29.2	45.9	43.5	30.8	X <sup>2</sup> = 3.225; p > 0.05
• De dos a cuatro episodios %	50.0	33.3	39.1	53.8	
• Cinco o más episodios %	20.8	20.8	17.4	15.4	

Fuente: Investigación realizada

La edad promedio de los grupos de tratamiento osciló entre 34 y 35 años con edades mínimas alrededor de 20-23 años y máximas entre 50-82. Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas considerándose los grupos homogéneos en cuanto a la edad (p > 0.05).

En todos los grupos de tratamiento predominó el sexo masculino. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el sexo por tipos de tratamiento, siendo por tanto homogéneos los grupos para esta variable (p > 0.05).

La cantidad de episodios de candidiasis al recibir el tratamiento presentó algunas diferencias en los grupos de tratamiento, sin embargo estas no fueron significativas ( $p > 0.05$ ).

Forma Clínica	Ketoconazol	Itraconazol	Nistatina	Clotrimazol	Cantidad	%
<b>Pseudomembranosa</b>	22	24	22	23	91	93.8
<b>Eritematosa</b>	-	1	-	1	2	2.1
<b>Mixta</b>	1	1	2	-	4	4.1
<b>Total</b>	23	26	24	24	97	100

Fuente: Investigación realizada

La gran mayoría de los pacientes presentó la forma pseudomembranosa que se distribuyó uniformemente entre los cuatro grupos de tratamiento (tabla 2).

Área afectada	Asintomáticos		Sintomáticos		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Extensa</b>	17	45.9	33	55	50	51.6
<b>Localizada</b>	20	54.1	27	45	47	48.4
<b>Total</b>	37	38.1 *	60	61.9 *	97	100.0

Fuente: Investigación realizada

Nota: \* Porcentaje calculado del total de la fila. El resto de los porcentajes calculados del total de las columnas.

La mayoría de los pacientes eran sintomáticos, tres de cada cinco presentaron esa condición, refiriendo entre otros síntomas: dolor, ardor y dificultad para la ingestión. El área afectada extensa predominó sobre la localizada en el total de pacientes. No obstante, en los pacientes asintomáticos predominó la lesión localizada y sucedió lo inverso en los sintomáticos (tabla3). Sin embargo, la muestra fue insuficiente para

demostrar significación estadística en las diferencias observadas, ( $X^2 = 0.5050$ ;  $p > 0.05$ ).

La figura 1 muestra el resultado de los cultivos iniciales de las lesiones orales de los 97 pacientes involucrados en el estudio. El 92% de los pacientes tuvieron *Candida albicans* y el 8% otras especies de *Candida*. El análisis de las especies identificadas al finalizar los tratamientos fue en los 47 pacientes que no alcanzaron la cura micológica, se demostró que el 89.4 % de las mismas fueron *C. albicans* y que en 5 pacientes las especies iniciales (4 *C. albicans* y una *Candida* sp.) fueron reemplazada por otras diferentes (*C. lusitanae*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilopsis* y *C. albicans*).

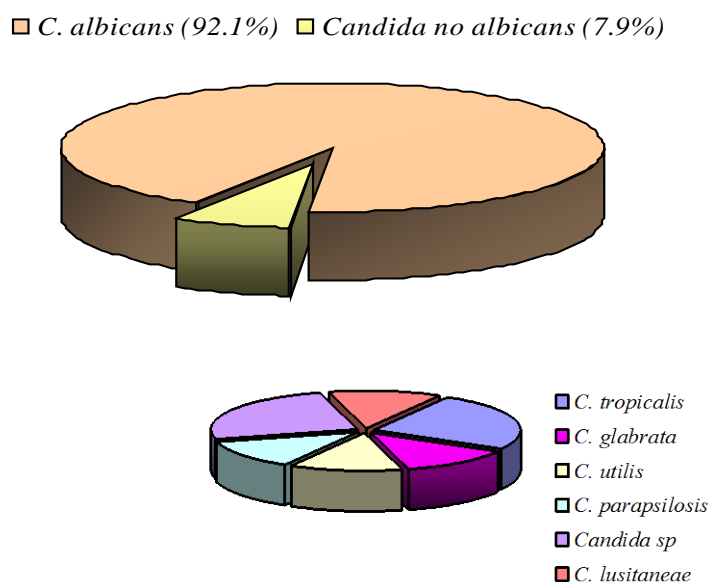


Fig. 1.- Distribución de las cepas encontradas según las especies de *Candida* en los aislamientos previos al tratamiento.

Tabla 4						
Distribución de los pacientes por resultados clínico y micológico según tratamiento utilizado.						
Resultados	Tópicos		Sistémicos		Total pacientes n= 97	Prueba Chi-cuadrado
	nista- tina n = 24	clotri- mazol n = 24	ketoco- nazol n = 23	itracono- nazol n = 26		
<b>Cínicos</b>						
• Remisión total %	12.5	25.0	21.7	15.4	18.6	X <sup>2</sup> = 3.072; p > 0.05
• Notable mejoría %	50.0	37.5	43.6	42.3	43.3	
• Moderada mejoría %	25.0	29.2	30.4	34.6	29.9	
• Igual o peor %	12.5	8.3	4.3	7.7	8.2	
<b>Micológico (cultivo)</b>						
• Negativo %	50.0	58.3	56.6	42.3	51.6	X <sup>2</sup> = 1.582; p > 0.05
• Positivo %	50.0	41.7	43.4	57.7	48.4	

Fuente: Investigación realizada

Los tratamientos fueron exitosos desde el punto de vista clínico (tabla 4), con remisión total de los síntomas y signos o mejoría notable o moderada en el 91.8% de los pacientes. Por tipo de tratamiento no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas. El efecto de los tratamientos tópicos se obtuvo en el 87.5% de éxito con remisión de los síntomas o mejoría con nistatina y con el clotrimazol el 91.7%. Con los tratamientos sistémicos se obtuvo un éxito de los síntomas o mejoría en el 95.7% de los pacientes con ketoconazol y 92.3% con itraconazol.

El resultado micológico denotó que la mayoría tuvo cultivos negativos al final del tratamiento y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos empleados. Los tratamientos tópicos presentaron un 50% de cultivo negativo con la nistatina y un 58.3% con el clotrimazol. Con los tratamientos sistémicos se obtuvo un 56.6% de mejoría con ketoconazol y un 42.3% con el itraconazol.

#### **IV.2.- Estudios de susceptibilidad \* in vitro”.**

En las tabla 5, se presentan los rangos, medias geométricas, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de la CMI de itraconazol, ketoconazol, clotrimazol y nistatina frente a las especies de *Candida*, aisladas de los pacientes que no alcanzaron la cura micológica, antes de

que iniciaran alguno de los cuatro esquemas de tratamientos (pre-tratamiento) y las obtenidas una vez finalizados los mismos (post tratamiento).

Tabla 5

Distribución de los valores de CMI por antifúngicos para las especies de *Candida* según momento de su aislamiento.

Parámetros de sensibilidad para cada antifúngico (µg-mL)	Pre-tratamiento			Post-tratamiento				
	<i>C. albicans</i> (n = 45)	<i>C. glabrata</i> (n = 1)	<i>Candida sp.</i> (n = 1)	<i>C. albicans</i> (n = 43)	<i>C. lusitanae</i> (n = 1)	<i>C. guilliermondii</i> (n = 1)	<i>C. famata</i> (n = 1)	<i>C. parapsilopsis</i> (n = 1)
<b>Itraconazol</b>								
Rango	0.016-8	0.016*	0.016*	0.016-0.5	0.125*	0.016*	0.016*	0.032*
MG	0.018	-	-	0.018	-	-	-	-
MIC <sub>50</sub>	0.016	-	-	0.016	-	-	-	-
MIC <sub>90</sub>	0.25	-	-	0.064	-	-	-	-
<b>Ketoconazol</b>								
Rango	0.016-8	0.016	0.016	0.016-1	0.016	0.016	8	0.016
MG	0.010	-	-	0.013	-	-	-	-
MIC <sub>50</sub>	0.016	-	-	0.016	-	-	-	-
MIC <sub>90</sub>	0.016	-	-	0.016	-	-	-	-
<b>Clotrimazol</b>								
Rango	0.016-1	0.016	0.125	0.016-0.25	0.016	0.016	0.016	0.016
MG	0.018	-	-	0.016	-	-	-	-
MIC <sub>50</sub>	0.016	-	-	0.016	-	-	-	-
MIC <sub>90</sub>	0.125	-	-	0.064	-	-	-	-
<b>Nistatina</b>								
Rango	0.5-2	0.5	1	0.5-2	4	1	2	1
MG	1.19	-	-	1.38	-	-	-	-
MIC <sub>50</sub>	1	-	-	1	-	-	-	-
MIC <sub>90</sub>	2	-	-	2	-	-	-	-

Fuente: Investigación realizada

\* Cuando se trata de una cepa única, solo se refiere el valor absoluto de CMI

En los pacientes que no alcanzaron la cura micológica, los rangos de CMIs de itraconazol y ketoconazol para las cepas de *C. albicans* aisladas antes de iniciar los tratamientos fueron más amplios (0.016-8µg/mL) que los correspondientes a los aislamientos de esa misma especie obtenidos al finalizar los esquemas de tratamiento (0.016-0.5µg/mL) para itraconazol y (0.016-1µg/mL) para ketoconazol, pero los valores de MG, CMI<sub>50</sub> y CMIC<sub>90</sub> fueron similares entre los dos grupos para ambas drogas. Para el resto de las especies los valores de CMIs de ambas drogas fueron bajos, con la única excepción del de ketoconazol frente a una cepa de *C. famata*, obtenida al finalizar el tratamiento en uno de los pacientes que recibió nistatina, que alcanzó el valor de 8µg/mL.

Los rangos de CMI de nistatina para las cepas de *Candida albicans*, fueron similares (0.5-2 µg/mL) entre ambos grupos así como los valores de las medias geométricas, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> correspondientes. Para el total de las cepas el rango de CMI a esta droga fue de 0.5-4 µg/mL y entre todas las especies identificadas, *Candida lusitanae* mostró el mayor valor absoluto de CMI de nistatina para un aislamiento (4 µg/mL). Para el clotrimazol, el rango de CMI frente a los aislamientos de *Candida albicans*, obtenidos antes de iniciar los tratamientos, fue mayor (0,016-1µg/mL) que el obtenido para los aislamientos post-tratamiento (0.016-0.025) pues una cepa de esta especie mostró el mayor valor absoluto de CMI de clotrimazol para un aislamiento. Sin embargo los valores de MG, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> fueron similares entre ambos grupos.

En la tabla 6 se presentan los resultados de los estudios de susceptibilidad "in vitro", expresados en los valores de rangos, medias geométricas, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de la CMI de itraconazol, ketoconazol, clotrimazol y nistatina frente a los aislamientos obtenidos de los pacientes **que alcanzaron la cura micológica**, En este caso, solo se estudió el comportamiento de cada cepa frente al antifúngico que fue utilizado como tratamiento en el paciente del cual fue aislada.

Tabla 6 Parámetros de susceptibilidad de los aislamientos obtenidos de los pacientes con cura micológica por antifúngico					
Antifúngico	Género y especie	CMI (µg/mL)			
		Rango	MG	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Itraconazol	<i>C. albicans</i> (n = 9)	0.016-0.032	0.011	0.016	0.032
	<i>C. tropicalis</i> (n = 1)	0.016	-	-	-
	<i>C. lusitanae</i> (n = 1)	0.016	-	.	-
Ketoconazol	<i>C. albicans</i> (n = 11)	0.016-0.064	0.016	0.016	0.064
	<i>C. tropicalis</i> (n = 1)	0.016	-	-	-
	<i>C. parapsilopsis</i> (n = 1)	0.016	-	-	-
Clotrimazol	<i>C. albicans</i> (n = 13)	0.016-1	0.019	0.016	0.032
	<i>C. utilis</i> (n = 1)	0.125	-	-	-
Nistatina	<i>C. albicans</i> (n = 11)	1-2	1.166	1	2
	<i>Candida</i> sp. (n = 1)	1	-	-	-

Fuente: Investigación realizada

\* Cuando se trata de una cepa única, solo se refiere el valor absoluto de CMI

La tabla 7 muestra un análisis similar al de la tabla anterior, pero solo para las cepas de *C. albicans* que se aislaron de los pacientes **que no alcanzaron la cura micológica** antes de que comenzaran sus esquemas de tratamiento. Al igual que en la tabla anterior, cada aislamiento fue evaluado solo, frente al antimicótico que se utilizó para tratar al paciente del que se aisló.

Al observar los valores de la MG y la CMI<sub>50</sub> de cada antifúngico por separado frente a las cepas de *C. albicans* aisladas de los pacientes que alcanzaron cura micológica (tabla 6) y compararlos con sus correspondientes valores frente a las cepas de esta misma especie obtenidas de los pacientes que no alcanzaron cura micológica (tabla 7) vemos que son casi idénticos. Para Itraconazol y ketoconazol los valores del rango y la CMI<sub>90</sub> son más elevados en este último grupo

Tabla 7 Parámetros de susceptibilidad de las cepas de <i>Candida albicans</i> aisladas antes de iniciar los tratamientos de pacientes que no alcanzaron la cura micológica.				
Antifúngicos	CMI (µg/mL)			
	Rango	MG	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
Itraconazol (n = 13)	0.016-1	0.013	0.032	0.25
Ketoconazol (n = 9)	0.016-8	0.011	0.016	8
Clotrimazol (n = 9)	0.016	0.016	0.016	0.016
Nistatina (n = 12)	1-2	1.14	1	2

Fuente: Investigación realizada

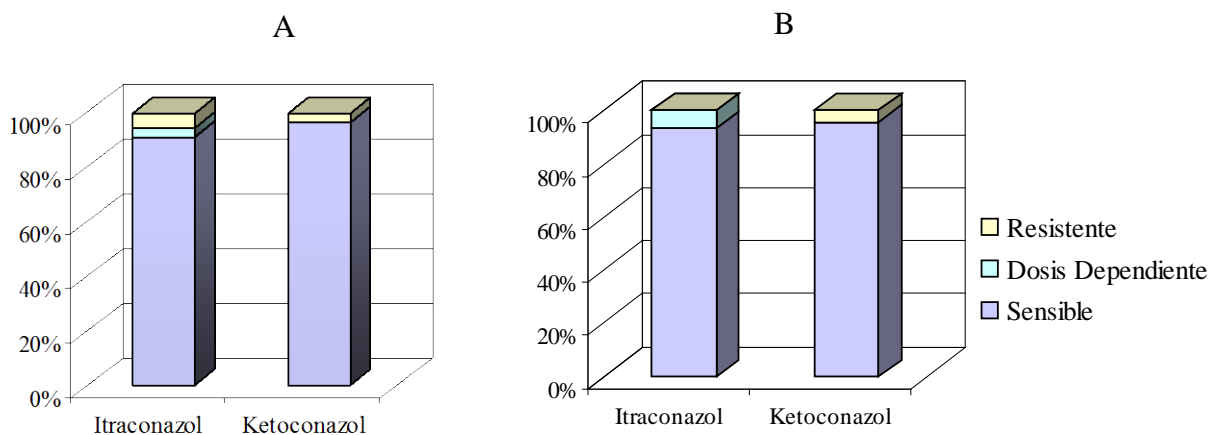


Figura 2.- Porcentajes de susceptibilidad frente a itraconazol y ketoconazol antes del tratamiento (A) y después del tratamiento (B) del total de cepas estudiadas.

Del total de cepas estudiadas (fig. 2), solo 3 (todas *C. albicans*) mostraron resistencia frente al itraconazol y 4 (3 *C. albicans* y 1 *C. famata*) al ketoconazol, para un 3.1 % y 4.0 % de cepas resistentes respectivamente. Otros 5 aislamientos (5.2 %), todos *C. albicans*, quedaron clasificados dentro de la categoría “susceptible dosis-dependiente” (SDD), para el itraconazol. Para la nistatina no se detectaron cepas resistentes y para el clotrimazol no están disponibles los valores de susceptibilidad in vitro que permitan realizar ese análisis para los aislamientos.

En la Fig 3, se presenta el coeficiente de correlación estimado mediante la formulación de Pearson el cual demostró una alta concordancia entre la lectura visual y espectrofotométrica para el ketoconazol, en tanto que el valor obtenido para el itraconazol fue inferior.

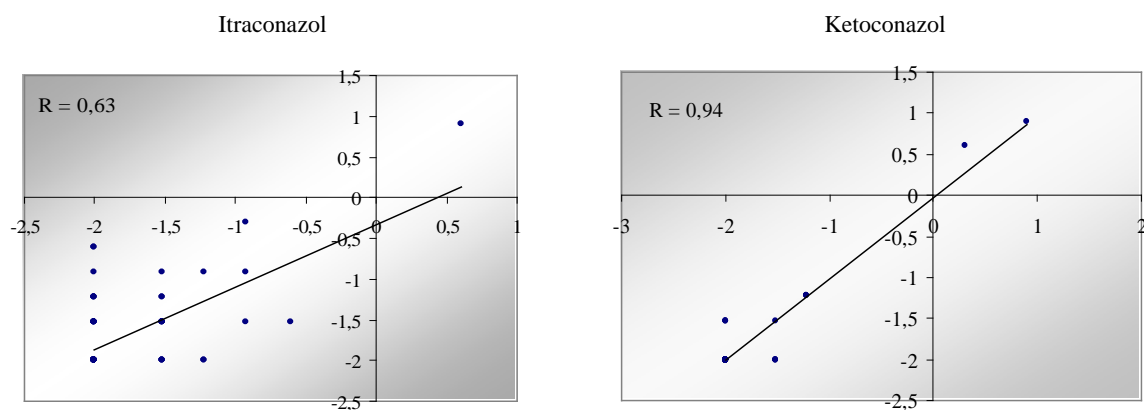


Figura 3.- Coeficiente de correlación de Pearson entre las lecturas visual y espectrofotométricas de los valores de CMI de itraconazol y ketoconazol.



## **CAPÍTULO V: DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

### V.1 Aspectos Clínicos, microbiológicos y terapéuticos.

La relación entre la candidiasis bucal y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida es tal, que esa afección se considera un importante marcador de progresión de la infección viral. Con la evolución de la enfermedad de base, se incrementan considerablemente la recurrencia y la recidiva de los episodios de candidiasis orofaríngea, lo anterior, obliga a la administración reiterada de antifúngicos e incluso, en ocasiones, a su prescripción profiláctica. Esa utilización frecuente e inevitable de los antifúngicos, con el riesgo de aparición de cepas resistentes y de episodios clínicos refractarios que genera, son un estímulo al desarrollo de estudios locales que permitan conocer, para una población dada, la capacidad de resolución de los episodios clínicos de las diferentes antifúngicos disponibles **(Fichtenbaum y Powderly, 1998)**.

En el periodo 1995-2003 se notificaban en el estado de Puebla, 1122 casos seropositivos al VIH. En todo el país, la distribución por sexo y edad, de los casos adultos acumulados al cierre del 2005, fue de un 83.2% para el masculino y de un 16.8% para el femenino y el grupo de edad más afectado fue el comprendido entre 15 y 45 años con el 78.8% de los casos. Por categoría de transmisión, en el 2003, año en que se desarrolló este trabajo, la distribución reportada por el Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA fue del 56.3% en heterosexuales, 24.8% en homosexuales y de un 18.8% en bisexuales. Los datos referidos permiten afirmar que las características demográficas generales (edad promedio, sexo y tendencias sexuales) de la población objeto de estudio se correspondió con las de la población afectada por VIH+/SIDA en México y su distribución (Tabla 1) fue homogénea entre los cuatro grupos de tratamiento **(CONASIDA, 2005)**.

Entre los aspectos clínicos de mayor interés, es de destacar que en esta casuística, el franco predominio de la forma pseudomembranosa lo que la diferencia de algunos trabajos en los que predomina, o tiene elevado porcentaje de presentación la forma eritematosa **(Wilson y Aguirre, 1997; Robinson et al., 1997)** pero coincide con otros en los que es esta forma de presentación la que prevalece **(Ranganathan et al., 2004; Campo et al., 2002)**.

De particular interés resulta un trabajo, de Sánchez-Vargas *et al.*, realizado recientemente en México, que señala 2.6% de los casos con la forma eritematosa, 10.5% de la mixta (eritematosa + pseudomembranosa) y el 84.2% de los casos con la pseudomembranosa haciendo referencia a un trabajo previo, en la misma población, con un 97.4% de prevalencia para esta última forma de presentación **(Sánchez *et al.*, 2005)**. Lo anterior sugiere la posible existencia de variaciones regionales en la forma de presentación de la candidiasis oral.

Como se aprecia en este estudio, la mayoría de los casos no refirieron síntomas acompañantes y entre los sintomáticos (dolor, ardor y dificultad para la ingestión), la mayoría tuvo lesiones extensas. La candidiasis oral suele cursar con escasos síntomas y cuando estos están presentes, predominan los referidos en esta casuística **(Aguirre Urizar, 2002; Ellepola y Samaranayake, 2000)**.

El franco predominio de *Candida albicans* como principal agente etiológico de la candidiasis bucal, en el curso de la infección por el VIH y casos con SIDA, ha sido constante en todos los estudios realizados aunque su frecuencia varía, como promedio, entre un 50% y más del 90% según las diferentes poblaciones objetos de estudio **(Ellepola y Samaranayake, 2000; Priscilla *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005)**. En México un estudio reciente describe esa especie en el 83.5% de los aislamientos **(Sánchez *et al.*, 2005)**.

En general, estos resultados son similares a los publicados por otros autores quienes demuestran un mayor porcentaje de aislamiento de *C. albicans* a partir de lesiones de la cavidad oral especialmente en pacientes inmunosuprimidos. En Cuba, Morán y Ferreiro, describieron las especies de levaduras aisladas en 34 pacientes SIDA con signos y síntomas de candidiasis oral e identificó a *C. albicans* en el 83% de los aislamientos, seguida de *C. kefyr* (7%), *C. tropicalis* (5%) y *C. krusei* (5%). Por su parte, Martínez. *et al.* encuentran valores inferiores de *C. albicans* (54.1 %) a expensas del incremento de otras especies como *C. tropicalis* (8.1 %) y *C. krusei* (5.4 %) **(Martínez *et al.*, 1997; Morán y Ferreiro, 2001)**.

Apoiados en datos de publicaciones de otros países, como los del estudio multicéntrico prospectivo desarrollado en Brasil en 130 pacientes con SIDA y candidiasis oral que reporta cifras muy similares a las encontradas en este trabajo

para *C. albicans* (91 %) o el trabajo de Hung *et al.* en Taiwan quienes reportan porcentajes de aislamiento de *C. albicans* del 91%, 86%, y 85.2% para los años 1999, 2001 y 2002 respectivamente, pensamos que una posible explicación a estas variaciones en los porcentajes de aislamientos de *C. albicans* pudiera relacionarse, como ha sido sugerido por otros autores, con diferencias regionales de las poblaciones objetos de estudio **(Priscilla *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005).**

Lo anterior, no es solamente válido para áreas geográficas diferentes sino que estas variaciones pueden estar presentes en el mismo país e incluso en la misma Ciudad. En México por ejemplo, a pesar de existir pocos estudios que reporten la identificación de levaduras en la cavidad oral de pacientes VIH/SIDA, es posible encontrar diferencias significativas en los porcentajes de *Candida* aisladas. Así, Hernandez *et al.* reportan en su trabajo, realizado en un hospital regional del Distrito Federal en el 2003, porcentajes de aislamientos, para las diferentes especies de *Candida*, muy similares a los que se reportan en el resto del mundo: 68.5 % para *C. albicans*, 8.57 % para *C. parapsilosis*, 5.71 % para *C. kruseii* y 2.85% para *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. lipolítica*. Sin embargo, en un estudio publicado por Sanchez-Vargas *et al.* en el 2005, en población del mismo Distrito Federal, ellos encuentran a *C. albicans* como agente etiológico del 84.2% de los episodios de candidiasis oral en los pacientes VIH/ SIDA estudiados **(Hernández *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).**

Dado los antecedentes de infección por *C. dubliniensis* en pacientes seropositivos al VIH, y la distribución mundial de dicho microorganismo, en el presente trabajo se realizaron las pruebas fisiológicas y bioquímicas establecidas para su identificación **(Sullivan *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2002).** No obstante, ninguno de los aislamientos se identificó como perteneciente a esta especie. Resultados similares se reportan en múltiples estudios a escala mundial, en particular en aquellos que solo utilizan los procedimientos fenotípicos para la identificación presuntiva de esta especie. Es conocido que estos procedimientos son controvertidos, por las variaciones que ofrecen sus resultados, y que en la actualidad, la mayoría de los expertos recomiendan los métodos moleculares para la identificación definitiva de *Candida dubliniensis*. **(Sánchez *et al.*, 2005; Priscilla *et al.*, 2002; Hung *et al.*, ; 2005 Costa *et al.*, 2006).**

Entre los aislamientos post- tratamiento, también predominó la especie *C. albicans* (43 de 47). En cinco pacientes, la especie aislada al finalizar los tratamientos fue diferente de la reportada antes de iniciar los mismos.

**Vargas y Joly (2002)**, al realizar un detallado análisis de diferentes estudios publicados, concluyeron que la relación genética entre las cepas obtenidas de pacientes con episodios recurrentes de candidiasis bucal, se expresa a través de uno de cuatro escenarios o posibilidades con franco predominio de los 2 primeros:

1. La misma cepa es la responsable de los diferentes episodios y se mantiene sin variaciones genéticas
2. La misma cepa es la responsable de los diferentes episodios aunque experimenta pequeñas variaciones en el genotipo
3. La cepa original es remplazada por otra cepa, de la misma especie, en algún episodio de recurrencia
4. La especie infectante es remplazada por otra especie no relacionada en algún episodio

Siguiendo lo notificado por estos autores y los resultados obtenidos por **Mayasaki et al. (1992)** que demuestran que la candidiasis bucal recurrente, en pacientes seropositivos al VIH, es generalmente causada por una misma cepa persistente y única para cada paciente, existen grandes posibilidades que la mayoría de las cepas de *C. albicans* no fueron erradicadas con los tratamientos y sean las mismas que ocasionaron el cuadro clínico inicial, aunque es imposible descartar que, al menos para algún paciente, se pudiera presentar el reemplazo de su cepa por otra de la misma especie.

Para los casos en que se presentó reemplazo de la cepa original por una de otra especie, la misma pudiera tener al menos dos orígenes: uno, que el paciente sufriera una nueva infección durante el periodo de tratamiento por una cepa exógena y el otro, que ambas coexistieran en la cavidad bucal desde un inicio, pero solo una fuera identificada. Esta última variante tendría mayores posibilidades pues es de conocerse que el principal origen de los episodios de candidiasis bucal es endógeno y que los pacientes VIH/SIDA presentan colonización simultánea de la cavidad bucal

por más de una especie de *Candida* con una frecuencia superior a la de los individuos sanos **(Sánchez et al., 2005; Priscilla et al., 2002)**.

Priscilla et al. en su estudio multicéntrico, analizaron 142 aislamientos obtenidos de 130 pacientes seropositivos al VIH con candidiasis oral, y demostraron que, en el momento del muestreo, 11 de dichos pacientes albergaban más de una especie de *Candida* en sus lesiones o diferentes serotipos de *C. albicans*, **(Priscilla et al., 2002)**. Por su parte Walmsley et al., reportaron el aislamiento de 2 especies diferentes en 7 de 90 pacientes con cultivos positivos **(Walmsley et al., 2001)**.

El medio de cultivo de Agar Dextrosa de Sabouraud, empleado en este trabajo por ser el más utilizado para el aislamiento primario de hongos filamentosos y levaduras a partir de muestras clínicas, tiene entre sus inconvenientes el no permitir una buena diferenciación inicial de las especies de levaduras, lo que trae como consecuencia que al seleccionar una colonia para las pruebas de identificación, lo más probable es que se corresponda con la especie más abundante en la muestra, que generalmente es *Candida albicans*. Esta limitación, lleva a algunos autores a sugerir la utilización de medios de cultivos diferenciales como el Agar Sabouraud Trifeniltetrazolium o más recientemente el CHROMagar Candida para los aislamientos iniciales **(Williams y Lewis, 2000)**.

En lo referente a la cura clínica y los resultados de los estudios micológicos, se ha demostrado que las cepas de *Candida* que colonizan la cavidad bucal de los pacientes seropositivos al VIH, pueden incrementar progresivamente su cuantía hasta alcanzar niveles que hacen manifiesto el cuadro clínico de candidiasis bucal y que, aún después de un tratamiento clínicamente exitoso, que erradique todos los síntomas y signos de la enfermedad, pueden permanecer en cuantía detectable mediante cultivo micológico. Por lo que un cultivo positivo después de un tratamiento, no significa necesariamente fracaso terapéutico. **(Vargas y Joly, 2002)**.

El concepto de cura clínica es controvertido, pero la mayoría de los autores incluyen en ese análisis a todos los pacientes con evolución favorable a un antimicótico dado (cura total + mejoría) por lo que se puede decir, que en este estudio predominaron los pacientes que obtuvieron cura clínica sobre los que obtuvieron la micológica. Discrepancia entre los resultados de cura clínica y micológica señala para la totalidad de los antifúngicos utilizadas en el tratamiento de la candidiasis bucal. Un ensayo terapéutico que compara clotrimazol con fluconazol durante 14 días de

tratamiento describe 85% de cura clínica para clotrimazol y 48% de cura micológica. Otro trabajo compara itraconazol (200mg/día) con ketoconazol (100 mg/día) señalando 71% de cura clínica para el primero y 60% para el segundo, mientras la cura micológica fue del 62% y 63%, respectivamente **(Bonito et al., 2002)**.

Dos estudios recientes, en enfermos con SIDA y candidiasis bucofaríngea, el itraconazol tuvo una actividad micológica similar al fluconazol (35%) y la respuesta clínica fue del 90% para ambos **(Del Palacio et al., 1999)**.

Finalmente Linpiyawan *et al* comparan, en un ensayo clínico, la eficacia y la asociación de efectos secundarios de la administración del itraconazol, en suspensión oral, y del clotrimazol tópico para el tratamiento de la candidiasis orofaríngea en pacientes seropositivos al VIH y reportan un 73.3% de cura clínica para el clotrimazol y un 66.7% con el itraconazol y concluyen que ambos medicamentos fueron similares en eficacia y seguridad no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en lo referente a la evolución clínica ni a los resultados de los estudios micológicos **(Linpiyawan et al., 2005)**.

## **V.2 Estudios de susceptibilidad *in vitro*.**

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* fueron concebidas inicialmente para medir la sensibilidad frente a los agentes antibacterianos **(Rex, Pfaller y Yu., 2001)**. No obstante, con la aparición de las primeras cepas de *C. albicans* que no respondían a los tratamientos antimicóticos, surgió la necesidad de extrapolar el soporte científico de las mismas al campo de la Micología. Idealmente, estas pruebas deben proveer una medida real de la actividad relativa de uno o más agentes antifúngicos, predecir la probable respuesta a la terapia, así como proveer un medio para el monitoreo del desarrollo de resistencia en una población normalmente susceptible o pronosticar el potencial terapéutico de nuevos agentes en investigación **(NCCLS, 2002; Hsueh et al., 2005)**. Estos estudios contribuyen a la selección de la mejor alternativa de tratamiento reduciendo al mínimo la posibilidad de que ocurra un fallo terapéutico **(Berrouane et al., 1999)**.

Un análisis de los valores de MG, CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de los cuatro antifúngicos estudiados frente a la totalidad de los aislamientos, como el que se representa en las tablas 5, 6 y 7, sugiere, de manera general, la existencia de elevados porcentajes de

sensibilidad *in vitro* de los aislamientos, independientemente del momento (pre o post tratamiento) de su obtención. Al relacionar los valores de CMI obtenidos con los puntos de corte para considerar una cepa como resistente frente a itraconazol o ketoconazol, que son los criterios aprobados por el CLSI y que rigen la casi totalidad de los estudios internacionales que se desarrollan sobre esta temática, se pudo confirmar muy bajos porcentajes de resistencia para esos antifúngicos.

Frente a la nistatina, con el valor de corte asumido ( $\geq 16\mu\text{g/mL}$ ) que fue extrapolado de otros estudios internacionales, ningún aislamiento se comportó como resistente.

Los porcentajes de cepas resistentes a Itraconazol y ketoconazol son muy variables en los numerosos estudios publicados sobre el tema. Un estudio similar a este, que evalúa la susceptibilidad *in vitro* frente al itraconazol y al ketoconazol, de 140 aislamientos de *Candida* procedentes de pacientes seropositivos al VIH con episodios de candidiasis oral, desarrollado por Ceballos *et al.*, reporta 1.7 % y 2.4 % de resistencia frente a uno y otro antifúngico respectivamente (**Ceballos *et al.*, 1999**). Por su parte, Carrillo-Muñoz *et al.* estudian un mayor número de aislamientos (181), y encuentran un 8.8 % de resistencia al itraconazol y un 17.7 % al ketoconazol (**Carrillo-Muñoz *et al.*, 1997**).

Se ha descrito como resistencia intrínseca o innata, aquella que presentan todas las cepas de una misma especie fúngica; mientras que la resistencia primaria ocurre cuando aparecen de forma espontánea cepas resistentes en una especie normalmente sensible a un determinado medicamento. En ambos casos, la resistencia se desarrolla, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico. Por su parte, la resistencia secundaria o adquirida aparece después de la exposición a los antimicóticos y puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria (**Johnson *et al.*, 1995; Revankar *et al.*, 1996**).

Las cepas que mostraron resistencia en este estudio fueron siete en total, seis *C. albicans* y una *C. famata* (4 al ketoconazol y 3 al itraconazol). De las *C. albicans* cinco cepas fueron aisladas antes de iniciar los tratamientos y la otra al igual que la *C. famata* se aislaron al finalizar los mismos, de pacientes que no alcanzaron la cura micológica. Para la especie *Candida albicans* no se reconoce la existencia de



resistencia intrínseca frente a los azoles. Ese tipo de resistencia se ha descrito para otras especies de *Candida*, en particular *C. glabrata* y *C. krusei* y muy especialmente frente al fluconazol **(Pfaller et al., 2006)**.

Cuatro de las cinco cepas de *C. albicans* obtenidas antes de iniciar los tratamientos fueron aisladas de pacientes que cursaban con su primer episodio de candidiasis bucal. Esto hace pensar en la posibilidad de que fueran portadoras de una resistencia primaria, debido a que en esos pacientes no se recogía antecedentes de tratamientos previos. Otras dos cepas eran, posiblemente, portadoras de resistencia secundaria o adquirida pues las mismas se aislaron de pacientes con episodios previos de candidiasis oral (uno en el cuarto y el otro en el quinto episodio) y ambos habían recibido tratamiento previo con itraconazol y ketoconazol. Finalmente, *C. famata* se aisló del exudado final de un paciente tratado con nistatina, que no alcanzó la cura micológica. Esa especie reemplazó a una *Candida albicans* que había sido aislada inicialmente de ese paciente por lo que debe ser portadora de una resistencia secundaria.

Como se comentó en los resultados, solo 2 cepas, ambas *C. albicans*, mostraron resistencia cruzada frente a itraconazol y ketoconazol. Esos aislamientos se obtuvieron de pacientes que recibieron posteriormente esas mismas drogas como esquema de tratamiento. La resistencia cruzada entre azoles ha sido ampliamente abordada en la literatura médica y puede ser inducida aún, tras cortos periodos de tratamiento **(Goldman et al., 2000; Magill et al., 2006)**. Marr, describió el desarrollo de resistencia cruzada entre el ketoconazol y el itraconazol en 14 de 87 aislamientos de *Candida*, de los cuales 4 mostraron reducción de la susceptibilidad al voriconazol y planteó que la profilaxis con las drogas azólicas, pudiera contribuir a la emergencia de levaduras menos susceptibles **(Marr, 2004)**.

En el caso de la nistatina, y según el criterio de cepa resistente adoptado para este trabajo (crecimiento a una concentración  $>16 \mu\text{g/mL}$ ), todas las cepas estudiadas, independientemente de la especie o el momento de su aislamiento se comportaron como sensibles.

En los pacientes que fueron tratados con drogas diferentes de nistatina (azoles) y que no alcanzaron cura micológica, la exposición de las cepas a esos medicamentos durante el tratamiento, no indujo en ellas, modificaciones detectables en sus patrones de susceptibilidad para la nistatina. Lo anterior se puede inferir porque frente a *C. albicans*, tanto para los aislamientos iniciales como para los post tratamiento, los rangos de CMI, de esa droga, y la media geométrica de sus valores fueron similares y porque la CMI<sub>90</sub> para ambos grupos fue la misma (2 µg/mL)(Tabla 5). Los reportes de resistencia cruzada entre azoles se comentaron anteriormente; Sin embargo, aunque se reporta con menor frecuencia, también se ha documentado que la exposición a los azoles puede inducir resistencia a la anfotericina B, que es un antifúngico del mismo grupo que la nistatina **(Vasquez.et al. 1998)**.

De las otras especies, *Candida lusitaniae* mostró el mayor valor absoluto de CMI de nistatina para una cepa (4 µg/mL). Aunque ese valor no es expresión de resistencia, es oportuno destacar que entre el 5 y 20 % de los aislamientos de esa especie son resistentes a la anfotericina B **(Krcmery y Barnes, 2002)**.

Al analizar el comportamiento de las cepas obtenidas de los pacientes que recibieron tratamiento con nistatina es de destacar que para todos los aislamientos iniciales, independientemente de que procedieran del grupo de pacientes que alcanzaron cura micológica o no (tablas 6 y 7), los rangos de CMI fueron idénticos y las medias geométricas de sus valores fueron muy similares. Lo mismo sucedió al comparar los aislamientos obtenidos antes y después del tratamiento de los pacientes que no alcanzaron su cura micológica (tabla5). Por lo que se puede afirmar, que la no erradicación de esas cepas durante el tratamiento no fue expresión de que las mismas fueran resistentes a la droga utilizada. Como mencionamos anteriormente, un cultivo positivo después de un tratamiento, no significa necesariamente fracaso terapéutico. **(Vargas y Joly, 2002)**.

Resultados muy similares a los de este trabajo son reportados por Kuriyama *et al.* en el 2005 en un estudio realizado en Inglaterra en el que evalúan la susceptibilidad *in vitro* de 618 aislamientos de diferentes especies de *Candida*, incluidas 362 obtenidas de episodios de candidiasis bucal, a los siete antifúngicos más utilizados mediante la metodología del NCCLS . Ellos encuentran que la totalidad de los aislamientos fueron sensibles a nistatina y que los valores de CMI<sub>90</sub> fueron de 1 µg/mL para *C.*

---

*albicans*, *C. tropicalis* y *Candida* spp. y de 2 µg/mL para las especies de *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* (**Kuriyama et al., 2005**).

Otro estudio desarrollado en Sudáfrica en 554 aislamientos de levaduras (330 procedentes de la cavidad bucal de pacientes VIH /SIDA) que utiliza la metodología del NCCLS reporta que todos los aislamientos fueron sensibles a nistatina pero obtienen rangos de CMI de la droga más elevados que los reportados en este trabajo (4-8 µg/mL). Estas diferencias pudieran, al menos en parte, estar determinadas por las políticas de utilización del medicamento en diferentes regiones (**Blignaut et al., 2002**).

En el Laboratorio de Micología del IPK, también se han desarrollado trabajos previos en los que se ha evaluado la susceptibilidad *in vitro* de diferentes especies de *Candida* a nistatina mediante un micrométodo, similar al utilizado en este trabajo, pero con la diferencia de que el medio de cultivo utilizado no fue el RPMI. En uno de esos estudios las cepas fueron obtenidas mediante exudados vaginales y las CMI<sub>90</sub> de nistatina para los aislamientos de *Candida albicans* fue de 2 µg/mL, con rango de 0.125-4 µg/mL. El otro estudio fue realizado con cepas procedentes de la cavidad bucal de pacientes con SIDA y el rango de CMI para esa misma especie fue de 0.125 -2 µg/mL y la CMI<sub>90</sub> de 2 µg/mL. En general, los resultados de estos 2 trabajos son muy similares a los reportados en este estudio. Todas las cepas resultaron ser sensibles a la nistatina, y las pequeñas diferencias en rangos pudieran estar asociadas a múltiples factores entre los que se pudieran destacar el uso de un medio de cultivo diferente, el sitio de procedencia de las cepas y las diferencias entre las poblaciones objeto de estudio (**Fernández et al., 2001; Llovera y Fernández, 2003**).

En el caso del clotrimazol, como hemos mencionado no existen puntos de corte para valorar las cepas estudiadas como sensibles o resistentes por lo que los autores hacen referencia a los valores absolutos de CMI de este antifúngico frente a los diferentes aislamientos, así como a sus rangos y valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>. En el trabajo antes referido de Blignaut *et al.*, se presentan los resultados de los estudios de susceptibilidad *in vitro* frente a clotrimazol de 466 cepas de *C. albicans* y reporta un rango de valores para la CMI de 0.07-1µg/mL, una media geométrica de 0.015µg/mL y una CMI<sub>50</sub> de 0.015 µg/mL.

Como se puede observar en la tabla 5 esos valores son casi idénticos a los obtenidos en este estudio. Un trabajo previo en el IPK, que estudió la susceptibilidad de aislamientos vaginales de *C. albicans* frente a clotrimazol, reporta valores de MG (0.16µg/mL), rango (0.125-2µg/mL) y de CMI<sub>50</sub> (0.125µg/mL) más elevados que los obtenidos en este estudio. Estas diferencias podrían explicarse, al menos en parte, por la utilización de caldo casitona como medio de cultivo en ese estudio en lugar del RPMI. La incidencia del medio de cultivo utilizado sobre los valores absolutos de CMI es un aspecto bien conocido de la estandarización de estas pruebas (**Rex et al., 2001**).

La lectura e interpretación de las pruebas de susceptibilidad a los azoles, suele ser una de las fuentes de variabilidad de los resultados tanto intra como interlaboratorio. Para estos antifúngicos, las levaduras mantienen cierto grado de crecimiento residual en las concentraciones superiores a la CMI. A este crecimiento se le denomina "cola de crecimiento" y se presenta sobre todo en cepas de *C. albicans* y *Candida tropicalis* (**Carrillo Muñoz et al., 1994**). Debido a esto, durante la lectura visual puede existir cierta incertidumbre en algunos casos, por lo que se utiliza, como herramienta adicional, la lectura espectrofotométrica a 405nm (máxima absorbancia del medio) para poder esclarecer los resultados dudosos obtenidos previamente.

Resultados similares a los obtenidos para el ketoconazol, han sido publicados por otros autores de reconocido prestigio en esta temática con coeficiente de correlación de 0.97 entre ambos tipos de lecturas (**Barchiesi et al., 1994; Rodero et al., 1995**).

A pesar de obtener una menor correspondencia entre las lecturas evaluadas para el itraconazol, es importante destacar, que las cepas resistentes y sensibles obtenidas visualmente confirmaron su resultado espectrofotométricamente, hecho de gran importancia pues indica la fiabilidad de este tipo de lectura, que es la recomendada por la metodología del el CLSI.

Los 18 pacientes con remisión total (tabla 4), tuvieron cultivos micológicos negativos al finalizar sus tratamientos, a diferencia de los 8 pacientes sin mejoría que todos mantuvieron cultivos positivos. Sin embargo, ninguna de las pocas cepas que mostraron resistencia *in vitro* se incluyó en este último grupo de pacientes sino que

se distribuyeron entre aquellos con notable o moderada mejoría. Es conocido que la aparición de resistencia a los antifúngicos puede depender de factores clínicos y microbiológicos. Una infección persistente a pesar de la administración de un antifúngico a dosis máximas se puede describir como clínicamente resistente al agente terapéutico. No obstante, el microorganismo responsable de la infección puede mostrar *in vitro* una sensibilidad normal a la droga o lo contrario, cepas resistentes *in vitro* a un antifúngico dado pueden obtenerse en pacientes que logran resolución clínica de su cuadro con ese medicamento **(Sanglard, 2002)**.

Son múltiples las causas que pueden explicar un fracaso terapéutico entre las que se destacan: La infección por una cepa resistente a la antimicótico utilizado, pacientes que no realizan adecuadamente los tratamientos, absorción inadecuada del medicamento, interacción con otros fármacos y finalmente, factores asociados al hospedero, entre los que sobresale, el grado de inmunosupresión **(Fichtenbaum y Powderly, 1998)**.

En resumen, en el presente estudio los tratamientos tópicos (clotrimazol y nistatina) y los sistémicos (ketoconazol e itraconazol) mostraron un comportamiento similar en cuanto a los porcentajes de cura clínica y cura micológica inducidos en los pacientes, a pesar de encontrarse muchos de ellos en un episodio de recidiva de su cuadro de candidiasis orofaríngea (tabla 1).

Los tratamientos, tópicos y sistémicos, utilizados para episodios de candidiasis oral son muchos y han sido recomendados por Comités de expertos **(Pappas et al., 2004)**. Sin embargo, es importante desarrollar estudios locales que se adapten a las realidades de cada región o país antes de extrapolar lo normado internacionalmente. Este estudio permite recomendar, sobre una base científica, una mayor utilización de los tratamientos tópicos en Puebla, sobre todo considerando su mayor inocuidad, fácil administración y menor costo y reservar las drogas sistémicas para aquellos casos en que se haya demostrado fracaso terapéutico con los tratamientos tópicos o que por la gravedad del cuadro, se requiera de una conducta más enérgica por la posible existencia de formas graves asociadas (esofágicas) o en los que la frecuencia de las recidivas interfieran con el bienestar del paciente. Lo anterior, ha sido por autores que sugieren que los antifúngicos tópicos se consideren como la primera línea terapéutica para tratar los episodios iniciales o recurrentes de

---

candidiasis orofaríngea no complicada y que los azoles para uso sistémico se reserven para los casos que no responden a los tratamientos tópicos. (**Powdery et al., 1999**).

## **CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES:

1.-Escasa sintomatología o ausencia total de síntomas subjetivos y extensión variable fueron características de la candidiasis oral, la cual adoptó, casi exclusivamente, la forma clínica pseudomembranosa en los pacientes VIH/SIDA en el Estado de Puebla, México.

2.-*Candida albicans* predominó ampliamente, sobre las otras especies, como agente etiológico de la candidiasis bucal en los pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA estudiados.

3. -Con todos los antifúngicos, administrados según las normas de CISA, México se obtuvieron elevados porcentajes de cura clínica y los tratamientos tópicos fueron tan efectivos como los sistémicos para alcanzar la cura micológica.

4.-Los valores de CMI de los cuatro antifúngicos frente a la población de especies de *Candida* estudiadas, fueron bajas, como se puede inferir al analizar los valores de sus medias geométricas.

5.-La inmensa mayoría de los pacientes alcanzaron la cura clínica, lo cual está en correspondencia con los bajos porcentajes de cepas resistentes detectadas en los estudios de susceptibilidad "in vitro".



## **CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES**

## VII. RECOMENDACIONES:

1.-Considerando el costo beneficio para los pacientes, la ausencia de efectos colaterales, el menor riesgo de cepas resistentes y su elevada efectividad, se sugiere incrementar el uso de los esquemas de tratamientos tópicos en el servicio de CISIDA-Puebla, México y reservar los tratamientos sistémicos para los casos con fracaso terapéutico o portadores de formas clínicas severas.

2.-Mantener una vigilancia sistemática de las especies de *Candida* involucradas en la etiología de la candidiasis orofaríngeas de los pacientes VIH/SIDA que acuden al servicio de CISIDA-Puebla, para detectar, de manera temprana, la aparición de especies con resistencia intrínseca a los azoles como *C. glabrata* y *C. kruseii*.

3.-Desarrollar estudios periódicos de la susceptibilidad "in vitro" de las especies de *Candida* involucradas en la etiología de la *Candidiasis orofaríngea* en el Estado de Puebla para sustentar científicamente recomendaciones relacionadas con la política del uso de los antifúngicos.

## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adnan OM, Tamer G, Koklu E, Cetil N, Koc N. Oral nystatin prophylaxis to prevent invasive candidiasis in neonatal intensive care unit. *Mycoses*. 2006;49:484-92.
2. Aguirre Urizar JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:17-21.
3. Aguirre Urizar JM, Echebarría GM, Eguía V. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida: manifestaciones en la cavidad bucal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004;9(Suppl. 1):148-57.
4. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Anstrom KJ. Comparative evaluation of Etest and Sensititre Yeast One Panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol*. 2007;698-706.
5. Alexandra TM. Métodos para la detección de resistencia a los antimocóticos. *Infection*. 2005;9(4):188-96.
6. Almagro Sánchez M, García Silva J, Fonseca Capdevila E. Manifestaciones cutáneas actuales de la infección por el VIH. *Piel*. 2003;4(1):15-25.
7. Almanza LD. *Vademecum farmacéutico*. 15ª ed. México, DF.: Editorial Multicolor; 2007.
8. Almirante B, Rodriguez D, Park JB, Cuenca EM, Almeda M. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infections: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002-2003. *J Clin Microbiol*. 2005:1829-35.
9. Arenas GR, López MR. *Micosis superficiales: tercera revisión del Consenso Nacional de Prevención, Diagnóstico y Tratamiento*. México, DF.: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Medicina de la UNAM; 2006.
10. Arenas GR. *Atlas de dermatología: diagnóstico y tratamiento*. 3ª ed. México, DF.: McGraw-Hill Interamericana; 2005.

11. Arenas GR. Micología médica. 2ª. ed. México, DF.: McGraw-Hill Interamericana; 2003.
12. Axell T, Samaranayake LP, Reichart PA. A proposal for reclassification of oral candidiasis. *Oral Surg Med Pathol Radiol Endod.* 1997;84(1):111-2.
13. Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Fothergill W, Rinaldi MG. *In vitro* activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(7):1530-3.
14. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari PM, Rosso R, *et al.* Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis.* 2006;6(21):1-6.
15. Bates S, De la Rosa JM, MacCallum DM, Brown AJ, Gow NA, Odds F. *Candida albicans* Iff11, a secreted protein required for cell wall structure and virulence. *Infect Immun.* 2007:2922-8.
16. Becker K, Almasri SA, Peters G, Heilmann Ch. Systematic survey of nonspecific agglutination by *Candida* spp. in latex assays. *J Clin Microbiol.* 2007:1315-8.
17. Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol.* 1999;32:531-7.
18. Blignaut E, Messer S, Hollis RJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibility of South African oral yeast isolates from HIV/AIDS patients and healthy individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;44:169-74.
19. Bliss JM, Sullivan M, Malone J, Haidaris G. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using recombinant human antibody single-chain variable fragments specific for hyphae. *J Clin Microbiol.* 2003: 1152-60.
20. Bonito AJ, Patton LL, Shugars DA. Management of dental patients who are HIV-positive. Evidence Report/Technology Assessment No. 37 (Contract 290-97-0011 to the Research Triangle Institute-University of North Carolina

- at Chapel Hill Evidence-based Practice Center). AHRQ Publication No. 01-E042. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality; 2002.
21. Bougnoux ME, Diogo D, Francois N, Sendid B. Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol.* 2006;1810-20.
  22. Calderone R, Suzuki S, Cannon R. *Candida albicans*: adherence, signalling and virulence. *Med Mycol.* 2000;30(suppl 1):125-37.
  23. Campo J, del Romero J, Castilla J, Garcia S, Rodriguez C, Bascones A. Oral candidiasis as a clinical marker related to viral load, CD4 lymphocyte count and CD4 lymphocyte percentage in HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med.* 2002;31:5-10.
  24. Carrillo-Muñoz AJ, Perman J, Gobernado M. Nuevos antifúngicos: presente y futuro. *Rev Esp Quimioter.* 1999;12(3):105-9.
  25. Carrillo-Muñoz AJ, Tur C, Estivill D, Montsant L, Carcelier A, Hernández-Molina JM, et al. Resistencia *in vitro* al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol.* 1997;14:50-4.
  26. Ceballos A, Gaitan L, Orihuela F, Olea D, Ceballos L, Quindos G. Resistencia *in vitro* a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidiasis oral. *Rev Iberoam Micol.* 1999;16:194-7.
  27. Ceballos SA, Gaitán C, Ruesga MT, Ceballos GL, Quindós G. Prevalencia de lesiones orales por *Candida* en una población con SIDA sometida a terapia antirretroviral altamente activa. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15:141-5.
  28. Chethrapilly PG, Thangam M. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:101-3.
  29. CONASIDA. Panorama epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México. México, DF.: Secretaria de Salud; 2005. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/conasida/estadis.htm>

30. Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA. Guía para la atención médica de pacientes con infección por VIH/SIDA en consulta externa y hospitales. 4ª ed. México, DF.: CONASIDA; 2000.
31. Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA. Panorama epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México. México, DF.: CONASIDA; 2006.
32. Coogan MM, Fidel PL, Komesu MC, Samaranayake LP. Candida and mycotic infections. Adv Dent Res. 2006;19:130-8.
33. Costa CR, de Lemos JA, Passos XS, de Araújo CR, Cohen AJ, Souza LK, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral candida isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. Mycopathologia. 2006;162:45-50.
34. De Beule K, Van Gestel J. Farmacología de itraconazol. Drugs. 2001; 61(suppl. 1):29-40.
35. De Faria P, Vargas P, Saldiva PH. Tongue disease in advanced AIDS. Oral Dis. 2005;11:72-80.
36. De Laet SAP, Pípolo E, Martínez R, Queiroz-Telles F, Simão M, Alcântara AP, et al. Multicenter Brazilian study of *Candida* species isolated from AIDS patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:253-7.
37. De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. Infect Immun. 2000;68(9):3172-9.
38. Del Palacio A, Garau M, Tena D, Sánchez G. Tratamiento antifúngico: últimos avances en dermatología. Rev Iberoam Micol. 1999;16:86-91.
39. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa Organisms Study. J Clin Microbiol. 2002;40:1298-1302.

40. Dilata Corell J, Navarro Mira M. Micosis cutáneomucosas en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia. *Piel*. 2000;1(6):297-306.
41. Ellepola ANB, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11:172-98.
42. Eraso E, Moragues MD, Villar VM, Sahand HI, Nagore GG, Pontòn J, *et al*. Evaluation of the new chromogenic medium Candida ID2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important Candida species. *J Clin Microbiol*. 2006:3340-5.
43. Erb-Downward J, Noverr CM. Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2007:3498-505.
44. Escobar CM, Zuluaga A. Nuevos antimocóticos y su uso en dermatología. *Med Cutan Ibero Latinoam*. 2004;32(6):231-42.
45. Fernández C, Echemendía Y, Cartaya T, Mendoza D. Sensibilidad *in vitro* a la nistatina de aislamientos de *Candida* spp. *Rev Cubana Med Trop*. 2001;53(3):194-8.
46. Fernández J, Díaz D, Otero X, Limeres J, de la Fuente J, Ocampo A. Valor predictivo de la candidiasis oral como marcador de evolución a SIDA. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10(2):32-40.
47. Fichtenbaum CJ, Powderly WG. Refractory mucosal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 1998;26:556-65.
48. Fidel PL. Candida-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res*. 2006(19):80-4.
49. Flint SR, Tappuni A, Leigh J, Schmidt AM, McPail L. Markers of immunodeficiency and mechanisms of HAART therapy on oral lesions. *Adv Dent Res*. 2006:19:146-51.
50. Frank CO, Alistair JP, Neil AR. Antifungal agents: mechanism of action. *Trends Microbiol*. 2003;11:272-9.



51. Goldman M, Cloud GA, Smedema M, LeMonte A, Connolly P, McKinsey DS, *et al.* Does long-term itraconazole prophylaxis result in in vitro azole resistance in mucosal *Candida albicans* isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection? *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1585-7.
52. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol.* 2002;42:207-27.
53. Hamza OJM, Matee MIN, Simon E. Oral manifestations of HIV infection in children and adults receiving highly active anti-retroviral therapy (HAART) in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Oral Health.* 2006;6(12):2-9.
54. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica de Goodman y Gilman.* 9ª ed. México, DF.: McGaw-Hill Interamericana; 1996.
55. Hariri S, McKenna TM. Epidemiology of human immunodeficiency virus in the United States. *Clin Microbiol Rev.* 2007;478-88.
56. Harwell JI, Obaro KS. Antiretroviral therapy for children. *JAMA.* 2006;296(3):330-1.
57. Hernández F, Cordova E, Manzano P, López R, Bazán E, López R. Frequency of mycoses in immunosuppressed patients in a regional hospital in México. *Salud Pub Mex.* 2003;45(6):1-6.
58. Hodgson TA, Greespan D. Oral lesions HIV disease and HAART in industrialized countries. *Adv Dent Res.* 2006;19(1):57-62
59. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):2629-32.
60. Hsueh PR, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, *et al.* Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(3):512-7.

61. Hung CC, Yang YL, Lauderdale TL, Mc Donald L, Hsiao CF, Cheg HH, et al. Colonization of human immunodeficiency virus-infected outpatients in Taiwan with *Candida* species. J Clin Microbiol. 2005;43:1600-3.
62. Infante C, Zarco A, Cuadra MS, Morrison K, Brofman M, Magis C. El estigma asociado al VIH/SIDA: El caso de los prestadores de servicios de salud en Mèxico. Salud Pub Mèx. 2006;48(2):141-50.
63. Jayatilake J, Samaranayake LP, Lu Q, Jin LJ. IL-1alfa, IL-Ira and IL-8 are differentially induced by *Candida* in experimental oral candidosis. Oral Dis. 2007;13:426-33.
64. Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidiasis. J Antimicrob Chemother. 1995;35:103-14.
65. Keating GM, Jarvis B. Caspofungin. Drugs. 2001;61:1121-9.
66. Kishore S. Oral lesions commonly associated with pediatric HIV-infection: presentation, management, and review of the literature. Gen Dent. 2006;284-7.
67. Kleber CJ, Rodrigues PC, Hiroyuki HM. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in Sao Pablo, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2006;48(1):21-6.
68. Klotz SA. Oropharyngeal candidiasis: a new treatment option. CID. 2006;42:1187-8.
69. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pahogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect. 2002;50:243-60.
70. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MAO. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. Oral Microbiol Immunol. 2005;20:349–53.

71. Lawrence HB, Aldona LB, Ritz JW. Antifungal effect of voriconazole on intracellular *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Candida parapsilopsis* in human monocyte-derived macrophages. J Med Microbiol. 2006;55:865-70.
72. Linares SM, Solís CF. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Rev Iberoam Micol. 2001;21:1-18.
73. Linpiyawon R, Jittreprasert K, Sivayathorn H. Clotrimazole troche vs. itraconazole oral solution in the treatment of oral candidosis in AIDS patients. Int J Dermatol. 2000;39:859-64.
74. Llovera V, Fernández C. Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos vaginales de *Candida* frente a clotrimazol y nistatina. Rev Cubana Med Trop. 2003;55(3):138-45.
75. López DB, Salatti DN, Ribero FF. Tratamiento antifúngico en pacientes con candidosis crónica bucal: estudio comparativo. Medicina Oral 2002;7(4):20-30.
76. Lozano-Chiu M, Arikan S, Paetznick L, Anaissie EJ, Rex JH. Optimizing voriconazole susceptibility testing of *Candida*: effects of incubation time, endpoint rule, species of *Candida*, and level of fluconazole susceptibility. J Clin Microbiol 1999;37(12):2755-9.
77. Maertens JA. History of the development of azoles derivatives. Clin Microbiol Infect. 2004;(suppl. 1):1-10.
78. Maestre JR, Alou L. Ventajas y desventajas de los antibióticos de uso tópico. Rev Esp Quimioter. 2001;14(3):230-3.
79. Maeve MC, Greespan J, Challachombe J, Stephen J. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. Bull World Health Org. 2005;83(9):700-6.
80. Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. J Clin Microbiol. 2006;44:529-35.

81. Maijala M, Rautemaa R, Järvensivu A, Richardson M. *Candida albicans* does not invade carious human dentine. *Oral Dis.* 2007(13):279-84.
82. Marr KA. Invasive *Candida* infections: discharging epidemiology. *Oncology.* 2004;18:9-14.
83. Martin CA. Invasive fungal infections in the critically ill patient. *J Pharm Pract.* 2005;18:9-17.
84. Martínez G, Perurena MR, Núñez J, Fernández CM, Bandera F. Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. *Rev Cubana Med Trop.* 1997;49(3):174-80.
85. Matsuura K, Yoshioka S, Tosha T, Hori H, Ishimori K, Kitagawa T, *et al.* Structural diversities of active site in clinical azole-bound forms between sterol 14{alpha}-demethylases (CYP51s) from human and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2005;280(11):9088-96.
86. Maza JL, Prado C, Vidooto V, Elgueazábal N, Pontón J. Adherencia de diversas especies de *Candida* a composites híbridos. *Rev Eur Odontoestomatol.* 2001;13(2):177-80.
87. Mbuagbaw J, Eyong I, Alemnji G, Mpoudi N, Same-Ekobo A. Patterns of skin manifestations and their relationships with CD4 counts among HIV/AIDS patients in Cameroon. *Int J Dermatol.* 2006;45:280-4.
88. McGinnis MR. *Laboratory handbook of medical mycology.* London: Academic Press; 1998.
89. Meletiadis J, Chanock S, Walsh JT. Human pharmacogenomic variations and their implications for antifungal efficacy. *Clin Microbiol Rev.* 2006:763-87.
90. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(6):523-30.
91. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Centro de Desarrollo de la Farmacoepidemiología. Formulario Nacional de Medicamentos. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2006.

92. Miyasaki SH, Hicks JB, Greenspan D, Polacheck I, MacPhail LA, White TC, *et al.* The identification and tracking of *Candida albicans* isolates from oral lesions in HIV-seropositive individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1992;5:1039-46.
93. Morán E, Ferreiro A. La candidiasis como manifestación bucal en el SIDA. *Rev Cubana Estomatol.* 2001;38(1):25-32.
94. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2. Villalova: NCCLS; 2002.
95. Odds FC, Arai T, Disalvo AF, Evans E, Hay RJ, Randhawa HC, *et al.* Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a sub-committee of the International Society of Human and Animal Mycosis (ISHAM). *J Med Vet Mycol.* 1992;30:1-10.
96. Pappas PG, Rex HJ, Lee JL, Hamill RJ. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 2003;37:634-43.
97. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38(2):161-89.
98. Patel M, Shackleton TJ, Coogan MM. Effect of antifungal treatment on the prevalence of yeast in HIV-infected subjects. *J Med Microbiol.* 2006;55:1279-84.
99. Pfaller MA, Dickema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006:435-47.
100. Pfaller MA, Messer SA, Coffman S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoints determinations using broth microdilution methods to test five antifungal agents including the new triazol DO870. *J Clin Microbiol* 1995;33(2):1094-7.
101. Pfaller MA, Yu WL. Antifungal susceptibility testing new technology and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am.* 2001;15(4):1227-61.

102. Pinjon E, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable methods for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 1998;36:2093-5.
103. Powdery WG, Mayer KH, Perfect JR. Diagnosis and treatment of oropharyngeal candidiasis in patients infected with HIV: a critical reassessment. AIDS Res Hum Retroviruses. 1999;15:1405-12.
104. Quindós G. Nuevas perspectivas en la terapia antifúngica. Gac Med Bilbao. 2001;98:20-3.
105. Ranganathan K, Hemalatha R. Oral lesions in HIV infection in developing countries: an overview. Adv Dent Res. 2006;19(1):63-8.
106. Ranganathan K, Umadevi M, Saraswathi TR, Kumarasamy N, Solomon S, Johnson N. Oral lesions and conditions associated with human immunodeficiency virus infection in 1000 South Indian patients. Ann Acad Med Singapore. 2004;33(Suppl):37S-42S.
107. Regina TS, Bernardo PC, Manhaes CD, Akiti T. A prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. Braz Oral Res. 2007;21(2):182-7.
108. Repetigny L, Lewandoski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. Clin Microbiol Rev. 2004;7:29-59.
109. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee, RK. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. J Infect Dis. 1996;174:821-7.
110. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev. 2001;14:643-58.
111. Reznik DA. Oral manifestations of HIV disease. Top HIV Med. 2006;13:143-8.
112. Rivas P, Quevedo R. Utilidad clínica de las pruebas de susceptibilidad antimicótica. Rev Colomb Cancerol. 2003;7:34-42.

113. Robinson PG, Challacombe SJ, Sheiham A, Zakrzewska JM. Is erythematous candidiasis associated with advanced HIV disease? *Oral Dis.* 1997;(Suppl 1):S116-8.
114. Sádaba B, García-Quetglas E, Azanza R. Relación entre estructura y funciones en los azoles. *Rev Esp Quimioter.* 2004;17(1):71-8.
115. Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM. Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis.* 2002; 8(1):151-60.
116. Sánchez VL, Ortiz LN, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Quindòs GP. Prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral candida isolated colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:83-92.
117. Sánchez VO, Perez RP, Romo GJ, Corona IP. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos. *Rev Iberoam Micol.* 2002(19):155-60.
118. Sanglard D, Odds CF. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:73-81.
119. Sanglard D. Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20:225-34
120. Shepherd MG. Fungi and parasites in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;1(4):373-6.
121. Shimahara MT Tongue pain: burning mouth syndrome vs. candida-associated lesion. *Oral Dis.* 2007;13:440-2.
122. Silva VV, Diaz CJ, Febré N. Vigilancia de la resistencia a levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infectol.* 2002;19(2):149-56.

123. Sullivan D, Haynes K, Bille J. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol. 1997;35:960-4.
124. Swinne D, Watelle M, Nolard N. *In vitro* activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non-*Candida albicans* yeast isolates. Rev Iberoam Micol. 2005;22:24-8.
125. Tay ET, Adam HM. Azole antifungal agents. Pediatr Rev. 2005;26(1):20-1.
126. Taylor BN, Staib P, Binder A, Biesecker A, Sehna M, Rollinghoff M, *et al.* Profile of *Candida albicans*-secreted aspartic proteinase elicited during vaginal infection. Infect Immun. 2005;73(15):1828-35.
127. Teixeira FV, De Assis SD, Resende MA. Identification and *in vitro* antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. Mycopathologia. 2007;164:27-33.
128. Tkacz JS, Di Domenico B. Antifungals: what is in the pipeline? Curr Op Microbiol. 2001;4:540-54.
129. Torres Lozada V, Mihm C, Sober A. Dermatología práctica. México, DF.: Nieto Editores; 2005.
130. Tsuruta R, Oda Y, Mizuno H, Hamada H, Nakahara T, Kasaoka S, *et al.* *Candida dubliniensis* isolated from the sputum of a patient with end-stage liver cirrhosis. Intern Med. 2007:597-600.
131. Van Eldere J, Joosten L, Verhaeghe A, Surmont I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and Semiautomated broth microdilution test. J Clin Microbiol. 1996:842-7
132. Vander BH. Mechanisms of antifungal resistance. Rev Iberoam Micol. 1997;14:44-9.
133. Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression of oral candidiasis in human



- immunodeficiency virus-positive individuals. J Clin Microbiol. 2002;40:341-50
134. Vasquez J, Arganoza M, Boikov D, Yoon S, Sobell J, Akins R. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. J Clin Microbiol. 1998;36:2690-5.
135. Wakiec R, Prasad R, Morschlauser J, Barchiesi F, Borowski E, Milewski S. Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. Mycoses. 2007;50:109-15.
136. Walmsley S, King S, McGeer A, Ye Y, Richardson S. Oropharyngeal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus: correlation of clinical outcome with *in vitro* resistance, serum azole levels and immunosuppression. CID. 2001;32:1554-61.
137. Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. Oral Dis. 2000;6:3-11.
138. Wilson D, Aguirre JM. Las micosis en la era del SIDA. Rev Iberoam Micol. 1997;14:14-22.
139. Yang Y, Lo H, Hung Ch, Li Y .Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis. BMC Infect Dis. 2006;6(8):1-4.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### Consentimiento informado

Yo, \_\_\_\_\_ acepto bajo mi voluntad participar en la investigación llevada a cabo por la Dra. Luz Marina Prieto Santa Anna, con el propósito de favorecer el Bienestar social que puedan crear los resultados del mismo, sin ningún tipo de presiones y pudiendo decidir en cualquier momento del desenvolvimiento del estudio y de forma totalmente libre, retirarme de esta investigación. También exijo se me explique cada uno de los procedimientos, pasos y pruebas a los que debo someterme antes de ser realizados los mismos y que el estudio tenga carácter confidencial.

Fecha:\_\_\_\_\_.

Firma:\_\_\_\_\_.

ANEXO 2

CÓDIGO \_\_\_\_\_

ENCUESTA

I.-DATOS GENERALES:

No de HC \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

—

Edad \_\_\_\_\_ Sexo F ( ) M ( ) Raza

Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_

Estado Civil \_\_\_\_\_ Ocupación \_\_\_\_\_

Tendencia sexual Hetero \_\_\_\_\_ Homo \_\_\_\_\_ Bisexual \_\_\_\_\_

FECHA: VIH positivo \_\_\_\_\_ SIDA \_\_\_\_\_

II.-EVALUACION CLINICA Y MICOLOGICA.

FORMAS CLÍNICAS:

Pseudomembranosa ( ) Eritematosa ( )

Hipertrófica ( ) Queilitis ( ) Mixta ( )

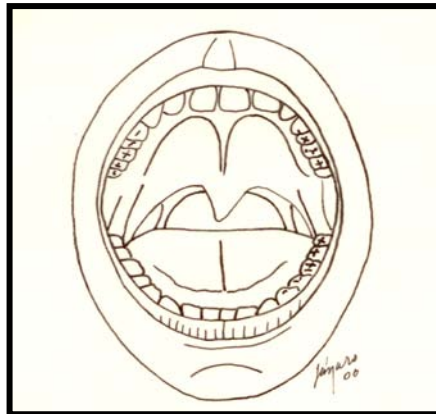
1.-Severidad de signos y síntomas:

	Día inicial	Día 18
Sintomático		
Asintomático		

Asintomático	( )	Sensación de quemadura	( )
dolor	( )	Onidofagia	( )
disfagia	( )	Pirosis	( )
acidez	( )	náuseas	( )
dolor retrosternal	( )	vómitos	( )

2.-. Extensión de las lesiones

	Día inicial	Día 18
Asintomático (sin lesiones)		
Localizadas		
Extensas		



### III.-Respuesta al Tratamiento

Cura Total ( )  
 Notable Mejoría ( )  
 Moderada Mejoría ( )  
 Sin cambios ( )

### IV.-Estudio micológico

Día inicial: Examen directo: Positivo ( ) Negativo ( )

Cultivo micológico: Positivo ( ) Negativo ( )

Agente etiológico: \_\_\_\_\_

Día 18: Examen directo: Positivo ( ) Negativo ( )

Cultivo micológico: Positivo ( ) Negativo ( )

Agente etiológico: \_\_\_\_\_

## ANEXO 3

### Medios de Cultivo

- **Agar Sabouraud**

Componentes:

- Dextrosa	40 g
- Peptona	10 g
- Agar	20 g
- Agua Destilada	1000 mL

Preparación:

- Ajustar a un pH final de 5,6.
- Esterilizar en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

- **Agar harina de maíz-tween-80**

Componentes:

- Harina de maíz	50 g
- Agar	15 g
- Tween 80	10 mL
- Agua destilada	1000 mL

Preparación:

- Mezclar la harina de maíz con 500mL de agua y calentar en baño termostatado durante 1 hora.
- Filtrar por gasa y algodón.
- Añadir agar y completar el volumen a 1000mL.
- Calentar hasta fundir y añadir tween 80.
- Esterilizar en autoclave 15minutos a 121 °C.

- **Caldo RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato de sodio (SIGMA)**

Componentes:

- RPMI 1640	10.40 g
- MOPS*	34.53 g
- Agua destilada	1000 mL

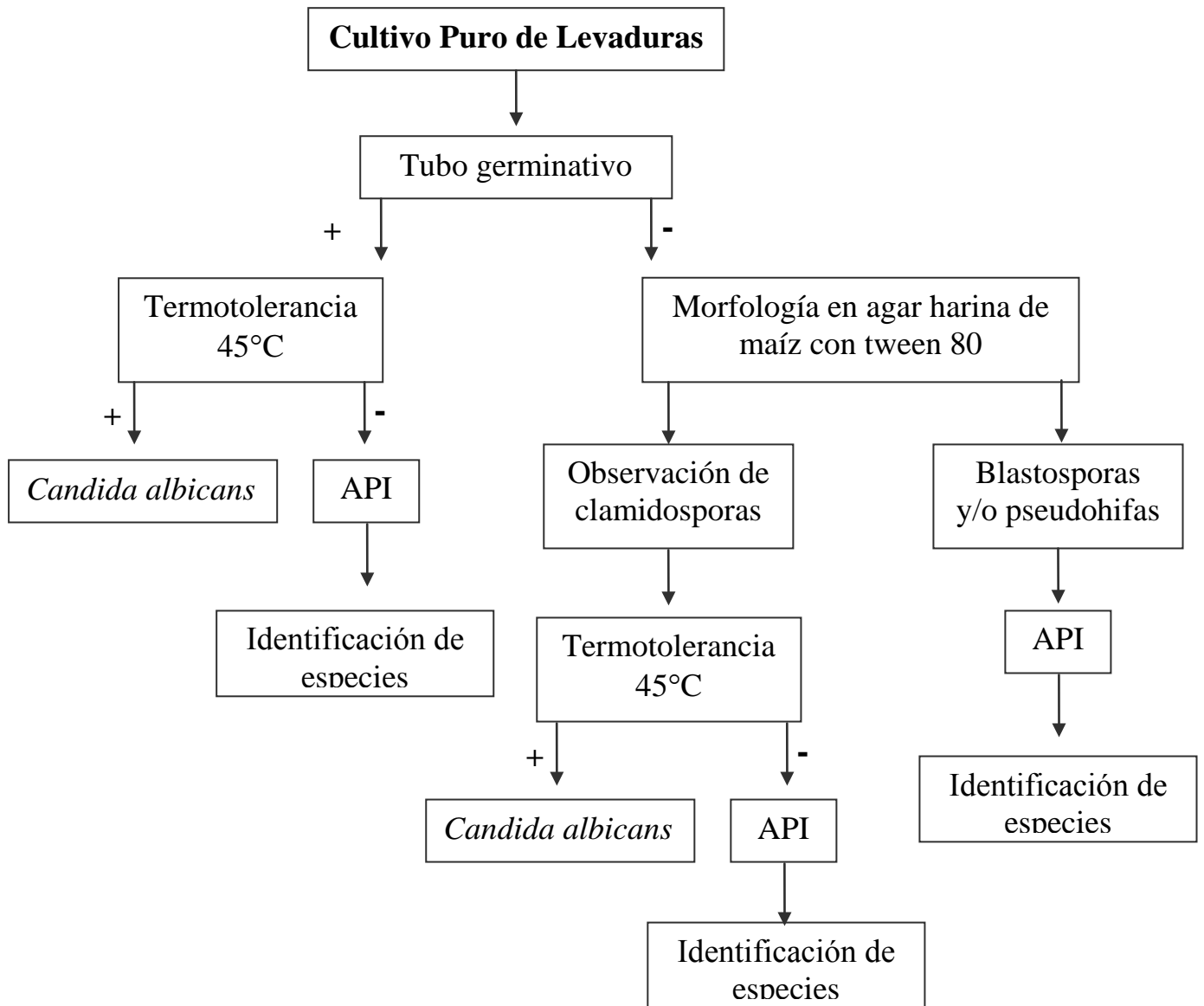
\*Ácido morfolino propano sulfónico.

Preparación:

- Disolver el medio de cultivo y el MOPS en 900 mL de agua destilada. Agitar hasta la completa disolución.
- Ajustar pH a 6.9-7.1 con NaOH 1N ó 10N.
- Añadir agua destilada hasta completar un volumen total de 1000 mL.
- Esterilizar mediante filtración. Y conservar a 4 – 8 °C hasta el momento de su utilización.

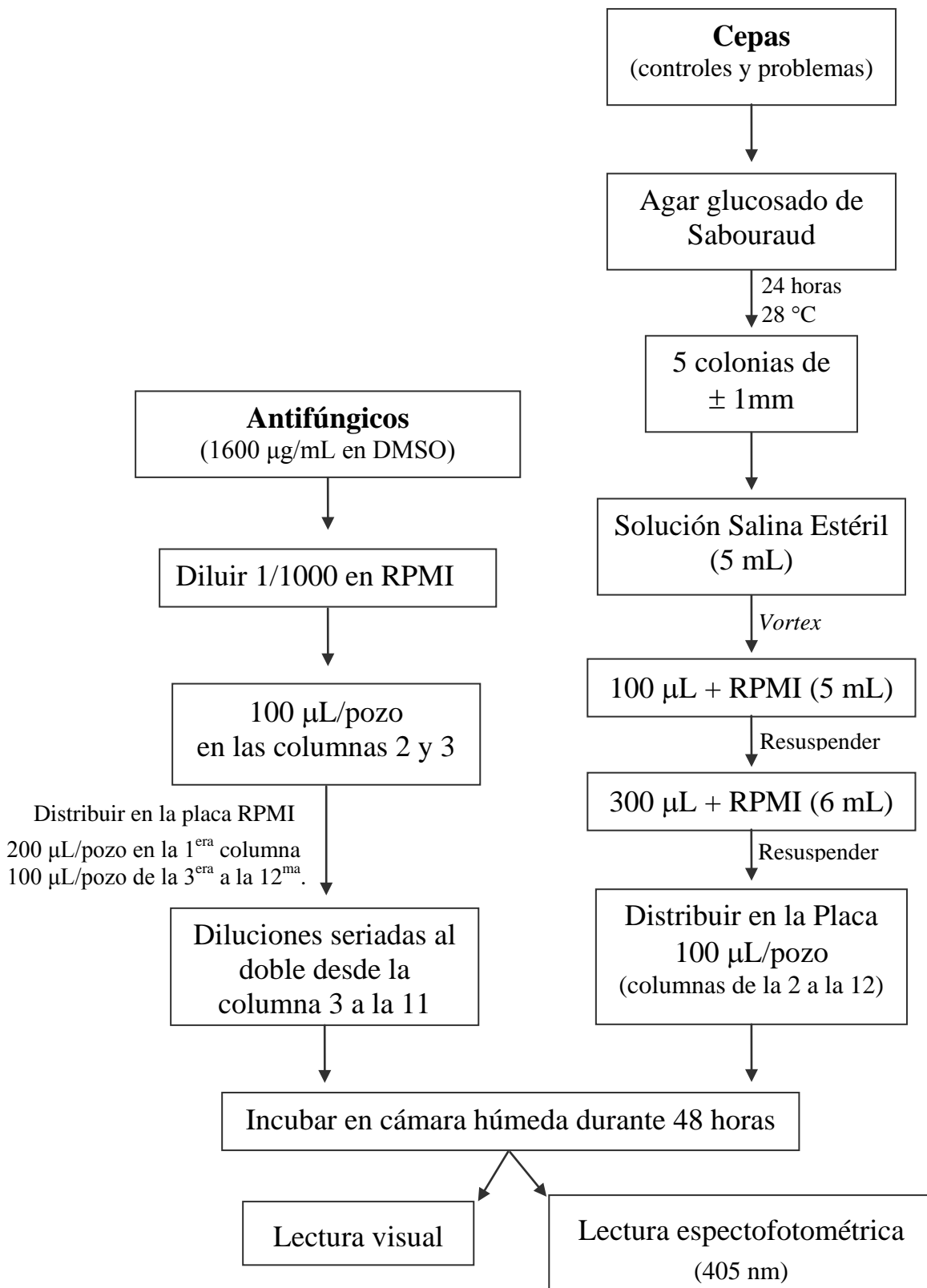
ANEXO 4

Secuencia de trabajo para la identificación de las cepas aisladas



ANEXO 5

Secuencia de trabajo para la determinación de la CMI.





ANEXO 6

Representación esquemática de la placa utilizada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
	CE	8 μg/m L	4 μg/m L	2 μg/m L	1 μg/m L	0.5 μg/m L	0.25 μg/m L	0.12 μg/m L	0.06 μg/m L	0.03 μg/m L	0.01 μg/m L	CC

Filas A y B: Cepas controles

Filas C - H: Cepas problemas

Columna 1 (CE): Control de esterilidad y blanco para la lectura automatizada

Columna 2 - 11: Gradiente de concentración del antifúngico

Columna 12 (CC): Control de crecimiento.