

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E  
INVESTIGACIÓN EN SALUD**



**EVALUACIÓN DEL MÉTODO COMERCIAL ATB FUNGUS 3 FRENTE AL  
MÉTODO DE REFERENCIA M 27 – A2, PARA DETERMINAR LA  
SUSCEPTIBILIDAD DE *CANDIDA ALBICANS* A DIFERENTES ANTIFUNGICOS**

**Tesis de grado para optar al grado de especialidad en diagnóstico de laboratorio en  
salud, mención microbiología**

**ELABORADO POR:**

**Lic. SANDRA GRISEL VARGAS NATTEZ**

**TUTOR:**

**Dra. RAQUEL CALDERON**

**LA PAZ - BOLIVIA  
2013**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por ser mi mejor amigo, mi fortaleza y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres Vicente y Emma, por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos, tíos, primos y sobrinos por haberme brindado todo su cariño y apoyo a lo largo de mi vida.

A la Dra. Raquel Calderon, por asesorarme a lo largo de esta tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina, por compartir su conocimiento conmigo e inspirar en mi mucha admiración.

A la Dra. Katty Terrazas, por creer en mi, brindarme su apoyo incondicional y por ser un ejemplo de perseverancia y constancia.

A los doctores: Dr. Pablo Irahola, Dra. Anneth Garcia y Dra Esther Damiani, por su valioso aporte en la elaboración de este trabajo.

A mis amigos: Paula, Esther, Edith, Sandy y Ramiro, por compartir los buenos y malos momentos, porque su amistad va más allá de un simple apoyo y compañía, porque cada uno de ustedes son la palabra de aliento y alegría que he necesitado.

Un agradecimiento muy especial al instituto SELADIS, por haberme acogido y haber sido mi segundo hogar en estos años de formación.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que sin esperar nada a cambio invirtieron su tiempo y conocimientos para ayudarme a completar mi proyecto de tesis.

**GRACIAS!!!**

## TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
III.	JUSTIFICACIÓN.....	6
IV.	OBJETIVOS.....	8
	A. OBJETIVO GENERAL.....	8
	B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	8
V.	DISEÑO TEÓRICO.....	9
	A. MARCO REFERENCIAL.....	9
	1. ANTECEDENTES.....	9
	B. MARCO TEORICO.....	10
	1. CANDIDA sp.....	10
	1.1 Generalidades.....	10
	1.2 Revisión histórica.....	11
	1.3 Taxonomía.....	12
	1.4 Morfología.....	12
	1.5 Estructura química de la pared celular.....	15
	1.6 Determinantes de la patogenicidad.....	12
	1.7 Epidemiología.....	17
	2. INFECCIONES CAUSADAS POR CANDIDA.....	18
	2.1 Tipos de Candidiasis.....	18
	2.1.1 Candidiasis superficiales.....	18
	2.1.2 Candidiasis sistémicas.....	19
	2.2 Patogenia.....	19
	2.3 Inmunidad del huésped.....	20
	2.4 Manifestaciones clínicas.....	22
	2.5 Tratamiento.....	25
	2.5.1 Clasificación química de los antifúngicos.....	25
	2.5.2 Estructura química y mecanismo de acción.....	26
	2.5.2.1 Azoles.....	26
	2.5.2.1.1 Imidazoles.....	27
	2.5.2.1.2 Triazoles.....	28
	2.5.2.2 Alilaminas.....	29

2.5.2.3 Polienos.....	30
2.6 Diagnóstico de laboratorio.....	32
2.6.1 Criterios morfológicos.....	32
2.6.1.1 Criterios macroscópicos.....	32
2.6.1.2 Criterios microscópicos.....	33
3. RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN LEVADURAS.....	34
3.1 Mecanismos celulares.....	35
3.2 Mecanismos moleculares.....	36
4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD IN VITRO.....	36
4.1 Métodos de referencia.....	36
4.1.1 Limitaciones de la técnica de referencia.....	37
4.2 Métodos comercializados.....	38
4.2.1 SensititreYeast One.....	38
4.2.2 Neo-Sensitabs TM.....	38
4.2.3 E-test.....	38
4.2.4 ATB - Fungus 3.....	39
5. PASOS PARA DETERMINAR LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE UNA PRUEBA.....	39
5.1 Sensibilidad y especificidad.....	40
5.2 Eficiencia.....	41
5.3 Valor predictivo.....	42
5.4 Pruebas de concordancia.....	43
5.5 Reproducibilidad.....	43
VI. DISEÑO METODOLÓGICO.....	45
A. TIPO DE ESTUDIO.....	45
B. POBLACIÓN ESTUDIADA.....	45
1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	45
2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	45
C. LUGAR Y TIEMPO DE ESTUDIO.....	46
D. TAMAÑO MUESTRAL.....	46
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
A. METODO.....	47

1. MICRODILUCIÓN EN CALDO M 27-A2 (CLSI).....	47
1.1 Fundamento de la técnica.....	47
1.2 Equipos e instrumentos.....	48
1.3 Material.....	48
1.4 Reactivos.....	48
1.5 Antifúngicos.....	48
1.6 Procedimiento.....	48
1.6.1 Estandarización de la técnica de microdilución planteado por la CLSI.....	48
1.7 Interpretación de resultados.....	57
2. MÉTODO COMERCIAL (ATB FUNGUS 3).....	59
1.1 Fundamento de la técnica.....	60
1.2 Equipos e instrumentos.....	60
1.3 Material.....	60
1.4 Reactivos.....	60
1.5 Procedimiento.....	61
1.6 Interpretación de resultados.....	61
B. ESTUDIO DIAGNÓSTICO.....	62
1. RANGO DE TRABAJO.....	62
2. REPRODUCIBILIDAD.....	62
3. REPETITIVIDAD.....	63
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
VIII. RESULTADOS.....	64
A. ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	64
1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN CALDO M27-A2.....	64
2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA COMERCIAL ATB FUNGUS 3.....	65
B. ESTUDIO DIAGNÓSTICO.....	66
1. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DIAGNÓSTICO DEL ATB- FUNGUS 3.....	66

---

2. PRUEBAS DE CONCORDANCIA EMPLEADOS PARA COMPARAR EL GOLD ESTANDAR CON EL MÉTODO COMERCIAL.....	68
3. RESULTADOS DE REPETITIVIDAD DEL ATB FUNGUS 3.....	69
4. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD.....	69
C. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> A LOS ANTIFUNGICOS POR AMBOS MÉTODOS.....	70
IX. DISCUSIÓN.....	72
X. CONCLUSIONES.....	80
XI. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	81
XII. BIBLIORAFÍA.....	82
ANEXOS.....	90

**INDICE DE TABLAS**

TABLA 1	Clasificación química de los antifúngicos.....	26
TABLA 2	Formato básico para la construcción de una tabla 2x 2, donde se pueden mostrar los resultados que se obtienen por 2 diferentes métodos de diagnóstico. (Dawson, 1994).....	42
TABLA 3	Clasificación del índice Kappa (Cura, E. (OPS), 1994).....	43
TABLA 4	Concentraciones utilizadas para el test de microdilución en caldo M27-A2.....	55
TABLA 5	Intervalo de la CIM de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A2.....	57
TABLA 6	Puntos de corte según CLSI, obtenidas por el método de microdiluciónM27-A2.....	59
TABLA 7	Puntuación asignada para la lectura de turbidez para el método comercial ATB FUNGUS 3.....	62
TABLA 8	Estandarización del protocolo óptimo M27-A2, donde se muestran las modificaciones en cuanto a: dilución del inóculo, adición de glucosa al medio de cultivo y tipo de placa utilizado.....	64
TABLA 9	Comparación de los 4 ensayos probados en la optimización de la técnica de microdilución en caldo M27-A2, donde se muestran los resultados obtenidos de las CIM para cada uno de los ensayos.....	65

---

TABLA 10	Resultados obtenidos de la estandarización del método comercial ATB FUNGUS 3, donde se resaltan los puntos de corte de los antifúngicos de interés para el estudio.....	66
TABLA 11	Tabla de contingencia para el cálculo del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, en el estudio de sensibilidad al Fluconazol (N = 50)...	67
TABLA 12	Tabla de contingencia para el cálculo del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, en el estudio de sensibilidad al Itraconazol (N = 50)...	67
TABLA 13	Resumen del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, para el estudio de sensibilidad al FLZ e ITZ.....	68
TABLA 14	Resultados de correlación de los resultados obtenidos por el método comercial ATB FUNGUS 3 en comparación a la técnica de referencia M27-A2.....	68
TABLA 15.	Resultados de repetitividad obtenidos para la prueba de ATB-FUNGUS 3, donde se muestran los valores de CIM obtenidos en cada uno de los ensayos.....	69



---

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura1:</b>	Diagrama esquemático de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	14
<b>Figura2:</b>	Representación de las manoproteínas de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	15
<b>Figura 3:</b>	Esquema de algunos de los factores de virulencia de <i>C. albicans</i> .....	16
<b>Figura 4:</b>	Mecanismo de acción de las Alilaminas y Azoles.....	27
<b>Figura 5:</b>	Estructura química de los principales Imidazoles.....	28
<b>Figura 6:</b>	Estructura química de los triazoles.....	29
<b>Figura 7:</b>	Esquema de la preparación del medio de cultivo.....	49
<b>Figura 8:</b>	Esquema de la preparación de la solución madre del antifúngico.....	51
<b>Figura 9:</b>	Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640.....	52
<b>Figura 10:</b>	Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua.....	52
<b>Figura 11:</b>	Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente (DMSO).....	53
<b>Figura 12:</b>	Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente RPMI 1640.....	54
<b>Figura 13:</b>	Preparación del inóculo de levaduras.....	56
<b>Figura 14:</b>	Estandarización del método comercial ATB FUNGUS 3.....	61

**INDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS**

---

<b>Cuadro 1.</b>	Solubilidad de los antifúngicos.....	50
<b>Cuadro 2.</b>	Puntuación asignada para la lectura de turbidez en el método de microdilución en caldo planteado por la CLSI.....	58
<b>Gráfica 1.</b>	Resultados de reproducibilidad obtenidos para el método de ATB-FUNGUS 3, donde se muestran los porcentajes de correlación para ambos antifúngicos.....	69
<b>Gráfica 2.</b>	Sensibilidad de <i>C. albicans</i> , según porcentaje de sensibilidad y resistencia a: FLZ, ITZ y KTZ.....	70
<b>Gráfica 3.</b>	Sensibilidad de <i>C. albicans</i> , según porcentaje de sensibilidad y resistencia a: 5 FC, AMB y VRC.....	71
<b>Gráfica 4.</b>	Resultados obtenidos para FLZ, ITZ, 5FC y VRC, donde se muestra el número de cepas con sensibilidad dosis dependiente (SDD) para los diferentes antifúngicos.....	71

---

## RESUMEN

El aumento de la incidencia de las micosis profundas ha generado la necesidad de desarrollar técnicas para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos; Actualmente el documento M27-A2 se ha convertido en el método de referencia para los estudios de sensibilidad en levaduras, es por esto que otras técnicas desarrolladas en los últimos años se han basado en este estándar. No obstante, estos no subsanan del todo las necesidades de la rutina de los laboratorios de Microbiología clínica, esto principalmente por ser un tanto laboriosos; en consecuencia métodos alternativos surgen ante la necesidad de contar con técnicas que puedan ser utilizadas para diagnóstico diario en el laboratorio clínico, una de ellas es la galería de ATB FUNGUS 3, que permite determinar la sensibilidad de *Candida* frente a diferentes antifúngicos, en condiciones muy próximas a las de la técnica de referencia de microdilución. Este método no sólo permite catalogar a una cepa como sensible o resistente, sino que también suministra el valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM), a ello se suma la fácil y rápida manipulación e interpretación de resultados, de acuerdo con esto el trabajo tuvo como objetivo: evaluar el método comercial ATB FUNGUS 3, frente al método de referencia M27-A2, con el fin de conocer su valor diagnóstico.

La primera etapa del trabajo, incluyó la estandarización del protocolo M27 - A2. En la segunda etapa se determinó la eficacia del método comercial a través de parámetros de test diagnóstico. Para ello se estudiaron 50 cepas de *Cándida albicans*, en las cuales se determinó la sensibilidad a Fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ) por ambos métodos. Posteriormente se evaluó el desempeño diagnóstico del método comercial con respecto al método de referencia (EPIDAT, versión 2.0 para Windows). Donde se encontró que el ATB - FUNGUS 3 presentó una especificidad para el FLZ de 100 %, sensibilidad de 91%, valor predictivo positivo (VPP) de 56%, valor predictivo negativo (VPN) de 100%, con una eficacia diagnóstica de 92%, calculados para un intervalo de confianza (IC) de 95%; para el ITZ la especificidad y sensibilidad fue de 88 % y 90% respectivamente, con un VPP de 64%, un VPN de 97% y una eficacia diagnóstica de 90%, IC 95%.

En cuanto a las pruebas de concordancia que se aplicaron al ATB-FUNGUS 3, el índice Kappa para el FLZ e ITZ fue de 0.67 y 0,68 respectivamente, que según podemos observar en

---

la escala de este índice (Tabla 3) corresponde a una concordancia “Buena “con los resultados obtenidos a través del método de referencia. Para la prueba de Likelihood ratio los resultados obtenidos para el FLZ fueron (LR+) de 11,25 y el (LR-) fue de 0; para el ITZ (LR+) de 9,19 y el (LR-) fue de 0,14. Al realizarse la prueba de reproducibilidad, los resultados obtenidos muestran que para ambos antifúngicos Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITZ) existe una buena correlación ya que pudimos encontrar un 90 % y un 85% de reproducibilidad. Los datos encontrados indican que el método comercial ATB FUNGUS 3, es una técnica reproducible, rápida y de fácil realización; pero el desempeño global de la técnica, sugiere que aún no es confiable para su uso en los laboratorios de análisis clínicos, debido principalmente, a los valores bajos obtenidos en los VPP para ambos antifúngicos, lo que podría derivar en errores al momento de determinar una cepa como sensible o resistente, punto importante al momento de decidir la conducta terapéutica, siendo de gran relevancia en pacientes críticos.

En cuanto a la susceptibilidad a los antifúngicos, existe un alto porcentaje de sensibilidad de AMB 94 %, 5-FC 92 %, FLZ 90 %, ITZ 84%, KTZ y VRZ 84% y 82% respectivamente. Estos resultados muestran que en nuestro medio las especies de *C. albicans* aún conservan la sensibilidad a diferentes tipos de antifúngicos.

**Palabras clave:** CIM, Método de referencia,

## I. INTRODUCCION

El género *Candida* forma parte de la microbiota normal de la piel, de las mucosas, del tracto digestivo y genitourinario del ser humano, encontrándose asimismo en animales, plantas, objetos inanimados y medio ambiente<sup>1</sup>. De las aproximadamente 150 especies del género *Candida*, sólo un pequeño número causa infecciones en humanos, entre ellas se encuentran: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii* y pese a que en los últimos años se ha incrementado la frecuencia de aislamientos de estas especies, *Candida albicans* sigue siendo la principal responsable de las infecciones invasoras<sup>2</sup>, causando de 5% a 10% de las septicemias nosocomiales, esto debido a múltiples factores como la edad extrema, terapia inmunosupresora, terapia antibacteriana prolongada, procedimientos quirúrgicos invasivos, así como la selección de cepas más virulentas de hongos han influido para el gran aumento de infecciones oportunistas producidas por estos agentes<sup>3</sup>.

*Candida albicans* fue descrita por primera vez con el nombre de *Oidium albicans* en el año 1853 por Robin y en 1890 Zopf la denominó *Monilia albicans*, siendo Berkhout, en 1923, quien propuso su actual denominación<sup>4</sup>. Este microorganismo, eucariota patógeno oportunista, se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, hallándose frecuentemente presente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal. Las infecciones que produce se denominan genéricamente candidiasis, que en ocasiones presentan un carácter crónico, hasta manifestaciones mucho más graves como la miocarditis candidiásica y las septicemias agudas, que pueden llegar a provocar la muerte del paciente<sup>5</sup>.

En los últimos años ha ocurrido un aumento continuo en el número de infecciones producidas por hongos. En el año 1950 el aislamiento de estos agentes en la sangre era reportado como un suceso raro y la mayoría de las infecciones diseminadas eran producidas por una cantidad limitada de especies<sup>1</sup>. Este aumento en la prevalencia de las micosis hizo necesario desarrollar fármacos con los cuales se puedan tratar estas infecciones. Sin embargo como resultado de estas alternativas se han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la

aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca<sup>6</sup>, por otra parte si bien *Candida albicans* sigue siendo la causa más común de candidemia, aproximadamente 35% de las candidiasis sistémicas han sido remplazadas por otras especies “no *albicans*”, reportándose por tanto una emergencia de estas, debido a que generan dificultades terapéuticas, emergiendo con ellas nuevos patrones de sensibilidad a los antifúngicos<sup>7</sup>. A modo de ejemplo mencionamos: *C. krusei*, que presenta resistencia intrínseca al fluconazol; *C. glabrata* con un perfil de sensibilidad variable existiendo cepas con resistencia intrínseca y cepas que desarrollan resistencia secundaria al fluconazol; *C. guilliermondi*, *C. lusitaniae* y *C. parasilopsis* con resistencia secundaria al fluconazol<sup>8</sup>. Actualmente se han reportado cepas de *C. glabrata* y *C. tropicalis* resistentes a la anfotericina B<sup>9</sup>; frente a estos hechos nace la importancia de conocer el perfil de sensibilidad a los antifúngicos.

La necesidad de desarrollar métodos estandarizados juega también un papel importante en la necesidad de evaluar las correlaciones de la eficacia de la droga in vivo versus in vitro. En respuesta a estas necesidades, en los últimos años se han desarrollado técnicas para el estudio de la susceptibilidad in vitro a los antifúngicos, de las cuales el método de microdilución en caldo es considerado la técnica de referencia para dicho fin. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (hoy en día CLSI) aprobó un primer estándar, para estudiar la sensibilidad a los antifúngicos en levaduras en el año 1999 (documento M27-A)<sup>10</sup>, modificándolo posteriormente y aprobando en el año 2003 el estándar vigente (documento M27-A2)<sup>11</sup>.

No obstante a pesar de existir documentos que estandarizan los métodos de estudio de sensibilidad “in vitro” de los hongos a diferentes agentes antifúngicos, estos no subsanan del todo las necesidades de la rutina de los laboratorios de Microbiología clínica, esto principalmente por ser un tanto laboriosos, en consecuencia métodos alternativos surgen ante la necesidad de contar con técnicas que puedan ser utilizadas para diagnóstico diario en el laboratorio clínico; una de ellas es la galería de ATB-FUNGUS 3 que permite determinar la sensibilidad de *Candida* frente a diferentes antifúngicos en medio semisólido en condiciones muy próximas a las de la técnica de referencia de microdilución, a ello se suma la fácil y

rápida manipulación e interpretación de resultados. Sin embargo, numerosos trabajos han evaluado diversas metodologías, mostrando resultados controvertidos en relación con la técnica de referencia<sup>12</sup>.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A raíz que en la segunda mitad del siglo XX, la prevalencia de las infecciones fúngicas ha aumentado constantemente, debido al mayor número de pacientes inmunodeprimidos y a la generalización de agresivas prácticas diagnósticas y terapéuticas<sup>13</sup>. Desde 1970, la incidencia anual de la candidosis y aspergilosis invasora ha aumentado 40 y 6,5 veces respectivamente<sup>14</sup>. Otros estudios publicados en Estados Unidos y Europa señalan que *Candida* spp., se ha situado entre los microorganismos aislados con más frecuencia en hemocultivos<sup>14</sup>; y constituyen entre el 5-10% de las sepsis nosocomiales<sup>15</sup>. La candidemia prolonga en 3 semanas la estancia hospitalaria media de los enfermos y multiplica por dos el riesgo de muerte durante el ingreso<sup>14</sup>.

En consonancia con lo anterior, en la última década el consumo de antifúngicos ha aumentado el 12% al año y según datos de la Agencia Europea del Medicamento, el coste anual mundial en antifúngicos asciende a 3.600 millones de euros. En paralelo, se está detectando un porcentaje creciente de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a estos antimicrobianos<sup>15</sup>. Además, se empieza a sospechar que el uso indiscriminado de algunos antifúngicos como el fluconazol o el itraconazol en tratamientos empíricos y en profilaxis está ocasionando cambios ecológicos, que se traducen en un desplazamiento de las especies sensibles por otras con resistencias intrínsecas a éstos<sup>16</sup>.

En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de la resistencia *in vitro*, que tienen cierta correlación con la evolución clínica de los enfermos. Por otra parte, prácticas terapéuticas como el uso de la profilaxis antifúngica y de los tratamientos empíricos han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de hongos que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca. Por eso parece cada vez más importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos. Además, desde la aparición de nuevas moléculas antifúngicas y de nuevas estrategias



terapéuticas, la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica u otra <sup>6,17</sup>.

Con la finalidad de responder a las necesidades de nuestros usuarios (pacientes y médicos), el laboratorio de Bacteriología clínica del instituto SELADIS-FCFB-UMSA se ha propuesto desarrollar métodos estandarizados en las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos que nos permita proveer buena concordancia entre los laboratorios y evaluar las correlaciones de la eficacia de la droga in vivo versus in vitro, para de esta forma evitar posibles resistencias.

### III. JUSTIFICACIÓN

Hasta hace unos años las infecciones fúngicas eran poco frecuentes y afectaban a una población muy concreta y a un número limitado de pacientes, además se disponía de pocos antifúngicos para uso clínico y en general su patrón de sensibilidad era predecible, pues las resistencias primarias para el agente habitual en la práctica clínica, eran muy raras y los factores asociados a la resistencias secundarias eran bien conocidas y sospechables en pacientes con historia de tratamiento antifúngico previo<sup>18</sup>.

Cuando la anfotericina B y la 5-fluorocitosina eran las únicas opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones fúngicas profundas, la realización de pruebas de sensibilidad antifúngica no estaba muy justificada. A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias<sup>19</sup>.

Motivado por esta nueva realidad, el comité norteamericano de estándares en laboratorios clínicos (CLSI) realizó, en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban. Además, se les solicitó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a una serie de cepas utilizando su propia metodología. Los resultados mostraron que pocos laboratorios realizaban pruebas de sensibilidad antifúngica y que la metodología empleada (medio de cultivo, inóculo, etc.) era muy variado. Como consecuencia de esta realidad el CLSI creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en las levaduras del género *Candida*, que dio lugar a la publicación, de varias propuestas metodológicas entre los años 1995 y 2002<sup>18</sup>.

Actualmente el documento M27-A2 se ha convertido en el método de referencia para los estudios de sensibilidad en levaduras es así que otras técnicas normalizadas desarrolladas en los últimos años se han basado en este estándar. No obstante a pesar de existir documentos que

estandarizan los métodos de estudio de sensibilidad “in vitro” de los hongos a diferentes agentes antifúngicos, estos no subsanan del todo las necesidades de la rutina de los laboratorios de Microbiología clínica, ya que muestran una serie de limitaciones técnicas entre las que destacan las siguientes:

1. Dificultades para detectar la resistencia a la anfotericina B.
2. Crecimiento residual descrito con fármacos fungistáticos como los azoles y la fluorocitosina.
3. Problemas de crecimiento en determinadas especies como *C. neoformans* y otras levaduras.

A pesar de todos estos problemas se han desarrollado una buena cantidad de técnicas comerciales que intentan simplificar los métodos de detección de resistencias. De todas ellas, sólo una minoría ha demostrado una buena concordancia con los resultados de los métodos de referencia. Entre éstas se ha destacado el ATB-FUNGUS 3, que muestra una buena concordancia con los resultados obtenidos mediante los estándares de la CLSI y pueden constituir una alternativa para los laboratorios asistenciales<sup>18,20</sup>; al respecto debemos resaltar que si bien los métodos comerciales pueden ser una alternativa para algunos laboratorios asistenciales, estos no deben emplearse sin un estudio previo de correlación con los métodos de referencia.

En este sentido el presente trabajo de investigación pretende realizar en primera instancia la estandarización de la técnica de “M27 – A2” (método de referencia), para posteriormente utilizar este como Gold estándar, en la evaluación del método comercial “ATB-FUNGUS 3”; a fin de determinar la eficacia diagnóstica del método comercial, para su posterior implementación dentro del laboratorio de Bacteriología clínica del Instituto SELADIS, como una alternativa del diagnóstico y determinación de CIM para la especie de *C. albicans*

## **IV. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar el método comercial ATB FUNGUS 3, frente al método de referencia M27-A2, para determinar la susceptibilidad de *Candida albicans* a diferentes antifúngicos.

### **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estandarizar el método de microdilución en caldo M27-A2, con los parámetros propuestos por la (CLSI), utilizando sustancia pura de diferentes antimicóticos.
- Determinar la eficacia del método comercial a través de parámetros de test diagnóstico.
- Determinar el porcentaje de resistencia de *Candida albicans* a los diferentes antifúngicos por ambos métodos.

## **V. DISEÑO TEÓRICO**

### **A. MARCO REFERENCIAL**

#### **1. ANTECEDENTES**

Hasta la década de 1980 había menos opciones terapéuticas que en el 2000. Las micosis eran menos frecuentes y se clasificaban en primarias, endémicas, cutáneas y subcutáneas. Recién estaban apareciendo las micosis oportunistas, por lo que había poco interés por realizar estas pruebas, además que los pocos métodos desarrollados tenían escasa reproducibilidad<sup>18</sup>.

En 1992, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI) publicó el primer método normalizado para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos. Esto supuso un gran avance en este campo, ya que permitió que los estudios sobre sensibilidad a los antifúngicos se homogeneizaran y que sus resultados pudieran generalizarse. Numerosos trabajos han demostrado que un buen seguimiento del método estándar ofrece una reproducibilidad mayor al 90%, tanto dentro del mismo laboratorio como con otros<sup>21</sup>.

En general las pruebas de sensibilidad tienen como objetivo principal predecir la respuesta clínica y microbiológica a un tratamiento concreto. En la actualidad en el campo de la micología existen numerosos trabajos utilizando los métodos de la CLSI, que demuestran una buena correlación entre la sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica. Sin embargo, estos estudios también han demostrado que la capacidad para predecir la respuesta depende de la población estudiada, del tipo de infección y de los antifúngicos probados<sup>18</sup>. Hoy en día sabemos que con las pruebas de sensibilidad hay una buena relación entre resistencia *in vitro* y fracaso terapéutico, pero no entre sensibilidad *in vitro* y éxito terapéutico<sup>22</sup>.

En nuestro medio no existen muchos estudios al respecto, uno de los pocos, es el realizado por Barrios en el Instituto SELADIS de la ciudad de La Paz, durante la gestión del 2004, donde se optimizó la técnica NCCLS M27-A, usando 2 antifúngicos: Ketoconazol y Nistatina, donde se encontraron dos cepas resistentes a ketoconazol y una cepa con sensibilidad dosis

dependiente (SDD) a la nistatina, aunque de este último no se tienen datos concretos sobre los rangos de concentración mínima inhibitoria (CIM) establecidos por la NCCLS<sup>23</sup>.

En el 2007 Calle, determinó la sensibilidad de *Candida sp.* a diferentes antifúngicos, usando el método de macrodilución en caldo de caseína-extracto de levadura glucosa, propuesto por la NCCLS; en donde encontró que la Anfotericina B fue la más eficaz con el 97.5% de sensibilidad<sup>24</sup>.

Por otro lado Martínez en su estudio de sensibilidad in vitro de levaduras por el sistema ATB-Fungus, realizado en Madrid el 2008, encontró que el ATB-Fungus presentaba una buena reproducibilidad (>95%), y concluyó que este método es una buena alternativa a los laboriosos métodos de referencia existentes, aunque cada laboratorio deberá buscar aquellos métodos que les resulten más adecuados a sus condiciones de trabajo<sup>25</sup>.

## **B. MARCO TEORICO**

### **1. CANDIDA SP**

El género *Candida* representa un grupo de levaduras comensales del hombre, con morfología oval o redondeada de 3 a 7 micrometros de diámetro, que se reproducen por blastoconidios, forman pseudomicelio y tiene capacidades de asimilación y fermentación de carbohidratos, no producen pigmento carotenoide, ni asimilan inositol, careciendo de capsula, habita en la piel, las mucosas el tracto respiratorio alto, el tracto genitourinario y el tracto digestivo. Pueden transformarse en patógenos oportunistas, provocando candidiasis, que en general, afecta a individuos inmunocomprometidos o inmunocompetentes<sup>25</sup>.

#### **1.1 Generalidades**

*Candida albicans* fue descrita por primera vez con el nombre de *Oidium albicans* en el año 1853 por Robin y en 1890 Zopf la denominó *Monilia albicans*, siendo Berkhout, en 1923, quien propuso su actual denominación. Es la especie de *Candida* aislada con mayor

frecuencia, aunque en la actualidad ha aumentado la proporción de infecciones producidas por otras especies de *Candida*. Este microorganismo, eucariota patógeno oportunista, se encuentra ampliamente difundido en la naturaleza, hallándose frecuentemente presente como comensal inocuo en la piel, mucosa bucal, faríngea y vaginal, así como en el intestino de los hombres y otros animales de sangre caliente, pudiendo manifestar carácter patógeno bajo determinadas condiciones. Las infecciones que produce se denominan genéricamente candidiasis, incluyendo desde infecciones de la mucosa oral y vaginal, que en ocasiones presentan un carácter crónico, hasta manifestaciones mucho más graves como la miocarditis candidiásica y las septicemias agudas, que pueden llegar a provocar la muerte del paciente<sup>4</sup>.

*C. albicans* se encuentra presente en la microbiota normal del tracto gastrointestinal. Algunos autores han atribuido las infecciones por *C. albicans*, exclusivamente a fuentes endógenas de infección (desde el mismo paciente), considerándose su paso a sangre principalmente desde el tubo digestivo y con una menor frecuencia desde la piel. Esta hipótesis ha sido confirmada mediante métodos de tipificación molecular<sup>26</sup>.

*C. albicans* no soporta la desecación, pero por el contrario sobrevive largo tiempo en ambientes húmedos tales como cepillos dentales, ropa, cremas y productos cosméticos.

## 1.2 Revisión histórica

Uno de los aspectos más importantes a considerar es el relativo a los distintos nombres que ha recibido la principal especie patógena: *C. albicans*. Desde que Robin la denominó en 1853 *Oidium albicans*, esta especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros. De estos géneros, sólo 2 han prevalecido por largo tiempo para referirse a esta especie: El Género *Monilia*, en el cual estaba incluida la especie *Monilia candida* (Plaut, 1885), luego *Monilia albicans* (Zopt, 1890) que dominó la literatura hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el Género *Candida* y la especie *C. albicans*, que fue aceptado por el 3<sup>er</sup> Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939. Desde entonces se pasaron al Género *Candida* todas aquellas levaduras que no encajaban en el Género *Monilia*, por lo cual todas las afecciones producidas por *Candida* se conoce con el nombre de candidiasis<sup>6, 27</sup>.

### 1.3 Taxonomía

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

**Reino:** Hongo

**División:** *Deuteromycota*

**Clase:** *Blastomycetes*

**Familia:** *Cryptococcaceae*

**Género:** *Candida*

**Especies:** *albicans* (como la más frecuente y virulenta) y otras especies<sup>28</sup>.

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al Género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37 °C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, estas son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii*<sup>2,28</sup>.

Estudios taxonómicos tratan de diferenciar las diversas especies del Género *Candida* de acuerdo a sus propiedades. *Candida paratropicalis* no ha sido considerada distinta a *Candida tropicalis*. En el caso de *Candida claussenii* y *Candida stellatoidea* la similitud de su morfología y fisiología sobrepasan las diferencias que puedan haber entre estas especies<sup>9,28</sup>.

### 1.4 Morfología

Las especies del género *Candida* suelen presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado



formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora, cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células.

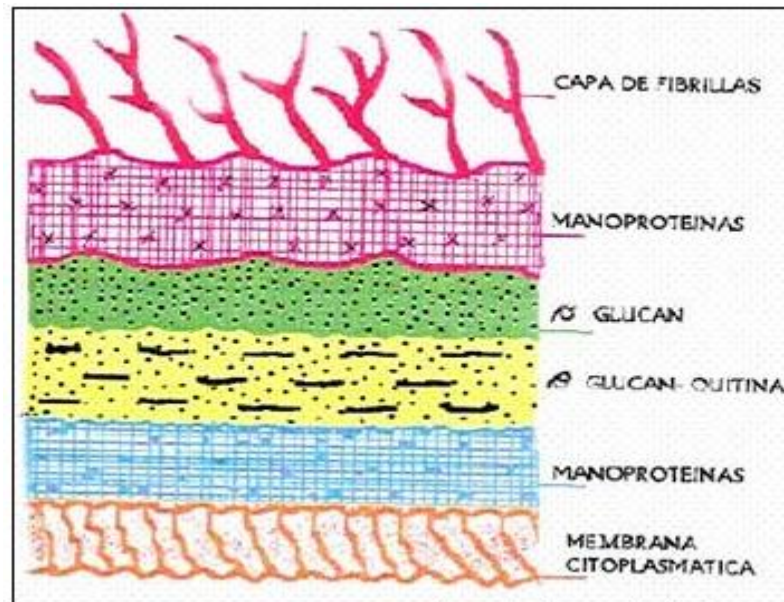
La forma filamentososa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemates a hifas<sup>30,31</sup>.

### 1.5 Estructura química de la pared celular

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos Manán, Glucán y Quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán  $\beta$ -1-3 y el D-Glucán  $\beta$ -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular<sup>2, 17, 30</sup>.

El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el

crecimiento celular y los procedimientos de fijación. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): Manoproteínas,  $\beta$ -Glucán-Quitina,  $\beta$ -Glucán, Manoproteínas, y una capa de fibrillas (Figura 1)<sup>30</sup>.

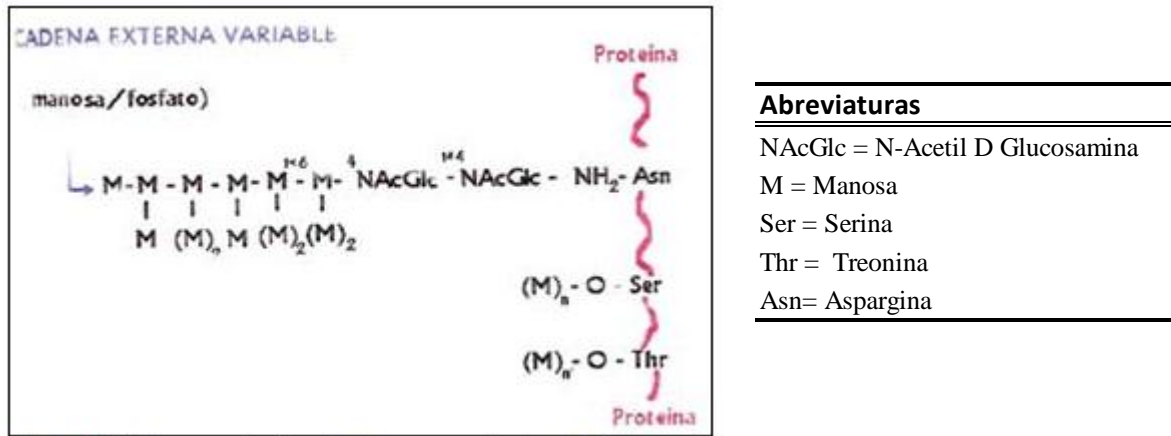


**Figura1:** Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans*.

El Manán ha sido identificado como el principal antígeno de la superficie celular de *C. albicans*<sup>22</sup>. Basados en estudios de adsorción y aglutinación, Hasenclever y Mitchell, agruparon a *C. albicans* en dos serotipos designados A y B<sup>30</sup>.

Básicamente, la representación de las Manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* está constituida por residuos de Manosa unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,6, los cuales se unen a la porción de Proteína a través de dos residuos de N-Acetil Glucosamina (unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4) y un residuo de Asparagina y residuos de Manosa que se unen a la Proteína a través de residuos de los aminoácidos Serina y Treonina<sup>22</sup> (Figura 2). La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se

observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción<sup>31</sup>.



**Figura2:** Representación de las manoproteínas de la pared Celular de *C. albicans*.

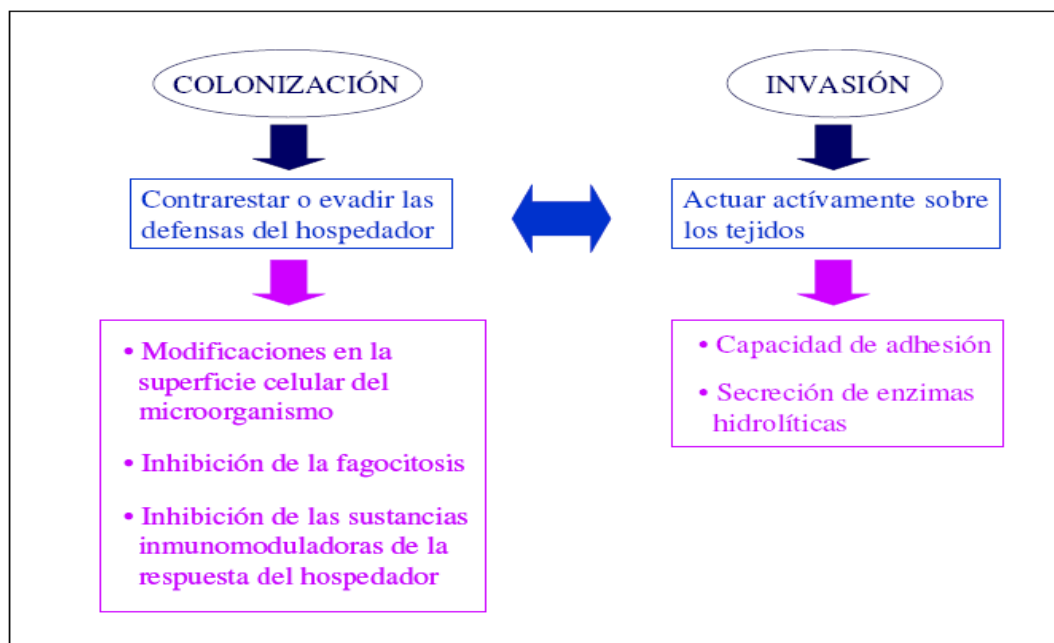
## 1.6 Determinantes de la patogenicidad

La virulencia de *C. albicans* se encuentra determinada por la combinación de múltiples factores involucrados en el equilibrio hospedador-hongo. Cuando se altera alguno de los parámetros implicados en este equilibrio, se inicia la invasión de tejidos y el desarrollo de la enfermedad, llegando en los casos más graves a diseminarse y a afectar zonas profundas. Los factores desencadenantes de estos procesos son múltiples, complejos e interrelacionados, por lo que es difícil determinar donde empieza y donde termina la actuación de cada uno de ellos. La penetración del hongo en los tejidos del hospedador marca, en muchos casos, el límite del proceso infeccioso, ya que *C. albicans* generalmente no continúa la invasión en hospedadores inmunológicamente sanos. No obstante, ante las situaciones en las que el hongo es capaz de llegar a sangre, debe necesariamente expresar factores que lo protejan contra las defensas celulares del hospedador y contra los inhibidores fúngicos del plasma, para así poder atravesar los endotelios e invadir los tejidos, y más aún, causar una infección diseminada.

Existen múltiples factores de virulencia (Figura 3) que se expresan en los diversos estadios de la infección, ya sea la etapa de colonización o la de invasión. Los factores de virulencia se

pueden agrupar en aquellos encaminados a contrarrestar o evadir las defensas del hospedador (como son las modificaciones en la superficie celular del microorganismo, la inhibición de la fagocitosis y las sustancias inmunomoduladoras de la respuesta del hospedador), y los encargados de actuar activamente sobre los tejidos (capacidad de adhesión y la secreción de enzimas hidrolíticas).

Finalmente cabe destacar que el fenómeno de virulencia es muy complejo dado que los múltiples factores que lo desencadenan están interrelacionados. Por ejemplo, modificaciones en la composición del manano de la superficie de *C. albicans* afectan no sólo a la inmunotolerancia, sino también a la adhesividad y producen cambios en el patrón antigénico. De igual manera, la formación de células miceliales puede contribuir a evadir la fagocitosis, favorecer la adhesión por sus características hidrofóbicas y variar la expresión de receptores. De estos datos se desprende que el papel que juega la pared celular en la interacción con el hospedador es esencial. Características de la pared como su composición antigénica, la presencia de manano o receptores específicos, su hidrofobicidad y la transición dimórfica tienen así mismo un papel muy importante en la virulencia. A continuación se detallarán algunos de los más importantes: el dimorfismo, el cambio fenotípico o “switching”, la secreción de enzimas hidrolíticas, la proteína inmunosupresora y mitogénica de células B (ISM) y la adhesión<sup>32</sup>.



**Figura 3:** Esquema de algunos de los factores de virulencia de *C. albicans*.

## 1.7 Epidemiología

La frecuencia de infecciones invasoras causadas por *Candida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas, constituyendo actualmente la candidemia un importante agente de infección intrahospitalaria. Se ha descrito en E.U.A. un aumento de 4 veces las tasas de fungemia nosocomial entre 1980 y 1990, representando alrededor del 10% de todas las infecciones del torrente sanguíneo durante 1990<sup>33</sup>.

Esto se debe en gran parte a avances de la medicina, con la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, son considerados factores de riesgo para esta infección. Con mayor frecuencia ocurren en pacientes que tienen condiciones de base tales como ser neonatos, prematuridad, patología oncológica en quimioterapia, terapia inmunosupresora, ser sometidos a gran cirugía y estar afectados por enfermedades severas que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos (UCI)<sup>33</sup>.

La candidemia, definida como la infección del torrente sanguíneo, puede derivar en la diseminación de la infección a múltiples órganos determinando la formación de microabscesos, lesiones cutáneas embólicas, abscesos renales y hepatoesplénicos, endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis y endoftalmitis.

La incidencia de infecciones invasoras causadas por *Candida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas como consecuencia del aumento de poblaciones de mayor riesgo, ya sea por su condición de inmuno - supresión, o por la utilización de procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos invasores. Sin embargo, el compromiso osteoarticular por *Candida*, secundario a la invasión del torrente sanguíneo por el hongo, es una localización infrecuente<sup>34, 35</sup>.

## 2. INFECCIONES CAUSADAS POR CANDIDA

### 2.1 Tipos de Candidiasis

*C. albicans* puede producir distintos tipos de infecciones conocidas genéricamente con el nombre de candidiasis. En realidad este término se refiere a cualquier infección causada por especies del género *Candida*. Forma parte de la flora saprófita mucocutánea, existiendo un equilibrio perfecto entre su virulencia y los mecanismos de defensa del huésped. *C. albicans* se encuentra habitualmente formando parte de la flora gastrointestinal y bucal (donde se halla en escaso número aunque su presencia sea constante), de la flora vulvovaginal (encontrándose en un 5% de las mujeres sanas y hasta en un 30% de las gestantes), y rara vez se encuentra como saprofito en la piel sana. Esta situación se modifica radicalmente cuando concurren factores micro ambientales predisponentes<sup>32</sup>. Las candidiasis pueden clasificarse en dos tipos fundamentales, superficiales y sistémicas, las cuales se detallan a continuación:

#### 2.1.1 Candidiasis superficiales

*C. albicans* es probablemente la causa mejor conocida del afta (pequeña úlcera blanquecina formada en la mucosa de la boca, del tubo digestivo o del aparato genital, esencialmente benigna y superficial) que puede afectar a una o a varias de las localizaciones anteriormente descritas. *C. albicans* forma parte de la flora normal gastrointestinal y es un patógeno oportunista que puede establecer una infección cuando las defensas inmunológicas y mecánicas del hospedador se ven inmunocomprometidas. Así, existen factores predisponentes para cada uno de los tipos de candidiasis, por ejemplo, para la candidiasis oral (de la boca) existen factores fisiológicos (embarazo, infancia, senectud,...etc), alteraciones endocrinas (diabetes, hipotiroidismo, deficiencias nutricionales,...etc), defectos inmunológicos, factores locales (dentaduras postizas, cambios en la composición de la saliva, flora comensal presente,...etc), que la favorecen. Sobre todo en pacientes con VIH a nivel del esófago, *C. albicans* produce esofagitis. La candidiasis genital puede afectar a la vulva y al área vaginal, así como a los pliegues perianales y crurales causando intérrigo candidiásico. Se estima que el

75% de todas las mujeres experimentarán al menos un episodio de vulvovaginitis en su vida (son subgrupos de mayor riesgo las mujeres embarazadas y las infectadas por VIH con un 40 a 60% de prevalencia de *C. vaginitis*)<sup>29, 36</sup>.

### 2.1.2 Candidiasis sistémicas

Existen otras infecciones candidiásicas que se conocen con el nombre de candidiasis invasivas o sistémicas. Se trata de una enfermedad muy debilitante con una mortalidad de hasta el 35%<sup>29</sup> y que causa el 85% de las infecciones nosocomiales en EE.UU.<sup>33</sup>. La candidiasis invasiva incluye la candidemia (definida como el aislamiento de *Candida* spp. de al menos un cultivo sanguíneo), la candidiasis diseminada por vía sanguínea y la infección de un órgano interno<sup>35</sup>. En EE.UU. la candidemia es la cuarta causa más común de infecciones en el torrente sanguíneo<sup>33</sup>, y la incidencia en Europa está aumentando asociada a infecciones nosocomiales y al aumento de pacientes inmunocomprometidos y pacientes que precisan cuidados intensivos. Los factores de riesgo más importantes para la candidemia son el uso de antibióticos de amplio espectro y de catéteres intravenosos, así como el cáncer, la cirugía abdominal, la diabetes y el VIH<sup>29, 36</sup>.

## 2.2 Patogenia

*Candida* tiene numerosas moléculas en su superficie responsables de su adherencia a los tejidos del huésped, entre las que se encuentran:

- a) Un receptor homólogo de la integrina humana CR 3, que se une con los grupos arginina glicina-ácido aspártico (RGD) de C3bi, fibrinógeno, fibronectina y laminina.
- b) Una lectina que se une con los azúcares de las células epiteliales.
- c) Proteínas con manosa que se unen con las moléculas similares a lectina de las células epiteliales.

Otros factores de virulencia son una aspartil proteínasa, que participa en la invasión tisular al degradar las proteínas de la matriz extracelular, y una adenosina secretada que bloquea la producción de radicales de O<sub>2</sub> en los neutrófilos y su degranulación. Finalmente, la transición de formas levaduriformes a hifas es importante para la virulencia del hongo, ya que parece que las hifas brotan fuera de las células, que las absorben<sup>34, 35, 37</sup>.

### 2.3 Inmunidad del huésped

*Candida albicans* es un hongo comúnmente asociado a los humanos sin causar daño alguno. La razón por la cual este hongo es generalmente inofensivo es porque las células del sistema Inmune vigilan constantemente los sitios del cuerpo donde el hongo vive, por ejemplo, la cavidad oral o el intestino. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, *C. albicans* es capaz de evadir la vigilancia del sistema inmune, provocando una variedad de enfermedades que van desde manifestaciones superficiales no letales hasta infecciones profundas que ponen en riesgo la vida.

Hemos encontrado que *C. albicans* responde de formas distintas dependiendo de si se encuentra dentro o sólo en contacto con los neutrófilos. Por ejemplo, dentro de los neutrófilos, hemos observado que *C. albicans* produce proteínas que neutralizan potentes oxidantes capaces de matar al hongo. Algunas de estas proteínas son producidas incluso antes de que el hongo entre en contacto con el neutrófilo, preparándose para encontrarse con oxidantes y, de esta manera, sobrevivir. Cuando el hongo es incapaz de producir estas proteínas, su sobrevivencia está disminuida en presencia de los neutrófilos. Hemos observado también que el hongo cambia su metabolismo para adaptarse a las condiciones deficientes en nutrientes dentro del neutrófilo.

La patogenicidad depende de modificaciones de los mecanismos de defensa del hospedero, los cuales inician secundariamente transformaciones en el comportamiento fúngico. Hoy en día se tiene un conocimiento razonablemente comprensible de los mecanismos dominantes de defensa y protección del hospedero contra la infección por *C. albicans*, tanto superficial como sistémica.



La inmunidad mediada por células es el mecanismo de defensa predominante en el hospedero durante la infección de la mucosa causada por *C. albicans*. Esto ha sido confirmado por estudios clínicos y experimentales que muestran el papel crítico de las células T en la protección contra la infección de la mucosa por *C. albicans* (por ejemplo, en candidosis mucocutánea crónica y candidosis gastrointestinal)<sup>38</sup>.

Existen dos tipos de respuesta inmune y su papel en el desarrollo de la enfermedad es antagónico. Se conoce hoy en día como el paradigma Th1 y Th2.

La respuesta Th1 está asociada con la producción de Interferón gamma (IFN-g) e Interleuquina 2 (IL-2), se relaciona con resistencia a la infección controlando la respuesta inmune celular y se expresa al inicio de la enfermedad. La respuesta Th2 está relacionada con la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, se presenta en la fase progresiva de la enfermedad y tiene el control de la inmunidad humoral. La relación entre estas respuestas antagónicas determinará el curso de la enfermedad.

La activación de la respuesta Th1 depende en mayor proporción de las células presentadoras de antígenos y del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II. Su inducción in vivo se correlaciona con la IL-12 y la extensión de la producción de IFN-g requiere la acción coordinada de algunas citoquinas incluyendo IL-6 y Factor de necrosis tumoral alfa (TNFá). La IL-12 es una citoquina fundamental, pues dirige la defensa tanto a nivel de las mucosas como a nivel sistémico.

En contraste, la respuesta Th2 no depende tanto de las células presentadoras de antígenos ni de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II. Se asocia con la detección de Inmunoglobulina E (IgE) específica en suero, con la producción de IL-4 e IL-10 y regula las funciones efectoras antifúngicas de los macrófagos, incluyendo acción sobre el óxido nítrico que secretan cuando están activados<sup>39, 40</sup>.

La candidiasis mucocutánea ha sido observada en personas con deficiencias fisiológicas de inmunidad celular. La candidiasis oral en el recién nacido o en la vejez puede estar relacionada con deficiencias del timo. La vulvovaginitis por *Candida*, asociada con el embarazo o el uso de anticonceptivos, puede estar ligada al papel de la progesterona sobre las células T y sobre la actividad anti-*Candida* de los leucocitos polimorfonucleares (LPMN). Además, la gonadotropina coriónica y la hormona luteinizante inducen la transición de de la fase

levaduriforme a la fase filamentosa<sup>41</sup>. La información clínica sugiere que la respuesta Th1 es sistemáticamente débil durante el embarazo.

El stress es frecuentemente una causa olvidada de inmunodeficiencia temporal. La regulación neuroendocrina y los efectos cronobiológicos pueden modular notablemente el sistema inmune y proveer la oportunidad de proliferación al hongo. La relevancia del stress en la candidiasis, ha sido examinada sobre la base de que induce deterioro de la respuesta inmune. Datos proporcionados por estudios clínicos que usaron voluntarios sanos, han demostrado el efecto que provoca el stress físico y emocional, aumentando la colonización de las superficies mucosas por *Candida*<sup>40, 41</sup>.

Además de las modificaciones fisiológicas, hay una larga lista de enfermedades que pueden facilitar el desarrollo de patógenos oportunistas. Deficiencias primarias o secundarias, que afectan las líneas mieloide o linfoide, muestran el papel fundamental de estas células en el control de la autodiscriminación y la homeostasis. La neutropenia y su duración es, obviamente, una de las principales causas de candidosis sistémica, mientras que la candidosis mucocutánea está directamente relacionada con deficiencias de las células T. La diabetes y otras endocrinopatías también son fuentes de candidosis mucocutánea<sup>40</sup>.

## 2.4 Manifestaciones clínicas

Los síntomas de candidiasis varían en función del tejido afectado. Por ejemplo, la infección de la boca (aftas) provoca la aparición de placas cremosas, que son de color blanco y causan dolor. Cuando se localizan en el esófago, existen dificultades para tragar o comer. Si las válvulas del corazón se ven afectadas, puede aparecer fiebre, soplo cardíaco y agrandamiento del bazo. Una infección de la retina (la membrana sensible a la luz que se encuentra sobre la superficie interna de la parte posterior del ojo) puede provocar ceguera. Una infección de la sangre (candidemia) o del riñón, puede generar fiebre, disminución de la presión arterial (shock) y una menor producción de orina, todo depende como el organismo reaccione frente al hongo oportunista, a continuación se describen algunos de los síntomas que *C. albicans* produce cuando<sup>42</sup>:

**Se multiplica y emigra:**

- a) Distorsiona el equilibrio de la flora intestinal, al anular las vulnerables bifidobacterias provocando: Indigestión, mal aliento, ventosidades, distensión abdominal gaseosa, estreñimiento, diarreas, síndrome de intestino irritable y prurito anal.
- b) Florece en las membrana mucosas provocando: Inflammaciones bucales y garganta, vaginales, oculares, nasales (incrementando las invasiones de alérgenos), y también en el tracto urinario, las uñas y la piel (provoca, acné, psoriasis y eczemas).
- c) Se transmuta en la muy agresiva forma de micelio, penetra a través de la pared intestinal, invade la corriente sanguínea y se refugia en los tejidos y articulaciones.

**Estimula el aumento de permeabilidad de las paredes intestinales**

- a) El intestino permeable deja que las proteínas incompletamente digeridas procedentes de la dieta penetren en la corriente sanguínea y provoquen reacciones inmunitarias (alergias e intolerancias alimenticias).
- b) Permite a las toxinas del intestino y a los metabolitos de la Candida pasar a la corriente sanguínea (autointoxicación, malestar general)

**Libera toxinas o antígenos conocidos**

- a) Afecta al cerebro. El acetaldheído (producto del fraccionamiento del alcohol producido por la Candida a partir del azúcar) reacciona con el neurotransmisor dopamina y provoca desarreglos mentales y emocionales (depresión, ansiedad, pánico, irritabilidad, oscilaciones del humor, sentimientos de “rechazo”, mala memoria, falta de concentración, etc.

- b) Afecta al sistema inmunológico. Los anticuerpos se lanzan contra las toxinas, dando origen a múltiples reacciones inmunitarias indiscriminadas: alergias e intolerancias a los productos químicos. Se estimula la liberación de histaminas. Los alérgenos provocan la supresión de las funciones de transmisión intercelular. Se incrementa la susceptibilidad a las infecciones y la incapacidad del sistema inmunológico para responder eficientemente a las infecciones o alérgenos.
- c) Afecta a todos los demás sistemas esenciales del organismo. Los dolores proliferan en las articulaciones y en los músculos, acompañados de debilidad muscular. Son comunes los adormecimientos, los hormigueos y los pruritos. La falta de energía y la fatiga se van haciendo cada vez más persistentes.

**Afecta a las funciones hormonales:** (síndrome post menopáusico y problemas menstruales, infertilidad, endometriosis).

- a) *Candida* posee en su membrana celular órganos receptores que tienen la capacidad de aceptar a las hormonas. Si la progesterona se liga a la *Cándida*, no llega nunca a su destino.
- b) *Candida* desarrolla con toda exactitud sus órganos receptores que quedan a la espera de las hormonas y que en efecto son más perfectos que las propias hormonas, al competir como órganos receptores de las mismas. La función hormonal queda bloqueada.
- c) *C. albicans* desencadena los procesos auto-inmunitarios, creando anticuerpos contra las hormonas propias y contra el tejido ovárico. Los síntomas van aumentando de ciclo en ciclo<sup>42</sup>.

## **2.5 Tratamiento**

El tratamiento de la candidiasis se basa en cuatro pilares:

- Realización de un diagnóstico precoz y certero de la infección.
- Corrección de los factores facilitadores o de las enfermedades subyacentes.
- Determinación del tipo de infección candidiásica.
- Empleo de fármacos antifúngicos apropiados<sup>44</sup>.

En el ámbito clínico, la candidiasis es comúnmente tratada con antimicóticos que comúnmente son usados para tratar la candidiasis, por ejemplo, una dosis única de fluconazol (una tableta de 150mg por vía oral) ha sido reportada de ser 90% eficaz en el tratamiento de una infección vaginal por levaduras<sup>42, 43</sup>. Esta dosis es solamente eficaz para las infecciones vaginales por levaduras, otros tipos de infecciones por levaduras podrían requerir diferentes dosis. En infecciones severas, se podría utilizar anfotericina B, caspofungina, o voriconazol. Los tratamientos locales pueden incluir supositorios vaginales o duchas vaginales medicadas. Se puede utilizar violeta de genciana para la lactancia materna con candidiasis, pero cuando se utiliza en grandes cantidades este puede causar ulceraciones en la boca y la garganta de los lactantes, y se ha relacionado con el cáncer de boca en los seres humanos y el cáncer en el tracto digestivo de otros animales<sup>43</sup>.

### **2.5.1 Clasificación química de los antifúngicos**

De acuerdo con el grupo químico al que pertenecen, los antifúngicos se clasifican en:

TABLA 1: Clasificación química de los antifúngicos

Grupo	Antimicóticos	
Poliénicos	Nistatina Nistatina liposomal Anfotericina B	
Azoles	Imidazoles	Miconazol Cotrimazol Ketoconazol
	Triazoles	Fluconazol Itraconazol
	Triazoles de segunda generación	Voriconazol Ravuconazol Posaconazol
Alilaminas	Terbinafina Naftifimina Papulacandinas	
Lipopéptidos	Equinocandinas Triterpenos glicosilados	

## 2.5.2 Estructura química y mecanismo de acción de los antifúngicos

### 2.5.2.1 Azoles

**Características:** Los azoles constituyen un grupo de compuestos sintéticos formados por anillos heteropentacíclicos con átomos de nitrógeno unidos, a su vez, mediante átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. Los azoles pueden ser imidazoles o triazoles, según tengan dos o tres átomos de nitrógeno en su anillo respectivamente.

**Mecanismo de acción:** Los azoles inhiben la actividad de la enzima 14-a-desmetilasa bloqueando la desmetilación de lanosterol a ergosterol, componente principal de la membrana celular de los hongos. Como consecuencia de ello, se altera la membrana celular y se acumulan compuestos no desmetilados que inhiben el crecimiento fúngico (Figura 4).

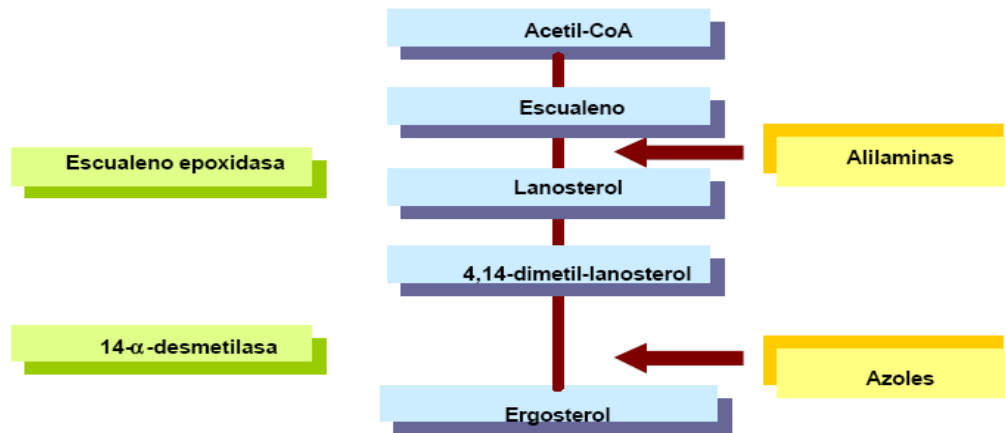


Figura 15. Mecanismo de acción de las alilaminas y azoles

Figura 4: Mecanismo de acción de las Alilaminas y Azoles

#### 2.5.2.1.1 Imidazoles

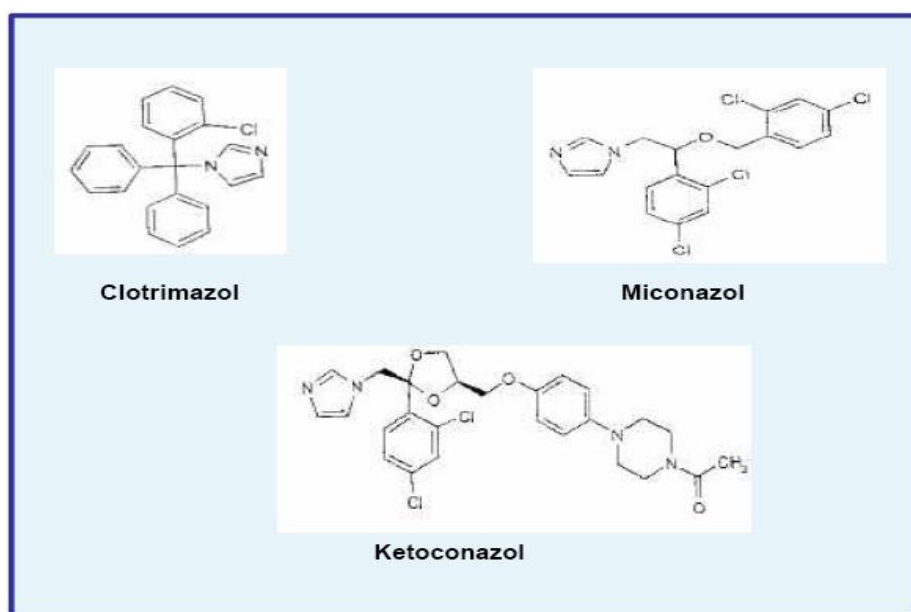
En la actualidad, todos los imidazoles que están disponibles comercialmente son antifúngicos tópicos con excepción del ketoconazol, que puede también ser oral. El uso de los imidazoles se limita sólo al tratamiento de las micosis superficiales. La estructura química de los principales imidazoles está representada en la (Figura 5). Dentro de este grupo, los más utilizados para el tratamiento de la candidiasis son:

##### a) Clotrimazol

Antimicótico de amplio espectro, activo frente a levaduras, dermatofitos y otros hongos filamentosos así como también frente a determinadas bacterias gram positivas y gramnegativas<sup>4</sup>. Está indicado en el tratamiento de las dermatofitosis de la piel así como también en la pitiriasis versicolor y en las candidiasis cutáneas o vaginales. Su forma de presentación suele ser en forma de crema al 1%. Este tipo de formulación tiene la ventaja que puede ir acompañada de un corticosteroide (dipropionato de betametasona), que contribuye a la reducción de la inflamación de la zona afectada.

## b) Ketoconazol

Este antimicótico en su forma tópica está indicado en el tratamiento de dermatofitosis, dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor y candidiasis cutáneas. Suele presentarse en forma de crema al 2%, gel o polvo. El ketoconazol en comprimidos o en suspensión está indicado para el tratamiento de blastomicosis y paracoccidomicosis<sup>45</sup> o en el tratamiento de algunas parasitosis como las producidas por *Leishmania* o *Plasmodium*. Sin embargo, como antifúngico oral es poco utilizado debido a su hepatotoxicidad.



**Figura 5:** Estructura química de los principales Imidazoles

### 2.5.2.2.2 Triazoles

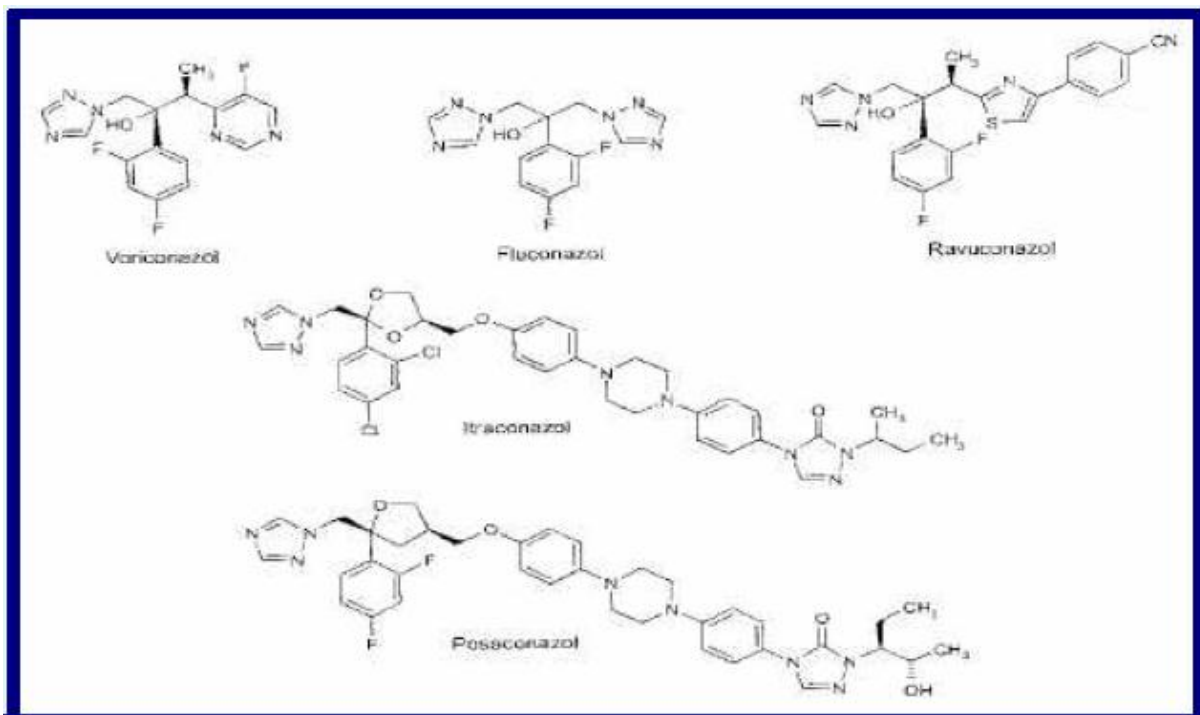
#### a) Fluconazol

Es una molécula relativamente pequeña que es parcialmente soluble en agua, fácilmente absorbida y con una vida media prolongada (hasta 25 horas en humanos), se excreta como droga activa en orina y penetra dentro del fluido cerebroespinal, tiene como inconveniente la resistencia natural a *C. Krusei* y la posibilidad de generar resistencia durante el tratamiento.



### b) Itraconazol

Es un componente lipofílico que se caracteriza por su buena absorción oral, distribución extensiva en los tejidos y una larga vida media en el suero. El itraconazol es muy insoluble en fluidos acuosos y tiene una alta tasa proteica (más del 90%). Esta droga se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y penetra ligeramente dentro del fluido cerebroespinal y a la orina pero lo hace bien en la piel y en los tejidos. Destaca su efectividad sobre *Aspergillus spp* y hongos dimórficos. Se administra en cápsulas, solución oral e intravenosa<sup>45</sup>.



**Figura 6:** Estructura química de los triazoles

#### 2.5.2.2 Alilaminas

**Características:** Son compuestos altamente lipofílicos que alcanzan concentraciones terapéuticas en tejido adiposo, uñas y piel, por lo que están indicados principalmente en el tratamiento de las dermatomicosis<sup>46</sup>. Son compuestos con baja toxicidad.

**Mecanismo de acción:** El mecanismo de acción de las alilaminas consiste en la inhibición de la actividad de la enzima escualeno - epoxidasa, impidiendo la síntesis del lanosterol (actividad fungistática). Por tanto, la vía enzimática es bloqueada en un paso anterior al inhibido por los azoles (Figura 4). Como resultado de ello, el escualeno acumulado en la célula fúngica provoca la muerte celular (actividad fungicida). El principal representante de esta clase de antifúngicos es:

a) **Terbinafina**

Este compuesto fue desarrollado en 1981 y destaca por su buena actividad *in vitro* frente a dermatofitos en cambio, frente a levaduras y otros hongos filamentosos, su actividad es variable, La terbinafina es usada como tratamiento de elección en pacientes con cromoblastomycosis, pero también es efectiva en el tratamiento de micosis subcutáneas<sup>46</sup>.

Recientes estudios *in vitro* han demostrado que este antifúngico presenta una buena actividad frente a la fase levaduriforme de *Sporothrix schenckii*<sup>45</sup>.

### 2.5.2.3 Polienos

**Características:** los macrólidos de polieno usados primeramente en el tratamiento de infecciones sistémicas y en infecciones fúngicas de tratamiento largo, tienen una formulación liposomal.

La Anfotericina B es producida por *Streptomyces nodosus* ; y ha sido usada por muchos años en el tratamiento de enfermedades micóticas, es inestable cuando se expone al calor, luz o pH ácido. La resistencia a la Anfotericina B es rara, sin embargo se han correlacionado cambios en los esteroides de membrana con el desarrollo de resistencia tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>44</sup>.

**Mecanismo de acción:** Los agentes antifúngicos de tipo polieno actúan mediante la unión con el ergosterol de la membrana de la célula fúngica, causando inestabilidad osmótica y la pérdida de la integridad de la membrana. La toxicidad directa de la membrana es debida en parte al daño oxidativo lo cual es frecuentemente fungicida<sup>43, 44</sup>. El efecto se extiende a las

células mamíferas, en las cuales la droga se une al colesterol, provocando la alta toxicidad asociada con los agentes de tipo polieno.

#### a) Anfotericina B

Las formulaciones liposomales y el complejo de lípidos de Anfotericina B, fueron diseñadas para maximizar la distribución de la Anfotericina B en pacientes con infecciones fúngicas diseminadas tales como la candidiasis hepatoesplénica y la aspergilosis pulmonar invasiva, una de las ventajas que presentan este tipo de drogas es que poseen una toxicidad selectiva para las células fúngicas y no para los eritrocitos<sup>43</sup>.

#### b) Nistatina

Fue descubierta por Hasen y Brown en 1951 se trata de una sustancia producida a partir del Actinomiceto *Streptomyces noursei*, siendo el primer antifúngico de su clase en aparecer, es un fármaco del grupo de los macrolidos polienicos que contiene tres o más dobles enlaces con dos partes muy diferenciadas ( hidrofilitas e hidrofóbicas que es la base de su mecanismo de acción<sup>44</sup>.

#### 2.5.2.4 5-fluorocitosina (5-FC)

**Características:** La 5-FC es un análogo de las pirimidinas diseñado en los años cincuenta del siglo XX como un posible agente antineoplásico. Tras descartar su utilidad para el tratamiento del cáncer por carecer de actividad frente a los tumores, se demostró que ejercía una buena acción antifúngica *in vitro* e *in vivo*. Debido a su elevada solubilidad en agua se la puede administrar por vía oral e intravenosa<sup>47</sup>.

**Mecanismo de acción:** La 5-FC penetra en las células fúngicas gracias a una citosina permeasa y allí una citosina desaminasa la convierte por desaminación en 5-fluorouracilo (5-FU), que es un potente antimetabolito. El 5-FU se puede transformar en un trifosfato de nucleósido que al unirse al ARN provoca errores de codificación. Además, el 5-FU se puede convertir en un desoxinucleósido que inhibe la timidilato sintasa y, por tanto, la síntesis de ADN.

La 5-FC es poco tóxica para las células de mamíferos, ya que carecen de citosina desaminasa o la que tienen es poco activa. El 5-FU, a su vez, es un potente agente antineoplásico, pero no puede penetrar en las células fúngicas. Las bacterias intestinales pueden convertir la 5-FC en 5-FU, de modo que las formulaciones orales de 5-FC podrían tener efectos tóxicos.

La 5-FC no se suele administrar en forma de monoterapia, ya que aparecen resistencias rápidamente, de modo que se la suele combinar con otros agentes, en particular con anfotericina B<sup>47</sup>.

## **2.6 Diagnóstico de laboratorio**

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestras vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal<sup>48</sup>.

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos:

### **2.6.1 Identificación mediante criterios morfológicos**

Los criterios morfológicos pueden ser, a su vez, macro o microscópicos:

#### **2.6.1.1 Criterios macroscópicos**

Estos criterios tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de Microbiología (agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc.). Sin embargo, el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras<sup>49</sup>.

En el medio SDA las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisa o rugosa, con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas a medida que envejecen. No todas las colonias blancas y cremosas son levaduras; las especies de algas aclorofílicas del género *Prototheca*, tras incubación a 28 °C durante 3-4 días, desarrollan unas colonias blancas cremosas muy parecidas a las producidas por el género *Candida*<sup>49</sup>.

### **2.6.1.2 Criterios microscópicos**

Ciertas características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas en la práctica son las siguientes:

#### **a) Prueba del tubo germinal o filamentación precoz**

El tubo germinal es una extensión filamentososa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*, aunque no está exenta de falsos negativos<sup>49</sup>.

#### **b) Auxonograma convencional**

Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Para su realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas por filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en el agar o bien discos de papel absorbente empapados con el nutriente. Sin embargo, las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, resultando mucho más laboriosas y costosas<sup>50</sup>.

### c) Detección de ureasa

Una levadura con reacción positiva a la prueba de la ureasa es sugestiva de pertenecer al género *Cryptococcus*. Concretamente, las cepas de *C. neoformans* que son grandes productores de ureasa, comienzan a provocar cambio de color a las 2 h de incubación a 35 °C. Esta prueba también puede utilizarse para diferenciar *Trichosporon* de *Geotrichum*; la mayoría de las especies de *Trichosporon* son ureasa (+) mientras que las de *Geotrichum* son ureasa (-) 49, 50 .

## 3. RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN LEVADURAS

La aparición de resistencias 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 vivo* una sensibilidad normal al agente<sup>51</sup>.

**a) Resistencia clínica**, puede deberse a resistencias de los microorganismos a un fármaco, pero también a interacciones complejas entre el antimicrobiano y el agente que causa la infección en el ser humano.

La resistencia clínica depende de lo siguiente:

- ✓ La respuesta inmune del hospederos
- ✓ La penetración de las drogas
- ✓ La presencia de un foco de infección persistente o protegido, lo que ocurre con los catéteres y con los abscesos.

A diferencia de lo que ocurre con las bacterias, en las infecciones fúngicas, la correlación *in vitro* e *in vivo* no siempre se da. Esta correlación se ha demostrado en pacientes con SIDA y

candidiasis orofaríngea con tratamientos prolongados con azoles, en los que se empiezan a ver cepas con CIM, más elevada y además, aparece fracaso terapéutico.

**b) Resistencia microbiológica**, se puede definir como un cambio (o sea, un descenso) en la sensibilidad a los antifúngicos que se puede medir *in vitro* mediante técnicas de laboratorio adecuadas y esta va depender de lo siguiente:

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

En algunas levaduras patógenas las resistencias a antifúngicos específicos son intrínsecas, aunque también se pueden haber adquirido de forma transitoria o permanente. La distinción entre levaduras o cepas fúngicas sensibles y resistentes se puede establecer mediante un valor umbral de sensibilidad a un fármaco dado (el punto de corte de la CIM, o concentración inhibidora mínima). De un modo ideal, en la práctica médica habitual los valores de estos puntos de corte predecirían el éxito o el fracaso de un tratamiento antifúngico. Sin embargo, las experiencias acumuladas con distintos agentes de este tipo demuestran que esta asociación no se puede aplicar inequívocamente<sup>51</sup>.

### 3.1 Mecanismos celulares de resistencia

Entre los mecanismos celulares de resistencia a los antifúngicos se encuentran los siguientes<sup>51, 52</sup>:

- ✓ Cambio a cepas más resistentes (cepas endógenas con resistencia intrínseca);
- ✓ Reemplazo con cepas más resistentes de *C. albicans* (0-33%);

- ✓ Alteraciones genéticas en cepas, es decir, resistencia secundaria; como las levaduras tienen plasmidios, igual que las bacterias, sufren mutaciones no cromosomales, con expresión génica transitoria, lo que da células temporalmente resistentes (resistencia epigenética);
- ✓ Alteraciones en el tipo celular (serotipo; levadura/hifa; colonias);
- ✓ Alteraciones de la población fúngica (predisposición genética a S o R).

### 3.2 Mecanismos moleculares de resistencia

En cuanto a los mecanismos moleculares de resistencia, las levaduras tienen muchos. Por este motivo es importante conocerlos y preocuparse de ellos, igual que en el caso de las bacterias y son los siguientes<sup>52</sup>:

- ✓ Alteraciones en la importación del fármaco, como ocurre con la fluorocitosina: al mutar la enzima permite la entrada del fármaco;
- ✓ Alteraciones en el procesamiento intracelular de la droga (modificación, degradación);
- ✓ Alteraciones en la enzima target (mutaciones puntuales, sobreexpresión, amplificación génica, conversión génica o recombinación mitótica);
- ✓ Alteraciones de otras enzimas que participan en la vía biosintética del ergosterol;
- ✓ Alteraciones en bombas de eflujo (transportadores ABC, facilitadores mayores).

## 4. MÉTODOS DE ESTUDIO DE SENSIBILIDAD IN VITRO

### 4.1 Métodos de referencia

En 1982, el NCCLS creó un subcomité con la finalidad de establecer protocolos de referencia para determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* a las levaduras. Sin embargo, no se publicó el primer documento (M27-P) (NCCLS, 1992) hasta 1992. Se propuso el método de dilución en caldo para levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, que se fue perfeccionando para dar lugar en 1995 al documento M27-T (NCCLS, 1995) y, en 1997, al M27-A (NCCLS, 1997). Este último protocolo hace referencia tanto a métodos de



microdilución como de macrodilución en medio líquido usando RPMI como medio de cultivo; en él, se definen los puntos de corte para fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Sin embargo, debido a que este método presentaba algunas dificultades en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los azoles, se elaboró el nuevo documento M27-A2 (NCCLS, 2002). Este documento recomienda una adición del 2% de glucosa al medio y una determinación de las CMI a las 24 horas para una mejor interpretación de la lectura.

Aunque para levaduras ya existen dos métodos estandarizados en medio líquido, el NCCLS, en su interés por desarrollar un método menos laborioso y más próximo al estandarizado con bacterias, publicó en 2003 el documento M44-P (NCCLS, 2003). Este documento propone el método de difusión en agar para determinar la sensibilidad de *Candida spp* frente a fluconazol y voriconazol. El método es mucho más sencillo y barato de realizar y la lectura es más fácil de interpretar que los métodos de macro y microdilución. El método de difusión en agar muestra una excelente correlación con el método de microdilución<sup>15</sup>, aunque el medio de cultivo usado (agar Mueller-Hinton con un 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno) es diferente del recomendado en el método de referencia de macro y microdilución (RPMI). Los puntos de corte sólo están establecidos para el fluconazol.

#### 4.1.1 Limitaciones de la técnica de referencia

La dificultad está en que no se puede diferenciar entre poblaciones cuando se hace estudios de la susceptibilidad a anfotericina. Las CIM del 99% de las cepas se incluyen en un intervalo de 4 diluciones dobles (0,12 y 1 microgramo por litro), por lo cual no puede establecerse valores de corte fiables para diferenciar ambas poblaciones. La propia variabilidad intrínseca de las pruebas de sensibilidad hacen necesario un intervalo de distribución más amplio, Por ejemplo, con fluconazol las CIM varían entre 0,12 y 0,5 en las cepas de *Candida*, lo que corresponde a la población sensible in vitro, y entre 16 y 64 microgramos por litro, lo que corresponde a la población resistente in vitro. Con el nuevo valor de corte, en que la sensibilidad es dosis dependiente, oscila entre 16 y 32 microgramos, de modo que el valor de corte estaría determinado como sensible dosis dependiente<sup>23</sup>.

## 4.2 Métodos comercializados

Los métodos de referencia tanto para levaduras como para hongos filamentosos son métodos poco prácticos, complejos y muy laboriosos para ser realizados rutinariamente en un laboratorio de microbiología. Para paliar esta dificultad, se han desarrollado métodos comerciales más sencillos y de más fácil ejecución. Entre ellos, tenemos:

### 4.2.1 Sensititre Yeast One

Este método de microdilución se basa en la dilución del antifúngico en medio líquido usando RPMI 1640 con glucosa y con un indicador de pH (azul Alamar). Cuando se produce crecimiento del hongo, la actividad metabólica oxida el indicador presente en el medio, que cambia de azul a rosa. Datos obtenidos por varios autores<sup>36</sup> han mostrado un alto porcentaje de concordancia entre el Sensititre Yeast One y el método de referencia para *Candida spp.* y *Cryptococcus spp.*

### 4.2.2 Neo-sensitabs TM

Este método se basa en la difusión del antifúngico en forma radial sobre el agar creando un gradiente de concentración. Así, en función del diámetro de inhibición obtenido, la cepa se clasifica como sensible, moderadamente sensible o resistente. El método está estandarizado solamente para bacterias y levaduras<sup>53</sup>. Los diámetros de las zonas de inhibición con este método muestran una buena correlación con las CMI obtenidas con el método de microdilución (NCCLS)<sup>36</sup>. Los antifúngicos están comercializados en forma de discos o tabletas.

### 4.2.3 E-test

Es un método basado en medio sólido que se basa en la difusión en el agar de varias concentraciones de antifúngicos incorporados a una tira de plástico inerte, la cual da lugar a la

formación de una elipse de inhibición de crecimiento. Es una técnica fácil de realizar, con un alto grado de reproducibilidad y una buena concordancia con el método de microdilución del NCCLS.

Estudios comparativos entre el Etest y el método de referencia han mostrado una excelente correlación en el caso de levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus*<sup>52</sup>.

#### 4.2.4 ATB Fungus 3

Este es otro método para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, se trata de un sistema no colorimétrico comercializado por bio Mérieux. Este método podría ser aplicable a la rutina de un laboratorio de Microbiología pero no incorpora antifúngicos tan importantes en la clínica como el fluconazol y el itraconazol, por lo que su utilidad en las micosis sistémicas es limitada. Por otra parte, la correlación con otros métodos es aceptable para los azoles (62%) y buena para anfotericina B (95%) y 5-fluorocitosina (100%). El fundamento se basa en el método del NCCLS, utiliza diluciones seriadas para anfotericina B y 5 fluorocitosina y dos concentraciones críticas para el resto de los antifúngicos<sup>36</sup>.

### 5. PASOS PARA DETERMINAR LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE UNA PRUEBA.

Estos pasos consisten en la evaluación de un proceso a fin de determinar su idoneidad para un uso particular e incluye la optimización de una prueba y la demostración de las características de su realización<sup>54</sup>.

Un ensayo validado proporciona de modo repetitivo unos resultados mediante una prueba que identifican a los elementos como positivos o negativos para un componente o proceso determinado y, por deducción, permite predecir de modo preciso el estado de infección y/o exposición de los pacientes con un grado predeterminado de fiabilidad estadística<sup>54</sup>.

Los procedimientos analíticos deben validarse para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Cada laboratorio establecerá los requisitos que deben cumplir estos métodos, con objeto de demostrar que son adecuados para la finalidad pretendida.

Para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios sus especificaciones técnicas que pueden incluir, entre otras:

- Precisión
- Sensibilidad
- Especificidad
- Eficiencia
- Valores predictivos
- Reproducibilidad

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance y objetivo a validar. Así mismo, habrá de tener en cuenta las características de los equipos que se van a utilizar.

Al realizar la validación de un procedimiento, es recomendable consultar la existencia a de protocolos recomendados por sociedades científicas o entidades de conocida solvencia, para seguimiento y aplicación tanto del diseño como de la metodología estadística a seguir.

El laboratorio dispondrá de los protocolos necesarios para realizar las actividades de validación de métodos, mantendrá registros de los resultados obtenidos y de la evaluación de los mismos<sup>55</sup>.

### **1. 1 Sensibilidad y especificidad**

La especificidad analítica es el grado en que el ensayo no muestra reacción cruzada con otras sustancias y la sensibilidad analítica de un ensayo es la cantidad más pequeña de la sustancia en cuestión que puede detectar la prueba validada<sup>55</sup>.

Al evaluar una prueba diagnóstica pueden darse 4 situaciones posibles:

- a) Un resultado positivo verdadero (VP): La prueba es positivas y el paciente tiene la enfermedad.
- b) Un resultado falsamente positivo (FP): La prueba es positiva pero el paciente no padece la enfermedad.

- c) Un resultado falsamente negativo (FN): La prueba es negativa pero el paciente presenta la enfermedad.
- d) Un resultado negativo verdadero (VN): La prueba es negativa y el paciente no tiene la enfermedad.

Las mejores pruebas diagnósticas son aquellas que generan pocos falsos positivos y falsos negativos. En general las pruebas diagnósticas se evalúan calculando su sensibilidad y su especificidad. La sensibilidad (Proporción de individuos con la enfermedad que presentan un resultado positivo) indica lo buena que es la prueba para identificar a las personas enfermas. La especificidad (Proporción de individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo) indica hasta que punto es buena la prueba, para identificar a los individuos que no tienen la enfermedad<sup>56</sup>.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100\%$$

## 1.2 Eficiencia

La eficiencia se define como la capacidad de una prueba para detectar correctamente las muestras positivas y negativas. Responde a la siguiente formula.

$$\text{Eficiencia} = \frac{VP + VN}{VP + FN + VN + FP} \times 100\%$$

### 1.3 Valor predictivo

El valor predictivo de una prueba con resultado positivo (VPP) es la probabilidad de que una persona con resultado positivo tenga en realidad la enfermedad. Es igual a la probabilidad de presentar un resultado positivo verdadero o un falso positivo.

El valor predictivo de una prueba con resultado negativo (VPN) es la probabilidad de que una persona con un resultado negativo no tenga en realidad la enfermedad es igual a la probabilidad de presentar un resultado negativo verdadero dividido por la probabilidad de presentar un resultado negativo verdadero o un falso negativo.

El valor predictivo es una buena medida de la utilidad clínica global, porque incorpora información tanto sobre la prueba como sobre la población estudiada<sup>56</sup>.

$$\text{Valor predictivo de una prueba positiva} = \frac{VP}{(VP + FP)} \times 100\%$$

$$\text{Valor predictivo de una prueba negativa} = \frac{VN}{(VN + FN)} \times 100\%$$

**TABLA 2.** Formato básico para la construcción de una tabla 2x 2, donde se pueden mostrar los resultados que se obtienen por 2 diferentes métodos de diagnóstico. (Dawson, 1994)

TEST	GOLD ESTANDAR		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	VP	FP	VP + FP
NEGATIVO	FN	VN	FN + VN
<b>TOTAL</b>	VP + FN	FP + VN	<b>TOTAL</b>

VP= Verdadero positivo; FP= Falso positivo

FN= Falso negativo; VN = Verdadero negativo

#### 1.4. Pruebas de concordancia

Cuando se requiere la evaluación de varios reactivos o diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia se usan estudios de concordancia (o eficiencia) como por ejemplo:

Índice de Kappa (**K**), que es un test de concordancia que se basa en la comparación de índice de concordancia esperada ( $P_e$ ) con los índices de concordancia observados ( $P_o$ ).

$$K = \frac{(P_o - P_e)}{(1 - P_e)}$$

Una forma común de asegurar la confiabilidad es realizar mediciones de repetitividad, en especial con propósitos de investigación es repetir la medición y valorar el grado de concordancia. El parámetro estadístico que con mayor frecuencia se emplea para medir la correspondencia entre dos observaciones ante una variable dicotómica es el índice de Kappa<sup>54</sup>. El índice de concordancia Kappa (**K**) puede clasificarse en 5 grupos distintos:

**TABLA 3.** Clasificación del índice Kappa (Cura, E. (OPS), 1994)

CONCORDANCIA	INDICE DE KAPPA
Deficiente	< 0,20
Regular	0,21 - 0,40
Moderada	0,41 - 0,60
Buena	0,61 - 0,80
Muy buena	0,81 - 1,00

#### 1.5 Reproducibilidad

La evidencia preliminar de reproducibilidad (concordancia entre los duplicados dentro de un mismo ensayo y entre distintas realizaciones de la prueba) resultan necesarias para garantizar el posterior desarrollo del ensayo a validar. Esto se lleva a cabo evaluando los resultados de,

como mínimo, tres de las cuatro muestras internas que representan la actividad dentro del rango lineal del ensayo. La variación entre diferentes realizaciones del mismo ensayo se analiza utilizando las mismas muestras en un mínimo de 20 realizaciones (en total), por dos o más operarios, preferiblemente en fechas diferentes. Todas las realizaciones deben llevarse a cabo de forma independiente<sup>54</sup>.

Una manera de determinar la consistencia de estos datos es midiendo su reproducibilidad en medidas repetidas, tanto por un mismo observador (intraobservador) como entre diferentes observadores (interobservadores)<sup>55</sup>.



## VI. DISEÑO METODOLÓGICO

### E. TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se trata de un test diagnóstico, ya que en primera instancia se realizó un estudio experimental de estandarización de la técnica de microdilución en caldo M27-A2 (método de referencia); y posteriormente se utilizó este como Gold estándar en la evaluación del método comercial ATB FUNGUS 3, a fin de determinar su idoneidad para el uso dentro del laboratorio.

### B. POBLACIÓN ESTUDIADA

La población del presente estudio estuvo constituida por cepas de *C. albicans* obtenidas de muestras de diferente naturaleza, mismas que fueron procesadas en el laboratorio de bacteriología del Instituto SELADIS.

También se incluyeron en el estudio cepas ATCC de *C. parapsilosis*, las cuales fueron utilizadas durante el proceso de validación de la técnica de microdilución en caldo propuesto por la CLSI.

#### 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✓ Se incluyó en el estudio todas las cepas de *C. albicans*, identificadas en el laboratorio de bacteriología clínica del instituto SELADIS, durante los meses de junio a diciembre del 2011.

#### 2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✓ Se excluyeron del estudio todas las cepas de *Candida sp.* no identificadas como *C. albicans*, en el laboratorio de bacteriología clínica del instituto SELADIS.

### **C. LUGAR Y TIEMPO DE ESTUDIO**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en laboratorio de bacteriología del Instituto de investigaciones SELADIS que está ubicado en la zona de Miraflores, avenida Saavedra N° 2224 Ciudad de La Paz - Bolivia.

### **D. TAMAÑO MUESTRAL**

El panel de muestras estuvo constituido por 50 cepas de *C. albicans* de diferentes muestras biológicas, pertenecientes a pacientes con diagnóstico clínico de candidiasis, confirmados por estudios laboratoriales realizados en el laboratorio de Bacteriología clínica de Instituto SELADIS.

El tamaño muestral ha sido definido de acuerdo al “Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios”, como una publicación oficial de la organización panamericana de la salud (OPS, 1994), que sugiere por lo menos 50 muestras, para la validación de un procedimiento frente a otro similar normalizado.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. METODO

#### 1. MICRODILUCIÓN EN CALDO M27-A2 (CLSI)

El método que describe este estándar está pensado para evaluar levaduras que causan infecciones invasoras. Estas levaduras abarcan todas las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*. Este método no se aplica para evaluar la fase levaduriforme de los hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum*<sup>11, 12</sup>.

El documento M27-A2 es un “ESTÁNDAR DE REFERENCIA”. Se desarrolló a través de un proceso de consenso para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos. Un objetivo primordial de un estándar de referencia es sentar las bases de forma que se puedan desarrollar otros métodos más accesibles pero que obtengan resultados similares al estándar. En conclusión, cualquier método que proporcione resultados equivalentes al M27-A2 se debe de considerar en conformidad y por tanto su utilización debe ser aceptada.

##### 1.1 Fundamento de la técnica

El métodos de referencia M27-A2, para levaduras, propuestos por la CLSI. Básicamente, consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura en el mismo medio pero sin antifúngico (control). Teniendo en cuenta que el medio de cultivo, pH, tampón, inóculo, tiempo y temperatura de incubación deben ajustarse estrictamente a lo recomendado en dichos documentos puesto que cualquier variación en estos parámetros puede afectar los resultados<sup>10</sup>.

## 1.2 Equipos e instrumentos

- ✓ Microscopio
- ✓ Espectrofotómetro
- ✓ Campana de flujo laminar

## 1.3 Material

- ✓ Microplacas de cultivo de 96 pocillos (Fondo plano)
- ✓ Micropipeta de 20, 200 y 1000 UI
- ✓ Micropipeta multicanal de 8 canales

## 1.4 Reactivos

- ✓ Agar Sabouraud glucosado 2%
- ✓ RPMI
- ✓ Tampón MOPS
- ✓ Escala de Mc Farland 0.5

## 1.5 Antifúngicos

- ✓ Fluconazol (sustancia pura)
- ✓ Itraconazol (sustancia pura)
- ✓ Ketoconazol (sustancia pura)

## 1.6 Procedimiento

### 1.6.1 Estandarización de la técnica de microdilución planteado por la CLSI.

- **Preparación del medio de cultivo** Para el inicio de la estandarización de la técnica de microdilución en caldo se procedió al preparado del medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), este medio fue tamponado con ácido morfolino propano

sulfónico (MOPS) (ICN, Sigma), en una concentración final 0,164 M y ajustado a pH  $7\pm 0,1$  (Ver anexos 1), para ello se prosiguió de la siguiente manera:



**Figura 7:** Esquema de la preparación del medio de cultivo.

Es importante recalcar que como se trata de un medio rico en nutrientes, es fácilmente contaminable, por lo que es necesario realizar todo el proceso dentro de una campana de flujo laminar y usar material estéril en todo el proceso.

### **b) Preparación de la solución madre de antifúngico**

Las soluciones madre de los antifúngicos se prepararon con sustancia pura de cada antimicótico a una concentración 100 veces superior a la concentración mayor ensayada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que varios antifúngicos tienen una solubilidad limitada o nula en agua, por lo que utilizamos el dimetil sulfóxido (DMSO), para los antifúngicos insolubles en agua, los pasos se describen en la (Figura 8).

**Cuadro 1: Solubilidad de los antifúngicos**

<b>Antifúngico</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Diluyente</b>
Anfotericina B	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Ketoconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Itraconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Posaconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Ravuconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Voriconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Fluconazol	Agua	Medio de cultivo
5-Fluorocitosina	Agua	Medio de cultivo

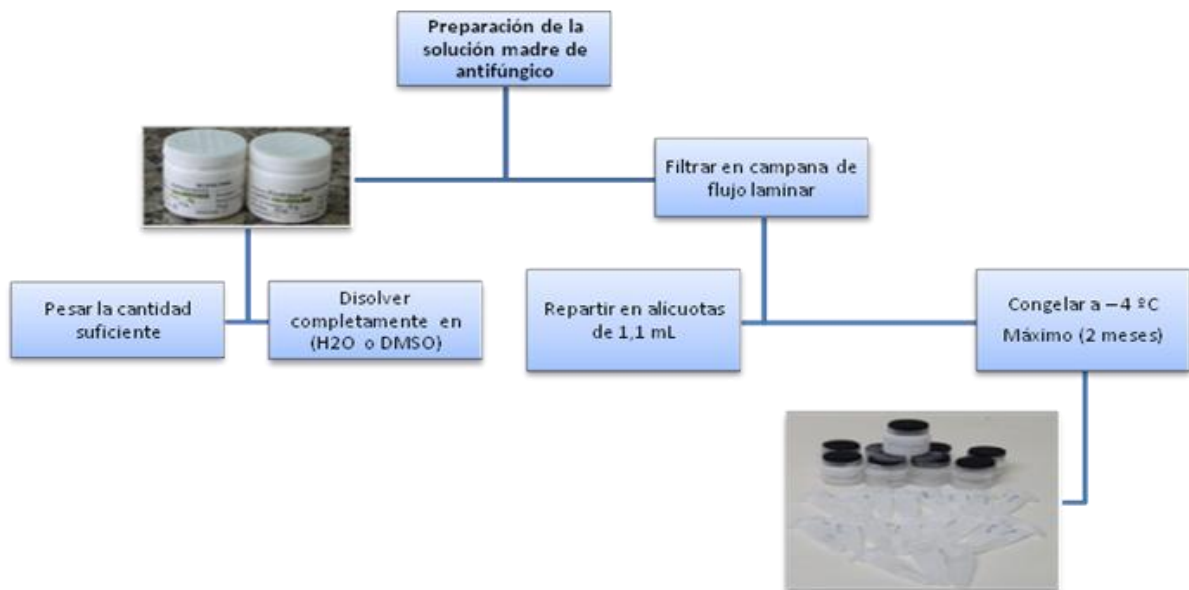
- **Antifúngicos solubles en agua ( Fluconazol )**

Se preparó el antifúngico a una concentración de 6 400 ug/mL, vale decir 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar (64 ug/mL) y se disolvió en agua destilada estéril.

Posteriormente se procedió a filtrar, tomando en cuenta que el antifúngico no se absorba o retenga. Luego este filtrado se repartió en alícuotas de 1,1 mL en tubos eppendorf y se congeló a – 40 °C hasta el día de su utilización (Ver anexos 2).

- **Antifúngicos insolubles en agua ( Ketoconazol, Itraconazol)**

Se pesó la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración de 1.600 µg/ml (100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar) y disolvió en (DMSO). Posteriormente se procedió a filtrar, tomando en cuenta que el antifúngico no se absorba o retenga. Luego este filtrado se repartió en alícuotas de 1,1 mL en tubos eppendorf y se congeló a – 40 °C hasta el día de su utilización (Ver anexos 2).



**Figura 8:** Esquema de la preparación de la solución madre del antifúngico.

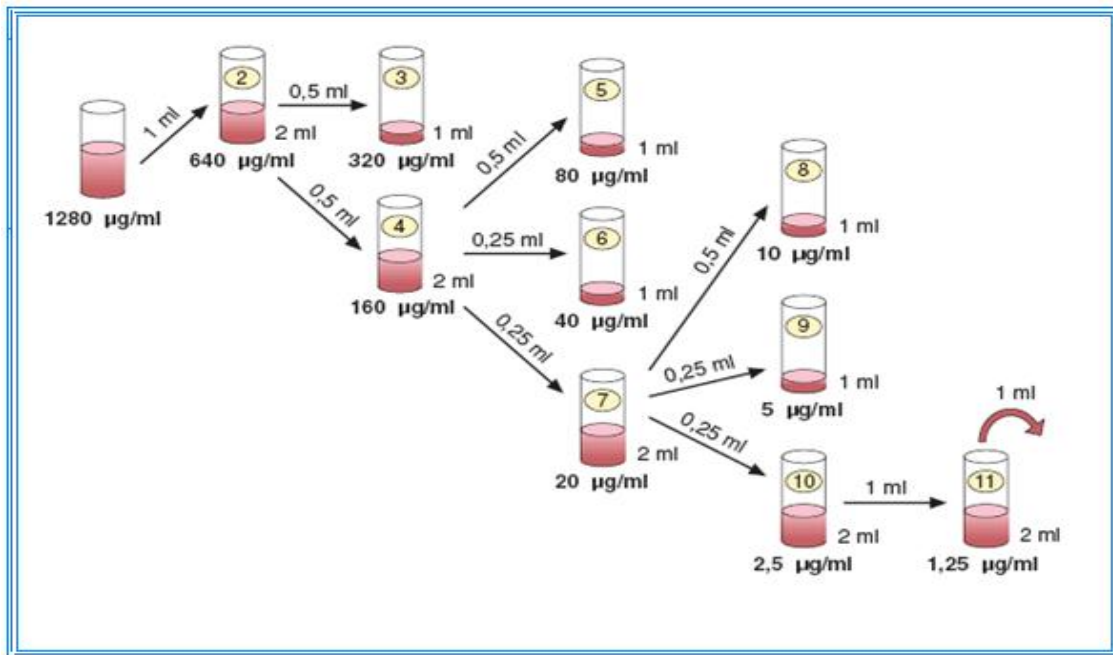
Es importante tomar en cuenta que concentraciones altas de antifúngicos no se disuelven bien, por lo que se recomienda calcular concentraciones más bajas en este paso. Otro punto a considerar es que solo se pueden descongelar una sola vez las alícuotas de solución madre, ya que al hacerlo este pierde su actividad.

### c) Preparación de las diluciones del antifúngico

Para este paso se realizaron diluciones dobles aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble o insoluble en agua.

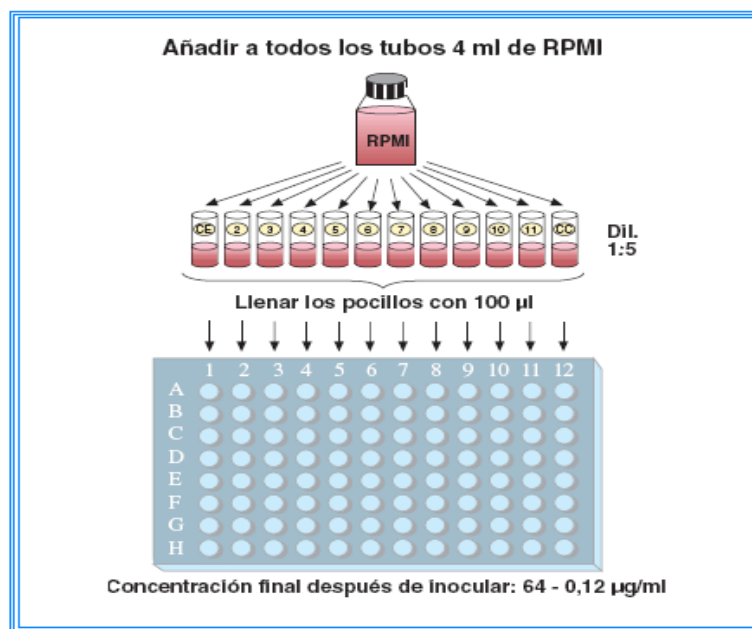
- **Antifúngicos solubles en agua (Fluconazol)**

1° A partir de la solución madre se prepararon una serie de diluciones, utilizando como diluyente RPMI 1640, como se describe en el siguiente flujograma (figura 9 y anexos 3).



**Figura 9:** Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640.

2º Luego que todos los tubos contienen 1 mL, con una concentración 10 veces superior a la concentración deseada. Se procedió a realizar una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos fue 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml).

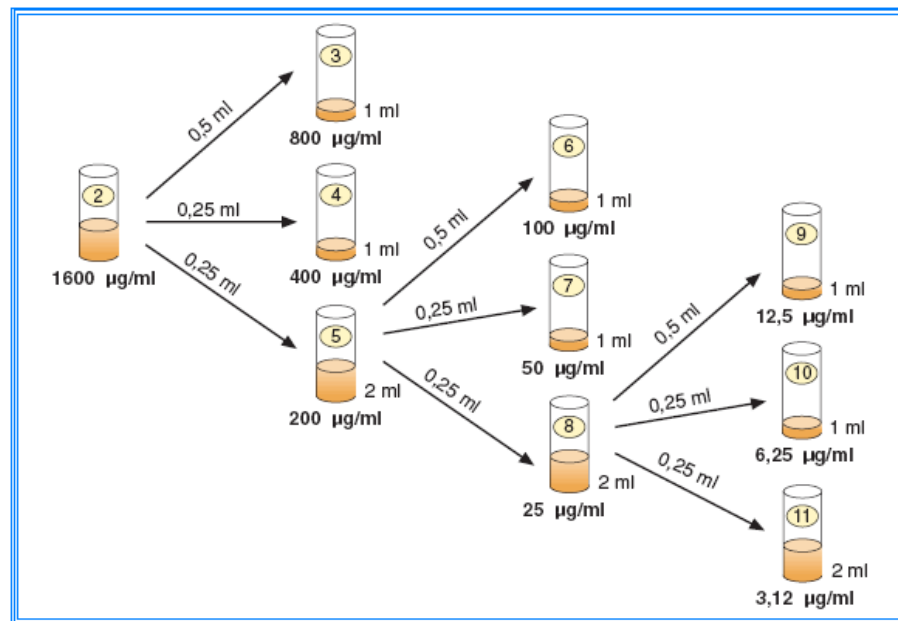


**Figura 10:** Segundo paso de las diluciones de antifúngicos solubles en agua.



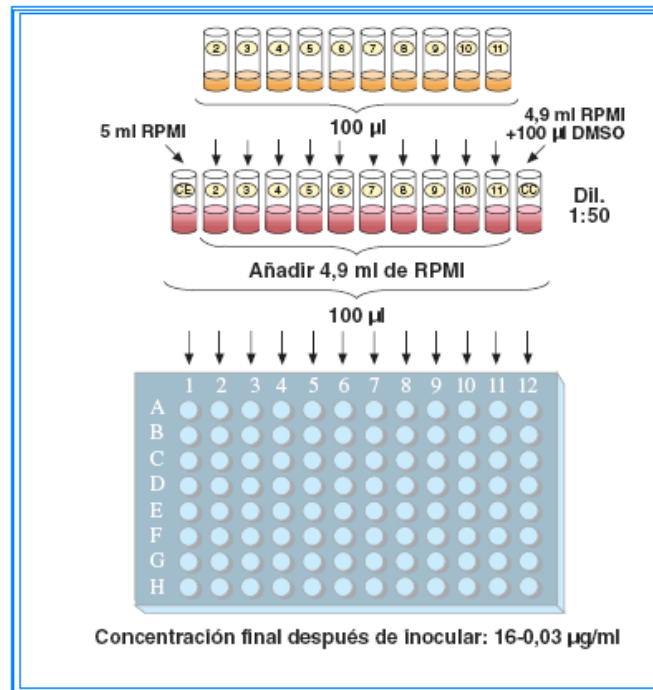
- Antifúngicos insolubles en agua ( Ketoconazol, Itraconazol )

1° A partir de la solución madre se prepararon una serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, utilizando como diluyente DMSO, como se describe en el siguiente flujograma (figura 9 y anexos 3).



**Figura 11:** Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente (DMSO).

2° Seguidamente se realizó una dilución 1/50 tomando 100 µL de cada tubo que se transfirieron a otro tubo que contiene 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32 µg/mL - 0,06 µg/mL) y la de DMSO, 2% (Figura 11).



**Figura 12:** Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente RPMI 1640.

#### d) Llenado de las placas

El contenido de cada tubo se puso en una cubeta y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se procedió al llenado de las placas de microtiter estériles de 96 pocillos, vertiendo en cada pocillo 100 µl de solución de antifúngico, de la siguiente manera:

- Desde la columna n° 2 a la n° 11, se llenaron los pocillos con las diferentes concentraciones de antifúngico (Tabla 4).
- La columna n° 1 se llenó con el control de esterilidad (200 uL de RPMI).
- La columna n° 12 se llenó con el control de crecimiento (100 uL de RPMI); en el caso de antifúngicos insolubles en agua, la columna n° 12 se relleno con 100 µL de RPMI con un 2% de DMSO, esto con el fin de descartar al DMSO como interferente de crecimiento.

Una vez llenas las placas estas se cerraron y envolvieron con una bolsa de plástico, para evitar la evaporación, posteriormente se congelaron a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En esta parte lo importante es utilizar placas de microdilución estériles, de un solo uso y de 96 pocillos de fondo plano (Ver anexos 4).

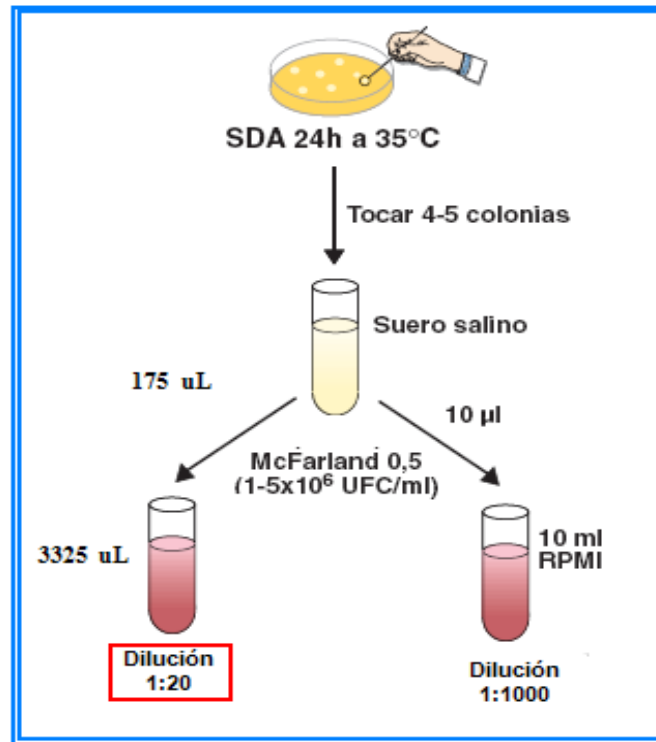
**TABLA 4.** Concentraciones utilizadas para el test de microdilución en caldo M27-A2.

Antifúngico	Concentraciones (ug/ml) utilizadas para el test de microdilución en caldo (CLSI)									
Fluconazol	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Itraconazol	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
Ketoconazol	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03

#### e) Preparación del inóculo

- Todas las muestras incluida la cepa control se subcultivaron en agar Sabouraud glucosado 2%.
- El inóculo se preparó tomando 3 colonias del cultivo de 24 hrs, luego se suspendieron en 5 ml de solución salina estéril al 0,85%.
- La suspensión se llevó al vortex durante 15 segundos, y se determino la absorbancia medida a 530 nm, en espectrofotómetro, de modo que el inóculo diera un valor entre 0,13 y 0,14 de densidad óptica que es equivalente al patrón de turbidez 0,5 de la escala de Mc Farland. Este ajuste produce una solución salina que contiene entre  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL.

Es importante considerar que si bien el método original plantea hacer una dilución 1:1000 del inóculo ajustado, en la práctica se obtuvieron mejores resultados realizando una dilución 1:20 con RPMI 1640. Este ajuste produce una solución más concentrada ya que contiene  $1 - 1-5 \times 10^4$  UFC/mL, esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas de antifúngico (Figura 12).



**Figura 13:** Preparación del inóculo de levaduras

También se debe considerar que el inóculo se puede guardar un máximo de 15 minutos a temperatura ambiente, ya que al no hacerlo la concentración de levaduras sufriría cambios trascendentales.

#### f) Inoculación de las placas

El día del ensayo se sacó las placas del congelador y se dejaron a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.

Luego se inocularon con 100 µL de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12.

La columna n° 1 que contenía 200 µL de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio.

La columna n° 12 no contenía antifúngico, pero tuvo la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico (100 uL RPMI), este pozo fue el control de crecimiento, luego de inocular las placas, estas se llevaron a un agitador por 15 minutos.

### g) Incubaciones de las placas

Las placas se incubaron, a 35°C durante 24 horas en atmósfera normal; tras este periodo de incubación se procedió a leer los resultados.

### h) Cepas control de calidad

Para la estandarización de la técnica se utilizó una cepa control recomendada por la CLSI, *C. parapsilosis* ATCC 22019; Esta es una cepa que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CIM se ha determinado repetidamente (Ver anexos 5).

**TABLA 5.** Intervalo de la CIM de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27-A2.

Antifúngico	C. parapsilosis ATCC 22019	
	24 h	48 h
Fluconazol	0,5 - 4	1,0 - 4
Ketokonazol	0,12 - 0,5	0,06 - 0,5
Itraconazol	0,12 - 0,5	0,06 - 0,5

## 1.7 Interpretación de resultados

- **Lectura e interpretación de resultado**

Para las lecturas de los resultados, la CIM se definió como la clara inhibición de crecimiento, frente a la cual las levaduras ensayadas no exhibieron crecimiento visible, para esto se tomó en cuenta los criterios propuestos por la CLSI.

### a) Anfotericina B

Para este antifúngico la CMI es la concentración más baja que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento, por tanto la visualización de cualquier tipo de crecimiento podría reflejar resistencia.

### b) Fluconazol, Itraconazol y ketoconazol

Para los azoles La CMI es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura (50%), comparada con el crecimiento control. Con los azoles la inhibición del crecimiento nunca es completa y es una tarea difícil elegir la CIM, para esto algunos autores proponen seguir los siguientes pasos para la lectura de los resultados:

- Las placas de microdilución se observaron sobre un fondo negro y cerca de la luz.
- Se comparó el crecimiento en cada pocillo con el pocillo control de crecimiento.
- Se le asignó una puntuación a cada pocillo con la siguiente clasificación:

**CUADRO 2.** Puntuación asignada para la lectura de turbidez en el método de microdilución en caldo planteado por la CLSI.

DEFINICIÓN MICRODILUCIÓN CLSI	VALORACIÓN
Sin disminución de la turbidez	4
Ligera disminución de la turbidez	3
Disminución prominente de la turbidez	2
Ligeramente turbio	1
Opticamente claro	0

- **Puntos de corte**

Para las muestras clínicas, por el momento, sólo se dispone de los puntos de corte de fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina ya que para establecer estos puntos de corte, la

CLSI se ha basado en estudios de correlación *in vitro-in vivo* de micosis orofaríngeas y pacientes con SIDA.

Aplicando estos criterios, el CLSI ha establecido diferentes categorías de sensibilidad: sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis administrada (S-DD).

**TABLA 7.** Puntos de corte según CLSI, obtenidas por el método de microdilución M27-A2

Antifúngico	Intervalos de CIM (ug/ mL)			
	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
Fluconazol	8	16 - 32	(-)	64
Itraconazol	0,12	0,25 - 0,5	(-)	1
5-Fluorocitocina	4	(-)	8,0 - 16	32

- La categoría de **sensible** no lleva implícito el éxito terapéutico.
- La categoría de **resistente** se correlaciona con fracaso terapéutico.
- La categoría **S-DD** para el fluconazol se basa en los niveles de antifúngico que se alcanzan con dosis 400 mg/día en pacientes con buen funcionamiento renal. Para el itraconazol se basan en una buena absorción del fármaco y que se alcancen niveles en sangre 0,5 µg/ml.
- En la categoría de **intermedio**, sólo es aplicable a 5FC, no se sabe con certeza si la cepa es sensible, ya que los datos que se tienen no permiten categorizarla como sensible o resistente.

## 2. MÉTODO COMERCIAL (ATB FUNGUS 3)

La galería ATB FUNGUS 3, permite determinar la sensibilidad de *candida* y *Criptococcus neoformans* frente a antifúngicos en medio semisólido en condiciones muy próximas a la de la técnica de referencia de microdilución, según recomendaciones de la CLSI.

## 2.1 Fundamento de la técnica

La galería ATB FUNGUS 3 (BioMérieux, Paris, France), que permite determinar la sensibilidad de *Candida* spp. Frente a antifúngicos en medio semisólido, en condiciones muy próximas a las de la técnica de referencia de microdilución, según las recomendaciones del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>10</sup>. Contiene 16 pares de capsulas, el primer par sin antifúngico, sirve de control de crecimiento. Las 15 capsulas siguientes contienen 5 antifungicos a varias concentraciones. La levadura a analizar es puesta en suspensión después se transfiere al medio de cultivo y se inocula en la galería. Después de incubar, la lectura del crecimiento se hace de forma visual. El resultado obtenido permite una CIM para: Anfotericina B (AMB), Fluconazol (FCA), Itraconazol (ITR), Voriconazol (VRC) y/o categorizar la cepa en Sensible, Intermedia o resistente para la 5-fluorocitocina (5FC). Cabe destacar que por razones de factibilidad de sustancia pura, en el estudio de test diagnostico solo se tomaran en cuenta 2 de los 5 antimicóticos: el fluconazol con rangos de 0,25 a 128 mg/L, e itraconazol, con rangos de 0,125 a 4 mg/L.

## 2.2 Equipos e instrumentos

- ✓ Campana de flujo laminar
- ✓ Shaker
- ✓ Espectrofotómetro

## 2.3 Material

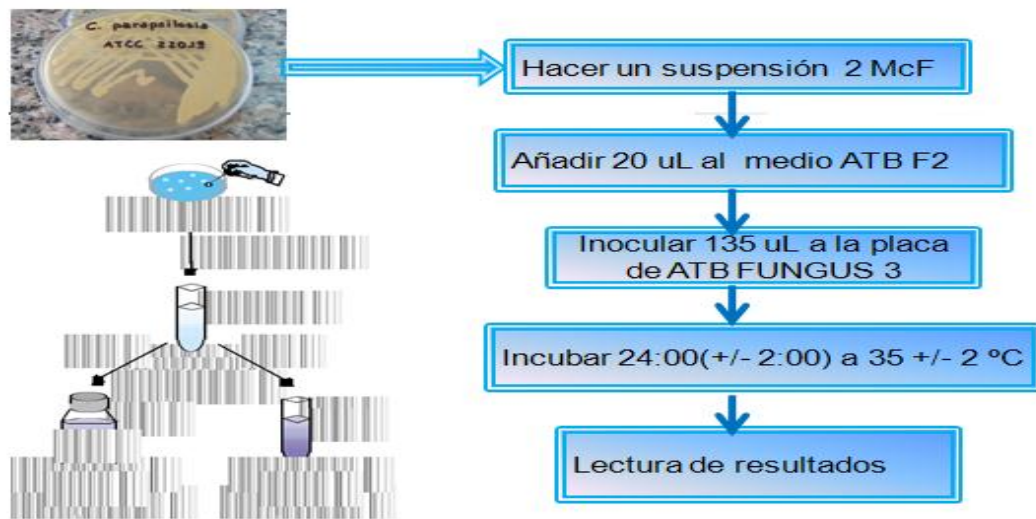
- ✓ Pipeta
- ✓ Protege ampollas
- ✓ Equipo general de laboratorio de bacteriología

## 2.4 Reactivos

- ✓ ATB F2 Medium
- ✓ Na Cl al 0,85%



## 2.5 Procedimiento



**Figura 14:** Estandarización del método comercial ATB FUNGUS 3

## 2.6 Interpretación de resultados

Para la lectura de los resultados se siguió los siguientes pasos:

- Se verificó la presencia de un crecimiento suficiente en la cúpula testigo. Para cepas de *Candida* debemos considerar la incubación de 48 hrs si el crecimiento es insuficiente. La ausencia de crecimiento en uno de los dos pocillos control invalida la prueba y debe ser repetida.
- Para la determinación del CIM, se leyeron los resultados sobre un fondo negro, la lectura se realizó a partir de la concentración mas baja y se anotaron los resultados sobre la ficha de resultados de crecimiento para cada una de las cúpulas comparando con las cúpulas testigo:

**TABLA 8.** Puntuación asignada para la lectura de turbidez para el método comercial ATB FUNGUS 3.

DEFINICIÓN	ATB FUNGUS	VALORACIÓN
Ausencia de reducción de crecimiento		4
Ligera reducción de crecimiento		3
Marcada reducción del crecimiento		2
Crecimiento muy debil		1
Ausencia de crecimiento		0

## B. ESTUDIO DIAGNÓSTICO

Las 50 muestras fueron procesadas tanto por el método estandarizado M27 –A2, como por el método comercial ATB FUNGUS 3 en diferentes tiempos y por el mismo operador.

### 1. RANGO DE TRABAJO

El total de las muestras fueron procesadas a la par, por el método de: M27-A2 (Gold estandar) y por el método comercial ATB FUNGUS 3; La lectura de los resultados fue realizado por un diferente operador quien no conocía los resultados de las pruebas obtenidas por el método M27 – A2.

### 2. REPRODUCIBILIDAD

Para determinar la reproducibilidad de los resultados emitidos por la prueba de ATB-FUNGUS 3, se seleccionaron 20 muestras al azar y se determinó la CIM para cada uno de los antifúngicos probados, en dos diferentes ensayos y por diferentes operadores.

### **3. Repetitividad**

Para determinar la repetitividad de los resultados emitidos por la prueba de ATB-FUNGUS 3, se seleccionaron 5 muestras al azar y se realizaron 3 ensayos para determinar la variación en las lecturas de la CIM, dentro de una misma realización.

### **4. Análisis estadístico**

Para la evaluación del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3 se analizaron los parámetros de sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo; Los cálculos correspondientes al desempeño diagnóstico del método evaluado ATB FUNGUS 3 con respecto al Gold estándar M27-A2, fueron realizadas con el programa EPIDAT (análisis epidemiológico para datos tabulados, versión 2.0 para Windows)

Para determinar la correlación en los resultados de ambos métodos, se calculo el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y el índice Kappa utilizando el programa Excel de Microsoft.

Los cinco parámetros de desempeño diagnóstico fueron calculados para detectar resistencia y sensibilidad hacia los antifúngicos; considerando como prueba positiva cuando cataloga a la cepa como resistente y prueba negativa cuando cataloga a la cepa como sensible, empleándose los puntos de corte recomendados por la CLSI para ambas técnicas.

Para el cálculo del desempeño diagnóstico se incluyeron las cepas sensibles dosis dependientes (SDD), dentro de las resistentes; debido a que este estadio es un evento previo al desarrollo de resistencia y podría determinar una mala respuesta clínica de acuerdo a la dosis con la que se realizará el tratamiento.

## VIII. RESULTADOS

### A. ESTUDIO EXPERIMENTAL

#### 1. Estandarización de la técnica de microdilución en caldo M27-A2.

El proceso de estandarización de la técnica de microdilución en caldo, inició con el desarrollo de un ensayo óptimo que reprodujera las CIM planteadas por la CLSI; para este paso se probaron 4 diferentes protocolos<sup>11, 12, 57</sup>; de los cuales se escogió el protocolo N° 4 (Tabla 8), en donde podemos destacar la dilución 1/20 de la muestra, la adición de 2% de glucosa al medio de cultivo y la utilización de una placa de fondo plano. Es importante aclarar que si bien, en los 4 ensayos realizados las concentraciones obtenidas, entraban dentro de los puntos de corte propuestos por la CLSI la elección del protocolo se debió a que la lectura de los resultados era mucho más clara; en la tabla 9, se encuentran resaltados los intervalos de CIM encontrados para cada antimicótico.

**TABLA 8.** Estandarización del protocolo óptimo M27-A2, donde se muestran las modificaciones en cuanto a: dilución del inóculo, adición de glucosa al medio de cultivo y tipo de placa utilizado.

°N de Ensayo	CEPA ATCC	Dilución de la muestra	% de glucosa en el RPMI	Fondo de Placa	Antimicótico probado
1º	C. Parapsilosis (22019)	(1/1000)	0	Fondo plano	FCA
1º	C. Parapsilosis (22019)	(1/1000)	0	Fondo plano	KETO
1º	C. Parapsilosis (22019)	(1/1000)	0	Fondo plano	ITRA
2º	C. Parapsilosis (22019)	(1/1000)	0	Fondo U	FCA
2º	C. Parapsilosis (22019)	(1/1000)	0	Fondo U	KETO
2º	C. Parapsilosis (22019)	(1/1000)	0	Fondo U	ITRA
3º	C. Parapsilosis (22019)	(1/50)	2%	Fondo plano	FCA
3º	C. Parapsilosis (22019)	(1/50)	2%	Fondo plano	KETO
3º	C. Parapsilosis (22019)	(1/50)	2%	Fondo plano	ITRA
4º	C. Parapsilosis (22019)	(1/20)	2%	Fondo plano	FCA
4º	C. Parapsilosis (22019)	(1/20)	2%	Fondo plano	KETO
4º	C. Parapsilosis (22019)	(1/20)	2%	Fondo plano	ITRA

FCA = Fluconazol; KETO = Ketoconazol; ITRA= Itraconazol

**TABLA 9.** Comparación de los 4 ensayos probados en la optimización de la técnica de microdilución en caldo M27-A2, donde se muestran los resultados obtenidos de las CIM para cada uno de los ensayos.

Dilución de la muestra	% de glucosa en el RPMI	CEPA ATCC	Antimicótico probado	Intervalos de CIM (µg/ml) CLSI	CIM - Experm (µg/ml)	Resultado
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	4 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	4 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,03 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/50)	2%	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	2 µg/ml	Dentro PC
(1/50)	2%	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	Dentro PC
(1/50)	2%	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/20)	2%	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	2 µg/ml	Dentro PC
(1/20)	2%	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/20)	2%	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC

FCA = Fluconazol

KETO = Ketoconazol

ITRA = Itraconazol

PC = Punto de corte

C. parap = Candida parapsilosis

## 2. Estandarización de la técnica comercial ATB FUNGUS 3

Para la estandarización del método comercial ATB FUNGUS 3, se realizaron los controles de calidad recomendados por el Kit, en primer lugar se hicieron las pruebas experimentales con la Cepa ATCC de *C. parapsilosis* 22019 y se probaron a la par dos muestras escogidas al azar, en las que se determinaron las condiciones óptimas para realizar el ensayo, probando los puntos de corte asignados para la cepa control (Tabla 10); Los resultados obtenidos de este ensayo nos ayudaron en la interpretación de los resultados obtenidos por este método.

**TABLA 10.** Resultados obtenidos de la estandarización del método comercial ATB FUNGUS 3, donde se resaltan los puntos de corte de los antifúngicos de interés para el estudio.

Dilución de la muestra	% de glucosa en el RPMI	CEPA ATCC	Antimicótico probado	Intervalos de CIM (µg/ml) CLSI	CIM - Experm (µg/ml)	Resultado
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	4 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	4 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,03 µg/ml	Dentro PC
(1/1000)	0	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/50)	2%	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	2 µg/ml	Dentro PC
(1/50)	2%	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	Dentro PC
(1/50)	2%	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/20)	2%	C. Parap (22019)	FCA	0,5 - 4 µg/ml	2 µg/ml	Dentro PC
(1/20)	2%	C. Parap (22019)	KETO	0,03 - 0,25 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC
(1/20)	2%	C. Parap (22019)	ITRA	0,12 - 0,5 µg/ml	0,12 µg/ml	Dentro PC

FCA = Fluconazol

PC = Punto de corte

KETO = Ketoconazol

C. parap = Candida parapsilosis

ITRA = Itraconazol

Es importante mencionar que se presentaron ciertos inconvenientes para los antifúngicos del grupo de los azoles, uno de ellos fue el efecto de arrastre de crecimiento, que en primera instancia causó confusión en la interpretación de resultados, en estos casos se utilizaron los criterios establecidos en la (Tabla 7), en la cual se asigna una puntuación de acuerdo a la intensidad de crecimiento que se presenta en cada dilución.

## B. ESTUDIO DIAGNÓSTICO

### 1. Evaluación del desempeño diagnóstico del ATB- FUNGUS 3

De las 50 muestras procesadas, se realizó el estudio diagnóstico y el estudio de correlación solo para dos antifúngicos, esto debido principalmente a la falta de disponibilidad de sustancia

pura de antifúngico en el mercado de nuestro país, los cuales eran necesarios para el desarrollo del método de referencia M27-A2.

En la (Tabla 11 y 12) se presentan los datos correspondientes para la construcción de la tabla de 2 X 2, tanto para el Fluconazol como para el Itraconazol, en donde se muestran los valores de: VP, VN, FP y FN.

**TABLA 11.** Tabla de contingencia para el cálculo del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, en el estudio de sensibilidad al Fluconazol (N = 50).

**Tabla 2X2 para el FLUCONAZOL**

Método de referencia	Metodo probado		TOTAL
	R (ATB-F)	S ( ATB-F )	
R ( CLSI )	5	4	9 *
S ( CLSI )	0	41	41
TOTAL	5	48	50

\* 2 Sensible dosis dependiente (SDD)

**TABLA 12.** Tabla de contingencia para el cálculo del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, en el estudio de sensibilidad al Itraconazol (N = 50).

**Tabla 2X2 para el ITRACONAZOL**

Método de referencia	Metodo probado		TOTAL
	R (ATB-F)	S ( ATB-F )	
R ( CLSI )	7	4	11*
S ( CLSI )	1	38	39
TOTAL	8	42	50

\* 1 Sensible dosis dependiente (SDD)

A partir de los datos mostrados en las (Tablas 11 y 12) se calcularon la sensibilidad, especificidad y la eficacia diagnóstica para los diferentes antifúngicos evaluados (Tabla 13); La especificidad para el FLZ fue de 100 % y la sensibilidad de 91%, con un VPP de 56%, un VPN de 100% y con una eficacia diagnóstica de 92%, calculados para un intervalo de confianza (IC) de 95%. Para el ITZ la especificidad y sensibilidad fue de 88 % y 90% respectivamente, con un VPP de 64%, un VPN de 97% y una eficacia diagnóstica de 90%, IC 95%.

**TABLA 13.** Resumen del desempeño diagnóstico del ATB FUNGUS 3, para el estudio de sensibilidad al FLZ e ITZ.

Antifungico probado	Sensibilidad (IC= 95%)	Especificidad (IC=95%)	Eficacia diagnóstica	Valor predictivo positivo (VPP)	Valor predictivo negativo (VPN)
Fluconazol (FLZ)	100%	91%	92%	56%	100%
Itraconazol (ITZ)	88%	90%	90%	64%	97%

## 2. Pruebas de concordancia empleados para comparar el Gold estandar con el método comercial.

Las pruebas de concordancia que se emplearon en este estudio fueron el índice Kappa y Likelihood ratio. Siendo el índice Kappa el utilizado como referencia para determinar el grado de concordancia o correlación, ya que este cuenta con un score que nos indica el grado de correlación obtenida.

El **índice de Kappa** encontrado para el FLZ e ITZ fue de 0,67 y 0,68 respectivamente, que según podemos observar en la escala de este índice (Tabla 3) corresponde a una concordancia “Buena“ con los resultados obtenidos a través del método de referencia M27-A2. Para la prueba de Likelihood ratio los resultados obtenidos para el FLZ fueron (LR+) de 11,25 y el (LR-) fue de 0; para el ITZ (LR+) de 9,19 y el (LR-) fue de 0,14, que según los valores de interpretación de este índice, nos indica que la prueba tiene utilidad diagnóstica.

**TABLA 14.** Resultados de correlación de los resultados obtenidos por el método comercial ATB FUNGUS 3 en comparación a la técnica de referencia M27-A2.

MÉTODO OPTIMIZADO	INDICE DE KAPPA	INTERPRETACIÓN "índice kappa"	Razon de Verosimilitud	Rango para Likelihood ratio	INTERPRETACIÓN Likelihood ratio
Fluconazol	0,67	Concordancia Buena	LR + 11,25 LR - 0,00	5 - 10 0,1-0,2	Prueba de utilidad diagnóstica
Itraconazol	0,68	Concordancia Buena	LR + 9,19 LR - 0,14	5 - 10 0,1-0,2	Prueba de utilidad diagnóstica



### 3. Resultados de repetitividad del ATB FUNGUS 3

Los resultados obtenidos en la prueba de repetitividad muestran, que en los tres ensayos realizados se obtuvo un 86% de repetitividad, tanto para el FLZ como para el ITZ. Ya que en ambos casos solo se presentaron 2 discordancias en la lectura de la CIM, mismas que se encuentran resaltadas en la Tabla 15.

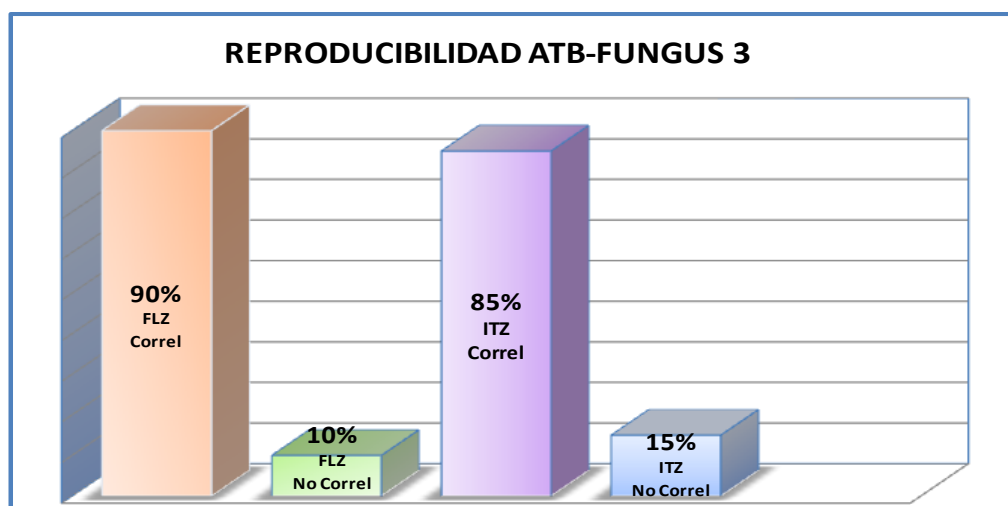
**TABLA 15.** Resultados de repetitividad obtenidos para la prueba de ATB-FUNGUS 3, donde se muestran los valores de CIM obtenidos en cada uno de los ensayos.

Cod - Int de la muestras	Prueba nºn 1 FLZ			Prueba nºn 2 FLZ			Prueba nºn 3 FLZ			Prueba nºn 1 ITZ			Prueba nºn 2 ITZ			Prueba nºn 3 ITZ		
	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R	S	S-DD	R
A-1	1*				16*		4*			0,125*				0,25*		0,125*		
A-2	1*			2*			1*					2*		0,5*				1*
A-3	1*			2*			2*			0,125*			0,125*			0,125*		
A-4	1*			2*			2*			0,125*			0,125*			0,125*		
A-5	1*			1*				16*		0,125*			0,125*			0,125*		

\*La muestra presento efecto de arrastre

### 4. Resultados de reproducibilidad del ATB FUNGUS 3

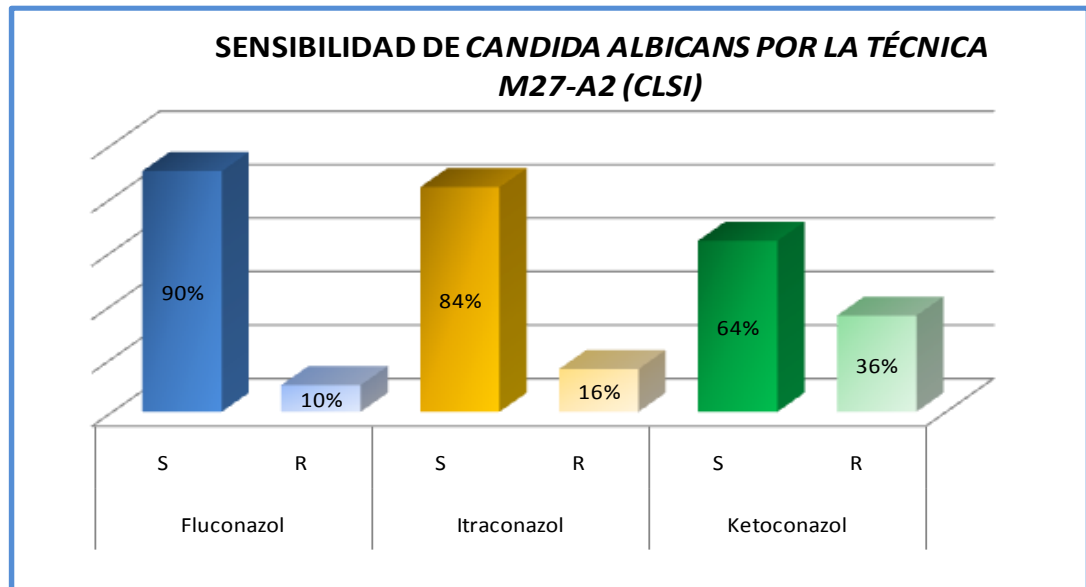
Los resultados obtenidos muestran que para ambos antifúngicos Fluconazol (FLZ) e Itraconazol (ITZ) existe una buena correlación ya que pudimos encontrar un 90 % y un 85% de reproducibilidad. (Gráfica 1)



**Gráfica 1.** Resultados de reproducibilidad obtenidos para el método de ATB-FUNGUS 3, donde se muestran los porcentajes de correlación para ambos antifúngicos.

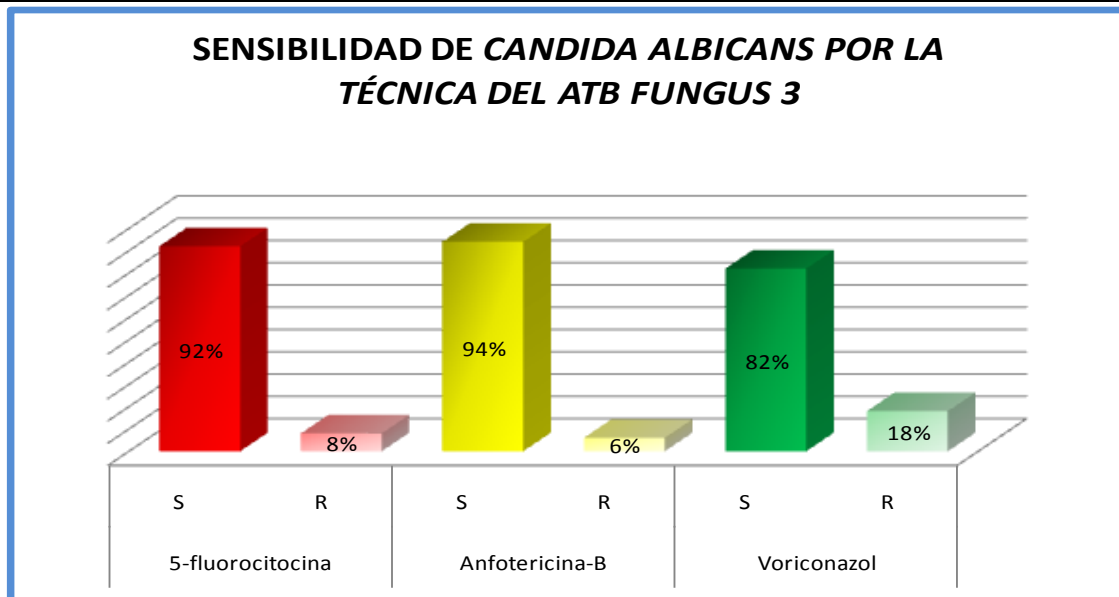
### C. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE *CANDIDA ALBICANS* A LOS ANTIFUNGICOS POR AMBOS MÉTODOS

De las 50 muestras de *C. albicans* procesadas por el método de referencia M27-A2; 90% fueron sensibles a Fluconazol (FLZ), 84% a Itraconazol (ITZ) y 64% Ketaconazol (KTZ). (Grafica 2).



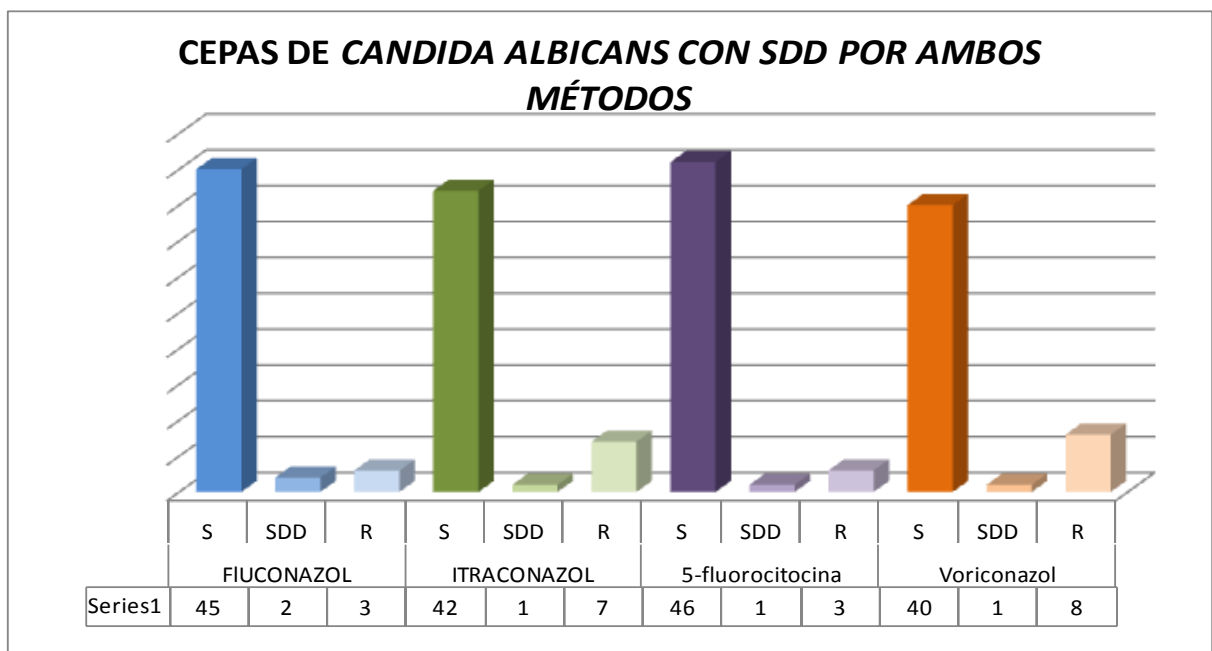
**Gráfica 2.** Sensibilidad de *C. albicans*, según porcentaje de sensibilidad y resistencia a: FLZ, ITZ y KTZ.

De las 50 muestras de *C. albicans* procesadas por el método comercial ATB-FUNGUS 3; 92% fueron sensibles a 5 Fluorocitocina (5FC), 94% a Anfotericina B (AMB) y 82% a Voriconazol (VRC). (Grafica 3); resultando la AMB como el antifúngico de mejor eficacia en relación a la cantidad de cepas sensibles encontradas.



**Gráfica 3.** Sensibilidad de *C. albicans*, según porcentaje de sensibilidad y resistencia a: 5 FC, AMB y VRC.

De las 50 muestras de *Candida albicans* procesadas por ambos métodos, se encontró un porcentaje que presentaron sensibilidad dosis dependiente ( SDD), 2 FLZ y 1 para el ITZ, 5FC y VRC, mismas que son mostradas en la (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Resultados obtenidos para FLZ, ITZ, 5FC y VRC, donde se muestra el número de cepas con sensibilidad dosis dependiente (SDD) para los diferentes antifúngicos.

## IX. DISCUSIÓN

Las infecciones sistémicas profundas producidas por levaduras u hongos filamentosos eran muy escasas antes de la década de 1980. La anfotericina B era el único antifúngico disponible para su tratamiento hasta el año 1990, fecha en que se comercializaron fluconazol e itraconazol, por lo que las pruebas de sensibilidad no eran necesarias<sup>49</sup>.

Por otro lado, las infecciones por especies del género *Candida* han incrementado su incidencia en las tres últimas décadas debido a múltiples factores entre los que destacan la aparición de hongos, que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca. Por esto es cada vez más importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos, ya que la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica<sup>2</sup>.

Los estudios de susceptibilidad a antifúngicos anteriores al uso de métodos estandarizados, eran inconsistentes y muy poco reproducibles, ya que hay muchos factores que influyen en estos ensayos<sup>20,51</sup>. En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de la resistencia *in vitro*. En 1992 apareció el primer estándar internacional para susceptibilidad de levaduras elaborado por el (NCCLS), en E.U.A.; que a lo largo de los años se ha ido modificando. Actualmente el documento M27-A2 aprobado el 2002 se ha convertido en el método de referencia; aunque presenta ciertas limitaciones, de las cuales podemos destacar: crecimiento paradójico (conocido como efecto trailing), cuando se utilizan agentes antifúngicos de tipo azólico; detección poco confiable de aquellas especies verdaderamente resistentes, de manera particular con la AB; tiempos de incubación más largos; y el empleo de una lectura visual que hace que la determinación de las CIM sean subjetivas<sup>20</sup>; sin embargo, el documento M27-A2 se considera un método de referencia a partir del cual se pueden desarrollar métodos alternativos más objetivos, prácticos y rápidos. Por esto en una primera fase el presente trabajo se planteó estandarizar y optimizar la técnica,

---

con el fin de utilizar este como Gold estándar en la evaluación del método comercial ATB-FUNGUS 3.

Se ha demostrado que ciertos factores como la temperatura, tiempo de incubación, punto de lectura de las CIM, medio de cultivo y el tamaño del inóculo, influyen en la sensibilidad de levaduras<sup>58</sup>. Por lo que durante el proceso de estandarización se probaron cuatro protocolos diferentes basados en el documento M27-A2<sup>11</sup>; donde se evaluaron el medio de cultivo, tiempo de incubación, tamaño del inóculo y el punto de lectura. Los resultados obtenidos permitieron comprobar las condiciones adecuadas para una buena reproducibilidad del ensayo; es importante mencionar que si bien todos los protocolos mostraron resultados satisfactorios, en relación a la reproducibilidad de los puntos de corte señalados para la cepa ATCC de *C. parapsilosis* (22019), uno de ellos resultó ser óptimo (Tabla 8 y 9), esto debido a que en estas condiciones la lectura de los resultados era mucho más clara.

En cuanto al medio de cultivo, diversos trabajos han estudiado la influencia de este, sobre las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos con diferentes especies de hongos y levaduras. Por ejemplo, Arıkan y Paetznick evaluaron un método de microdilución para ensayar caspofungina frente a *Aspergillus* y *Fusarium* y obtuvieron CIM más bajas con Agar antibiótico 3 (AM3) que con RPMI o RPMI con 2% glucosa<sup>58</sup>. Por otro lado, Tortorano y Odabasi en el 2003 hallaron resultados distintos, ya que ellos no encontraron diferencias cuando compararon varios medios de cultivo<sup>59</sup> y por último el 2011 Maldonado y Fernández realizaron la evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos, donde se utilizó RPMI 1640 con 2 % de glucosa y resultó ser el medio óptimo para realizar ensayos de la técnica estandarizada<sup>60</sup>. En nuestro caso, encontramos que la incorporación de 2% de glucosa al medio de cultivo RPMI 1640, por un lado favorece el crecimiento de la levadura, otorgándonos mayor turbidez en los pozos, con lo que la lectura de los resultados resulta ser mucho más clara; además que se logran obtener los resultados a las 24 horas de la inoculación de la cepa, dato que es importante al momento de evaluar la eficiencia del método, en cuanto a la prontitud en la entrega de resultados, ya que como sabemos los cultivos micológicos de por sí resultan ser morosos (7 días), por lo que es importante ganar tiempo en el proceso del antifungigrama. Al respecto también debemos

aclarar, que si bien esta adición es de gran ayuda en el crecimiento de las cepas, tiene el inconveniente de hacer al medio mucho más susceptible a contaminación externa, por lo que se recomienda, realizar controles de esterilidad del medio de cultivo periódicamente y realizar todo el proceso dentro de una campana de flujo laminar para subsanar este inconveniente.

En cuanto a la preparación de la solución madre del antifúngico, se probaron 4 diferentes disolventes (Agua, DMSO, HCl y alcohol étlico). De los cuales se escogieron al agua como disolvente para el FLZ y DMSO para el ITZ y KTZ; es importante aclarar que si bien el uso de DMSO en altas concentraciones resulta ser tóxico para las cepas de *Candida*, y por ende podría impedir el crecimiento de estas en el medio de cultivo; corriendo el riesgo de crear falsos negativos, se subsana este inconveniente incluyendo dentro de cada ensayo un control de crecimiento que contenía solo el medio de cultivo + 2% de DMSO, con lo que se descartó la presencia de falsos negativos. Al respecto Calle el 2001, probó el HCl al 0,2 N como disolvente del Ketoconazol, donde encontró 78% de sensibilidad para *C. albicans*, datos que no coincidían con otros estudios realizados<sup>24</sup>, esto debido posiblemente a que el HCl, resultó ser tóxico para las cepas evaluadas. Es por esta razón que el presente trabajo no escogió al HCl como disolvente. Otro inconveniente fue que el antifúngico soluble en agua (FLZ), se saturaba a la concentración propuesta por la CLSI (10 veces más concentrado), por lo que se optó por utilizar concentraciones más bajas (5 veces más concentrado), con lo que se logró obtener mejores resultados.

Otra modificación importante fue la variación en la dilución del inóculo, ya que cuando utilizamos la dilución 1/1000 planteada por la CLSI, se lograba una concentración del inóculo de  $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC/mL, condición que dificultó la lectura de resultados, ya que estos no mostraban claramente los puntos de corte; por lo que se optó por realizar una dilución 1/20 equivalente a una concentración de inóculo de  $1-5 \times 10^4$  UFC/ml, cuya finalidad fue obtener un mejor crecimiento de la levadura, lo que junto a la incorporación del 2% de glucosa permitieron simplificar la determinación e interpretación de las CIM y realizar la prueba de sensibilidad antimicótica de una manera más fácil y comprensible.

Si bien uno de los aspectos más relevantes del presente estudio fue estandarizar el documento M27-A2, pudimos constatar que este método es costoso, laborioso y puede que no sea el adecuado para ser utilizado como rutina en los laboratorios de microbiología clínica. Por lo que, con la finalidad de ensayar y estandarizar alternativas aparentemente más sencillas para el ensayo de la sensibilidad de *C. albicans* a los antifúngicos, se ha evaluado un nuevo método comercial; el ATB FUNGUS 3 que es un método cuantitativo basado en el método de microdilución propuesto por la CLSI.

Como podemos observar en los resultados, al evaluar el FLZ, este método alcanza una sensibilidad del 100%, lo que significa que este método tiene una alta capacidad de detectar cepas resistentes (verdaderos positivos); Sin embargo cuando se obtiene un resultado positivo por cualquiera de los dos procedimientos de sensibilidad estudiados (Técnica estandarizada o el kit comercial), este resultado no es del todo certero, ya que pudimos evidenciar que existe solo un 56 % de VPP, es decir que cuando el método comercial cataloga a las cepas como resistentes para el FLZ, se equivoca 44 veces en 100 con respecto al Gold estándar (M27-A2); por otro lado la especificidad fue del 91%, con un VPN de 100%, lo que indica lo buena que es la prueba para detectar cepas sensibles, equivocándose solo en un 8% de las cepas evaluadas.

Para el ITZ, el método comercial mostró un desempeño diagnóstico relativamente bueno, con una sensibilidad del 88%, una especificidad del 90%, VPP y VPN 64% y 97% respectivamente, en la interpretación de estos resultados debemos destacar el bajo valor de VPP, lo que implica que cuando el método cataloga a las cepas como resistentes se equivoca 34 veces en 100.

La discordancia en los resultados positivos tanto para el FLZ como para el ITZ, posiblemente se deban a dificultad que tuvimos en la lectura e interpretación de resultados, esto por el fenómeno de “trailing” o arrastre que *C. albicans* expresa frente a un gran número de los azoles, que hoy por hoy es una de las grandes desventajas al momento de utilizar pruebas de susceptibilidad basados en microdilución<sup>38,49,61</sup>. Es precisamente por esta razón que en los

últimos años se han estado introduciendo en el mercado métodos colorimétricos que faciliten la determinación de la CIM, mismos que incorporan varios indicadores colorimétricos de oxido reducción, de los que el que el Alamar Bleu es el más utilizado, ya que posee una buena reproducibilidad y concordancia con el estándar de la CLSI, también permite dar resultados más rápidos para los azoles y la determinación visual del punto de corte esta facilitada por la presencia del indicador<sup>63</sup>; por otro lado el documento M44-P planteado por la CLSI, define puntos de corte para el FLZ basados en un método de difusión de discos, En donde se considera como sensible aquellas cepas con un diámetro de halo de inhibición  $\geq 19$  mm y resistentes con un halo de inhibición  $\leq 14$  mm, con lo que la CLSI pretende subsanar la interpretación de resultados para los azoles debida al efecto de arrastre<sup>62</sup>.

Ahora bien para evaluar plenamente un método se debe determinar la reproducibilidad de resultados, por consiguiente el ATB FUNGUS 3 obtuvo un porcentaje de reproducibilidad del 90% y 85% para el FLZ e ITZ. Además que obtuvo una eficiencia diagnostica del 92% y 90% para el FLZ e ITZ respectivamente ( $p > 0,005$ ); datos que concuerdan con resultados, encontrados en otros estudios, mismos que se discutirán más adelante.

Por otro lado, cuando se aplica un test diagnóstico para evaluar métodos diferentes frente a un mismo grupo de muestras, se usan indicadores estadísticos de concordancia como ser el índice de Kappa. Este análisis de concordancia, determinó que existía un índice Kappa de **0,67 y 0,68** ( $p > 0,005$ ) para el FLZ e ITZ respectivamente, que según lo expuesto en la tabla 3, corresponde a una concordancia “buena”. También se determino el likelihood ratio, para medir la utilidad diagnostica del método comercial, los valores obtenidos de LR+ fueron de = 11,25 y 9,19 y el LR - 0,00 y 0,140 para el FLZ e ITZ respectivamente, datos que nos indican, que un método diagnóstico es útil cuando su LR+ es alto (idealmente  $> 5-10$ ) y su LR- es bajo ( $< 0,1-0,2$ ).

Al respecto de los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño diagnóstico del método comercial, son pocos los estudios que utilizan estos parámetros para evaluar un método comercial, la mayoría realiza solo un estudio de comparación entre ambos métodos;



entre estos se encuentra “El estudio de evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad *in vitro* de especies de *Candida* a los antifúngicos”, llevado a cabo por Maldonado y Fernandez el 2011, en el que se encontró que la concordancia general entre el método de referencia y el ATB Fungus 3 fue del 90,2 %, datos que concuerdan con nuestros resultados; mientras que la concordancia del método de referencia con los métodos por difusión con discos y con tabletas alcanzó el 96,3% y el 92,7 %, respectivamente; siendo el ITZ la droga con más baja concordancia 79,3%<sup>58</sup>. Datos que de algún modo concuerdan con nuestro estudio, con la diferencia que nosotros utilizamos el índice Kappa como marcador de correlación, pero en ambos casos la correlación fue buena, con la única limitante del efecto “trailing”; que ellos subsanaron utilizando el método de difusión en disco, con los que los datos de concordancia aumentaron significativamente. Existen otros estudios que encontraron resultados similares a los nuestros. En este sentido, Eraso *et al.* Comparó el ATB F2 con el Sensititre Yeast one y concluyeron que el ATB F2 es una alternativa simple, efectiva y reproducible para determinar la actividad antifúngica de la 5-FC y la AMB; sin embargo, con FZL e ITR es menos eficaz debido a que se encontró discrepancias muy mayores con algunos aislamientos<sup>64</sup>. Estos resultados también concuerdan con los nuestros, ya que ellos también encontraron dificultades al determinar los puntos de corte para los azoles, por otro lado la elección del método Sensititre Yeast one, no fue del todo acertado para realizar una comparación con el ATB FUNGUS 3, ya que para incorporar una técnica dentro de un laboratorio, la CLSI recomienda que los estudios de correlación tienen que realizarse en base a un método de referencia (CLSI M27-A2 o EUCAST).

Otro estudio importante, fue el realizado por Torres y Ramírez, donde compararon el ATB Fungus 2 y Sensititre Yeast one, donde observaron que el ATB F2 tuvo una concordancia global mayor del 95 % con la lectura visual por ambos métodos. Cuando compararon el ATB F2 con el M27-A2, la lectura visual mostró mejor porcentaje de concordancia que la lectura automatizada para los antifúngicos evaluados (AMB, 100 % vs. 97 %; 5-FC, 100 % vs. 97 %; FZL, 97 % vs. 93 %; ITR, 98 % vs. 89 %)<sup>65</sup>. Las CIM más altas se debieron al fenómeno de crecimiento residual, particularmente con *C. tropicalis* y algunos aislamientos de *C. albicans*; Los valores obtenidos en este estudio no concuerdan del todo con nuestros resultados, ya que estos son mejores, esto debido posiblemente a que por un lado no aplicaron el mismo tipo de

estudio estadístico para correlacionar ambos métodos y por otro lado la elección del método Sensititre Yeast one, no fue del todo acertado para realizar una comparación con el ATB FUNGUS 3, ya que para la evaluación de una técnica dentro de un laboratorio, la CLSI recomienda que los estudios de correlación tienen que realizarse en base a un método de referencia (CLSI M27-A2 o EUCAST).

Por todo lo mencionado, el desempeño global del ATB FUNGUS 3 sugiere que si bien este método resulta ser práctico, efectivo y reproducible; y que además otorgan resultados razonablemente buenos, en cuanto a sensibilidad, especificidad, eficacia, índice K y LR+ y LR- . Por los valores bajos en los VPP, este método aún no es confiable para su uso dentro de nuestro laboratorio, ya que como lo indica Ballesté y Arteta en su estudio de la “Evaluación del desempeño diagnóstico del medio de difusión en agar Etest”, la determinación de una cepa como sensible o resistente tiene implicancias clínicas al momento de decidir la conducta terapéutica, siendo de gran relevancia en pacientes críticos. Además se debe tener presente que un resultado falso positivo hará considerar a una cepa que es sensible como resistente, ello determinará la indicación de antifúngicos más potentes en situaciones en las que no es necesario; este uso inadecuado de los antifúngicos puede determinar con el paso del tiempo (al igual que ocurre con los antibacterianos) la aparición de cepas resistentes<sup>63</sup>.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad indican que el antifúngico con mayor porcentaje de sensibilidad fue la AMB con un 94 % de sensibilidad, seguido de la 5-FC con 92 %, el FLZ con 90 %, el ITZ 84% y por último el KTZ y VRZ con un 84% y 82% respectivamente. Al respecto Calle realizó un estudio de sensibilidad de *Candida sp* en nuestro medio; en el que encontró que la AMB fue la más eficaz con el 97,5% de sensibilidad, seguido del KTZ una sensibilidad del 77,5 %<sup>24</sup>; esta pequeña discordancia con nuestros resultados posiblemente se deba a que en el estudio citado se aislaron diferentes tipos de candida y se realizaron sobre estos los estudios de sensibilidad; que a diferencia de nuestro estudio solo se trabajó con la especie de *C. albicans*; otra razón podría ser las diferencias de acuerdo con la metodología empleada, ya que como se pudo observar en nuestro estudio se empleó el método M27-A2 de microdilución en caldo; en cambio el estudio citado utilizó el método de macrodilución en caldo. Estos resultados nos llevan a suponer que en nuestro medio las especies de *C. albicans*

todavía conservan la sensibilidad a diferentes tipos de antifungicos y que los porcentajes de resistencia aun son bajos en comparación con reportes internacionales en los que el tipo de paciente, la enfermedad de base, el grado de invasividad de la especie implicada o los antecedentes de tratamiento pueden explicar la variabilidad en los resultados.

## X. CONCLUSIONES

- La evaluación de 4 diferentes protocolos modificados en base al documento propuesto por la CLSI, permitió estandarizar las condiciones óptimas del método de microdilución en caldo M27-A2, para determinar la sensibilidad de *C. albicans* frente a FLZ, ITZ y KTZ; llegando a concluir que si bien pudimos obtener una buena reproducibilidad en los resultados, este método aun presenta dificultades, principalmente en ser una técnica laboriosa, además que presenta limitaciones en la detección de la resistencia anfotericina B, por no contar con los puntos de corte; y el crecimiento residual para fármacos como los azoles, hecho que puede ser subsanado utilizando técnicas alternativas como la difusión en disco.
- Se ha demostrado que el método comercial ATB FUNGUS 3, es una técnica reproducible, rápida y de fácil realización; pero el desempeño global de la técnica, sugiere que aún no es confiable para su uso en los laboratorios de análisis clínicos, debido principalmente, a los valores bajos obtenidos en los VPP para ambos antifúngicos, lo que podría derivar en errores al momento de determinar una cepa como sensible o resistente, punto importante al momento de decidir la conducta terapéutica, siendo de gran relevancia en pacientes críticos.
- En cuanto a la susceptibilidad a los antifúngicos, existe un alto porcentaje de sensibilidad de AMB 94 %, 5-FC 92 %, FLZ 90 %, ITZ 84%, KTZ y VRZ 84% y 82% respectivamente a la cepa de *C. albicans*. Estos resultados muestran que en nuestro medio las especies de *C. albicans* aún conservan la sensibilidad a diferentes tipos de antifúngicos.

## **XI. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS**

En relación a lectura de los resultados para los azoles, es importante probar los nuevos métodos propuestos por la CLSI, ya que de esta forma se obtendrán resultados más confiables.

En relación con los estudios de susceptibilidad a los antifúngicos, es importante que en nuestro medio se continúe con la estandarización de pruebas de sensibilidad in vitro, ya que de esta forma se lograran encontrar protocolos que demuestren una mejor correlación de resultados intra e inter laboratorios; De manera que estas pruebas permitan implementar estrategias para el uso racionalizado de los antifúngicos, así como establecer pautas de manejo y control de las infecciones por levaduras.

Por otro lado, si bien los métodos comerciales pueden ser una alternativa para los laboratorios de microbiología, ya que son rápidos y de fácil realización; recomendamos continuar con este tipo de estudios, pero siempre tomando en cuenta las recomendaciones de la CLSI con respecto al uso de métodos de referencia (CLSI, NCCLS - *like* o EUCAST) como Gold estándar.

Una de las principales limitantes del presente estudio, fue la dificultad al momento de encontrar sustancia pura de antimicótico, razón por la cual no se pudo evaluar a la anfotericina B; por tanto recomendamos incluir a este antimicótico en futuras investigaciones, por ser este de gran relevancia en el tratamiento de micosis sistémicas.

**XII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Galván B. y Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario La Paz, Madrid *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 12-15
2. Mujica M.T., Finkelievich J.L., Jewtuchowicz V., Iovannitti C.A. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001 *REV. ARGENT. MICROBIOL.* v.36 n.3. Ciudad Autónoma de Buenos Aires jul./sep. 2004
3. López O, Torres JM. Especies fúngicas poco comunes responsables de onicomicosis. *Rev. IBEROAM. Micol.* 16: S11-S15. Sep. 2008.
4. Pereiro, M. 1996. Historia de la Micología. 1ª ed. Madrid: Drug Farma.
5. Agabian, N., F. C. Odds, D. Poulain, D. R. Soll, and T. C. White. 1994. Pathogenesis of invasive candidiasis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32:229-23
6. Cuenca M. y Rodríguez JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? Servicio nacional de micología, centro nacional de microbiología. 2002. Madrid – España.
7. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):501-17.
8. Lebowitz LD, Ashbee HR, Evans EG, Chong Y, Mallatova N, Zaidi M, et al. A two year global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 4(1-2): 27-33.

9. Powderly WC, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immune compromised patients. *Am J Med* 1988; 84(5): 826-32.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard. Document M27-A2. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of yeast. Approved Standard. Document M27-A2. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
12. Colombo AL, Barchiesi F, McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. Evaluation of the E test system versus a microtitre broth method for antifungal susceptibility testing of yeasts against fluconazole and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36(1): 93-100.
13. Rodríguez -Tudela JL, Cuenca-Estrella M. [A multicenter study on fungemia caused by yeasts in Spain (April-June, 1997). A Work Group to Study Fungemia]. *Rev Clin Esp* 1999; 199:356-61.
14. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1526-30.
15. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:747-51.
16. Harari S. Current strategies in the treatment of invasive *Aspergillus* infections in immune compromised patients. *Drugs* 1999; 58:621-31.

17. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49 (Suppl 1): 7-10.
18. Canton E. y otros. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad de los antifúngicos. *Rev. Iberoamericana de micología*. ISBN 2008 España.
19. Silva V. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev. Chile infectología*, Vol. 19 2006 149 - 156.
20. 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.
21. Fromtling R.A. Gaguiani, J.N. Phaller M.A. y cols. Multicenter evaluation of a broth macrodilution antifungal susceptibility test for yeasts. *Antimicrob agents Chemother*.
22. Espine, Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, et al. Multicenter comparison of the sensititre Yeast One Colorimetric Antifungal Panel with the National Committee for Clinical Laboratory standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 591-5.
23. Barrios E. Optimización de la técnica de sensibilidad in Vitro NCCLS M-27<sup>a</sup>, usando nistatina Y Ketoconazol a partir de aislamientos de *C. albicans*. SELADIS 2004
24. Calle K. Sensibilidad de *Candida* sp a diferentes antifúngicos en muestras de pacientes que asisten al instituto SELADIS. La Paz julio 2001 a julio 2002.



25. Martínez, P. Mendaza, R.M. Daza, G. Estudio de la sensibilidad in vitro de levaduras por el sistema ATB-Fungus. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro, C/ San Martín de Porres Madrid 2008.
26. Reagan, D. R., Pfaller M. A., Hollis R. J., and Wenzel R. P. 1990 Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* 28:2733-2738.
27. Santana JC. Candidiasis de la mucosa bucal. En: Santana JC. Infección por el VIH en el complejo bucal. La Habana: Ciencias Médicas; 2000.p.73-87.
28. Casas R. G. (1999): *Micología General*. Caracas. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca, pp. 243-247.
29. Baker, J. G.; Salquin, I. F.; Pincus, D.H.; Damato, R.H. (1991): *Candida paratropicalis*, a new species of *Candida*. *Mycotaxon.* 13: 115-119.
30. Pardi G., Cardoso E, Algunas consideraciones sobre candida albicans como agente etiológico de candidiasis bucal, Facultad de Odontología, U.C.V. Ediciones Volumen 40 N° 1 / 2002.
31. Ziarrusta G B. Vulvovaginitis candidiásica. *Rev. Iberam, Mico* 119- 2009: 22-24.
32. Agabian, N., F. C. Odds, D. Poulain, D. R. Soll, and T. C. White. 1994. Pathogenesis of invasive candidiasis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32:229-237.
33. Beck-Sagué, C., and W. R. Jarvis. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J. Infect. Dis.* 167:1247-1251.

34. Cervera LA, Maestre JR, Moreno R y grupo para el estudio del consumo de antimicrobianos en España. 2001. Consumo de antifúngicos de uso tópico en España. *Rev. Esp. Quimioterap.* 14:340-344.
35. Mc Nicholas P, Loebenberg D, Santos P. 2005. Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:317-319.
36. Carrillo-Muñoz A, Abarca L, Quindós G. 2001. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad in vitro de los antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:150-155.
37. Silva V. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev. Chile infectología*, Vol. 19 2006 149 - 156.
38. Fidel Jr, P. L.; Vázquez, J. A.; Sobel, J. D.: *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12: 80-96, 1999.
39. Murphy, J. W.; Bistoni, F.; Deepe, G. S. et al: Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol* 36 (Suppl 1): 109-118, 1998.
40. Senet, J. M.: Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 14: 6-13, 1997.
41. Mishra, S. K.; Segal, E.; Gunter, E. et al: Stress, immunity and mycotic diseases. *J Med Vet Mycol* 32 (Suppl 1): 379-406, 1994.
42. Bland, Jeffrey, "Hidden diseases caused by candida", *Preventive Medicine*, 3(4): 12, 1994. Krause, W., y otros, "Fungemia and funguria after oral administration of *Candida Albicans*", *Lancet*, i:598-9,

43. Ashman BR, et al. IL-12 and Related Cytokines: Function and Regulatory Implications in *Candida albicans* Infection. *Clinical and Developmental Immunology*. 2010. 2011: 1-9
44. Ferris DG; Nyirjesy P; Sobel JD; Soper D; Pavletic A; Litaker MS (March 2002). «Over-the-counter antifungal drug misuse associated with patient-diagnosed vulvovaginal candidiasis». *Obstetrics and Gynecology*99 (3): pp. 419–425
45. Restrepo A. 1994. Treatment of tropical mycoses. *J. Am Acad. Dermatol.* 31:S91-S-102.
46. Elewski BE. 2000. Onychomycosis. *Am. J. Clin. Dermatol.* 1:19-26.
47. Polak A. Mode of action studies. En: Ryley JF, editor. *Chemotherapy of fungal Diseases*. Berlin: Springer-Verlag, 1990; p. 153-8 2.
48. Viudes A.; Canton E. *Correlación entre las pruebas de sensibilidad in Vitro a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis*. San Antonio Texas. U.S.A. 2007
49. Canton E. y otros. *Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad de los antifúngicos*. Rev. Iberoamericana de micología. ISBN 2008 España.
50. Koneman E. *Micología: prácticas de laboratorio*. 4ta ed. Buenos Aires. 6ta Ed. Medicina panamericana, 2008. Argentina. P. Bib. 181 - 191.
51. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal

- Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin Infect Dis 1997; 24:235-472.
52. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 1994; 20:127-33 .
53. Rosco Diagnostica A/S. User's guide Neo-sensitabs TM susceptibility testing. 2004. 17th Ed. Taastrup, Denmark.
54. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Principios de validación para las pruebas diagnósticas de enfermedades infecciosas. Capítulo actualizado (mayo de 2006).
55. Montoya, B. S. Validación de pruebas diagnósticas. Angiología 2007; 59: 433-8.
56. Hulley, Stephen. Diseño de la investigación clínica: Un enfoque epidemiológico. Barcelona: Ed. Doyma.
57. Davel G, Cordova S. Curso a Distancia y Taller: "Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos" Departamento Micología INEI, ANLIS "Dr. C. G. Malbrán "Buenos Aires , Argentina 2007.
58. Maldonado Ivana, Fernández Canigia Liliana, Vivot Walter, Domec Patricia, Davel Graciela, Córdoba Susana. Evaluación de tres métodos para la detección de la sensibilidad in vitro de especies de *Candida* a los antifúngicos. Rev. argent. microbiol. [revista en la Internet]. 2011 Jun [citado 2012
59. Duarte Carolina, Pulido Ninna, Rivas Pilar, Sánchez Ricardo, Cortés Jorge A, Cuervo Sonia et al . Comparación de métodos de microdilución CLSI M27-A2 y EUCAST en aislamientos de *Candida* spp. en pacientes con cáncer. Infect.

- 
60. Tortorano AM, Dannaoui E, Cogliati M, Piens MA, Rigoni AL, Grillot R, Viviani MA, Network E. 2000. Evaluation of different in vitro procedures for testing amphotericin B and itraconazole susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. J. Mycol. Med. 10:123-127.
61. Arikan S, Paetznick V, Rex JH. 2002. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob. Agents and Chemother. 46:3084-3087.
62. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-Test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. J Clin Microbiol 2002; 40(3): 918-2.
63. Ballesté Raquel, Arteta Zaida, Barloco Ana, Mier Cristina, Fernández Nora, Mousqués Nélica et al. Evaluación del desempeño diagnóstico del medio de difusión en agar Etest® para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos. Rev. Méd. Urug. [revista en la Internet]. 2006 Mayo; 22(2): 128-135.
64. Eraso E, Ruesga M, Villar M, Carrillo A, Espinel A y Quindós G. Evaluación comparativa de ATB Fungus 2 y Sensititre Yeast One en el estudio de la sensibilidad in vitro de *Candida* a los antifúngicos. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 3-6.
65. Torres- Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E. *In vitro* susceptibilities to yeasts using the ATB® Fungus 2 method, compared with Sensititre Yeastone® and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. J Antimicrob Chemother 2007; 60: 658-61.

# **ANEXOS**

## ANEXO N° 1

Preparación del medio de cultivo

Componentes del medio	Cantidad necesaria	Volumen total
RPMI 1640	5, 2 gr	500 m L
MOPS	17,3 gr	500 m L
NaOH 1N	20 m L	500 m L
H2O Inti	480 m L	500 m L

Cálculos para 500 mL

## a) MOPS

$$\begin{array}{r}
 34,53 \text{ gr} \longrightarrow 1\ 000 \text{ m L} \\
 X \longleftarrow 500 \text{ m L} \\
 X = 17,3 \text{ gr}
 \end{array}$$

## b) RPMI

$$\begin{array}{r}
 10,40 \text{ gr} \longrightarrow 1\ 000 \text{ m L} \\
 X \longleftarrow 500 \text{ m L} \\
 X = 15,2 \text{ gr}
 \end{array}$$

## ANEXO N° 2

Preparación de antifúngicos solubles en agua

FLUCONAZOL	
Disolvente	H2O Inti
Pureza	96%
© A enzayar	64 - 0,12 ug / m L
© A preparar	6 400 ug / m L

©= Concentración

## • Cálculos para 20 mL

$$64 \text{ ug / mL} \times 100 = 6\ 400 \text{ ug / mL}$$

$$\begin{array}{r}
 6\ 400 \text{ ug} \longrightarrow 1 \text{ m L} \\
 X \longleftarrow 20 \text{ m L} \\
 X = 128\ 000 \text{ ug}
 \end{array}$$

$$\text{Pesar} = 0,128 \text{ g}$$

**Preparación de antifúngicos insolubles en agua**

Ketoconazol	
Disolvente	Dimetilsulfóxido
Pureza	96%
© A enayar	16 - 0,03 ug / m L
© A preparar	1 600 ug / m L

© = Concentración

- **Cálculos para 20 mL**

$$16 \text{ ug / mL} \times 100 = 1\,600 \text{ ug / mL}$$

$$\begin{array}{l}
 1\,600 \text{ ug} \xrightarrow{\quad\quad\quad} 1 \text{ m L} \\
 X \xleftarrow{\quad\quad\quad} 20 \text{ m L} \\
 X = 32\,000 \text{ ug}
 \end{array}$$

$$\text{Pesar} = 0,032 \text{ g}$$

ITRACONAZOL	
Disolvente	H <sub>2</sub> O Inti
Pureza	96%
© A enayar	64 - 0,12 ug / m L
© A preparar	6 400 ug / m L

© = Concentración

- **Cálculos para 20 mL**

$$16 \text{ ug / mL} \times 100 = 1\,600 \text{ ug / mL}$$

$$\begin{array}{l}
 1\,600 \text{ ug} \xrightarrow{\quad\quad\quad} 1 \text{ m L} \\
 X \xleftarrow{\quad\quad\quad} 20 \text{ m L} \\
 X = 32\,000 \text{ ug}
 \end{array}$$

$$\text{Pesar} = 0,032 \text{ g}$$

$$\begin{array}{l}
 20 \text{ g Sp} \xrightarrow{\quad\quad\quad} 100 \text{ g de pellet} \\
 X \xleftarrow{\quad\quad\quad} 5 \text{ g de pellet} \\
 X = 1 \text{ g Sp (Sustancia pura)}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 5 \text{ g pellet} \xrightarrow{\quad\quad\quad} 1 \text{ g Sp} \\
 X \xleftarrow{\quad\quad\quad} 0,032 \text{ g} \\
 X = 0,16 \text{ g pellet}
 \end{array}$$

$$\text{Pesar} = 0,16 \text{ g}$$



## ANEXO N° 3

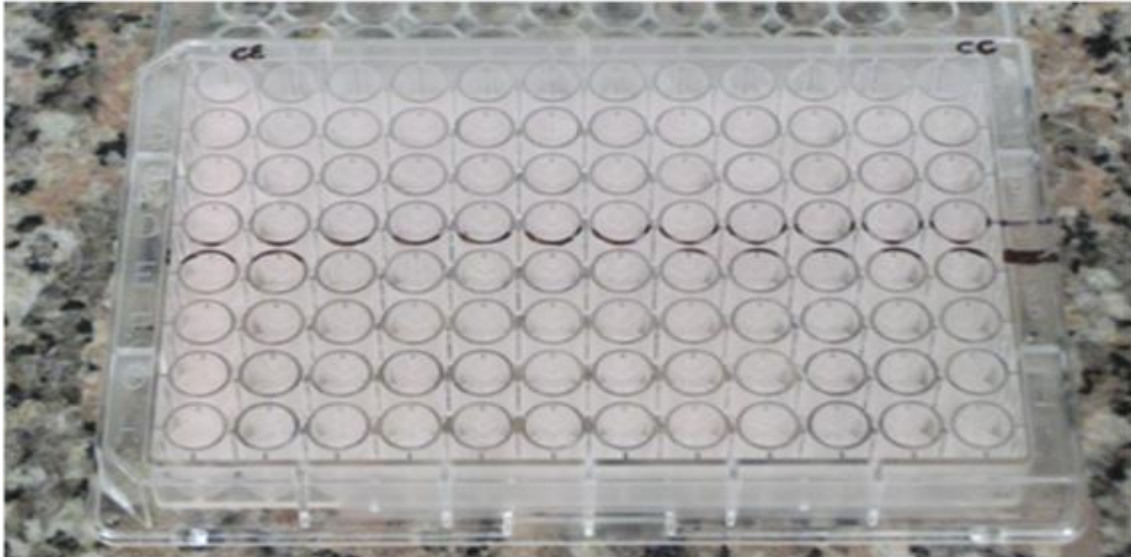
**Diluciones de los antifúngicos solubles en agua**

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

**Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua**

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

ANEXO N° 4



*En la fotografía se observa una placa de 96 pocillos:  
(Columnas 2 – 11 ) rellenas con diferentes diluciones del antifúngico a probar.  
Columna 1: Contiene el CE (control de esterilidad)  
Columna 12: Contiene el CC (control de crecimiento)*

## ANEXO N° 5



En la fotografía se observa el aislamientos de la cepa de *C. parapsilosis*: ATCC 22019.

## ANEXO 6

## Cálculos del índice de Kappa

$$K = \frac{(Po - Pe)}{(1 - Pe)}$$

$$Po = \frac{VP + VN}{N}$$

$$Pe = \frac{CP + CN}{N}$$

Concordancia en el caso de positivos

Concordancia en el caso de negativos

$$CP = \frac{VP + FP}{N} \times \frac{VP + FN + N}{N}$$

$$CN = (FN + VN) - [(VP + FN) - CP]$$

## A. FLUCONAZOL

$$Po : \frac{5 + 41}{50} = 0,92$$

$$CP : \frac{5 + 4}{50} \times \frac{(5+0) \times 50}{50} = 0,9$$

$$CN : (0 + 41) - [(5 + 0) - 0,9] = 36,9$$

$$Pe : \frac{0,9 + 36,9}{50} = 0,76$$

$$K : \frac{0,92 - 0,76}{1 - 0,76} = 0,67$$

**B. ITRACONAZOL**

$$Po : \frac{7 + 38}{50} = 0,9$$

$$CP : \frac{7 + 4}{50} \times \frac{(7 + 1) \times 50}{50} = 1,76$$

$$CN : (1 + 38) - [(7 + 1) - 1,76] = 32,76$$

$$Pe : \frac{1,76 + 32,76}{50} = 0,69$$

$$K : \frac{0,9 - 0,69}{1 - 0,69} = 0,68$$

ANEXO N° 7

Tabla de resultados finales obtenidos de la comparación del método de referencia con el método comercial, en donde se muestran los valores de: CC: Control de crecimiento; S: Sensibilidad; SDD: Sensibilidad dosis dependiente; R: resistencia

TABLA FINAL DE RESULTADOS

n°	COD	TIPO DE M	FCA (ATB-FUNGUS)				FCA (Método estand)				ITR (ATB-FUNGUS)				ITR(Método estand)				5FC(ATB-FUNGUS)				AMB(ATB-FUNGUS)				VRC(ATB-FUNGUS)				KTZ(Método estand)					
			CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R	CC	S	S-DD	R		
			1	5126	GENITAL	P		32		P	4			P			2	2		0.5	P			16	P	1			P			8	P		0.25	
2	5340	HEMO	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.3			
3	1280	GENITAL	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P				1	
4	1034	GENITAL	P	1			P	4			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			2
5	1347	FARINGEO	P		32		P		32			P		4			1	P	4			P		4		P	0.125			P		0.25				
6	2461	FARINGEO	P		32		P		64		P		0.5		P	0.25			P	4			P	1			P	0.06			P		0.25			
7	2722	GENITAL	P	1			P	2			P	0.125			P	0.03			P	4			P	0.5			P	0.06			P				0.5	
8	2812	FARINGEO	P	1			P	0.12			P	0.25			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
9	3441	GENITAL	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
10	3542	GENITAL	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.03			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
11	3637	FARINGEO	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.03			
12	4704	SEMINAL	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
13	4889	GENITAL	P	1			P	2			P	0.25			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P				1	
14	5005	FARINGEO	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.06			P				2	
15	5143	URETRAL	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
16	5282	GENITAL	P	1			P	2			P	0.25			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.6			P				8	
17	5392	GENITAL	N			32	P		32	N			4	P			1	N	4			N	0.5			N			2	P				16		
18	5651	ESPUTO	P	1			P	1			P	0.125			P	0.12			P	4			P	0.5			P	0.06			P				8	
19	6393	GENITAL	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.12			P	4			P	0.5			P	0.125			P		0.25			
20	6347	ESPUTO	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P			2	P		0.25			
21	6695	GENITAL	P	1			P	2			P	0.125			P	0.03			P	4			P	1			P	0.06			P				2	
22	6897	FARINGEO	P	1			P	1			P			2	P				P	4			P	0.5			P			2	P		0.12			
23	7307	GENITAL	P	1			P	0.12			P			1	P			1	P	4			P	0.5			P	0.25			P		0.25			
24	8187	FARINGEO	P	2			P	0.5			P	0.125			P	0.03			P	4			P	1			P			4	P				0.25	
25	8431	FARINGEO	P			64	P	0.5			P	0.125			P	0.03			P	4			P			16	P		4	P		0.25				
26	8494	GENITAL	P	8			P	1			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.5			P				8	
27	8689	FARINGEO	P		16		P	8			P	0.125			P	0.25			P	4			P	1			P	0.25			P		0.06			
28	190	ESPUTO	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
29	606	ESPUTO	P	2			P	1			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P				16	
30	2836	GENITAL	P	1			P	0.25			P		0.5		P		0.5		P			31	P	1			P	0.06			P		0.12			
31	3303	FARINGEO	P	2			P	1			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.125			P				8	
32	3307	GENITAL	P	1			P	4			P	0.125			P	0.03			P	4			P	0.5			P	0.125			P		0.12			
33	3669	FARINGEO	P	1			P	0.25			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
34	3979	GENITAL	P			16	P	0.25			P			2	P		0.5		P	4			P	0.5			P	0.06			P				1	
35	4117	FARINGEO	P	1			P	1			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.25			
36	2328	GENITAL	P	1			P	0.12			P		1	P	0.03				P	4			P	0.5			P	0.125			P				1	
37	4670	ESPUTO	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.125			P		0.25			
38	7924	FARINGEO	P	1			P	1			P	0.125			P	0.03			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.12			
39	5722	GENITAL	P	1			P	1			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.25			
40	6125	GENITAL	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.25			
41	6360	GENITAL	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.03			P			16	P	0.5			P	0.06			P				2	
42	7051	FARINGEO	P	1			P	0.12			P	0.125			P	0.03			P	4			P	0.5			P	0.06			P		0.03			
43	6006	FARINGEO	P	1			P	0.25			P	0.125			P	0.03			P	4			P	0.5			P	0.25			P				1	
44	304	ESPUTO	P		16		P		16	P			1	P	0.25				P			32	P	1			P			2	P		0.06			
45	8133	FARINGEO	P	1			P	4			P	0.125			P	0.25			P	4			P	0.5			P	0.125			P		0.25			
46	8053	FARINGEO	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.12			P	4			P	0.5			P			0.5	P				1	
47	30	GENITAL	P	1			P	0.25			P	1.125			P	0.06			P	4			P	0.5			P	0.06			P				1	
48	8071	GENITAL	P	1			P	0.5			P	0.125			P	0.12			P	4			P			2	P	0.06			P		0.12			
49	505	GENITAL	P	2			P	1			P	0.125			P	0.25			P	4			P	1			P			8	P		0.06			
50	7221	GENITAL	P			128	P		16	P		0.5		P		1			P	4			P	1			P	0.06			P		0.25			

ANEXO N° 7



*Materiales empleados para realizar el método de microdilución en caldo M 27-A2 (CLSI) y Atb Fungus – 3.*

ANEXO N° 8



*En estas fotografía se observan los pozos de ATB-FUNGUS 3: 1) Control de crecimiento (+); 2) Antifúngicos probados y 3) Concentraciones probados.*