

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**DETERMINACION Y CARACTERIZACION DE ESPECIES DE *Candida* EN
PERSONAS VIVIENDO CON VIH/sida QUE ACUDEN A LA CLINICA FAMILIAR
“LUIS ANGEL GARCIA” DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS**

Informe de Tesis

Presentado por
WENDY DEL MILAGRO PAIZ MENDEZ

Para optar al título de
QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, octubre 2008

INDICE

I. RESUMEN	02
II. INTRODUCCION	03
III. ANTECEDENTES	04
IV. JUSTIFICACION	30
V. OBJETIVOS	31
VI. HIPOTESIS	32
VII. MATERIALES Y METODOS	33
VIII. RESULTADOS	40
IX. DISCUSION	47
X. CONCLUSIONES	51
XI. RECOMENDACIONES	53
XII. REFERENCIAS	54
XIII. ANEXOS	64

I. RESUMEN

Candida es reconocida actualmente como patógeno oportunista asociado con episodios de candidiasis oral recurrente en personas que viven con VIH/sida (PVVS). Hay más de 150 especies de *Candida*, de las cuales 10 son consideradas patógenos importantes para el ser humano, siendo las principales especies aisladas en candidiasis oral: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicales*, *C. parapsilosis*. Por lo que el presente estudio se realizó con el objetivo de determinar y caracterizar la presencia de las diferentes especies de *Candida* en infecciones a nivel oral de las PVVS.

Durante el período comprendido de abril a julio del año 2006 fueron recolectadas en Guatemala 68 cepas de *Candida* provenientes de 56 pacientes con candidiasis oral que viven con VIH/sida (12/56, 21.4% femeninas y 44/56, 78.6% masculinos). A cada paciente le fue solicitado su consentimiento y posteriormente se recolectaron datos en una encuesta para obtener información clínica del mismo. Seguidamente se aisló e identificó cada cepa mediante pruebas fenotípicas (aislamiento en *Candida* CHROMagar producción de tubos germinales, crecimiento a distintas temperaturas, API® 32C y producción de clamidosporas). Finalmente a todas las cepas se les determinó el perfil de susceptibilidad antifúngica mediante el sistema Sensititre® YeastOne. Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva.

Se observó que las principales especies del género *Candida* identificadas en el estudio fueron *C. albicans* (52/68, 77%) seguido por *C. glabrata* (10/68, 15%). Solamente dos aislamientos de *C. dubliniensis* (2/68, 3%) fueron observados, reportándose por primera vez en Guatemala. Las coinfecciones más frecuentes en estos pacientes fueron las fúngicas (8/35, 22.8%) seguidas por las bacterianas específicamente tuberculosis (13/35, 37.1%). La mayoría (45/56, 80.3%) no poseían tratamiento antirretroviral debido a que eran pacientes que visitaban por primera vez la clínica. Los principales tipos de candidiasis oral detectados fueron la pseudomembranosa seguida de la eritematosa. La mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a los antifúngicos evaluados (fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina y voriconazol), presentando únicamente resistencia *C. glabrata* a itraconazol y a fluconazol (10/64, 15.6% y 1/64, 1.6%, respectivamente), datos similares a los obtenidos en México, Estados Unidos y Canadá.

En conclusión, los datos obtenidos en el presente estudio constituyen el primer registro en el que se describen a las diferentes especies de *Candida* en personas que viven con el VIH/sida en Guatemala. Así también se documenta la resistencia de *C. glabrata* a itraconazol y fluconazol y se reporta por primera vez la especie de *Candida* (*C. dubliniensis*) asociada a esta infección; la cual es necesario confirmar a través de pruebas moleculares.

II. INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies de *Candida* son ahora reconocidas como patógenos oportunistas, asociadas con episodios de candidiasis oral recurrentes, en personas viviendo con VIH/sida (PVVS); las cuales presentan resistencia a los azoles, agentes antifúngicos altamente efectivos y de baja toxicidad utilizados en prevención y terapia para la candidiasis. Además, han sido aisladas del torrente sanguíneo así como de orina y reportes recientes sugieren que podrían diseminarse a otros sitios anatómicos (1).

C. dubliniensis posee características morfológicas y fenotípicas similares a aquellas de *Candida albicans*; por lo que *C. dubliniensis* no es identificada con los métodos de rutina utilizados. En raras ocasiones esta especie ha sido reportada en individuos inmunocompetentes; todo ello debido a que tanto el sistema inmune, como la microbiota oral normal, previenen el sobrecrecimiento de *C. dubliniensis*. Sin embargo, cuando las células T están disminuidas, ocurre un desequilibrio que tiende a aumentar los niveles de *C. dubliniensis* (2).

Por lo anterior, con este estudio se pretendió determinar y caracterizar la existencia, y presentación clínica de las diferentes especies de *Candida* en muestras provenientes de la mucosa oral de PVVS que acudieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios. Así como establecer una metodología de trabajo que permitiera la identificación en los laboratorios de las diferentes especies de *Candida* basados en las pruebas fenotípicas y el perfil de susceptibilidad en pro del bienestar físico de dichas personas.

III. ANTECEDENTES

A. Principales especies del género *Candida* en candidiasis oral

Hay más de 150 especies de *Candida*. De éstas 10 son consideradas patógenos importantes para el ser humano siendo las principales especies aisladas en lesiones orales: *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y la especie *Saccharomyces cerevisiae*. *C. albicans* puede ser considerada la especie más importante debido a que es la causa más frecuente de la enfermedad; sin embargo como grupo las especies de *Candida* no-*albicans* pueden ser un rival o sobrepasar el número de infecciones causadas por *C. albicans*; seguido de *C. glabrata*, la cual posee una susceptibilidad no predecible además de ser frecuentemente recuperada en laboratorios clínicos. En algunas instituciones, en el caso de infecciones fúngicas nosocomiales, su frecuencia es secundaria después de *C. albicans*; para lo cual es deseable la identificación debido a las diferencias en patogenicidad y resistencia; sin embargo, el tratamiento antirretroviral de alta actividad (HAART) reduce la prevalencia de este cuadro clínico (3, 4).

La razón del cambio epidemiológico que está provocando esta emergencia no está clara, aunque se ha sugerido que la reducida sensibilidad de estas especies a los antifúngicos utilizados comúnmente, como el fluconazol, puede haber llevado a su selección (3, 4).

B. Características morfológicas de *Candida dubliniensis*

El nombre de *Candida dubliniensis* deriva de Dublin, la capital de la República de Irlanda, donde las primeras especies fueron identificadas en julio de 1995 (2, 5).

Estas levaduras crecen en Agar Papa Dextrosa o Mycobiotic con o sin cicloheximida, a 37 °C después de 48 horas de incubación. Sus colonias son cremosas, no pigmentadas y filamentosas. Además pueden producir blastoconidias con pseudohifas, hifas verdaderas como *C. albicans*, pero no coinciden con los esquemas de identificación (asimilación/fermentación) existentes en las bases de datos de los últimos años. *C. albicans* es la especie filogenéticamente más cercana a *C. dubliniensis* (6-8).

C. Características comparativas entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis comparte muchas características fenotípicas con *Candida albicans*. Por lo tanto, la diferenciación de *C. dubliniensis* de *C. albicans* es muy importante para comprender la significancia clínica y el papel epidemiológico de esta levadura. Para ello pueden utilizarse varias pruebas de laboratorio basándose únicamente en las características fenotípicas tales como: actividad beta glucosidasa, patrones de asimilación de carbohidratos, color de la colonia en el medio Candida CHROMagar, crecimiento a 42°C y 45°C, entre otras (Tabla 1) (2).

Otra característica fenotípica comparativa entre estas dos especies del género *Candida* que ha sido estudiada, es la producción de clamidosporas. Diversos estudios indican que la mayoría de cepas de *C. dubliniensis* producen clamidosporas aunque *C. albicans* también tiene la capacidad de producirlas pero en menor cantidad, tal como se observa en la tabla 2 (2).

Tabla 1. Principales características comparativas entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*

Características	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
Tubos germinales	+	+
Crecimiento a 42°C	+	+/-
Crecimiento a 45°C	+	-
CHROMagar* a 37°C por 48 hrs.	Verde tierno	Verde oscuro
Agar sabouraud con azul de metileno**	Fluorescencia amarilla con lámpara de Wood	No fluorescencia
Actividad beta glucosidasa	+	-

*Puede cambiar después del almacenaje o en subcultivos, ** no se conserva en subcultivos.

Fuente: Sullivan D, *et al.* *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and Molecular Characterization of a Novel Species Associated with Oral Candidosis in HIV-infected Individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507-1521.

Tabla 2. Identificación de *C. dubliniensis* por la formación de clamidosporas.

	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>
Crecimiento clamidosporas	16/23	1/28
Abundantes	70%	3.6%

Fuente: Rubio-Calvo, C. *et al.* Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus - infected Patient in North America by Primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 3007-3010.

D. Frecuencia de especies de *Candida* en personas viviendo con VIH/sida (PVVS)

C. albicans y las otras especies de *Candida* son levaduras oportunistas que han sido implicadas cada vez más en candidiasis orofaríngea en PVVS y se encuentran especialmente en pacientes sintomáticos (Tabla 3). *Candida dubliniensis* no es identificada en pruebas de laboratorio de rutina, ya que comparte muchas características fenotípicas con *C. albicans*, por lo que no es reportada (9).

La candidiasis oral causada por especies de levaduras del género *Candida* es la infección oportunista más común observada en PVVS. Más del 90% de estas personas han sido víctimas de un episodio de candidiasis oral durante el transcurso del desarrollo del sida, y se encuentran propensas a padecer nuevos episodios de candidiasis si su recuento de células CD4+ es inferior a 200 células/mm³. Por el contrario, la terapia antirretroviral es un factor protector. Hay que considerar que *C. dubliniensis* no sólo puede presentarse en la cavidad oral sino puede diseminarse a otros sitios anatómicos (Tabla 4) (2, 8, 10, 11).

Tabla 3. Incidencias de *C. dubliniensis* en diferentes tipos de pacientes

	VIH+	VIH-	Sida
Con síntomas de candidiasis oral	27%	14%	32%
Sin síntomas de candidiasis oral	9%	3%	25%

Fuente: Sullivan D, *et al.* Widespread Geographic Distribution of Oral *Candida dubliniensis* Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 960–964.

Tabla 4. Frecuencia de aislamientos de *C. dubliniensis* según la localización anatómica

Presentación	No. de Muestras	Total de	Frecuencia
	Positivas	Muestras	%
Heces	8	37	21.6
Cavidad oral o esputo	38	258	14.7
Vagina	1	64	1.5
Piel y uñas	0	25	0
Organos profundos	0	27	0
Otros	0	128	0

Fuente: Rubio-Calvo, C. *et al.* *Candida dubliniensis*. Lkd. J Clin Microbiol: Prevalence of *Candida dubliniensis* Isolates in a Yeast Stock Collection. (1998; 36: 2869-2873) at Soc Esp Quimioter, 2000.

E. Aspectos clínicos, micológico y terapéuticos de *Candida* sp.

La prevalencia casi absoluta de *Candida albicans* y la ausencia de resistencia a los antimicóticos que caracterizaban los estudios de candidiasis oral va cediendo terreno a la aparición de cepas menos sensibles y adicionalmente a otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* las que se reportan como patógenos oportunistas en la cavidad oral con frecuencia creciente (12).

La relación entre la candidiasis bucal y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida es tal, que esa afección se considera un importante marcador de progresión de la infección viral. Con la evolución de la enfermedad de base, se incrementan de manera considerable la

recurrencia y la recidiva de los episodios de candidiasis orofaríngea. Lo anterior, obliga a la administración reiterada de antifúngicos e incluso, en ocasiones, a su prescripción profiláctica. Esa utilización frecuente e inevitable de los antifúngicos, con el riesgo de aparición de cepas resistentes y de episodios clínicos refractarios que genera, son un estímulo al desarrollo de estudios locales que permitan conocer, para una población dada, la capacidad de resolución de los episodios clínicos de las diferentes drogas disponibles (12).

F. Presentación clínica de la infección por *Candida* sp.

C. dubliniensis y las otras especies de *Candida* son probablemente parte de la microbiota de la cavidad oral. Pero es posible que *C. dubliniensis* ocupe otros sitios anatómicos con el potencial de causar candidiasis, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (2, 8).

Candida spp en raras ocasiones ha sido reportada en individuos inmunocompetentes; todo ello debido a que tanto el sistema inmune como la microbiota oral normal, previenen el sobrecrecimiento de *Candida* spp. Sin embargo, cuando las células T están disminuidas, ocurre un desequilibrio que tiende a aumentar los niveles de *Candida* spp (2).

La mucosa oral presenta propiedades antifúngicas que protegen contra la invasión candidiásica gracias a la presencia de ciertas proteínas y otros factores no determinados. Todas aquellas circunstancias que alteren la integridad de la mucosa mediante traumatismos, maceración u oclusión (como ocurre en los portadores de prótesis dentales) favorecen la adhesión del hongo y la invasión de la mucosa (11).

La saliva constituye uno de los principales antifúngicos, ya que tiene la función de barrido mecánico que dificulta la adhesión del hongo y un poder antifúngico gracias a sus componentes proteicos: Lisozimas, lactoferrina, lactoperoxidasas y glucoproteínas. La reducción del pH salival, que habitualmente oscila entre 5.6 y 7.8, como ocurre bajo las prótesis dentales removibles debido a la formación de placa dental y a la dieta alimenticia, favorece la adhesión del hongo. Los anticuerpos anti-*Candida* presentes en la saliva son del tipo IgA secretor y actúan inhibiendo la adherencia de *Candida* a la mucosa oral. Por todo esto, todas

aquellas situaciones que reducen la producción de saliva como la radioterapia local y algunos fármacos, favorecen la aparición de candidiasis oral (11, 13).

La microbiota oral regula la proliferación de hongos, inhibe la adhesión a las superficies orales por bloqueo de los receptores celulares; compite por los nutrientes y algunas bacterias producen factores antifúngicos. El uso de antibióticos reduce la microbiota bacteriana, favoreciendo el crecimiento de *Candida* en la cavidad oral. Los tratamientos con corticoides tópicos en aerosoles, crema o solución, disminuyen los mecanismos defensivos locales favoreciendo también la candidiasis oral (11).

Además, la cavidad oral es un ambiente complejo y posee una rica microbiota, como cepas de *C. dubliniensis* y otras especies del género *Candida*, entre otras. Las densidades poblacionales de especies individuales de *Candida* son probablemente dinámicas y cambian frecuentemente dependiendo de las condiciones ambientales, incluyendo dieta, tratamiento farmacológico y estado de inmunocompetencia. Esto quiere decir que las especies más resistentes a los cambios pueden sobrepoblar y ser causa de algún tipo de candidiasis (2, 14).

Las candidiasis orales son causadas frecuentemente por más de una especie y/o cepa del género *Candida*, así que hace difícil determinar que cepas están activamente contribuyendo a los síntomas de la enfermedad. *C. albicans* es la especie más frecuentemente implicada en candidiasis oral. Sin embargo, en pacientes con episodios recurrentes de candidiasis, *C. albicans* como la especie mayoritaria, puede ser reemplazada por otras especies menos patogénicas, tales como *C. dubliniensis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* entre otras. Una hipótesis que puede explicar este cambio epidemiológico es que estas especies, excepto *C. albicans*, pueden persistir en la cavidad oral después del tratamiento antifúngico (2, 14).

Según estudios de tipificación molecular, se ha demostrado que cada persona es colonizada por una cepa única que persiste durante un tiempo prolongado y es responsable de las infecciones recurrentes (2, 14).

Si bien la candidiasis oral puede producirse a veces sin la presencia de síntomas, cuando estos se presentan, los más habituales son molestia de diferente grado, una alteración en el sentido del gusto (que a menudo se describe como “mal sabor”) y ardor en la boca y garganta. También son frecuentes unas placas blancas o amarillentas en la boca y la garganta, que pueden ser eliminadas al rasparlas suavemente; pueden estar acompañadas de rajaduras, enrojecimiento, dolor e inflamación en las comisuras de la boca. Un caso crónico puede incluir llagas bucales (15).

En lo que respecta a las manifestaciones bucales en una candidiasis causada por *Candida spp* existen tres tipos; los cuales se describen a continuación.

1. Candidiasis pseudomembranosa o muguet

Se caracteriza por manchas típicas, y placas blanquecinas o de color crema, a veces cubiertas por una capa marrón o negra, que se eliminan por raspadura dejando una superficie sangrante y dolorosa (5, 14, 16).

La candidiasis pseudomembranosa es también conocida como muguet, la forma clínica más conocida. Las lesiones se pueden localizar en cualquier zona de la mucosa oral, pero predominan en la mucosa yugal, orofaringe y márgenes laterales de la lengua. En PVVS es predominante y pueden aparecer formas crónicas difíciles de erradicar (5, 11).

Histológicamente las pseudomembranas están compuestas por células epiteliales descamadas, fibrina, tejido necrótico, restos de alimentos, células inflamatorias y células candidiásicas con micelio. El estrato córneo del epitelio presenta edema y microabscesos, pero aún no es invadido por *C. albicans*. El tejido conectivo subepitelial presenta un infiltrado inflamatorio mixto con polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos (11).

2. Candidiasis eritematosa

La candidiasis eritematosa, mal llamada atrófica, se presenta clínicamente como un área rojiza de bordes mal definidos en la mucosa oral sin la presencia de placas blanquecinas. Es

más frecuente identificarla en el dorso de la lengua y en el paladar. En general es una lesión asintomática o que produce un ligero picor, por lo que en muchas ocasiones es un hallazgo casual. Esta forma es común en PVVS (5, 11, 16).

Los hallazgos histopatológicos son similares a los encontrados en la pseudomembranosa, con una infiltración de polimorfonucleares en el tejido conectivo, cierta atrofia epitelial y vascularización hiperémica. No se suele ver infiltración de hifas, pero sí blastosporas en la superficie de la mucosa. También se ha descrito mayor proporción de células de Langerhans en relación con el tipo pseudomembranoso (11).

3. Candidiasis hiperplásica

La candidiasis hiperplásica o leucoplásica, se define como una lesión oral en placas o pequeños nódulos blancos, que no pueden ser desprendidos por raspado y no pueden ser atribuidos a ninguna patología diagnosticable. Se pueden localizar en cualquier lugar de la mucosa oral, pero aparecen más frecuentemente en la mucosa yugal cerca de las áreas retrocomisurales y en la lengua. En los cortes histopatológicos se reconoce la invasión por hifas que penetran en ángulo recto desde la superficie (11).

G. Complicaciones clínicas

La candidiasis oral como tal no es una enfermedad mortal, aunque provoca molestias de diferente grado y altera el gusto, haciendo desagradable y dolorosa la ingesta, lo que lleva a una disminución del apetito y a la emaciación del paciente, que puede resultar fatal en enfermos que precisen una ingesta hipercalórica como es el caso de los PVVS (11).

Al mismo tiempo, la candidiasis oral puede ser la puerta de entrada de otras formas de candidiasis más graves, como la esofágica o la sistémica (11).

H. Patrones de susceptibilidad antifúngica de la diferentes especies de *Candida* sp.

Existen 3 patrones de resistencia los cuales son: Primaria o intrínseca la cual se presenta antes de cualquier exposición a antifúngicos, la secundaria o extrínseca después de una exposición a un antifúngico y la resistencia clínica que abarca progresión o recaída de una infección y en el laboratorio es completamente susceptible al antifúngico usado por el tratamiento de la infección (17)

La susceptibilidad de *C. glabrata* no es predecible, esta levadura puede ser resistente a fluconazol o puede ser susceptible dependiendo de la dosis administrada. *C. glabrata* es frecuentemente recuperada en el laboratorio clínico y en algunas instituciones su frecuencia es la siguiente después de *C. albicans* como causa de infecciones fúngicas nosocomiales (18)

A principios de 1990, el incremento del uso de fluconazol para pacientes infectados con HIV con recurrentes episodios de candidiasis orofaríngea resultó en la selección de especies de *Candida* intrínsecamente menos susceptibles a los azoles y en la emergencia de cepas resistentes a los azoles en estos pacientes debido a la adquisición de resistencia por cepas previamente susceptibles de *C. albicans* (19)

Este fenómeno ha conducido a la inquietud que la dispersión del uso del fluconazol en poblaciones de pacientes más amplia podría dirigir a la selección similar para las especies y cepas que poseen resistencia adquirida o inherente a los azoles. Un número de estudio ha intentado determinar la semejanza de tales hechos por cambios cuantificados en distribuciones de especies hacia especies menos susceptibles o resistentes a azoles, tales como *C. glabrata* y *C. krusei*, y el incremento del valor de la concentración mínima inhibitoria hacia valores resistentes en especies usualmente susceptibles a azoles, tales como *C. albicans* y *C. tropicalis* (19).

I. Drogas antifúngicas de uso común contra levaduras.

Los antifúngicos se agrupan según su mecanismo de acción en tres clases (Anexo 1):

1. Los que actúan sobre la membrana plasmática inhibiendo la síntesis del ergosterol (azoles, polienos y alilaminas).
2. Los que lo hacen sobre la pared celular bloqueando la síntesis de glucano (equinocandinas).
3. La 5-fluorocitosina, que actúa inhibiendo los ácidos nucleicos (21).

Pero además de inhibir la síntesis de ergosterol, los azoles pueden inhibir enzimas (como la citocromo oxidasa o la peroxidasa) o inhibir la transformación de las levaduras a su fase micelial actuando sobre los fosfolípidos, o incluso en el caso del miconazol y el itraconazol, dañar directamente la membrana plasmática provocando la pérdida de componentes intracelulares y por consiguiente la muerte celular (21).

El mecanismo de acción de los polienos es doble:

- a. Formación de poros en la membrana plasmática a través de los cuales salen al exterior componentes intracelulares como el potasio.
- b. Bloqueo de la ATPasa de la membrana y daño oxidativo directo sobre ésta (21).

Las equinocandinas son lipopéptidos con actividad fungicida *in vitro* e *in vivo* sobre *Candida* y *Aspergillus*. Actúan inhibiendo la beta-glucanosintetasa, lo que provoca una disminución de la síntesis de glucano e indirectamente, de lanosterol y ergosterol (21).

La 5-fluorocitosina se introduce en el interior de la levadura por la acción de una citosina permeasa y es rápidamente desaminada, convirtiéndose en 5-fluorouracilo (5-FU), que actúa por dos vías diferentes:

- a. Transformado en 5-FUTP (5-fluoridina trifosfato) se incorporará al RNA dando lugar a moléculas aberrantes.
- b. Convertido en 5-dUMP (5-fluorodesoxiuridina trifosfato) bloqueará la timidilato sintetasa y, por lo tanto, la síntesis de DNA (21).

1. 5-fluorocitosina o flucitosina

Su utilización ha sido restringida por su estrecho espectro de actividad, y por la rápida aparición de cepas resistentes dentro de las especies susceptibles cuando se usa como agente antifúngico único (22).

La flucitosina es un análogo fluorado del nucleósido citosina; impide la síntesis del ADN del hongo. En las dosis en las que se administra esta transformación se produce preferentemente en el interior del hongo, lo que explica la relativa especificidad de la acción sobre la célula fúngica (22).

Entre los antifúngicos actualmente en uso, es el único inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos siendo uno de los que mejor se conoce su mecanismo de acción y de resistencia. Es una pirimidina fluorada que por sí sola no posee actividad antifúngica y necesita ser metabolizada, por los sistemas enzimáticos de la levadura, para transformarse en el compuesto activo que actuará como un antimetabolito (23).

La flucitosina y la anfotericina B tienen efectos aditivos *in vitro* frente a *Candida*. Flucitosina se absorbe bien por vía oral aunque su absorción puede verse retrasada por la comida y los antiácidos. Cuando la flucitosina se administra con ABD (anfotericina B), el 38% de los pacientes desarrollan efectos secundarios relacionados con la flucitosina (22).

2. Fluconazol

Fluconazol es un triazol de baja toxicidad y muy hidrosoluble; además de ser un inhibidor potente y específico de la síntesis de esteroides en los hongos. Su absorción oral es muy rápida y completa (85-90%) no se ve modificada por la alimentación, la hipoclorhidria ni los tratamientos de la úlcera péptica (15, 22).

Una de las características más destacadas es la elevada penetración en los líquidos biológicos de todo el organismo (22).

La mayoría de especies de *Candida* spp son sensibles, aunque un buen número de cepas de *C. glabrata* son resistentes y *C. krusei* es intrínsecamente resistente. Fluconazol es muy eficaz en el tratamiento de las infecciones por *Candida* y se considera el tratamiento de elección de muchas de ellas. Puede ser usado como terapia de mantenimiento para prevenir la recaída de la enfermedad sobre todo en aquellos que presentan factores predisponentes para la infección candidiásica (15, 22, 23).

a. Resistencia a fluconazol

La significancia clínica de cualquier especie, incluyendo *C. dubliniensis*, es primariamente basada en la facultad para determinar si la patogénesis o manejo de la infección es diferente de una infección causada por otros miembros del género, especialmente *C. albicans* (20).

Tanto el fluconazol como los demás triazoles son fármacos utilizados comúnmente en la prevención y terapia de la candidiasis oral ya que son altamente efectivos y de baja toxicidad, sin embargo dichos azoles han sido la causa de la resistencia de las especies aisladas e incluso de desarrollar resistencia *in vitro*. Además los episodios recurrentes de candidiasis han contribuido a la adquisición de resistencia secundaria (7, 9, 10).

El objetivo último de los antifúngicos que actúan sobre la membrana celular es el ergosterol, que es un regulador de la asimetría y fluidez de la membrana, y por tanto encargado de la integridad de la célula fúngica. Los azoles inhiben una enzima dependiente del citocromo P450, la lanosterol 14-alfa-desmetilasa (14 DM), provocando una disminución de la síntesis del ergosterol y la acumulación de esteroides metilados. Todo ello altera la estructura y función de la membrana (sobre todo el transporte de nutrientes y la síntesis de quitina), que se vuelve más permeable y vulnerable. El resultado final es una inhibición del crecimiento celular, causando un efecto fungistático. Esta propiedad fungistática de los azoles implica en muchas ocasiones tratamientos prolongados y está directamente relacionada con el desarrollo de resistencias secundarias (2, 21).

El mecanismo de resistencia al fluconazol en *C. dubliniensis* se debe al sistema de bombeo activo del antifúngico al exterior, que usa como fuente de energía el gradiente de protones de membrana, a diferencia de como ocurre con otros azoles lipofílicos en *C. albicans*, que necesitan un bombeo especial con gasto de energía (6).

Moran y Sanglar estudiaron cuatro cepas de *C. dubliniensis* con sensibilidad disminuida al fluconazol (8-64 mg/l), donde comprobaron un aumento del ARNm del gen MDR1. Por tratarse de *C. dubliniensis* lo denominaron CdMDR1 y se observó una homología del 96% con el de *C. albicans* (CaMDR1), tanto en la secuencia genética como en la proteína transmembrana que codifica, CdMdr1p. Los autores concluyen que el mecanismo de resistencia al fluconazol sería por sobreexpresión del sistema de expulsión, y además indican que también puede existir una mutación en el citocromo P450 (que actúa como una 14- α -desmetilasa en la síntesis del ergosterol, cuya inhibición llevan a cabo los azoles), como también se ha demostrado en *C. albicans*. Esta resistencia se mantiene en los subcultivos libres de fluconazol, por lo que no es una resistencia epigenética, sino genéticamente estable (6).

3. Itraconazol

Es un derivado triazólico activo por vía oral. Itraconazol tiene una excelente actividad *in vitro* frente a levaduras, incluidas algunas especies de *Candida* resistentes a fluconazol. Itraconazol es una alternativa válida a fluconazol en el tratamiento de la infección orofaríngea por *Candida* (muguet), tanto en pacientes con infección por VIH como sin ella. Hay que tener presente que las cepas de *Candida* resistentes a fluconazol exhiben una concentración mínima inhibitoria (CIM) relativamente elevadas frente a itraconazol (15, 22).

La absorción oral de la presentación de itraconazol en cápsulas necesita un ambiente ácido, por lo que ésta se incrementa si se administra tras las comidas o junto a bebidas de cola o con zumos de frutas (22).

Se combina fuertemente con las proteínas plasmáticas, sobre todo con la albúmina y tiene una vida media plasmática de veinticinco horas. Ya que es la fracción libre la que determina la concentración del fármaco en el agua corporal, sus niveles en los líquidos

orgánicos son bajos. En los tejidos, concretamente en el tejido adiposo, el hígado y los tejidos queratinizados (piel y cabello), alcanza unas concentraciones mucho más altas que en el plasma, pudiendo permanecer en la capa córnea durante dos semanas después de suspender su administración, a ella llega mediante la secreción sebácea. En las uñas alcanza altas concentraciones, que se mantienen hasta seis meses después de haber suspendido el fármaco, lo que posibilita pautas terapéuticas intermitentes (terapia pulsátil). Es metabolizado casi en su totalidad por el organismo y sólo el 1% es excretado en la orina (24).

4. Voriconazol

El voriconazol, posaconazol y ravuconazol son derivados triazólicos fluorados llamados de "azoles de segunda generación", al igual que el fluconazol y el itraconazol. A diferencia de los primeros azoles, cuyo anillo básico es el imidazol, con dos átomos de nitrógeno, en estos compuestos el núcleo fundamental es el triazol, que presenta tres átomos de nitrógeno. Éstas y otras modificaciones en la molécula, como la presencia de átomos de flúor, le confiere una mayor capacidad inhibitoria de las enzimas de la vía de síntesis de los esteroides, especialmente la desmetilasa del lanosterol. Se metaboliza en el hígado vía citocromo P-450 y sus metabolitos carecen de actividad antifúngica (22, 25). Por esta razón, la actividad *in vitro* está mejorada y su espectro se ha ampliado a especies fúngicas que normalmente eran refractarias a otros compuestos de la misma familia (25).

Voriconazol es, entre los triazoles disponibles en el mercado, el que tiene una mayor actividad antifúngica. Es activo frente a *Candida*, incluyendo las especies que como *C. glabrata* o *C. krusei* son resistentes al fluconazol o al itraconazol, para estas especies las CIM de voriconazol son mayores que para otras especies de *Candida* (20, 24).

J. Pruebas fenotípicas de laboratorio para la identificación de las especies de *Candida*

Aunque es imposible distinguir las colonias de *C. dubliniensis* y *C. albicans* con un medio sólido convencional, es factible distinguir ambas especies por sus características fenotípicas a través de una secuencia de pruebas de laboratorio tales como: Tubos germinales,

crecimiento a 42°C y 45°C, Candida CHROMagar, asimilación de carbohidratos y producción de clamidosporas (Anexo 2) (1, 2).

1. Producción de tubos germinales

Esta es la prueba principal, es utilizada como prueba de rutina para la identificación de *C. albicans*, en la cual la presencia de dicha levadura se ve expresada con la elongación de la misma después de ser incubada en suero durante un corto período de tiempo. Esta característica es propia tanto de *C. albicans* como de *C. dubliniensis* (2).

2. Crecimiento a 42°C y 45°C

C. albicans tiende a crecer en ambas temperaturas después de 48 horas de incubación; por lo contrario, *C. dubliniensis* crece muy poco a 42°C y no crece a 45°C; por lo tanto, se considera la ausencia de crecimiento a esa temperatura como un parámetro para la identificación presuntiva de *C. dubliniensis* (2, 26).

Esta prueba de laboratorio puede ser utilizada como la primera alternativa en la diferenciación de las colonias de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y no es factible para las otras especies de *Candida*.

3. Color de la colonia en Candida CHROMagar

Candida CHROMagar es un medio sólido que contiene sustratos cromogénicos, los cuales permiten la diferenciación de varias especies de *Candida* clínicamente importantes en base del color de la colonia. *C. dubliniensis* produce colonias verde oscuro, mientras que las colonias típicas de *C. albicans* son verde claro, *C. glabrata* genera colonias rosa rojizo púrpura, *C. tropicalis* desarrolla colonias azules, *C. krusei* forma colonias rosadas pálidas con bordes blancos y *C. parapsilosis* da origen a colonias blanco marfil (2, 8, 27, 28).

Este medio es útil para identificar colonias de *C. dubliniensis* de cultivos primarios de muestras clínicas después de 48 horas de incubación. En un estudio reciente se reportó que los

aislamientos de *C. dubliniensis*, pueden perder la habilidad para producir colonias verde oscuras en subcultivos o por almacenaje. Las razones de esta aparente inestabilidad no son claras pero puede estar relacionado con la habilidad de *C. dubliniensis* para exhibir el fenómeno de semejanza fenotípica. Por tal motivo se recomienda que esta prueba sea realizada del cultivo primario de 48 horas de incubación para evitar una interpretación incorrecta de los resultados (1, 2).

4. Producción de clamidosporas

La abundante producción de clamidosporas en agar caseína o harina de maíz a 24°C por 48 horas puede utilizarse como una prueba presuntiva para la identificación de *Candida dubliniensis*. Estas clamidosporas pueden ser visualizadas más fácilmente en algunos casos con azul de lactofenol (20, 29).

Tanto esta prueba como las anteriores son de gran utilidad para la identificación de *C. dubliniensis* ya que en el caso de las cepas de *C. albicans* no produce clamidosporas y las pocas que si producen lo hacen en una mínima cantidad (29).

5. Asimilación de carbohidratos

Otra característica fenotípica específica para *C. dubliniensis* es la incapacidad para asimilar las fuentes de carbono como: L-arabinosa, D-xilosa, D-ribosa, L-sorbosa, L-ramnosa, celobiosa, lactosa, rafinosa, glicerol, inositol, DL-ácido láctico, DL-lactato, gluconato, así como la ausencia de la actividad beta glucosidasa e hidrólisis de urea y esculina (27).

Sin embargo *C. dubliniensis* cuenta con la capacidad para asimilar algunos sustratos, tales como: Glucosa, galactosa, maltosa, sucrosa, D-manitol, sorbitol, 2-ceto-gluconato, N-acetilglucosamina, glucosamina. Mientras que con el carbohidrato trehalosa su asimilación de carbono es variable (27).

C. glabrata utiliza únicamente dos carbohidratos D-trehalosa y D-glucosa. *C. parapsilosis* utiliza como fuentes de carbono la D-galactosa, D-sacarosa, N-acetilglucosamina,

L-arabinosa, D-maltosa, D-trehalosa, 2-cetogluconato potásico, metil- α D-glucopiranosida, D-sorbitol, D-xilosa, glicerol, palatinosa, D-melecitosa, gluconato potásico, D-manitol, D-glucosa, glucosamina principalmente y *C. tropicalis* D-galactosa, D-sacarosa, N-acetilglucosamina, D-celobiosa, D-maltosa, D-trehalosa, 2-cetogluconato potásico, metil- α D-glucopiranosida, D-sorbitol, D-xilosa, palatinosa, D-melecitosa, D-manitol, D-glucosa y glucosamina (27).

Según reportes de algunos estudios (Tabla 5) tanto trehalosa como xilosa y la actividad beta glucosidasa han sido los principales determinantes de la clasificación de las cepas del género *Candida*, aunque trehalosa en la mayor parte de los casos es utilizada como fuente de carbono por *C. albicans* (30, 31).

Tabla 5. Asimilación de sustratos por *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* determinada con el sistema de identificación de levaduras API ID 32C.

Substrato o Prueba	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
• Pentosas	0	0
L-arabinosa	0	0
Ribose	0	0
D-xilosa	+/-	0
• Hexosas		
Galactosa	+	+
Glucosa	+	+
Sorbosa	0	0
Ramnosa	0	0
• Disacáridos		
Celobiosa	0	0
Maltosa	+	+
Lactosa	0	0
Melobiosa	0	0
Sucrosa	+	+
Trehalosa	+	+/-
• Trisacáridos		
Rafinosa	0	0
• Alcoholes		
Glicerol	0	0
Manitol	+	+
Inositol	0	0
Sorbitol	+	+
• Ácidos Orgánicos		
DL-lactato	+	0
Gluconato	0	0
• Aminoácidos		
N-acetilglucosamina	+	+/-
Glucosamina	+	+/-
• Hidrólisis de esculina	0	0
• Resistencia a Cicloheximida	+	+

Fuente: Sullivan D, *et al.* Widespread Geographic Distribution of Oral *Candida dubliniensis* Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 960–964.

K. Importancia de determinar la susceptibilidad antifúngica

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. Además, el incremento en la población de pacientes inmunocomprometidos o con otros factores de riesgo (edades extremas, antibioterapia de amplio espectro, etc.) ha determinado un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas sistémicas en las últimas décadas (32, 33).

Otras ventajas de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* son: proporcionan una medida contable de la actividad relativa de dos o más agentes antifúngicos, correlacionan la actividad *in vivo* y predicen que se puede esperar en la terapia, permiten monitorear el desarrollo de la resistencia entre poblaciones de organismos normalmente susceptibles y predicen el potencial terapéutico de agentes de reciente descubrimiento (34).

Motivado por esta nueva realidad, el Comité Norteamericano de Estándares en Laboratorios Clínicos –NCCLS- (actualmente CLSI) realizó en 1985, una encuesta en diferentes laboratorios para conocer las pruebas de sensibilidad antifúngica que realizan habitualmente y como se realizan. 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 variada. Los resultados de las CMI también fueron impactantes ya que en algunos casos, las diferencias entre los distintos laboratorios fueron de 512 veces (32, 33).

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* y en *Cryptococcus neoformans*, que dio lugar a la publicación en 1992, de la

propuesta de un método (M27-P). En 1995 se publicó el método provisional (M27-T) y en 1997, se aprobó definitivamente el método conocido como M27-A (32, 34).

A pesar de todo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos no están tan desarrolladas como las de los antibacterianos. Los puntos de corte y los criterios de sensibilidad y resistencia de las levaduras para los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina sólo están determinados para las micosis orofaríngeas de enfermos con sida (34).

L. Metodología para evaluar la susceptibilidad antifúngica

1. Método de difusión en agar

Este método es de gran beneficio para pequeños laboratorios debido a que la metodología es similar a la antibacteriana donde es utilizado como medio de cultivo Mueller Hinton y especialmente para especies del género *Candida* (35).

La utilidad de los métodos de difusión en agar para estudiar los antifúngicos ha sido limitada por los problemas de difusión de la mayoría de los agentes antifúngicos y por la falta de correlación de los halos de inhibición con la clínica. Sólo se ha encontrado correlación en los fármacos más solubles en agua (fluconazol y 5-fluorocitosina) (35).

Son varios los autores que reportan una buena correlación entre los halos de inhibición de los discos de fluconazol (25 µg, 50 µg) en distintos medios de cultivo y los valores de CMI obtenidos por el método de referencia (CLSI). En algunos casos estos métodos no diferencian bien entre cepas dependientes de la dosis y resistentes, siendo necesario recurrir a métodos cuantitativos (35).

2. Método de Etest ®

Etest ® es un método de difusión en agar, que consta de una tira con un gradiente de concentración de antifúngico y que permite cuantificar, mediante la lectura de un elipse de

inhibición, la concentración mínima inhibitoria (CMI). Este método ha demostrado una buena concordancia con el método de referencia en diversos estudios (33-35).

Ha sido ampliamente usado para ensayos de susceptibilidad de bacterias así como también de agentes antifúngicos tales como anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y 5 fluorocitosina (36).

Uno de los problemas más frecuentes en los estudios de susceptibilidad a antifúngicos, es efecto de "arrastre" (trailing effect) que presentan algunas cepas fundamentalmente con azoles (drogas fungistáticas) y que en el caso de Etest ® corresponde a la presencia de microcolonias alrededor o dentro del área de inhibición que dificultan la lectura de la CMI . Este fenómeno se observa también en el método de microdilución en caldo como un crecimiento sostenido de colonias en todos los pocillos del gradiente de antifúngico (33).

El grado de concordancia entre Etest ® y el método de referencia, depende del medio utilizado para realizar la técnica, siendo los medios más recomendados RPMI 1640 (2% glucosa) y Casitona. El uso de estos medios enriquecidos, permite el óptimo crecimiento de las especies, mejora la lectura de los halos (punto de corte) y el fenómeno de trailing se minimiza (33).

3. Método de macrodilución

El método de macrodilución es el más ampliamente usado y es el método de referencia para células levaduriformes y es el propuesto por el CLSI (34).

Este método es adecuado para evaluar todos los agentes antifúngicos en cualquier aislamiento fúngico. Este método se utiliza en laboratorios en los cuales el volumen de estas pruebas es bajo. También es útil en aquellas cepas de *C. albicans* en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (*trailing effect*) (32, 34).

El medio de cultivo que se utiliza se define como un medio sintético y actualmente, se está utilizando el caldo RPMI 1640 con L-glutamina y un indicador de pH sin bicarbonato de sodio. Dicho medio es bufferizado a pH 7,0 a 25°C. Un buffer que da resultados satisfactorios para pruebas antifúngicas es el MOPS (ácido morfopropileno sulfónico) el cual tiene una molaridad final de 0,165 para un pH de 7,0 (34, 36).

Este medio es apropiado para Anfotericina B, 5-fluorocitosina y azoles y es el recomendado a emplear cuando se realiza una prueba de susceptibilidad contra especies de *Candida* y varios hongos filamentosos (34).

No obstante, el RPMI 1640 no es adecuado para soportar el crecimiento de algunas cepas de *Cryptococcus neoformans* y no permite distinguir aislamientos susceptibles de algunas cepas potencialmente resistentes a anfotericina B (34).

4. Método de microdilución

Las pruebas antifúngicas usando el método de microdilución es similar al de la prueba de la macrodilución y provee resultados comparables. Estas pruebas por microdilución no se usan con frecuencia como las pruebas de macrodilución. Sin embargo un estudio reportado por el CLSI ha demostrado discrepancias entre las dos pruebas; macro y microdilución. Estas diferencias entre las dos pruebas no son estadísticamente significativas y es muy posible que la utilización de la microdilución sea más fácil y eficiente en un laboratorio clínico. Además de las pocas discrepancias entre las dos pruebas, existe común acuerdo entre los diferentes laboratorios, que las pruebas de microdilución proveen una CMI más consistente (34, 37).

El test de microdilución está diseñado para ser usado con placas de 96 pozos, que deben ser estériles y con fondo plano o en U. Con una pipeta multicanal se dispensan volúmenes de 100 ul de la concentración 2x de la droga y se colocan desde el pozo 1 al 10, empezando por la concentración más alta y así sucesivamente hasta la concentración más baja. El pozo del tubo control contiene 100ul de medio sin droga estéril y se inocula con 100 ul de suspensión diluida 2x de inóculo (34).

Las placas para microdilución se incuban a 35°C y los pozos se observan con la ayuda de un espejo lector, el crecimiento de cada pozo es comparado con el crecimiento del pozo control negativo (sin droga). Para caracterizar cada pozo se utiliza un puntaje con un rango numérico que va en una escala de 0 a 4: 0 ópticamente claro o transparente; 1 ligeramente turbio; 2 prominente incremento en la turbiedad; 3 ligera reducción en la turbiedad; 4 no reducción en la turbiedad. La CMI para anfotericina B se define como la menor concentración de droga, en la cual el puntaje es 0 (ausencia completa de crecimiento), y para la 5-fluorocitosina y los azoles se describe como la mínima concentración en la cual se observa un puntaje de 2 (34, 37).

5. Métodos comerciales: Método colorimétrico Sensititre® Yeastone

Este método se diferencia del creado por el CLSI por utilizar un indicador de crecimiento de oxidorreducción (azul Alamar) comercializado, que tiene la ventaja de que la lectura de los puntos finales es más objetiva al manifestarse por un cambio de color de azul a rojo o púrpura, pero los azoles siguen siendo los más problemáticos de leer. La correlación es también variable según los estudios (43% a 100%), siendo menor para *C. krusei* con 5-fluorocitosina y *C. glabrata* y *C. tropicalis* con fluconazol y mayor para *C. krusei* y *C. tropicalis* con anfotericina B y *C. krusei* con itraconazol. La lectura a las 24 horas ofrece mejor correlación con la clínica, excepto con anfotericina B, que se aconseja leer a las 48 horas. Este método no parece útil para la detección de cepas resistentes a la anfotericina B (35, 38).

Por lo tanto, varias modificaciones del método standard del NCCLS han sido evaluadas y adoptadas como una alternativa que puede mejorar las necesidades del laboratorio clínico. Entre estos métodos modificados, la determinación del punto final de la MIC tanto colorimétrica como espectrofotométricamente son particularmente dignos de observar (38).

6. Puntos de corte según el Comité Norteamericano de Estándares en Laboratorios Clínicos -NCCLS- actualmente CLSI e intervalo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antifúngicos

La determinación del punto final o CMI es un paso crítico en las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos, especialmente con los azoles. La inhibición parcial que es observada con la 5-fluorocitosina y los azoles hace difícil la determinación de un buen punto final y crea mucha variabilidad. Tradicionalmente la CMI fue considerada como la más baja concentración de un agente antifúngico que inhibe totalmente el crecimiento de un hongo (34).

La determinación del punto final (CMI) con un criterio menos estricto (baja turbiedad cerca del punto final es ignorada), ha incrementado la reproducibilidad entre diferentes laboratorios y produjo un cambio en la distribución de la CMI hacia bajas concentraciones de droga para *Candida albicans* y *Candida tropicalis* especialmente cuando se utilizan los azoles (34).

En cada determinación es necesario aplicar un control de calidad con cepas ATCC (American Type Culture Collection/Cepas Tipificadas de la Colección Americana) con intervalos de las CMI conocidos para validar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de susceptibilidad. La frecuencia de las pruebas de control de calidad debe ajustarse a las directrices del laboratorio. El inóculo debe cultivarse en un medio adecuado con el fin de comprobar su pureza. Los resultados de las pruebas no son válidos si se detecta un cultivo mixto y no deben ser informados si los resultados del control de calidad no están dentro del intervalo (32-34).

Las cepas utilizadas de rutina para validar los resultados obtenidos son *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. Los intervalos de CMI para microdilución se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución

Antifúngico	Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$)			
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	24h	48h	24h	48h
Anfotericina B	0.25-2	0.5-4	0.5-2	1-4
Fluconazol	0.5-4	1-4	8-64	15-128
Itraconazol	0.12-0.5	0.12-0.5	0.12-1	0.25-1
Ketoconazol	0.03-0.25	0.06-0.5	0.12-1	0.25-1
Posaconazol	0.06-0.25	0.06-0.25	0.06-0.5	0.12-1
Ravuconazol	0.016-0.12	0.03-0.25	0.06-0.5	0.25-2
Voriconazol	0.016-0.12	0.03-0.25	0.06-0.5	0.25-1
5-fluorocitosina	0.06-0.25	0.12-0.5	4-16	8-32

Fuente: Pfaller MA, *et al.* Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; NCCLS document M27-A2. Approved Standard-2nd ed. 2002; 22(15): 15-29.

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 (SDD) (Tabla 7) (32).

Tabla 7. Puntos de corte según el Comité Norteamericano de Estándares en Laboratorios Clínicos (NCCLS, actualmente CLSI)

Antifúngico	Intervalos de las CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente	No susceptible
Fluconazol	≤ 8	16-32	NA	≥ 64	NA
Itraconazol	≤ 0.125	0.25-0.5	NA	≥ 1	NA
Voriconazol	≤ 1	2	NA	≥ 4	NA
5-fluorocitosiana	≤ 4	NA	8-16	≥ 32	NA
Equinocandinas	≤ 2	NA	NA	NA	≥ 4

Fuente: Pfaller MA, *et al.* Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; NCCLS document M27-A2. Approved Standard-2nd ed. 2002; 22(15): 15-29.

Equinocandinas incluye: Anidulafungina, caspofungina y micafungina. Los puntos de corte son considerados tentativos hasta Junio 2008. NA = no aplica.

La categoría de sensible no lleva implícito el éxito terapéutico. La categoría de resistente se correlaciona con fracaso terapéutico. La categoría SDD (sensible dependiente de la dosis administrada) para el fluconazol se basa en los niveles de antifúngico que se alcanzan con dosis de 400 mg/día en pacientes con buen funcionamiento renal. Para el itraconazol se basan en una buena absorción de fármaco y que se alcancen niveles en sangre 0,5 µg/ml. En la categoría de intermedio, es sólo aplicable a 5-fluorocitosina, no se sabe con certeza si la cepa es sensible, ya que los datos que se tienen no permiten categorizarla como sensible o resistente (32).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las especies de *Candida* han sido reportadas por adquirir resistencia a los azoles, antifúngicos comúnmente utilizados para combatir la candidiasis oral. Además de ello algunas especies comparten características fenotípicas como lo son *C.dublinskiensis* y *C. albicans*. Por lo tanto es importante diferenciar las especies de *Candida* ya que es indispensable comprender la significancia clínica y el papel epidemiológico de estas en personas inmunocomprometidas, especialmente en personas viviendo con VIH/sida (PVVS) en Guatemala.

Es necesario considerar que la mayoría de PVVS (más del 90%), sufren al menos un episodio de candidiasis durante el transcurso de la enfermedad; lo cual tiende a incrementar el número de cepas resistentes a los azoles.

Además la disponibilidad de pruebas fenotípicas para la identificación de las especies de *Candida* puede servir como una herramienta valiosa para la identificación de estos microorganismos, usando una serie de pruebas que manifiesten características distintivas.

Hoy en día existen técnicas moleculares para la identificación de microorganismos, las cuales son muy precisas y exactas. Sin embargo, la combinación de pruebas que manifiesten características fenotípicas de las levaduras puede ser de gran utilidad en laboratorios que no cuentan con los recursos para la realización de pruebas genéticas. Por lo anterior y en ausencia de pruebas moleculares, el objetivo de esta investigación es describir las diferentes especies de *Candida*, basándose en pruebas fenotípicas.

V. OBJETIVOS

A. Generales:

Determinar y caracterizar la presencia de especies de *Candida* en las infecciones a nivel oral de las personas viviendo con VIH/sida (PVVS).

B. Específicos:

1. Identificar las características demográficas de las personas viviendo con VIH/sida y que presentan candidiasis oral.
2. Determinar las manifestaciones clínicas que se presentan en la candidiasis oral en las personas con sida.
3. Establecer mediante pruebas fenotípicas las especies de *Candida* que se presentan con mayor frecuencia en la candidiasis oral de personas viviendo con VIH/sida.
4. Determinar el perfil de susceptibilidad antifúngica de las *Candidas* aisladas a nivel oral en personas viviendo con VIH/sida.
5. Conocer las coinfecciones asociadas a candidiasis oral y VIH/sida.

VI. HIPÓTESIS

Considerando que es un estudio descriptivo, no analítico acerca de la determinación de especies de *Candida* en personas viviendo con VIH/sida, no se hace necesario el planteamiento de una hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Personas viviendo con VIH/sida (PVVS) con manifestaciones clínicas de candidiasis que asistieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios.

B. Muestra

56 personas viviendo con VIH/sida (PVVS) de las cuales fueron aisladas 68 cepas de *Candida sp.*

C. Medios

1. Recursos humanos

Br. Wendy del Milagro Paiz Méndez

Licda. Blanca Samayoa Herrera, QB, MSPH, asesora

Licda. Sandra Patricia Lima Pimentel, coasesora

2. Recursos institucionales

Laboratorio de Micobacterias y Hongos del Hospital General San Juan de Dios

Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios

D. Recursos materiales

1. Recursos químicos y biológicos

Agua destilada

Suero

API ID 32C

Cepa ATCC de *C. albicans*

Cepa ATCC de *C. dubliniensis*

Aceite mineral

2. Medios de cultivo

Agar sabouraud

Agar candida CHROMagar

Agar harina de maíz

3. Equipo y cristalería

Balanza semi-analítica

Incubadora

Microscopio

Campana de flujo laminar

Autoclave

Estufa

Refrigerador

Asa de inoculación

Portaobjetos

Cubreobjetos

Bajalenguas

Tubos pequeños de rosca

Tubos de ensayo

Pipetas pasteur

Probeta graduada

E. Procedimiento

El presente trabajo es un estudio descriptivo, no analítico en el que se incluyeron a cincuenta y seis pacientes con manifestaciones clínicas de candidiasis, que asistieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios, quienes voluntariamente accedieron a participar en el estudio.

Se revisaron los expedientes clínicos de estas personas, con la finalidad de analizar algunas variables ligadas al estudio (Anexo 3). Luego del consentimiento verbal donde se les informó de la naturaleza del estudio a los pacientes, se procedió por indicación médica a tomar la muestra la cual fue sembrada en Candida CHROMagar debido a que así lo requería el medio de cultivo.

1. Producción de tubos germinales (5, 39)

- ✓ Se buscaron colonias sugestivas de *Candida dubliniensis*.
- ✓ Se suspendió una colonia en 0.5 ml de suero o plasma humano.
- ✓ Se incubó a 37°C por un período de 2 a 4 horas.
- ✓ Luego de la incubación se colocó 1 gota de la suspensión de levaduras en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.
- ✓ Se observó al microscopio en 40x.
- ✓ Se consideró prueba positiva la presencia de filamentos que surgieron de las levaduras y como prueba negativa las levaduras sin filamentos.
- ✓ Tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* producen tubos germinales, a diferencia de las otras especies de *Candida*.

2. Crecimiento a 42°C y 45°C (1)

- ✓ Se tomaron las colonias sugestivas de *Candida dubliniensis*.
- ✓ Se sembraron en tres placas de agar Sabouraud.
- ✓ Se incubó la primera placa a 37°C, la segunda a 42°C y la última placa a 45°C por 48 horas.
- ✓ Luego de la incubación se procedió a observar el crecimiento de la levadura en el medio y calificarlo como: (1) ninguno, (2) pobre o (3) bueno.
- ✓ Fue categorizado como crecimiento bueno aquel que fue igual al producido a 37°C.
- ✓ *C. dubliniensis* presenta un buen crecimiento a 37°C, escaso o nulo a 42°C y no crece a 45°C.
- ✓ La mayor parte de cepas de *C. albicans* crece incluso a 45°C, aunque en escasa cantidad.
- ✓ Esta prueba no aplicó a las otras especies de *Candida*.

3. Color de las colonias en el medio Candida CHROMagar a 37°C por 48 hrs. (1)

- ✓ Se tomó la muestra del área con manifestaciones clínicas de candidiasis.
- ✓ Se sembró directamente en candida CHROMagar.
- ✓ Se incubó a 37°C y se observó a las 24 y 48 horas posteriores a su inoculación.
- ✓ Se leyó macroscópicamente los resultados de acuerdo al color de la colonia.
- ✓ Se consideraron colonias presuntivas de *C. dubliniensis* aquellas de color verde oscuro o verde azulado.
- ✓ Se consideraron colonias presuntivas de *C. albicans* aquellas de color verde claro.
- ✓ Se consideraron colonias presuntivas de *C. glabrata* aquellas de color rosa rojizo púrpura.
- ✓ Se consideraron colonias presuntivas de *C. tropicalis* aquellas de color azul.
- ✓ Se consideraron colonias presuntivas de *C. krusei* aquellas de color rosa pálido con bordes blancos.
- ✓ Se consideraron colonias presuntivas de *C. parapsilosis* aquellas de color blanco marfil.

4. Producción de clamidosporas (29, 40, 41)

- ✓ Se tomó con un asa en espátula una colonia sugestiva de *Candida dubliniensis*.
- ✓ Se inoculó haciendo varias estrías profundas en el medio de cultivo, luego se hizo una estria profunda, longitudinal y se rayó encima de ésta.
- ✓ Se incubó a 27°C durante 48 hrs.
- ✓ Se cortó un pequeño fragmento del medio, en donde se apreció el desarrollo de la levadura en profundidad.
- ✓ Se colocó el fragmento en una lámina portaobjetos.
- ✓ Se adicionó una gota de azul de lactofenol y se cubrió con un cubreobjetos presionando suavemente.
- ✓ Se observó al microscopio con seco débil.
- ✓ Se reportó como abundante o escasa producción de clamidosporas.
- ✓ Las cepas de *C. dubliniensis* producen abundantes o regular cantidad de clamidosporas.
- ✓ La mayor parte de cepas de *C. albicans* no producen clamidosporas o las producen en escasa cantidad.

5. Asimilación de carbohidratos (1, 42)

- ✓ Se aislaron las colonias en agar Sabouraud después de 48 hrs. de ser incubadas a 37°C.
- ✓ Se tomaron algunas colonias idénticas.
- ✓ Se suspendieron en una ampolla de API Suspension Medium (2ml).
- ✓ La turbidez de la suspensión fue igual al patrón 2 de McFarland.
- ✓ Se abrió una ampolla de API C Medium y se transfirió unos 250 ul de la suspensión precedente.
- ✓ Se homogenizó la ampolla de API C Medium sembrada y se inoculó la galería distribuyendo 135 ul de suspensión por cúpula.
- ✓ Se incubó a 29°C ± 2°C durante 24-48 horas en una atmósfera húmeda.
- ✓ Se compararon con el control (0) y se anotaron todas las cúpulas que aparecieron con turbidez como positivos.
- ✓ Las reacciones obtenidas se codificaron en un perfil numérico.
- ✓ La identificación se obtuvo de un programa informático de identificación APIWEB, al teclear manualmente el perfil numérico.

6. Susceptibilidad por microdilución colorimétrica: Sensititre® Yeastone (43)

- ✓ Se tomaron de 1 a 2 colonias de cultivo puro de 24 hrs de incubación a 37°C.
- ✓ Se suspendieron en 5 ml de solución salina fisiológica.
- ✓ La turbidez de la solución fue igual al patrón 0.5 de McFarland.
- ✓ Se transfirieron 20 ul de la suspensión a 11 ml de caldo de inóculo YeastOne.
- ✓ Se homogenizó el caldo sembrado y se inoculó la placa Sensititre en un lapso de 15 minutos distribuyendo 100 ul de la suspensión por cúpula.
- ✓ Se cubrió la placa con las láminas adhesivas incluidas en el kit, evitando cualquier burbuja de aire.
- ✓ Se incubaron las placas durante 24 hrs a 35°C, evitando la apilación en más de 3.
- ✓ Se inoculó una placa de agar Sabouraud con 10 ul de la suspensión de caldo de inóculo YeastOne.
- ✓ Se incubó la placa de agar Sabouraud en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que las placas Sensititre.

- ✓ Un inóculo correcto produjo 15-80 colonias.
- ✓ El crecimiento de levaduras en soluciones antifúngicas se percibió como un cambio en el indicador de crecimiento colorimétrico de azul (negativo) a rojo (positivo) o incluso un ligero cambio a morado (positivo).
- ✓ La concentración mínima inhibitoria (CIM), fue la concentración más baja de agente antifúngico que inhibió sustancialmente el crecimiento del organismo que pudo detectarse por medio de un cambio de color.
- ✓ Cuando no hubo cambio en el indicador azul en ninguna dilución de agente antifúngico, no se produjo crecimiento. El organismo fue sensible a la concentración más baja de antifúngico.
- ✓ La CIM se registró como la concentración más baja de agente antifúngico que impidió el desarrollo de un pocillo de crecimiento rojo o morado.
- ✓ Cuando se observó crecimiento en todos los pocillos, el organismo fue resistente a la concentración más alta de antifúngico. El punto final de la CIM fue registrado como “mayor que” (>) la concentración más alta.

F. Análisis de la investigación

6.1 Muestreo

Se realizó un muestreo por conveniencia donde el tamaño de la muestra (n) fue de cincuenta y seis pacientes equivalente a sesenta y ocho aislamientos de *Candida* sp

La selección de los pacientes fue al azar y los criterios de inclusión que se utilizaron en el presente estudio fueron: Pacientes con candidiasis oral que asistieron a la institución mencionada.

La muestra fue tomada con asesoría médica y sembrada directamente en candida CHROMagar.

6.2 Diseño de la investigación

La determinación de *C. dubliniensis* y las otras especies de *Candida* fue basada en un análisis microbiológico fenotípico.

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva.

6.3 Diseño del estudio

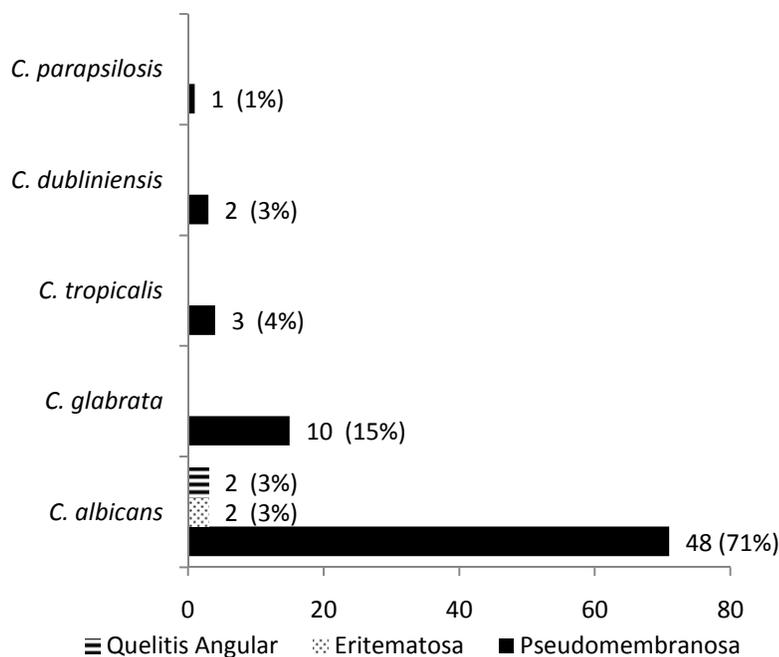
Estudio descriptivo, prospectivo en 56 casos clínicos de candidiasis.

VIII. RESULTADOS

Durante un período de cuatro meses (comprendido de abril a julio del año 2006) se procesaron muestras de raspado de la mucosa oral provenientes de 56 personas viviendo con VIH/sida (PVVS).

Los porcentajes de las principales especies del género *Candida* identificadas en el estudio de acuerdo a las manifestaciones orales de los pacientes se presentan en Gráfica 1. El 77% corresponde a *Candida albicans* siendo la levadura más aislada (52/68) seguido por 15% de *Candida glabrata* (10/68). Como pudo observarse *Candida albicans* fue el agente causal más aislado en candidiasis pseudomembranosa, eritematosa y queilitis angular. Las otras especies de *Candida* aisladas (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dublinensis* y *C. parapsilosis*) solamente fueron aisladas de aquellos pacientes que presentaron candidiasis pseudomembranosa.

Gráfica 1. Manifestaciones bucales de acuerdo a la especie de levadura aislada (N =68)



Fuente: Datos experimentales

La información demográfica de los pacientes que participaron en el estudio se encuentra en Tabla 8, en la cual se reportaron los datos de acuerdo a la especie de *Candida* aislada y a las manifestaciones orales. La media (35 años) y la mediana (32 años) de la edad de los pacientes fueron semejantes en cada especie de *Candida* aislada. El 78.6% eran hombres (44/56); el 48.2% de población procedía fuera de la capital (27/56) y el 46.4% de la ciudad capital (26/56).

El estado de los pacientes incluidos en el estudio de acuerdo a los datos recopilados en la entrevista y a los revisados en el expediente clínico de cada paciente se describe en la Tabla 9. El recuento de linfocitos se mantuvo entre 1000-2000 (valor normal 2000-4000), solo dos casos se presentaron con recuentos mayores de 3000 (3.6%). Con respecto al recuento de células CD4+/ μ l, el 69.6% era menor de 200 células (39/56) y únicamente un paciente presentó un recuento mayor a 500. El 76.8% de los pacientes (43/56) tenía cargas virales muy elevadas, por arriba de 10,000 copias HIV RNA/ml, siendo la media de 338,742 y únicamente uno (1.78%) estuvo debajo de 10,000 copias. Con respecto a la terapia antirretroviral menos del 19.6% (11/56) de la población contaba con triple terapia antirretroviral al momento del estudio, siendo zidovudina, lamivudina y efavirenz el principal tratamiento de elección.

Tabla 8. Datos demográficos de las personas viviendo con VIH/sida (PVVS) incluidos en el estudio (N= 56)

	<i>C. albicans</i> (n=52)			<i>C. glabrata</i> (n=10)	<i>C. tropicalis</i> (n=3)	<i>C. dubliniensis</i> (n=2)	<i>C. parapsilosis</i> (n=1)	Todas las especies			Total
	PSC ¹	EC ²	QA ³	PSC	PSC	PSC	PSC	PSC	EC	QA	(n = 68)
Edad (años)											
Media ± DS	34±11	45±8	31±9	37±13	41±6	23±3	32	35±11	45±8	31±9	35±11
Mediana	29	45	31	34	41	23	32	32	45	31	32
Rango	10-69	37-53	22-40	13-69	32-51	20-26	N/A ⁴	10-69	37-53	22-40	10-69
Género (%)											
Femenino	11 (21.2)	--	1 (1.9)	2 (20.0)	0 (0.0)	--	0 (0.0)	13(19.1)	0(0.0)	1(1.5)	14(20.6)
Masculino	37 (71.2)	2 (3.8)	1 (1.9)	8 (80.0)	3 (100.0)	2 (100.0)	1 (100.0)	51(75.0)	2(2.9)	1(1.5)	54(79.4)
Procedencia (%)											
Fuera de la capital	22 (42.3)	--	1 (1.9)	5 (50.0)	2 (66.7)	2 (100.0)	1 (100.0)	32 (47.1)	--	1 (1.5)	33(48.6)
Ciudad capital	23 (44.2)	2 (3.8)	1 (1.9)	4 (40.0)	1 (33.3)	--	--	28 (41.2)	2 (2.9)	1 (1.5)	31(45.6)
Desconocido	3 (5.8)	--	--	1 (10.0)	--	--	--	4 (5.9)	--	--	4(5.9)

Fuente: Datos experimentales

¹PSC= candidiasis pseudomembranosa, ²EC= candidiasis eritematosa, ³QA= candidiasis quelitis angular, ⁴N/A= no aplica

* Las columnas carentes de datos, fueron excluidas de la tabla

Tabla 9. Características clínicas de las 56 personas viviendo con VIH/sida (PVVS) que participaron en el estudio

	<i>C. albicans</i> (n=52)			<i>C. glabrata</i> (n=10)	<i>C. tropicalis</i> (n=3)	<i>C. dubliniensis</i> (n=2)	<i>C. parapsilosis</i> (n=1)	Todas las especies			Total (n = 68)
	PSC ¹	EC ²	QA ³	PSC	PSC	PSC	PSC	PSC	EC	QA	
Recuento de Linfocitos/mm³											
Media	1,028	905	1,532	1,181	1,047	1,769	1,911	1,092	905	1,532	1176
No. Personas (%) 100-1000	23 (44.2)	1 (1.9)	--	5 (50.0)	1 (33.3)	--	--	29(42.6)	1 (1.5)	--	30(44.1)
1000-3000	18 (34.6)	1 (1.9)	1 (1.9)	1 (10.0)	2 (66.7)	2 (100.0)	1 (100.0)	24 (35.3)	1 (1.5)	1 (1.5)	26(38.3)
>3000	1 (1.9)	--	--	1 (10.0)	--	--	--	2 (2.9)	--	--	2(2.9)
NSS ⁴	6 (11.5)	--	1 (1.9)	3 (30.0)	--	--	--	9 (13.2)	--	1 (1.5)	10(14.7)
Células T CD4+/μl											
Media	100	44	428	91	48	186	92	100	44	428	191
No. Personas (%) <200	35 (67.3)	2 (3.8)	1 (1.9)	6 (60.0)	3 (100.0)	1 (50.0)	1 (100.0)	46 (67.6)	2 (2.9)	1 (1.5)	49(72)
200-500	5 (9.6)	--	--	1 (10.0)	--	1 (50.0)	--	7 (10.3)	--	--	7(10.3)
> 500	1 (1.9)	--	1 (1.9)	--	--	--	--	1 (1.5)	--	1 (1.5)	2(3)
NSS	7 (13.5)	--	--	3 (30.0)	--	--	--	10 (14.7)	--	--	10(14.7)
Carga viral (copias HIV RNA/ml)											
Media	362,372	165,600	395,000	1,203,817	58,000	128,640	282,000	455,627	165,600	395,000	338742
No. Personas (%) < 10,000	1 (1.9)	--	--	--	--	--	--	1 (1.5)	--	--	1(1.5)
≥10,000	36 (69.2)	2 (3.8)	2 (3.8)	7 (70.0)	1 (33.3)	2 (100.0)	1 (100.0)	47 (69.1)	2 (2.9)	2 (2.9)	51(74.9)
NSS	11 (21.2)	--	--	3 (30.0)	2 (66.7)	--	--	16 (23.5)	--	--	16(23.5)
No. Pacientes en terapia antirretroviral (%)											
AZT ⁵ + 3TC ⁶ + EFV ⁷	5 (9.6)	--	1 (1.9)	1 (10.0)	1 (33.3)	--	--	7 (50.0)	--	1 (7.1)	8(57.1)
D4T ⁸ + 3TC + EFV	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
D4T + 3TC + NVP ⁹	4 (7.7)	--	--	--	--	--	--	4 (28.6)	--	--	4(28.6)
HAART ¹¹	1 (1.9)	--	--	--	--	--	--	1 (7.1)	--	--	1(7.1)
Otro	1 (1.9)	--	--	--	--	--	--	1 (7.1)	--	--	1(7.1)

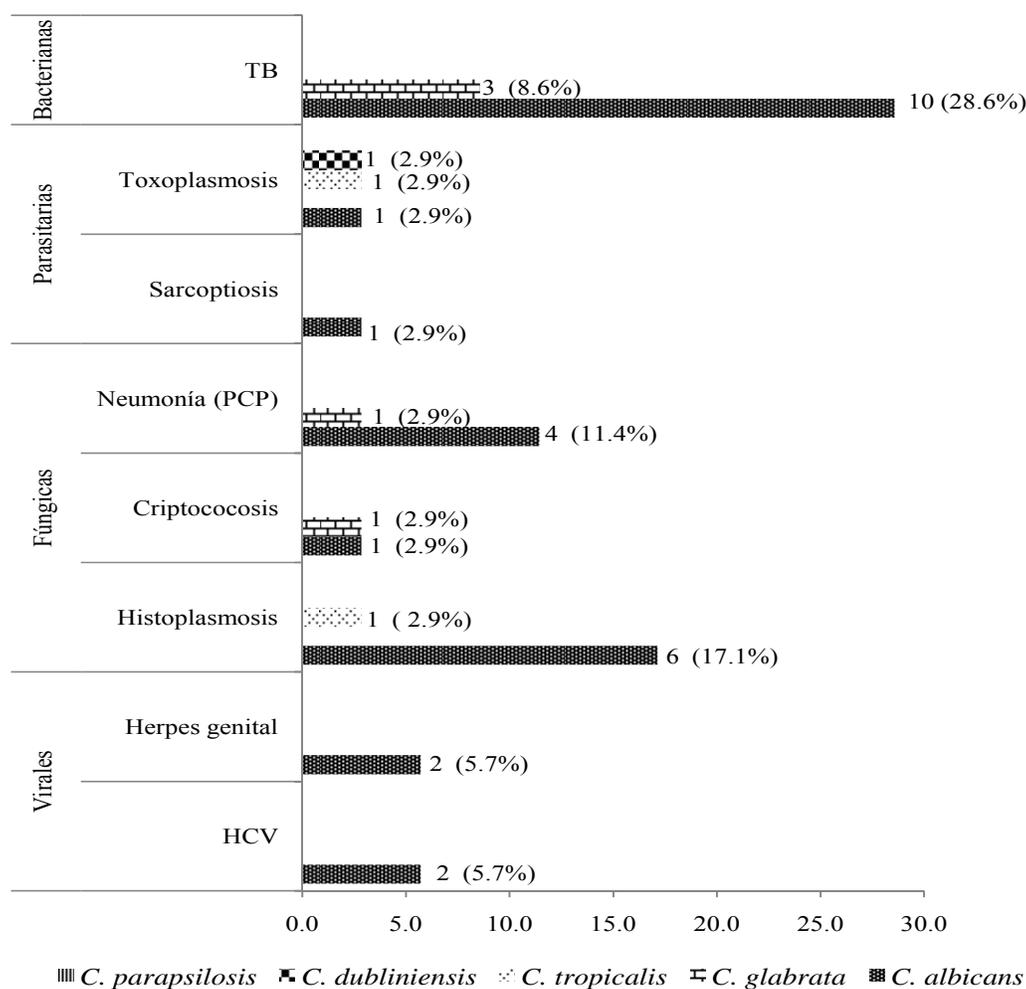
Fuente: Datos experimentales

¹PSC= candidiasis pseudomembranosa, ²EC= candidiasis eritematosa, ³QA= candidiasis quelitis angular, ⁴NSS= no se sabe, ⁵AZT= zidovudina, ⁶3TC= lamivudina, ⁷EFV= efavirenz, ⁸D4T= estavudina, ⁹NVP= neviraparina,¹⁰HAART= tratamiento antirretroviral altamente activo

* Las columnas carentes de datos, fueron excluidas de la tabla

Las coinfecciones observadas fueron clasificadas como fúngicas, bacterianas, virales y parasitarias (Gráfica 2). Las coinfecciones más frecuentes fueron las fúngicas: 20% de histoplasmosis (7/35), 5.7% de criptococosis (2/35) y 14.3% por *P. jiroveci* (5/35). La coinfección bacteriana, más frecuente fue la tuberculosis (13/35, 37.1%). Además pudo observarse que en *Candida albicans* se manifestaron otras coinfecciones virales y en el caso de *Candida glabrata* la tuberculosis fue la coinfección que predominó.

Gráfica 2. Coinfecciones presentadas por las personas viviendo con VIH/sida (PVVS) que participaron en el estudio (N = 56)

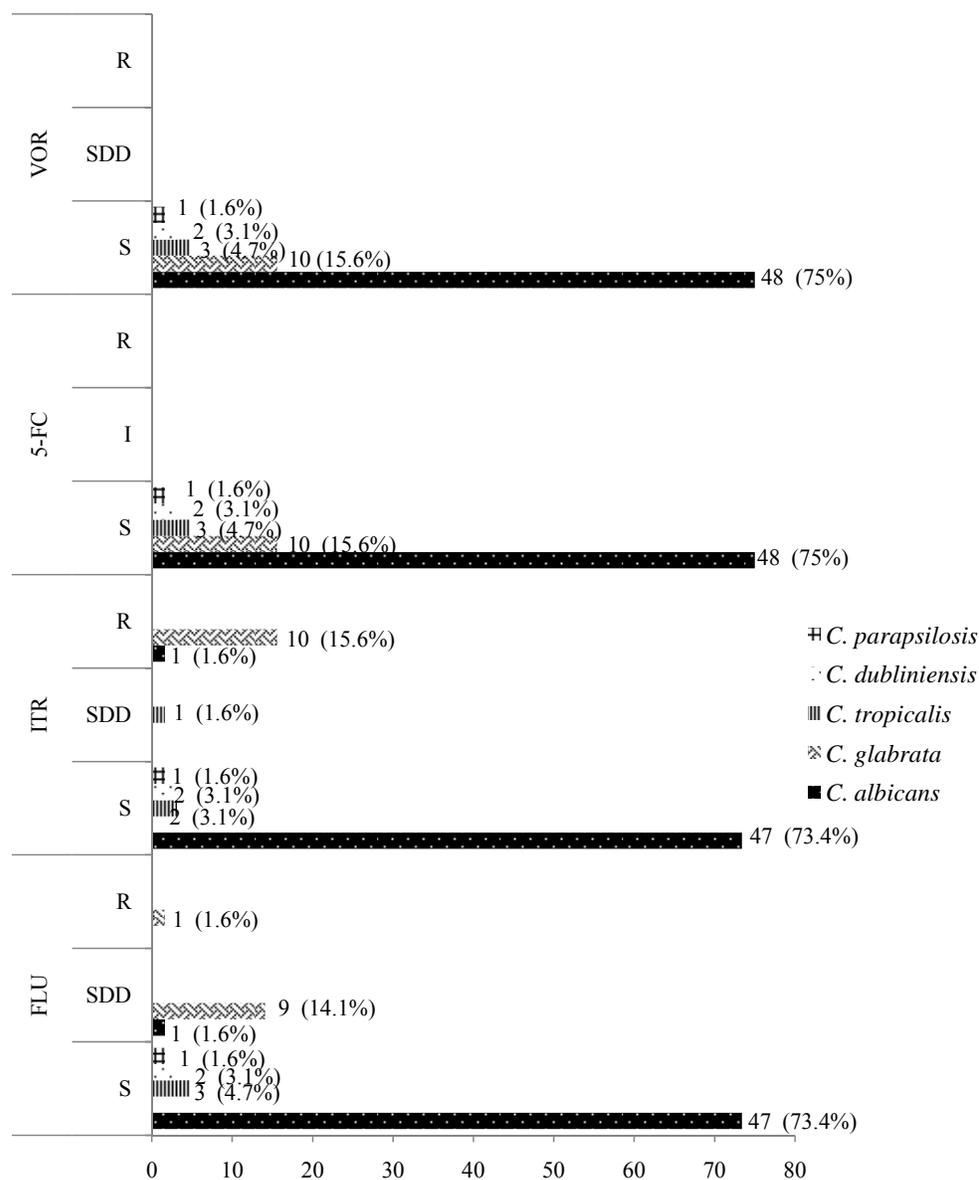


Fuente: Datos experimentales

HCV= hepatitis C, PCP= *Pneumocystis jiroveci*, TB= tuberculosis

En la Gráfica 3 puede observarse el perfil de susceptibilidad antifúngica de los aislamientos. Los aislamientos de *C. glabrata* presentaron el 1.6% de resistencia a fluconazol (FLU) (1/64) y el 15.6% a itraconazol (ITR) (10/64), en tanto que los de *C. albicans* solamente presentaron el 1.6% de resistencia a ITR (1/64). Ninguna de las otras especies de *Candida* presentó resistencia a los antifúngicos ensayados. Todas las especies estudiadas fueron susceptibles a voriconazol y 5-fluorocitosina. El 14.1% de los aislamientos de *Candida glabrata* (9/64) y el 1.6% de los de *C. albicans* (1/64) presentaron susceptibilidad a FLU dependiendo de la dosis. El 1.6% de los aislamientos de *C. tropicalis* (1/64) fueron susceptibles a ITR dependiendo de la dosis.

Gráfica 3. Susceptibilidad antifúngica de los aislamientos de *Candida* provenientes de las personas viviendo con VIH/sida (PVVS) (N=64)



Fuente: datos experimentales

FLU= fluconazol, ITR= itraconazol, 5 FC= 5-fluorocitosina, VOR= voriconazol, S= sensible, SDD=sensible dependiente de la dosis, R=resistente, I=intermedio

IX. DISCUSION

En el grupo de pacientes en estudio se aisló en forma predominante 77% de *C. albicans* (52/68), seguido por 15% de *C. glabrata* (10/68), 4% de *C. tropicalis* (3/68), 3% de *C. dubliniensis* (2/68) y el 1% de *C. parapsilosis* (1/68). Fueron identificadas por primera vez en Guatemala dos cepas de *C. dubliniensis* (3%) provenientes de la mucosa oral mediante pruebas fenotípicas, aunque solo con pruebas genotípicas podría confirmarse esta nueva especie con base en la especificidad que poseen las pruebas moleculares.

Los datos obtenidos son consistentes con un estudio en África del Sur, en el que se obtuvieron 78.6% de aislamientos de *C. albicans* y 21.4% de otras especies de *Candida*. En este estudio las especies de *Candida* no *albicans* aisladas fueron *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* (44). Especies que también fueron aisladas en esta investigación con excepción de *C. krusei* la cual no fue aislada en ninguno de los participantes. En un estudio semejante llevado a cabo en México se reportó que *C. glabrata* fue la especie de *Candida* no *albicans* más frecuentemente aislada en la infección oral de los pacientes con sida (18.7%), seguida por *C. tropicalis* (5.9%) (3). Estos datos son similares a los obtenidos en el presente estudio.

No se poseen registros epidemiológicos confiables en cuanto a la presencia de la candidiasis oral en pacientes VIH positivos de Guatemala. Estudios en otros países señalan que las variantes clínicas de candidiasis eritematosa y atrófica aguda son las más frecuentes, seguida por las formas pseudomembranosa y queilitis angular, la variante hiperplásica es la menos común (45, 46).

En un estudio llevado a cabo en Venezuela se observó que la forma más común fue la pseudomembranosa seguida por la forma hiperplásica y la queilitis angular siendo la forma eritematosa la menos frecuente contrario a lo encontrado en este estudio (47). Se observó que la candidiasis pseudomembranosa (PSC), mejor conocida como muguet fue la predominante, seguida por la forma eritematosa (EC) y queilitis angular (QA). Estos resultados son semejantes con los de Venezuela excepto en el caso de la forma eritematosa que fue la menos frecuente en dicho país. Algunas publicaciones recientes han evidenciado que la candidiasis

eritematosa suele ser la forma más frecuentemente subdiagnosticada en las manifestaciones orales del VIH (48).

Como en otros países del mundo, en Guatemala los pacientes con sida que manifiestan infecciones orales causadas por *Candida* tienden a ser adultos jóvenes económicamente activos en su mayoría varones (44/56, 78.6%) (49), por lo que el género femenino corre el riesgo de ser contagiado por su pareja sexual, la pandemia del sida se expande más y por consecuencia la presentación de candidiasis oral.

La candidiasis oral es la infección oportunista más común observada en PVVS ya que se ha encontrado en pacientes con un recuento de células CD4+ incluso de 400; más del 90% de estas personas han sufrido un episodio de candidiasis oral durante el transcurso del desarrollo del sida y se considera un importante marcador de progresión de la infección viral; datos similares a los de la presente investigación (50, 51). Aunque en su mayoría los pacientes de este estudio poseían recuentos bajos de linfocitos ($<2,000/\text{mm}^3$), recuento de células CD4+/ μl disminuido y la carga viral aumentada. A este hecho también se le atribuye el alto porcentaje de aislamientos de *Candida no albicans* que generalmente pueden estar colonizando la cavidad oral en personas que no poseen VIH y se convierten en potenciales patógenos cuando hay supresión de la inmunidad de la mucosa oral (52).

La carga viral es reducida por la utilización de terapia antirretroviral (ARV) y favorece el proceso de reconstitución inmune. Recientes datos experimentales han mostrado que algunas moléculas antirretrovirales relacionadas a los inhibidores de proteasas también pueden interferir en la infección por *Candida* mediante inhibición de proteasas fúngicas secretorias. Algunas de estas enzimas son similares a las proteasas del VIH y se ha demostrado que poseen un papel patogénico en la invasión de las mucosas (3). A diferencia de la mayoría de pacientes incluidos en este estudio (45/56,80%) no poseía ningún tratamiento antirretroviral y solamente uno de ellos había sido incluido en la terapia antirretroviral altamente activa (HAART). La ausencia de tratamiento antirretroviral respondió al hecho de que era la primera vez que estos pacientes VIH positivos visitaban la Clínica Familiar por manifestar diversas sintomatologías asociadas (52).

Las coinfecciones más observadas en este estudio fueron las infecciones fúngicas debidas a: *H. capsulatum*, *C. neoformans* y *Pneumocystis jiroveci*, seguidas por las coinfecciones bacterianas, principalmente *M. tuberculosis*. Sobre estos datos se posee un subregistro en Guatemala por ello no se mencionan los datos regionales. Sin embargo, en una revisión llevada a cabo en Venezuela se encontró coinfección en 43 de los 419 pacientes en estudio con sida; los cuales presentaban diagnóstico de enfermedad micótica profunda tales como histoplasmosis, criptococosis, paracoccidioidomicosis y candidiasis sistémica (53). Estos datos son semejantes a los hallazgos de esta investigación con excepción de la paracoccidioidomicosis y la candidiasis sistémica, las cuales no fueron observadas.

Los tratamientos tópicos sugeridos para casos leves y moderados de candidiasis eritematosa y pseudomembranosa incluyen nistatina en suspensión oral o bien la utilización de óvulos de nistatina. En casos severos se recomienda la utilización de fluconazol o itraconazol. Estos dos últimos medicamentos deben reservarse para aquellos casos en los que haya fallado el tratamiento tópico con nistatina. La acción sistémica del fluconazol y del itraconazol pueden retrasar el diagnóstico de otras enfermedades fúngicas sistémicas como la criptococosis y la histoplasmosis (54).

En cuanto a susceptibilidad se pudo determinar que *C. glabrata* presentó resistencia a fluconazol (FLU) e itraconazol (ITR) en tanto que *C. albicans* solamente presentó resistencia a ITR. Estos resultados son semejantes a los reportados en un estudio en México en el que se encontró resistencia a itraconazol en los aislamientos de *C. albicans* y *C. glabrata* (8.1% y 20%, respectivamente) (3). En dicho estudio también se observó resistencia de *C. glabrata* a fluconazol (5.7%). Algunos reportes indican que *C. glabrata* puede presentar resistencia intrínseca a los azoles y los factores asociados a ello incluyen la exposición previa y recuentos de células CD4+ bajos. Además se ha descrito que en general las especies de *Candida* no *albicans* pueden presentar fácilmente resistencia a los azoles (3, 48).

Ninguna de las otras especies presentó resistencia a los antifúngicos ensayados. Solamente presentaron susceptibilidad dependiendo de la dosis a FLU *Candida glabrata* y *C. albicans* y el 1.6% (1/68) de *C. tropicalis* mostró susceptibilidad a ITR dependiendo de la dosis. En general, los patrones de susceptibilidad de los aislamientos guatemaltecos no difieren

de aquellos obtenidos en México, Estados Unidos y Canadá. Sin embargo, se observa mayor número de cepas susceptibles incluso más que en los aislamientos mexicanos, probablemente porque la mayoría de los pacientes eran tratados por primera vez con los medicamentos evaluados (3, 55).

A pesar de que varios estudios han dado mucha importancia al aislamiento de *C. dubliniensis* por ser la nueva especie de *Candida* asociada a candidiasis oral en PVVS, ninguna de las cepas aisladas de esta especie mostró resistencia. Los datos obtenidos son semejantes a los obtenidos en Irlanda en donde se demostró que esta especie posee susceptibilidad inherentemente a los antifúngicos comúnmente utilizados y su resistencia se presenta cuando se induce por la exposición a la droga (56).

En conclusión, puede mencionarse que este estudio es el primer registro donde se describen a las diferentes especies de *Candida* en personas que viven y conviven con el VIH/sida en Guatemala con sus perfiles de susceptibilidad a los antifúngicos y en el cual se reporta la nueva especie de *Candida* (*C. dubliniensis*) asociada a esta infección en dicho país, la cual fue identificada con pruebas fenotípicas. Además de reportarse la Candidiasis pseudomembranosa, como el tipo de manifestación oral predominante en los participantes de la presente investigación.

X. CONCLUSIONES

1. La candidiasis oral fue la infección oportunista comúnmente observada en las personas que participaron en el estudio.
2. Se manifestó en adultos jóvenes, en su mayoría varones (44/56, 78.6%) procedentes tanto del área urbana como rural. La mayoría de los pacientes presentaron recuentos de células CD4+/ μ l disminuidos y carga viral aumentada, por lo que se considera *Candida* como marcador de inmunosupresión.
3. La candidiasis pseudomembranosa fue predominante, seguida por la eritematosa y quelitis angular; lo cual es semejante a lo reportado en Venezuela excepto por la forma eritematosa que fue la menos frecuente en dicho país.
4. Los porcentajes de aislamientos de *C. albicans* (52/68, 77%), *C. glabrata* (10/68, 15%), *C. tropicalis* (3/68, 4%), *C. dubliniensis* (2/68, 3%) y *C. parapsilosis* (1/68, 1%) provenientes de la mucosa oral semejantes a los encontrados y los reportados en África del Sur y México.
5. Los aislamientos de *C. glabrata* presentaron resistencia a fluconazol (FLU) (1/68, 1.6%) e itraconazol (ITR) (10/68, 15.6%) en tanto que *C. albicans* solamente presentó resistencia a ITR (1/68, 1.6%), datos semejantes a los reportados en México. Ninguna de las otras especies presentó resistencia.
6. Las coinfecciones fúngicas (14/35, 40.1%): *H. capsulatum* (7/35, 20%), *C. neoformans* (2/35, 5.8%) y *Pneumocystis jiroveci* (5/35, 14.3%); seguidas por las coinfecciones bacterianas principalmente *M. tuberculosis* (13/35, 37.2%) semejan a los datos reportados en Venezuela.

7. En general, el presente estudio fue el primer registro en el que se describen a las diferentes especies de *Candida* en personas que viven con VIH/sida en Guatemala y donde se documenta la resistencia de *C. glabrata* a itraconazol y fluconazol además de reportar por primera vez la especie *C. dubliniensis* asociada a candidiasis oral en PVVS.

XI. RECOMENDACIONES

1. Confirmar las levaduras aisladas especialmente *C. dublinensis* y *C. albicans* con pruebas moleculares.
2. Realizar una comparación de susceptibilidad de aislamientos de especies de *Candida* mediante el método comercial y el método de referencia de susceptibilidad antifúngica de dilución en caldo de levaduras, del Comité Norteamericano de Estándares en Laboratorios Clínicos –NCCLS- (actualmente CLSI)
3. Verificar los cambios en la microbiota oral y los perfiles de resistencia de las levaduras aisladas en PVVS.

XII. REFERENCIAS

1. Ellepola ANB, *et al.* Rapid and Unequivocal Differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* Species Using Species-specific DNA Probes: Comparison with Phenotypic Identification Methods. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 379-388.
2. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 329–334.
3. Sánchez LO, *et al.* Point Prevalence, Microbiology and Antifungal Susceptibility Patterns of Oral *Candida* Isolates Colonizing or Infecting Mexican HIV/AIDS Patients and Healthy Persons. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 83-92.
4. Pendland SL. Fungal Infections: Antifungal Agents. *Pharmacotherapy-A Pathophysiologic Approach*. Third edition. Chapter 113, 1997; (2251-2279p.)
5. Coleman D, *et al.* Candidiasis: The Emergence of a Novel Species, *Candida dubliniensis*. *Official J Internat Aids Society* 1997; 11(5): 557-567.
6. Rubio-Calvo C, *et al.* Detection of *Candida dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus - infected Patient in North America by Primary CHROMagar *Candida* Screening and Susceptibility Testing of Isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3007-3010.
7. Sullivan D, *et al.* *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and Molecular Characterization of a Novel Species Associated with Oral Candidosis in HIV-infected Individuals. *Microbiology* 1995; 141: 1507-1521.
8. Sullivan D, *et al.* Widespread Geographic Distribution of Oral *Candida dubliniensis* Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 960–964.

9. Martinez M. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis Treated with Fluconazole. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3135–3139.
10. Tapia, C. Susceptibilidad Antifúngica de *Candida albicans* Recuperadas de Pacientes con SIDA y Candidiasis Orofaringea y Esofágica. Experiencia con Etest. *Rev Med Chile* 2003; 131(5).
11. Aguirre JM. Candidiasis Orales. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 17-21.
12. Prieto LM. Candidiasis Oral en Pacientes Seropositivos al VIH y Casos SIDA. Aspectos Clínicos, Micológicos y Terapéuticos. *Rev Cubana Med Trop* 2006; 58(3).
13. Pardi G, Cardozo EI. Algunas Consideraciones sobre *Candida albicans* como Agente Etiológico de Candidiasis Bucal. *Acta Odont Venezolona* 2005; 43(1).
14. Puerto JL. *et al.* Candidiasis Orofaríngea. *Rev Diag Biol. Madrid: Editorial Siglo,* 2001. 50(4).
15. Delgado W, Aguirre JM. Las Micosis Orales en la Era del Sida. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 14-22.
16. Kulak Y, Arikan A. Existence of *Candida albicans* and Microorganisms in Denture Stomatitis Patients. *J Oral Rehabil* 1997; 24(10): 788-90.
17. Kontoyiannis D, Lewis R. Antifungal Drug Resistance of Pathogenic Fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135–1144.
18. Procop GW, Roberts GD. Emerging Fungal Diseases: The Importance of the Host. *Clin Lab Med* 2004; 24: 691-719.

19. Hajjeh R, *et al.* Incidence of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species and *In Vitro* Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1519-1527.
20. Jabra-Rizk M. Identification of *Candida dubliniensis* in a Prospective Study of Patients in the United States. *J Clin Microbiol* 1999; 37(2): 321–326.
21. Pemán García J. Mecanismos de Resistencia Antifúngica en Levaduras. *Soc Esp Quimioter* 2000; 100p
22. Lumbreras C, Lizasoain M, Aguado JM. Antifúngicos de Uso Sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(7): 366-380.
23. Rodríguez J, Almagro M, Fonseca E. Aspectos Clínicos y Terapéuticos de las Candidosis Mucocutáneas. *Salud Rural* 2003; 20(4).
24. Bouza E, *et al.* Antifúngicos; Criterios de uso Racional y Guía Práctica Terapéutica. Módulo 2. Madrid: Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Zaragoza: Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, 2001.
25. Pérez J. Nuevos Azoles: Voriconazol. *Revi Mico* 2007; 28: 45-50.
26. Barnett , *et al.* Yeasts characteristics and identification. Cambridge University Press. New York, 1990.
27. Kirkpatrick W, *et al.* Growth Competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under Broth and Biofilm Growing Conditions. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 902-904.

28. Gatica JL, *et al.* Utilidad del Agar Cromocandida para el Diagnóstico Diferencial de *Candida* spp Aisladas de Muestras Vaginales. Rev Chil Obstet Ginecol 2002; 67(4): 300-304.
29. Mosca C, *et al.* Casein Agar: a Useful Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2002; 41(3): 1259.
30. Gales AC, *et al.* Identification of *Candida dubliniensis* Based on Temperature and Utilization of Xylose and Alfa- Methyl-D-Glucoside as Determined with de API 20C AUX and Vitek YBC Systems. J Clin Microbiol 1999; 37(12): 3804-3808.
31. Pincus DH, *et al.* Rapid Identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3533-3539.
32. Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Pruebas Estandarizadas para el Estudio de la Sensibilidad a los Antifúngicos. Rev Iberoam Micol 2001; ISBN: 84-607-3050-6.
33. Tapia C, León E, Palavecino E. Susceptibilidad Antifúngica de Levaduras Mediante Etest®. Comparación de 3 Medios. Rev Méd Chile 2003; 131(3).
34. Méndez J, Herrera M. Métodos de Susceptibilidad Antifúngica. Revisión Metodológica. Rev Méd Chile 2001; 36 (1-2)
35. Martín E. Métodos de Estudio de la Sensibilidad *in vitro* de Levaduras. Soc Esp Quimioter 2000; 100p.
36. Silva MRR, *et al.* Evaluation of Etest and Macrodilution Broth Method for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* sp Strains Isolated from Oral Cavities of Aids Patients. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2002; 44(3): 121-125.

37. Pfaller MA, Barry AL. Evaluation of a Novel Colorimetric Broth Microdilution Method for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Isolates. *J Clin Microbiol* 1994; 32(8): 1992-1996.
38. Jeong Hwan Shin, *et al.* Evaluation of a Colorimetric Antifungal Susceptibility Test by Using 2,3-Diphenyl-5-Thienyl-(2)-Tetrazolium Chloride. *Anti Agents Chemo* 2004; 48(11): 4457-4459.
39. Ramage G, Biofilm Formation of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3234-3240.
40. Kirkpatrick W, *et al.* Detection of *Candida dubliniensis* Oropharyngeal Samples from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in North America by Primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 3007-3012.
41. Logemann HE. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, 1995.
42. BioMérieux, Inc. ID 32 C, Sistema de Identificación de Levaduras. Durham, NC, USA. 07990F-ES-2004/11.
43. Trek Diagnostic Systems. Yeastone. Imberhorne Lane, East Grinstead, West Sussex, England. YST04_V1.2
44. Patel M, *et al.* Effect of Antifungal Treatment on the Prevalence of Yeasts in HIV-Infected Subjects. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1279-1284.
45. Samaranayake LP, *et al.* Oral Candidiasis and Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 554-564.

46. Syrjanen S, *et al.* Oral *Candida* Infection as Sign of HIV Infection in Homosexual Men. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 65: 36-40.
47. Oliver M, *et al.* Serotipos de *Candida albicans* Aislados en Pacientes VIH Positivos. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 204-207.
48. Reznik DDS, David A. Perspective: Oral Manifestations of HIV Disease. *IAS-USA* 2005; 13(5): 143-148.
49. Samayoa B, Arathoon E, *et al.* The Emergente of AIDS in Guatemala: Impatient Experience at the Hospital General San Juan de Dios. *International J STD & AIDS* 2003; 14: 810-813.
50. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. London: Blackwell Scientific Publications, 1993.
51. Flores Z, *et al.* Candidiasis Esofágica en Pacientes con SIDA. Estudio Clínico y Microbiológico. *Rev Cubana Med Trop* 1997; 50(2): 110-114.
52. Gottfredsson M, *et al.* Association of Plasma Levels of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA and Oropharyngeal *Candida* Colonization. *J Infect Dis* 1999; 180: 534-537.
53. Fernández R, Mandel S. Micosis Profundas en Pacientes con SIDA. *Rev Soc Ven Microbiol* 1990; 17.
54. Salazar A, *et al.* Guía de Tratamiento Antirretroviral y de Infecciones Oportunistas en Guatemala. *Progr Nac ITS, VIH y SIDA*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública, 2006.
55. Pfaller MA, *et al.* International Surveillance of Bloodstream Infections due to *Candida* Species: Frecuency of Ocurrence and Antifungal Susceptibilities of Isolates Collected in 1997 in the United States, Canada and South America for the SENTRY Program. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1886-1889.

56. Moran G, *et al.* Antifungal Drug Susceptibilities of Oral *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected and Non-HIV-Infected Subjects and Generation of Stable Fluconazole-Resistant Derivatives in Vitro. *Anti Agents Chemo* 1997; 41(3): 617-623.

XIII. ANEXOS

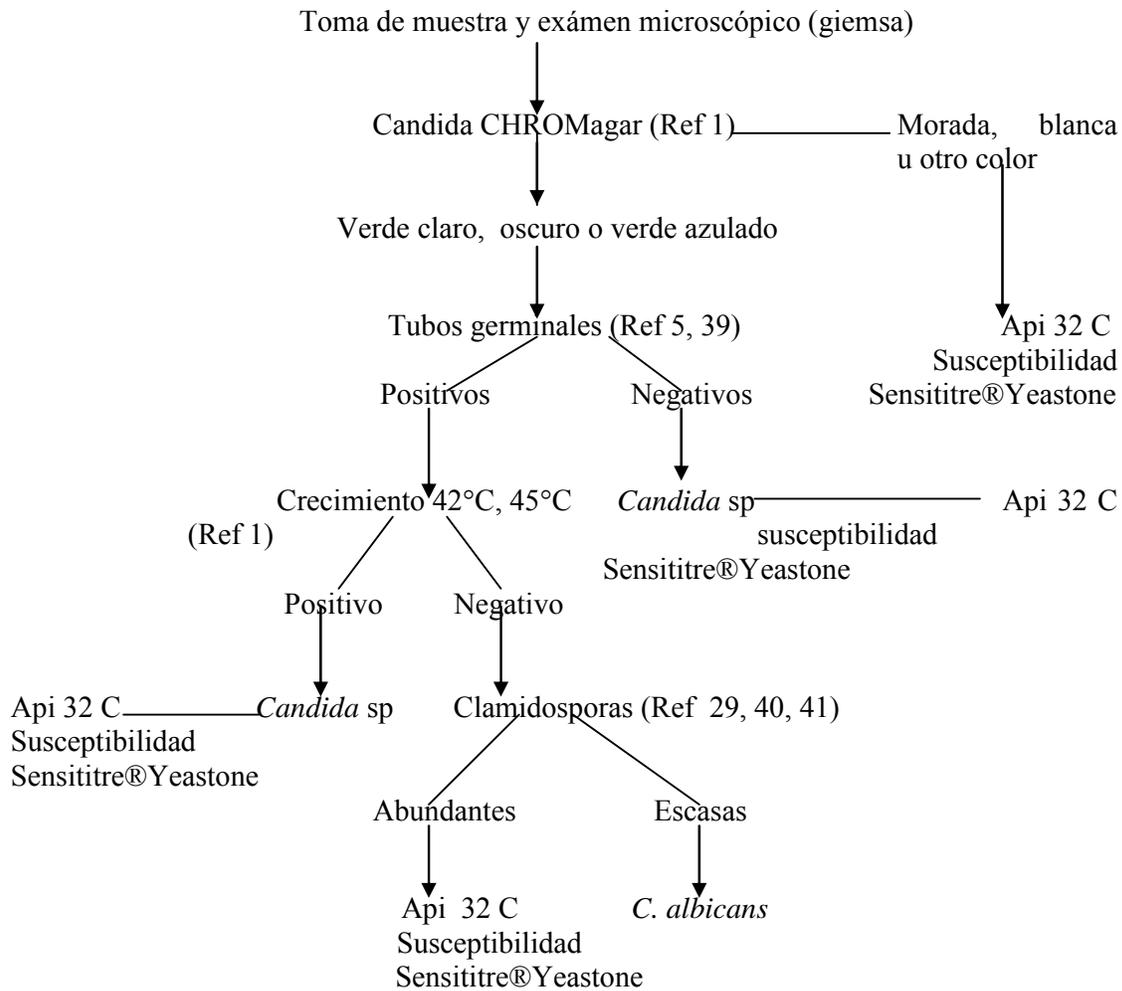
Anexo 1

Mecanismo de acción y espectro de los principales antifúngicos

Antifúngico	Mecanismo(s) de Acción	Espectro/Comentarios
Polienos		
Anfotericina B	Interacción con ergosterol, intercalación de membrana antifúngica, incremento de la permeabilidad de la membrana a cationes univalentes y divalentes, muerte celular	Resistencia primaria y secundaria rara vez ha sido reportada por levaduras ((<i>Trichosporon beigelli</i> , <i>Candida lusitanea</i> , y <i>C. guilliermondii</i>)
Anfotericina B, fórmulas lipídicas		Similar a anfotericina desoxicolato, la frecuencia de nefrotoxicidad es más baja con formulaciones lipídicas.
Fluoropirimidinas		
5-fluorocitosina	Impide la síntesis de ADN/ARN del hongo	Activa contra <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i> spp. Rápida aparición de resistencia secundaria en <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i> por uso estricto de 5-FC como monoterapia.
Azoles		
Cetoconazol	Inhibición de la enzima P450 14 α -desmetilasa del citocromo, acumulación de lanosterol dirigido a la perturbación de la membrana celular fúngica, efecto fungistático	Absorción oral pobre e interacciones de drogas son razones comunes para la resistencia clínica. Interferencia con biosíntesis de esteroides humanos.
Fluconazol	Igual a cetoconazol, pero su inhibición es más selectiva de la enzima	Activa contra la mayoría de <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i> spp. No activa contra hongos invasores. Resistencia primaria es común con algunas <i>Candida</i> spp, particularmente <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> . Resistencia secundaria ha sido vista en <i>C. albicans</i> en aquellos pacientes con SIDA y con un cuadro de candidiasis oral.
Itraconazol	Similar a fluconazol	Actividad mejorada a comparación de fluconazol en hongos invasores. Así como cetoconazol pobre absorción e interacción de la droga son causa común de resistencia clínica. Resistencia cruzada puede ser apreciada con fluconazol.
Voriconazol	Similar a fluconazol	Como itraconazol más activo que fluconazol contra hongos invasivos. Resistencia cruzada con fluconazol?
Posaconazol	Similar a fluconazol	Más activo que itraconazol contra hongos invasivos. Absorción oral e interacciones de la droga son fuentes potenciales de resistencia clínica. No aplica para fórmula intravenosa.
Equinocandinas		
Caspofungina	Inhibición de la síntesis del glucano de la pared celular, dirigido a la susceptibilidad de la pared celular a lisis osmótica	Fungicida contra <i>Candida</i> spp incluyendo especies resistentes a los azoles. Menor actividad contra <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. guilliermondii</i> .

Kontoyiannis D, Lewis R. Antifungal Drug Resistance of Pathogenic Fungi. Lancet 2002; 359: 1135–1144.

Anexo 2



	Xilosa	Lactato	Acetilglucosamina	Glucosamina	Beta Glucosidasa	Trehalosa
<i>C. dubliniensis</i>	Neg	Neg	+/-	+/-	Neg	+/-
<i>C. albicans</i>	+/-	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

Kirkpatrick W, *et al.* Growth Competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under Broth and Biofilm Growing Conditions. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 902-904.

Anexo 3

Estudio Sobre Determinación de *Candida dubliniensis* en Personas Viviendo con VIH/SIDA que Acuden a la Clínica Familiar “Luis Angel García” del Hospital General San Juan de Dios
Fecha de impresión 23/01/06
Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica
Tesisista: Wendy Paiz

Identificación _____
Fecha _____
Encuestados: Pacientes de la Clínica Familiar “Luis Angel García”
Tipo de encuestas: Preguntas Abiertas
Entrevistador: WMPM

La presente encuesta se realiza con el fin de determinar la presencia de Candidiasis Oral.

1. Género: ___F ___M 2. Edad: _____ años 3. Procedencia: _____
4. Motivo de consulta: _____
5. Sitio anatómico de la muestra: ___ Cavidad Oral ___ Otro _____ especifique
6. Pacientes con Candidiasis Oral: ___ Pseudomembranosa ___ Eritematosa ___ Hiperplásica
7. Paciente con odinofagia: ___ Si ___ No
8. Cuadro clínico de Candidiasis oral presentado anteriormente: ___ Si _____ fecha(s) ___ No
9. Tratamiento antifúngico preventivo: ___ Si, _____ cuál ___ No
- a) Fluconazol b) Anfotericina B c) Nistatina d) Clotrimazol
e) Miconazol f) Ketoconazol g) Itraconazol
- Especifique cuando: ___ Hace < 2 años ___ Hace >2 años
10. Tratamiento antifúngico por candidiasis oral: ___ Si, _____ cuál ___ No
- a) Fluconazol b) Anfotericina B c) Nistatina d) Clotrimazol
e) Miconazol f) Ketoconazol g) Itraconazol
- Especifique cuando: ___ 0-6 meses ___ 6-12 meses
11. Fecha de diagnóstico de VIH: _____
12. Fecha de diagnóstico de SIDA: _____
13. Recuento de células CD4+: ___ Si _____ valor ___ No
14. Recuento de linfocitos, especifique recuento absoluto: _____
15. Carga viral: ___ Si _____ valor _____ fecha ___ No
16. Tratamiento antirretroviral ___ Si _____ cuáles

17. Enfermedades oportunista, especifique cuales:

2. _____

4. _____

1. _____

3. _____

5. _____

18. Enfermedades subyacentes, especifique cuales:

2. _____

4. _____

1. _____

3. _____

5. _____

Wendy del Milagro Paiz Méndez

AUTORA

Licda. Blanca Samayoa, QB, MSPH

ASESORA

Licda. Sandra Lima

COASESORA

Licda. Vivian Matta, QB, MSc

Revisora

Licda. Amanda Gálvez

Revisora

Licda. Vivian Matta, QB, MSc

Directora Escuela de Química Biológica

Lic. Oscar Cobar, Ph.D.

Decano