

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Comparación del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método SENSITITRE® YEASTONE® para la determinación de la susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* en pacientes VIH”

Informe de Tesis

Presentado por

Clara Luisa María Calderón Sierra

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, julio del 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Comparación del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método SENSITRE® YEASTONE® para la determinación de la susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* en pacientes VIH”

Clara Luisa María Calderón Sierra

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, julio del 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fayver Manuel de León Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela Córdova Audón	Vocal V

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen, por darme mucha salud y la oportunidad de vivir, por iluminar mi mente y por haber puesto en mí camino a todas aquellas personas que han sido mi apoyo y compañía durante todo el tiempo de estudio.

A mis padres, Azucena y Estuardo, por ser un pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo, sus consejos, sus valores y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor, hoy pueden ver alcanzada mi meta.

A mi abuelita, por creer en mí, por quererme mucho y porque siempre me apoyaste y estuviste en todo momento, Todo esto te lo debo a ti también.

A mi hermano, por estar conmigo y apoyarme siempre, te quiero mucho.

A mi esposo, por contar con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen, por haberme acompañado y guiado durante toda mi carrera y por brindarme una vida llena de aprendizaje, experiencia y sobre todo de felicidad.

A mis padres, Azucena y Estuardo, por apoyarme en todo momento y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A mi abuelita, que aunque ya no se encuentre físicamente, le agradezco por confiar y haber creído en mí hasta el último momento. ¡Ya soy Licenciada!

A mi hermano, por ser parte importante de mi vida y por estar presente en los momentos cuando más lo he necesitado.

A mi esposo, por ser una parte importante de mi vida, por el apoyo recibido para la realización de mi tesis, por aguantarme y soportar mis malos momentos. Te amo mucho.

A mi suegra, por estar conmigo y apoyarme siempre, la quiero mucho.

A mi asesora, Licenciada Blanca Samayoa por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de mi tesis, por su tiempo, amistad y por los conocimientos que me transmitió.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar una carrera profesional.

Al Hospital General San Juan de Dios, Laboratorio de Tuberculosis y Hongos, Clínica Familiar “Luis Ángel García” y Asociación de Salud Integral, por el apoyo y colaboración brindados.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	
A. Generalidades de los Hongos	4
1. Estructura morfológica	4
a. Composición de la pared celular	4
2. El género <i>Candida</i>	5
B. Antifúngicos	7
1. Clasificación	7
2. Mecanismo de acción	7
a. Antifúngicos que alteran la barrera de la membrana citoplasmática	8
i. Polienos	8
b. Antifúngicos que inhiben la síntesis del ergosterol (alilaminas, azoles)	8
i. Alilaminas	8
ii. Azoles	9
c. Antifúngicos que bloquean la síntesis de glucano en la pared celular	9
i. Lipopéptidos	9
d. Antifúngicos que inhiben la síntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos)	10
i. Antimetabolitos	10
e. Antifúngicos que interaccionan con los microtúbulos	10
3. Resistencia antifúngica de las diferentes especies de <i>Candida</i>	10
4. Factores que contribuyen a la resistencia antifúngica	11
5. Mecanismos de resistencia	12
a. Mecanismos de resistencia a los polienos	13
b. Mecanismos de resistencia a los azoles	13
i. Resistencias a los azoles por alteraciones en la entrada del fármaco	13

ii. Resistencia por incremento de bombas de flujo	14
iii. Resistencia por alteraciones de las dianas celulares	14
c. Mecanismos de resistencia a las pirimidinas	14
C. Determinación de susceptibilidad antifúngica	15
1. Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> para levaduras	16
2. Factores que pueden tener influencia en la correlación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	17
3. Factores relacionados con el Antimicrobiano	18
E. Métodos comerciales para la determinación de susceptibilidad antifúngica	18
1. ATB™ FUNGUS 3	18
2. SENSITITRE® YEASTONE®	19
IV. Justificación	20
V. Objetivos	21
VI. Hipótesis	22
VII. Materiales y Métodos	23
VIII. Resultados	30
IX. Discusión de Resultados	36
X. Conclusiones	40
XI. Recomendaciones	41
XII. Referencias	42
XIII. Anexos	46

I. RESUMEN

El objetivo general del estudio fue la comparación del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne® para la determinación de la susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* aisladas de pacientes VIH.

Se trató de un estudio de pruebas diagnósticas, para el cual se realizó un muestreo de tipo no probabilístico, realizado por intención o conveniencia de 67 cepas de diferentes especies de *Candida* provenientes de 56 personas que viven o conviven con VIH del Laboratorio de Tuberculosis y Hongos de la Clínica Familiar “Luis Ángel García” ubicada en el Hospital General San Juan de Dios. Todas las cepas, incluyendo las cepas control, fueron subcultivadas por 24-48 horas a 36 ± 1 °C en agar Sabouraud dextrosado para luego ser evaluadas mediante el sistema ATB™ FUNGUS 3.

Fueron identificadas, 52 cepas de *C. albicans*, 9 cepas de *C. glabrata*, 3 cepas de *C. tropicalis*, 2 cepas de *Candida sp.* y 1 cepa a *C. parapsilosis*. Las 67 cepas fueron susceptibles para 5-Flucitosina, Anfotericina B y Voriconazol en ambos métodos (Sensititre® YeastOne®- ATB™ FUNGUS 3). En cuanto a Fluconazol, 56 cepas fueron susceptibles, 9 cepas susceptibles dependiendo de la dosis y 2 cepas resistentes al correr el sistema ATB™ FUNGUS 3, mientras que para el método Sensititre® YeastOne®, 64 cepas fueron susceptibles y 3 cepas susceptibles dependiendo de la dosis. Para el antifúngico Itraconazol, 50 cepas fueron susceptibles, 7 cepas susceptibles dependiendo de la dosis y 10 cepas resistentes al correr el sistema ATB™ FUNGUS 3, mientras que para el método Sensititre® YeastOne®, 55 cepas fueron susceptibles, 3 cepas susceptibles dependiendo de la dosis y 9 cepas resistentes.

Se determinó la concordancia de resultados entre el método ATB™ FUNGUS 3 y el sistema Sensititre® YeastOne® a través del Índice de Kappa ponderado, así como la sensibilidad y especificidad del método en estudio para determinar su desempeño diagnóstico, demostrándose concordancia perfecta (Kappa=1) entre el método ATB™ FUNGUS 3 y el sistema Sensititre® YeastOne® para los antifúngicos 5-Flucitosina (5-FCT), Anfotericina B (AMB) y Voriconazol (VOR), tanto para *C. albicans* como para las especies *no-albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida sp.* y *C. parapsilosis*). En cuanto a Fluconazol (FLU), se demostró una concordancia buena (Kappa=0.63) para las

especies *no-albicans* y óptima ($Kappa=0.97$) para *C. albicans* y para Itraconazol (ITR), una concordancia buena ($Kappa=0.66$) para *C. albicans* y óptima ($Kappa=0.86$) para las especies *no-albicans*.

El desempeño diagnóstico del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne® mostró que el ATB™ FUNGUS 3 tuvo un desempeño diagnóstico bueno (98%) con respecto al método Sensititre® YeastOne®; la alta confiabilidad del método se determinó al observar los altos valores predictivos en general, así como también los altos valores de sensibilidad (100%) y especificidad (98%) para Fluconazol (FLU) e Itraconazol (ITR).

Es evidente la necesidad de realizar más estudios de susceptibilidad antifúngica, para encontrar métodos que contribuyan a la identificación de las diferentes especies de *Candida* y al tratamiento correcto de las mismas.

II. INTRODUCCIÓN

Los agentes antifúngicos son sustancias capaces de producir una alteración en la estructura de la célula fúngica, inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, de forma directa o indirecta (Birdar T, 2004; Diomedi A., 2004).

La interacción de las levaduras con los agentes antifúngicos ha provocado la aparición de sistemas de defensa en estos microorganismos, mediante mecanismos intrínsecos de resistencia o por mecanismos adquiridos específicos (Birdar T, 2004; Diomedi A., 2004).

Los factores de resistencia han creado la necesidad de establecer métodos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* estandarizados, reproducibles y con relevancia clínica, que ayuden como guía terapéutica en la toma de decisión, permitiendo el estudio de nuevos medicamentos y proporcionando un medio para monitorizar el desarrollo de resistencia en estudios epidemiológicos.

Estudios multicéntricos han detectado problemas de concordancia en la susceptibilidad antifúngica para levaduras. El Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico –NCCLS- (actualmente Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico –CLSI-) de Estados Unidos, publicó el documento M27-A2, que describe el método estándar aprobado para determinar cuantitativamente la susceptibilidad *in vitro* de las levaduras. Sin embargo, este método consume mucho tiempo para llevarse a cabo de rutina y solamente se realiza en laboratorios de referencia (Fothergill A., Rinaldi M., Sutton D., 2006; Rodríguez J., Cuenca M., Mellado E. *et al.* 2003).

La necesidad de simplificar la metodología descrita en el documento M27-A2 para laboratorios de rutina ha permitido desarrollar varias técnicas alternativas. Estas técnicas permiten evaluar la susceptibilidad *in vitro*, son más económicas y más rápidas que el estándar de referencia. Entre las más conocidas destacan el Sistema ATB™ FUNGUS 3 y el Sensititre® YeastOne®. El presente estudio fue realizado para comparar ambos métodos comerciales para la determinación del perfil de susceptibilidad antifúngica de diferentes especies de *Candida* aislados de pacientes o personas que viven con VIH.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades de los hongos

1. Estructura morfológica

Los hongos son organismos eucariotas cuyas células contienen núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria y otras organelas; semejan a las células humanas. La mayoría de las células de los hongos poseen una pared celular rígida compuesta de polisacáridos de alto peso molecular que difiere en la composición de azúcares de la pared bacteriana. La membrana plasmática actúa como barrera entre los componentes intra y extracelulares. Esta última está involucrada en la síntesis de la pared celular y es la responsable del transporte selectivo de moléculas. La diferencia más significativa entre la membrana celular humana y fúngica es la presencia de esteroides. El ergosterol, molécula semejante al colesterol, es el componente primario de la membrana celular fúngica. La función primaria del ergosterol es modular la fluidez de la membrana, iniciar el crecimiento y aumentar el tamaño de la célula (**Anexo 1**) (Alexopoulos C. *et al.* 1996; Shepherd MG., Poulter RT., Sullivan PA., 1985).

a. Composición de la pared celular

La pared celular de los hongos es una estructura de gran plasticidad, que da forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además de estas funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que tras su activación, desencadenarán la cascada de señales en el interior de la célula (Pontón J., 2008).

Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedero, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica. Algunos componentes de la pared son muy inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección. Componentes de la pared celular como los β -glucanos y los mananos, así como los

anticuerpos dirigidos contra ellos son de utilidad diagnóstica al detectarse en pacientes con infección fúngica invasiva (Pontón J., 2008, 78-82; Marcilla A., Valentín E., Sentandreu R., 1998).

La pared celular es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación, tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la pared celular juega en la fisiología de la célula fúngica, puede considerarse el talón de Aquiles de los hongos y por lo tanto, una diana muy importante para la acción de los nuevos fármacos antifúngicos (Pontón J., 2008; Marcilla A., Valentín E., Sentandreu R., 1998).

Aproximadamente el 90 por ciento de la pared celular está compuesta por polisacáridos y un 5-10 por ciento de proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o galactomanano. Las proteínas generalmente están agrupadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida (**Anexo 2**) (Marcilla A., Valentín E., Sentandreu R., 1998; Adams D., 2004).

2. El género *Candida*

El género *Candida* pertenece al phylum *Ascomycota*, orden *Saccharomycetales* y familia *Saccharomycetaceae*. Estas levaduras forman parte de una familia caracterizada por poseer reproducción asexual primaria por gemación multilateral, talo predominante unicelular que produce pseudomicelio y producción de ascosporas mediante células somáticas simples (Alexopoulos C. *et al.* 1996).

Las especies de *Candida* son las levaduras patógenas más importantes. Existen más de 160 especies, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas. El patógeno más común en el género es *C. albicans*. La frecuencia con que se aíslan otras especies varía en función de la infección y sitio anatómico del cual es aislada. En la candidiasis oral las principales especies aisladas son: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Henry J., 2005, 1504; Odds FC., Bernaerts R., 1994).

De las especies no-*albicans* de *Candida*, se sabe que *C. tropicalis* se encuentra en pacientes inmunodeprimidos que tienen enfermedad diseminada. *C. parapsilosis* puede producir también enfermedad diseminada, particularmente cuando el paciente ha abusado de las drogas o ha tenido catéteres intravenosos. *C. glabrata* también causa fungemias y se ha asociado con infecciones del tracto urinario y vaginal. *C. krusei* es una causante menos común de infección diseminada que se parece a la producida por *C. tropicalis*. En pacientes hospitalizados las especies de *Candida* ocupan el cuarto lugar en orden de frecuencia en las infecciones del torrente sanguíneo. Su incidencia varía en relación con el espacio geográfico, el grupo etario considerado, el período analizado y el estado inmunológico de los pacientes (Pfaller M., Diekema D., 2007; Mujica M. *et al.*, 2004).

Las candidosis humanas son las más comunes de las infecciones fúngicas oportunistas a nivel mundial. Se presentan en pacientes VIH positivo o en personas VIH negativas asociadas a múltiples factores predisponentes, de cualquier edad y género. Generalmente poseen localización superficial, pero pueden comprometer también órganos profundos, en cuyo caso presentan alta mortalidad y morbilidad (Runco R., Van Gelderen A., 2007).

En los últimos años se ha observado aumento progresivo de candidosis debidas a *C. albicans* y a especies no-*albicans* en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados en cuidados intensivos, así como en pacientes VIH. También se han asociado con la sobrevivencia del paciente en estado crítico, debilitado o con inmunosupresión (Henry J., 2005; Runco R., Van Gelderen A., 2007).

La identificación temprana del aislamiento orienta en la selección de la terapia antifúngica ya que, el uso frecuente de antifúngicos y el aumento de las dosis terapéuticas han puesto en evidencia la aparición de resistencias (en especial a derivados azólicos) en algunas especies. *C. glabrata* y *C. krusei* en particular son intrínsecamente más resistentes a los azoles que *C. albicans*. *C. lusitanae*, un patógeno aislado con poca frecuencia, es propensa a desarrollar resistencia a la anfotericina *in vivo* (Henry J., 2005; Runco R., Van Gelderen A., 2007).

B. Antifúngicos

Los agentes antifúngicos, son sustancias capaces de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica consiguiendo así inhibir su desarrollo como también alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia (Gregori B., 2005).

La síntesis de estos fármacos comenzó durante el siglo pasado (**Anexo 3**) y desde entonces se han diseñado nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasivas, aumentando estas sustancialmente en las últimas 2 décadas en relación con la aparición de la epidemia del SIDA y otras enfermedades (Gregori B., 2005; Odds F., 2003).

1. Clasificación

La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura (polienos, azoles, alilaminas, entre otros) (**Anexo 4**), su origen (en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química), su espectro de acción (amplio o restringido) y su sitio de acción (Gregori B., 2005; Odds F., 2003).

2. Mecanismo de acción

Varias drogas antifúngicas actúan sobre el ergosterol o en los pasos que involucran la síntesis de este compuesto.

Los antifúngicos se agrupan en cinco clases según su mecanismo de acción:

- Los que alteran la función de barrera de la membrana (polienos).
- Aquellos que inhiben la síntesis del ergosterol (alilaminas, azoles).
- Los que bloquean la síntesis de glucano en la pared celular (equinocandinas).
- Los que actúa inhibiendo la síntesis de macromoléculas (5-flucitosina).
- Los que interaccionan con los microtúbulos (griseofulvina) (**Anexo 5**) (Vanden H., 1997, 44-49; Anderson J., 2005).

a. Antifúngicos que alteran la barrera de la membrana citoplásmática

La membrana celular de la célula humana, así como la de los hongos, desempeña una importante función, delimitando y protegiendo a la célula; impidiendo el intercambio de materiales de un lado a otro; permitiendo el paso de solutos y además participa en la división celular y en el metabolismo (Garnacho-Montero J., Ortiz-Leyba J., Garmendia G., Jiménez F., 1998).

i. Polienos

Anfotericina B y nistatina son los polienos que se encuentran con mayor disponibilidad. Estos medicamentos se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causando la muerte celular (Gregori B., 2005; Thompson G., Cadena J., Patterson T., 2009).

b. Antifúngicos que inhiben la síntesis del ergosterol (alilaminas, azoles)

i. Alilaminas

Estos agentes son ampliamente conocidos como fungicidas para las plantas, sin embargo, también se han desarrollado nuevos compuestos con valor clínico. Por ejemplo, la naftifina se está utilizando como un agente de uso tópico. El terbinafine ha sido utilizado contra las infecciones por dermatofitos convirtiéndose en el tratamiento ampliamente utilizado para las infecciones fúngicas en uñas (Odds F., 2003).

El mecanismo de acción de estos agentes es inhibir la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso previo al ergosterol sintetizado, inhibiendo a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (**Anexo 6**) (Gregori B., 2005; Cohen J., Powderly W., 2004).

ii. Azoles

Este grupo incluye los imidazoles y triazoles. Químicamente, todos estos compuestos poseen un grupo imidazol o un triazol unido de forma asimétrica a un átomo de carbono como grupo funcional farmacóforo. A través del tiempo han surgido diferentes compuestos de este grupo para utilización superficial hasta los utilizados para el tratamiento de micosis sistémicas. Los más utilizados son el fluconazol, el itraconazol, el ketoconazol y el voriconazol (Odds F., 2003).

Estos inhiben al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima lanosterol 14- α -dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (**Anexo 6**) (Gregori B., 2005).

c. Antifúngicos que bloquean la síntesis de glucano en la pared celular

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad que protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que destacan los cambios osmóticos. Además, la pared celular permite la interacción con el medio externo ya que algunas de sus proteínas son adhesinas y receptores. Algunos de sus componentes tienen una alta capacidad inmunogénica. La pared celular es una estructura característica de los hongos y está compuesta por glucanos, quitina y glicoproteínas. Al no estar presentes los componentes de la pared celular fúngica en el ser humano, esta estructura es una diana excelente para la terapia antifúngica (Gregori B., 2005).

i. Lipopéptidos

Las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina) son lipopéptidos compuestos por un hexapéptido cíclico unido a una cadena lipídica. Estos antifúngicos actúan sobre la pared celular mediante la inhibición de la síntesis de los glucanos, a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa, enzima responsable de formar este polímero de la glucosa que es esencial para la estructura de la pared de la

célula fúngica. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere (Enoch D., Ludlam H., Brown N., 2006).

d. Antifúngicos que inhiben la síntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos)

Dentro de esta clase de compuestos se encuentran los denominados antifúngicos antimetabolitos, los cuales fueron inicialmente generados como drogas potencialmente anticancerígenas (Odds F., 2003).

i. Antimetabolitos

Las pirimidinas fluoradas actúan como antimetabolitos. La más conocida de este grupo es la flucitosina o 5-fluorocitosina que inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico (Gregori B., 2005).

e. Antifúngicos que interaccionan con los microtúbulos

Estos fueron los primeros agentes antifúngicos evaluados en seres humanos. La más antiguamente conocida es la griseofulvina. Este agente inhibe la mitosis, destruyendo el huso mitótico, en la división celular (Arenas E., 2005).

3. Resistencia antifúngica de la diferentes especies de *Candida*

Desde la década de los noventa se ha observado un dramático aumento de la prevalencia de las infecciones fúngicas, resultado de las alteraciones del estado inmune asociado con la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la quimioterapia y los trasplantes de órganos. Al mismo tiempo, la resistencia a la drogas

antifúngicas se han convertido en un importante problema debido a la amplia variedad de infecciones fúngicas (Yang Y., Lo H., 2001).

En la misma década, el incremento del uso de fluconazol en pacientes infectados con HIV con recurrentes episodios de candidiasis orofaríngea, resultó en la selección de especies de *Candida* intrínsecamente menos susceptibles y en la emergencia de cepas resistentes a los azoles (Procop G., Roberts G., 2004).

Actualmente, la resistencia a las drogas antifúngicas ha sido reportada en diferentes situaciones clínicas para tres clases de drogas antifúngicas: los polienos, análogos de las pirimidinas (5-flucitosina) y en los azoles. La resistencia adquirida a los azoles en las especies fúngicas ha sido observada mayormente en las especies de *Candida* principalmente en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* (Sanglard D., 2003).

4. Factores que contribuyen a la resistencia antifúngica

La prevalencia de las infecciones fúngicas en pacientes con disminución de las defensas inmunes ha incrementado la dependencia de agentes antifúngicos para profilaxis y tratamiento. Numerosos reportes de resistencia antifúngica se han incrementado coincidentemente con el incremento del uso de estas drogas (Yang Y., Lo H., 2001).

La resistencia antifúngica ha sido descrita en dos categorías: resistencia clínica y resistencia *in vitro*. La resistencia clínica es definida como un fallo terapéutico debido a insuficiencia de la droga en suero y/o en tejido. Los factores que contribuyen a la resistencia clínica del agente pueden ser divididos en tres clases: fúngicos, del agente y del hospedero (Yang Y., Lo H., 2001; White T., Marr K., Bowden R., 1998).

Los factores fúngicos incluyen las especies, la concentración inhibitoria mínima (MIC), el tipo celular y la población de microorganismos. El tipo celular puede ser identificado por morfología. El MIC del organismo puede ser determinado mediante técnicas estándares para susceptibilidad antifúngica y es útil para predecir el tratamiento

clínico. Los factores que incluyen al agente incluyen la clase del agente, la dosis y la farmacocinética. El estado inmune del hospedero también es un factor que determina la resistencia clínica (Yang Y., Lo H., 2001; White T., Marr K., Bowden R., 1998).

La resistencia *in vitro* puede ser de dos tipos: primaria y secundaria. La resistencia primaria también es conocida como resistencia innata o intrínseca y es definida como la resistencia natural de un organismo a la exposición de una droga. La resistencia secundaria también es conocida como resistencia adquirida y se desarrolla después de la exposición a una droga específica. Esta última ha sido reportada frecuentemente en pacientes con inmunodeficiencia (Yang Y., Lo H., 2001).

Para las diferentes especies fúngicas existen diferentes grados de susceptibilidad para cada droga antifúngica. Las especies de *Candida* poseen diferentes grados de susceptibilidad para agentes antifúngicos comunes. Por ejemplo, *C. krusei* y *C. glabrata* son menos susceptibles a fluconazol que otras especies de *Candida*, mientras que *C. lusitaniae* es relativamente resistente a anfotericina B (Orozco A., *et al.*, 1998; Piemonte P., *et al.*, 1996).

5. Mecanismos de resistencia

Los agentes antifúngicos deben entrar en contacto con la célula, encontrar su sitio de acción (diana), alterar la función celular fúngica, eliminar al organismo infeccioso y establecer el éxito terapéutico. Existen diferentes mecanismos que contribuyen a la resistencia a una droga y son generados a nivel molecular. Los mecanismos identificados son:

- i. Reducción de la acumulación de la droga. Esto puede deberse a mecanismos que previenen la entrada de la droga en la célula y la activación de sistemas de flujo de la droga.
- ii. Alteraciones en el sitio de acción. Incluyendo mutaciones en el blanco de la droga, sobreexpresión del sitio de acción y cambio enzimático.
- iii. Inactivación de la droga. Incluyendo modificación y degradación de la droga.

(Anexo 7) (Yang Y., Lo H., 2001).

a. Mecanismos de resistencia a los polienos

Las resistencias microbiológicas a los polienos pueden ser naturales o adquiridas. El mecanismo de resistencia a la anfotericina B ha sido pobremente estudiado, pero se ha asociado con la disminución del contenido de ergosterol en la membrana. Esta deficiencia puede ser resultado de mutaciones en genes que codifican algunas enzimas involucradas en la síntesis de ergosterol. Se han reportado defectos en el gen ERG3, como promotor de la acumulación de otros esteroides que no son ergosterol. Las resistencias por naturaleza a la anfotericina B son frecuentes en algunas cepas de *C. lusitanae* y en el género *Trichosporon* (**Anexo 8**) (Sanglard D., 2003; Espinel-Ingroff A., 2008; Dick J., Merz W., Saral R., 1980).

b. Mecanismos de resistencia a los azoles

En las levaduras los azoles tienen como diana celular común un citocromo P450. Este citocromo P450, actualmente denominado Erg11p, es el producto del gen ERG11. La afinidad de los derivados imidazólicos y triazólicos no sólo depende de esta interacción, sino que también viene determinada por la sustitución en N-1, la cual es, de hecho, la responsable de la elevada afinidad de los antifúngicos azólicos para su diana (Rex J., Bennett J., Sugar A., Pappas P., Van der Horst C., Edwards J., *et al.*, 1994).

Existen diversos mecanismos a través de los que las levaduras pueden adquirir resistencias contra los antifúngicos azólicos, estos pueden ser: por alteración en la entrada del fármaco, el incremento de bombas de flujo y alteración en el sitio de acción o diana (**Anexo 8**) (Yang Y., Lo H., 2001).

i. Resistencias a los azoles por alteraciones en la entrada del fármaco

Este primer mecanismo es un defecto en la importación del fármaco. Para prevenir que la droga entre, la célula puede alterar la composición de la membrana principalmente a nivel de los esteroides y fosfolípidos. Se ha demostrado que la alteración de la composición de la membrana citoplasmática contribuye a la resistencia fenotípica de *C. albicans*. Sin

embargo, la correlación directa entre la composición citoplasmática y la resistencia de la droga no ha sido completamente establecida. Poco se conoce acerca de la entrada de la droga en la célula fúngica (Yang Y., Lo H., 2001; Sanglard D., 2003; Espinel-Ingroff A., 2008).

ii. Resistencia por incremento de bombas de flujo

Los dos sistemas de eflujo a los cuales se les atribuye la resistencia a estas drogas son: los sistemas de las proteínas pertenecientes a la familia de transportadores de enlaces-ATP (ABC) y a la familia de facilitadores (MF). El eflujo activo es uno de los mayores mecanismos de resistencia. Cuando existe resistencia a los azoles, los genes (CDR1, CDR2 y MDR1) que codifican los sistemas de flujo (ABC y MF) están sobrerregulados y por lo tanto la levadura es incapaz de acumular el antifúngico (Yang Y., Lo H., 2001; Sanglard D., 2003; Espinel-Ingroff A., 2008).

iii. Resistencias por alteraciones de las dianas celulares

Un mecanismo común en la resistencia a los azoles es la modificación de las enzimas en la ruta biosintética del ergosterol. Existen tres mecanismos que desarrollan resistencia fenotípica en la ruta del ergosterol, estos son: la alteración del blanco que previene que la droga se una a éste, el incremento de la expresión del gen de la diana y una modificación de otras enzimas de la misma vía. La enzima diana predominante de los azoles es la lanosterol demetilasa, producida por el gen ERG11. Las mutaciones en ERG11 pueden causar resistencia (Yang Y., Lo H., 2001; Sanglard D., 2003; Espinel-Ingroff A., 2008).

c. Mecanismos de resistencia a las pirimidinas

Las resistencias contra la 5-fluorocitosina (5-FC) también pueden ser naturales o adquiridas. Pueden aparecer resistencias como consecuencia de un defecto o una carencia de las enzimas implicadas en el metabolismo de la 5-FC (Citosina permeasa y citoisicina desaminasa) o de una desregulación de la vía de biosíntesis de las pirimidinas

en la que los productos puedan competir con los metabolitos fluorados de la 5-FC (Polak A., 1990; Coleman D., Rinaldi M., Haynes K., Rex J., Summerbell R., Annaisie E., *et al.*, 1998; Groll A., Piscitelli S., Walsh T., 1998).

Las resistencias intrínsecas de los hongos a dicho fármaco pueden deberse a un defecto en la citosina permeasa (observado en *C. glabrata*, pero no en *C. albicans* ni en *C. neoformans*), mientras que las adquiridas son el resultado de que no se pueda metabolizar la 5-FC para obtener 5-FUTP y 5-Fd-UMP (que son los metabolitos antifúngicos que se originan dentro de la célula que causan la muerte de ésta) o de la pérdida del control de la biosíntesis de las pirimidinas (Polak A., 1990; Coleman D., Rinaldi M., Haynes K., Rex J., Summerbell R., Annaisie E., *et al.*, 1998; Groll A., Piscitelli S., Walsh T., 1998).

C. Determinación de susceptibilidad antifúngica

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica aparecieron con décadas de retraso en comparación con las pruebas antibacterianas. Una de las razones más importantes para el lento desarrollo fue la poca frecuencia de aparición de infecciones fúngicas antes de la década de los ochenta, así como el número limitado de agentes terapéuticos disponibles, unido al pobre reconocimiento del potencial emergente de resistencia a estos agentes (Berrouane Y., Herwaldt L., Pfaller M., 1999; Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller MA., Yu WL., 2001).

La aparición de resistencia a los agentes antifúngicos ha producido secuelas de importancia clínica y epidemiológica. Estos factores han creado la necesidad de establecer métodos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* estandarizados. La estandarización puede jugar un papel importante en la necesidad de evaluar *in vitro* versus *in vivo* la eficiencia un medicamento (Berrouane Y., Herwaldt L., Pfaller M., 1999; Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller MA., Yu WL., 2001).

Como respuesta a esta necesidad el Comité Nacional de Estandarización del Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (National Committee for Clinical Laboratory Standard, NCCLS) (actualmente Clinical Laboratory Standard Institute –CLSI-) en 1982 estableció un subcomité coordinador del trabajo de pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos (Berrouane Y., Herwaldt L., Pfaller M., 1999, 531-537; Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller MA., Yu WL., 2001).

La meta del subcomité fue desarrollar un método eficaz de referencia para pruebas de susceptibilidad de levaduras *in vitro* y buscar que se correlacionara con la respuesta clínica. Como resultado, el CLSI propuso el método de referencia (M27-A) para levaduras como *Candida spp.*, *Torulopsis glabrata* y *Cryptococcus neoformans* (Berrouane Y., Herwaldt L., Pfaller M., 1999, 531-537; Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller MA., Yu WL., 2001).

1. Pruebas de susceptibilidad *in vitro* para levaduras

El método que describe este estándar está pensado para evaluar levaduras que causan infecciones invasivas. Estas levaduras abarcan todas las especies de *Candida* y otros. El documento M27-A es un “estándar de referencia” que se ha desarrollado a través de un proceso de consenso para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos (Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller M., Yu W., 2001; National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1997).

Este método sigue los mismos principios que las pruebas para agentes antibacterianos y provee resultados cuantitativos, en concentración mínima inhibitoria (CMI), que representa la medida de la actividad antimicrobiana *in vitro* del agente bajo estudio (Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller M., Yu W., 2001; National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal

susceptibility testing of yeast. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1997).

Idealmente, las pruebas de susceptibilidad *in vitro* deben proveer una medida real de la actividad relativa de uno o más agentes antimicrobianos antifúngicos, correlacionar la actividad *in vivo* y predecir la probable respuesta a la terapia, proveer un medio que monitoree el desarrollo de la resistencia en una población normalmente susceptible y predecir el potencial terapéutico de agentes nuevos en investigación (Espinel-Ingroff A., 1996; Espinel-Ingroff A., 1997; Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; Pfaller M., Yu W., 2001; National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1997).

2. Factores que pueden tener influencia en la correlación *in vitro* e *in vivo*

Numerosos factores influyen en las interacciones que se producen entre los microorganismos y sus hospederos. Algunos son intrínsecos al antimicrobiano pero otros se derivan del patógeno y del huésped y aunque las pruebas de sensibilidad no pueden tomar en consideración todos estos factores, proveen valores que, de alguna forma, conforman el diagnóstico que tiene el paciente y, por lo tanto, ayudan a su tratamiento (Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; White T., Marr K., Bowden R., 1998).

En la mayoría de los casos, las pruebas de sensibilidad se llevan a cabo de tal forma que no reproducen lo que ocurre en la realidad; se realizan en condiciones estandarizadas, utilizando una fase relativamente constante de crecimiento del microorganismo y en condiciones fijas de pH, temperatura, humedad y concentración de oxígeno. En contraste, no hay nada estandarizado en el tratamiento de una infección. La exposición de un número relativamente pequeño de microorganismos (10³-10⁶ UFC/ml) a concentraciones constantes del antimicrobiano difiere considerablemente de la situación clínica, en la cual un gran número de microorganismos (a menudo 10⁹ UFC/ml o más) están expuestos a concentraciones fluctuantes del fármaco (Rex J., Pfaller M., Galgiani J., Bartlett M., Espinel I., Ghannoum M., *et al.*, 1997; White T., Marr K., Bowden R., 1998).

3. Factores relacionados con el Antimicrobiano

Se debe asumir que para establecer una correlación entre los resultados de las pruebas de sensibilidad y la eficacia de un tratamiento, la respuesta del microorganismo *in vivo* debe ser paralela a la obtenida *in vitro*. Sin embargo, antimicrobianos que tienen una actividad similar *in vitro* demuestran diferente eficacia clínica (III Curso Hispano Argentino de Micología Médica. “Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio”. Memorias. Buenos Aires, Argentina. 2000).

E. Métodos comerciales para la determinación de susceptibilidad antifúngica

1. ATB™ FUNGUS 3

ATB™ FUNGUS 3 es un método comercial que contiene 16 pares de cúpulas. El primer par, sin antifúngico, sirve de control de crecimiento. Las 15 cúpulas siguientes contienen 5 antifúngicos a varias concentraciones y permiten determinar las CMI y/o categorías clínicas (Manual técnico para antibiograma de levaduras ATB™ FUNGUS 3. Biomérieux® S.A. Francia).

La levadura a analizar es puesta en suspensión, después se transfiere al medio de cultivo y se inocula en la galería. Después de incubar, la lectura del crecimiento se hace de forma visual, o con el sistema automatizado ATB o mini API®. El resultado obtenido permite dar un CIM (Anfotericina B (AMB), Fluconazol (FCA), Itraconazol (ITR), Voriconazol (VRC) y/o 5-Flucitosina (5-FCT) (Manual técnico para antibiograma de levaduras ATB™ FUNGUS 3. Biomérieux® S.A. Francia).

Es un sistema de sensibilidad que permite el diagnóstico *in vitro* para la realización de pruebas de sensibilidad a levaduras no exigentes como especies de *Candida* y otras especies de levadura de rápido crecimiento. Es un método de microdilución que ofrece resultados cualitativos y cuantitativos de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en formato de placa seca (**Anexo 9**) (Manual técnico para antibiograma de levaduras ATB™ FUNGUS 3. Biomérieux® S.A. Francia).

2. SENSITITRE[®] YEASTONE[®]

La prueba de sensibilidad a levaduras Sensititre es una prueba de microdilución colorimétrica comercial. Se basa en el método de microdilución del documento M27-A del CLSI al que se le ha adicionado un indicador de crecimiento de óxido reducción (Azul Alamar). Tiene la ventaja de ser la lectura más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que, cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules. Sin embargo, con los azoles sigue habiendo problemas de lectura ya que, debido al efecto “trailing” o de transición, el cambio de color no es tan evidente y en ocasiones, pasa de rosa (crecimiento) a púrpura (inhibición parcial del crecimiento) (Manual técnico para antibiograma de levaduras Sensititre[®] YeastOne[®]. TREK Diagnostic Systems. United Kingdom. YST04_V1.2.).

Cada placa contiene diversos agentes antifúngicos en las diluciones correspondientes y los resultados se leen manualmente observando la concentración antifúngica más baja, que muestra la inhibición del crecimiento (que viene indicada por la ausencia de cambio de color) (Manual técnico para antibiograma de levaduras Sensititre[®] YeastOne[®]. TREK Diagnostic Systems. United Kingdom. YST04_V1.2.).

IV. JUSTIFICACIÓN

El incremento en la población de pacientes inmunocomprometidos o con otros factores (edades extremas, antibioterapia de amplio espectro, etc.), ha determinado un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas sistémicas en las últimas décadas. Esto último, asociado al uso creciente de drogas antifúngicas, han contribuido a la aparición de levaduras con resistencia secundaria a los antifúngicos y ha hecho necesario el desarrollo de métodos para evaluar susceptibilidad a estas drogas.

Los estudios de susceptibilidad a los antifúngicos, previo al uso de métodos estandarizados, eran inconsistentes y muy poco reproducibles, ya que muchos factores influían en estos ensayos. Por este problema, surgió un método estandarizado de microdilución en caldo (CLSI M27-A). Éste constituye el método de referencia, sin embargo es muy laborioso y se encuentra reservado para laboratorios especializados. Además, con el aumento de la incidencia de micosis, se ha generado la necesidad de desarrollar nuevas alternativas que presenten una buena reproducibilidad y que sean viables para el estudio de la susceptibilidad *in vitro* de los antifúngicos.

En Guatemala, hasta el momento se ha realizado un estudio para la determinación y caracterización de especies de *Candida* en personas viviendo con VIH que acuden a la "Clínica Luis Ángel García", pero no se ha llevado a cabo un estudio de comparación del método comercial, ATB™ FUNGUS 3 (Biomerieux® S.A.) con respecto al sistema Sensititre® YeastOne® (TREK Diagnostic System), para la determinación de la susceptibilidad antifúngica de diferentes especies de *Candida*.

Por lo anterior se hace necesario establecer una metodología confiable y adecuada que brinden informes más exactos para elegir la mejor terapia para el paciente y de esta forma, contribuir a evitar el incremento de la resistencia antifúngica y la propagación de cepas multirresistentes que afecten a la población en general.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Comparar el sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne® para determinar la susceptibilidad antifúngica de especies de *Candida* en pacientes VIH.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Establecer la sensibilidad y especificidad, del sistema ATB™ Fungus 3 con respecto al método y Sensititre® YeastOne® .

- b. Determinar la fiabilidad a través de la concordancia del sistema ATB™ Fungus 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne® .

VI. HIPÓTESIS

1. El sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne® no presentan similitud en cuanto a sensibilidad y especificidad.
2. El sistema ATB™ FUNGUS 3 posee una concordancia menor al 50% con respecto al método Sensititre® YeastOne®.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Personas viviendo con VIH con manifestaciones clínicas de candidosis que asistieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García”, Asociación de Salud Integral del Hospital General San Juan de Dios.

B. Muestra

67 cepas de diferentes especies de *Candida* provenientes de la cavidad oral de pacientes con VIH

C. Medios

1. Recursos humanos

Br. Clara Luisa María Calderón Sierra

Licda. Blanca Samayoa Herrera, QB, MSPH, DrPH ^{candidate} asesora

Licda. Sandra Patricia Lima Pimentel, QB coasesora

2. Recursos institucionales

Laboratorio de Micobacterias y Hongos/ Clínica Familiar “Luis Ángel García”, Asociación de Salud Integral en el Hospital General San Juan de Dios

D. Recursos materiales

1. Recursos químicos y biológicos

- Estándar de turbidez de McFarland 0.5
- Estándar de turbidez de McFarland 2
- Agua estéril
- Kit de ATB™ FUNGUS 3

- Kit de Sensititre® YeastOne®
- Solución salina
- Cepa control *C. tropicalis* ATCC 750
- Cepa control *C. albicans* ATCC 24433
- Cepa control *C. parapsilosis* ATCC 22019
- Cepa control *C. kefyr* ATCC 2512

2. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud
- Caldo RMPI

3. Equipos y cristalería

- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Estufa
- Refrigerador
- Asa de inoculación
- Incinerador
- Pipetas de volumen variable
- Turbidímetro
- Incubadora
- Computadora
- Vortex
- Pipetas automáticas
- Impresora
- Tubos con tapa de rosca
- Erlenmeyers
- Cajas de petri desechables
- Vaso de precipitación de diferentes volúmenes
- Varillas de vidrio
- Hisopos de algodón estériles

- Asas de nicromo
- Puntas desechables para pipetas
- Marcador indeleble
- Parafilm
- Microplacas de 96 pozos

E. Procedimiento

1. Recolección de las cepas y datos

Se incluyeron 67 cepas del género *Candida* procedentes de 56 hisopados provenientes de lesiones orales en personas que viven con VIH previamente analizadas mediante el sistema Sensititre[®] YeastOne[®] y que fueron identificadas mediante pruebas fenotípicas y el panel de levaduras API ID 32C. Las cepas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Tuberculosis y Hongos de la Clínica Familiar Luis Ángel García ubicada en el Hospital General San Juan de Dios y fueron evaluadas mediante el sistema ATB[™] FUNGUS 3.

Todas las cepas, incluyendo las cepas control, fueron subcultivadas por 24-48 horas a 36 ± 1 °C en agar Sabouraud dextrosado antes de realizar los ensayos. Se utilizó la base de datos que contiene el registro de los antecedentes clínicos de tratamiento antifúngico de los pacientes de los cuales proceden dichas cepas.

2. Sistema ATB[™] FUNGUS 3

a. Preparación de la galería

Se sacó la galería de su embalaje y luego se anotó la identificación de la levadura a analizar sobre la lengüeta lateral de la galería.

b. Preparación del inóculo

Se abrió una ampolla de API[®] NaCl 0.85% Medium, la cual fue inoculada con varias colonias de la cepa en estudio procedentes de un cultivo no mayor de 4 días.

Luego se llevó a una suspensión de turbidez equivalente al patrón 2 de McFarland mediante un turbidímetro. Posteriormente se transfirió 20 ul de esta suspensión al ATB F2 Medium.

c. Inoculación de la galería

Se homogenizó el ATB F2 Medium y se inoculó la galería con 135 ul de dicho medio en cada cúpula. Se tapó la galería y se incubó a 27° C durante 24-48 horas.

d. Lectura e Interpretación

Se verificó la presencia de un crecimiento suficiente en las cúpulas testigo. Para *Candida*, en caso de que hubiese crecimiento insuficiente después de 24 horas de incubación, que dificulte la lectura de la galería o la haga imposible, se procedió entonces a reincubar 24 horas suplementarias en las mismas condiciones.

e. Determinación de la CMI (AMB, FCA, ITR, VRC)

La lectura se llevó a cabo visualmente. La galería se colocó sobre un fondo negro y se utilizó la siguiente valoración para determinar el CMI:

Definición	Valoración
Ausencia de reducción de crecimiento	4
Ligera reducción del crecimiento	3
Marcada reducción de crecimiento	2
Crecimiento muy débil	1
Ausencia de crecimiento	0

Para el Fluconazol (FCA), el Itraconazol (ITR) debido a la posibilidad de un fenómeno de crecimiento residual “trailing”, la CMI correspondió a la concentración de antifúngicos más baja que permitió obtener una valoración 2,1 o 0.

3. Sistema SENSITITRE® YEASTONE®

- Se tomaron de 1 a 2 colonias de cultivo puro de 24 hrs de incubación a 37°C.
- Se suspendió en 5 ml de solución salina fisiológica.
- La turbidez de la solución fué 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 incubó 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® YeastOne®.
- Un inóculo correcto produjo 15-80 colonias.
- El crecimiento de levaduras en soluciones antifúngicas se observó 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), fué 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 fué 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 fué resistente a la concentración más alta de antifúngico. El punto final de la CIM fué registrado como “mayor que” (>) la concentración más alta.

4. Control de Calidad

Para cada una de las pruebas se utilizó como control de calidad de la corrida las cepas control: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans* ATCC 24433 y *Candida kefyr* ATCC 2512 para todos los antifúngicos. Estas cepas poseen valores de concentraciones mínimas inhibitorias conocidas y reproducibles. El crecimiento de los pozos de control debió asegurar que el medio funciona apropiadamente, que el inóculo es viable y que el crecimiento es activo y que cualquier disolvente que se utilizó en la preparación de las drogas, no fueron soluciones que influían en los resultados de la prueba.

5. Aspectos éticos

Se solicitó el consentimiento escrito a las autoridades de la Clínica Familiar para poder utilizar las cepas conservadas en el cepario del Laboratorio de Tuberculosis y Hongos. Así también, se dio a conocer los resultados obtenidos a las autoridades para la toma de acciones que beneficien el diagnóstico y terapéutica de los pacientes que son atendidos por la institución.

E. Análisis de la investigación

1. Tipo de estudio

Estudio de pruebas diagnósticas.

2. Tipo de Muestreo

Tipo no probabilístico realizado por intención o conveniencia de sesenta y siete (67) cepas de diferentes especies de *Candida* provenientes de personas que viven o conviven con VIH del Laboratorio de Tuberculosis y Hongos de la Clínica Familiar Luis Ángel García del Hospital General San Juan de Dios.

3. Análisis estadístico

Se combinaron los factores susceptibilidad, susceptibilidad dependiendo de la dosis, intermedio y resistencia de los antifúngicos fluconazol, itraconazol y 5-flucitosina obtenido con el sistema ATB™ FUNGUS 3 (Biomerieux® S.A.) versus los factores de susceptibilidad, susceptibilidad dependiendo de la dosis, intermedio y resistencia obtenido con el método Sensititre® YeastOne® (TREK Diagnostic System).

Se determinó la sensibilidad, especificidad a un nivel de confianza del 95%. Seguidamente se determinó la fiabilidad del sistema ATB™ FUNGUS 3 (Biomerieux® S.A.) respecto al método Sensititre® YeastOne® (TREK Diagnostic System) mediante el empleo de un test de concordancia medido a través del coeficiente *Kappa* (K^3) a un nivel de confianza del 95%.

$$K^3 = \frac{\text{proporción de concordancia observada} - \text{proporción de concordancia esperada}}{1 - \text{Proporción de concordancia esperada}}$$

La interpretación del valor obtenido, que indica la fuerza de la concordancia, se realizó mediante la tabla de valoración del índice *Kappa* (**Anexo 10**) (Maclure M., 1987).

VIII. RESULTADOS

Las muestras utilizadas en el estudio fueron obtenidas del raspado de la mucosa oral proveniente de 56 personas viviendo con VIH que presentaban lesiones características de candidiasis oral. El propósito fue determinar la susceptibilidad antifúngica de las diferentes especies de *Candida* de aislamientos clínicos frente a cinco antifúngicos (Anfotericina B (AMB), Fluconazol (FLU), Itraconazol (ITR), Voriconazol (VOR) y/o 5-Flucitosina (5-FCT), a través del sistema ATB™ FUNGUS 3.

Los pacientes presentaron tres formas clínicas de candidiasis: pseudomembranosa, eritematosa y queilitis angular. *Candida albicans* fue el agente causal más aislado de candidiasis pseudomembranosa, seguida de eritematosa y queilitis angular. En cuanto a *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* solamente fueron aisladas de aquellos pacientes que presentaron candidiasis pseudomembranosa. El género más afectado que predominó en la población de estudio fue el masculino para las diferentes especies de *Candida*. La edad de los pacientes que participaron en el estudio se encuentra en una media de 35 años y una mediana de 32 años (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Manifestaciones Clínicas Bucales y Datos Demográficos de pacientes viviendo con VIH/Sida (PVVS) utilizados en el estudio según especie de *Candida* aislada.

	<i>C. albicans</i> (n=52)		<i>C. glabrata</i> (n=9)		<i>C. tropicalis</i> (n=3)		<i>Candida sp.</i> (n=2)		<i>C. parapsilosis</i> (n=1)	
Manifestación Clínica Bucal	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Queilitis Angular	2	3	****	****	****	****	****	****	****	****
Candidiasis Eritematosa	2	3	****	****	****	****	****	****	****	****
Pseudomembranosa	48	72	9	13	3	4	2	3	1	2
Edad (años)	Rango de edad	Media	Rango de edad	Media	Rango de edad	Media	Rango de edad	Media	Rango de edad	Media
Queilitis Angular	22 - 40	37	****	****	****	****	****	****	****	****
Candidiasis Eritematosa	37 - 53	45	****	****	****	****	****	****	****	****
Pseudomembranosa	10 - 69	34	13 - 69	37	32 - 51	41	20 - 26	23	N/A	32
Género (%)	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino
Queilitis Angular	1.9	1.9	****	****	****	****	****	****	****	****
Candidiasis Eritematosa	****	3.8	****	****	****	****	****	****	****	****
Pseudomembranosa	21.2	71.2	20	80	0	100	0	100	0	100

Fuente: Datos experimentales

Los porcentajes de las principales especies del género *Candida* identificadas en el estudio se presentan en el **Cuadro 2**. De las 67 muestras de mucosa analizadas, el 78% corresponde a *Candida albicans* siendo la levadura más aislada (52/67) seguido por 13% de *Candida glabrata* (9/67), 4% de *Candida tropicalis* (3/67), 3% de *Candida sp.* (2/67) y por último 1% de *Candida parapsilosis* (1/67).

Cuadro 2. Distribución de especies de *Candida spp.* aisladas en pacientes viviendo con VIH/sida (PVVS). (N=67)

Especies	N	%
<i>Candida albicans</i>	52	78
<i>Candida glabrata</i>	9	13
<i>Candida tropicalis</i>	3	4
<i>Candida sp.</i>	2	3
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1
Total	67	100

Fuente: Datos experimentales

Con respecto a la sensibilidad *in vitro* de los 67 aislamientos a los cinco agentes antifúngicos analizados, por los dos métodos (Sensititre® YeastOne® - ATB™ FUNGUS 3) se listan en el **Cuadro 3**. Al comparar los perfiles de sensibilidad, se encontró 83.58% (ATB™ FUNGUS 3) frente a 95.52% (Sensititre® YeastOne®) al utilizar FLU; y 74.63% (ATB™ FUNGUS 3) frente a 82.09% (Sensititre® YeastOne®) al utilizar ITR. Los antifúngicos FCT, AMB y VOR presentaron un porcentaje de sensibilidad del 100%. En cuanto a los perfiles de resistencia, se encontró 2.98% (ATB™ FUNGUS 3) al utilizar FLU; y 14.92% (ATB™ FUNGUS 3) frente a 13.43% (Sensititre® YeastOne®) al utilizar ITR.

Cuadro 3. Patrones de resistencia global a los agentes antifúngicos de los diferentes aislamientos en estudio (N=67).

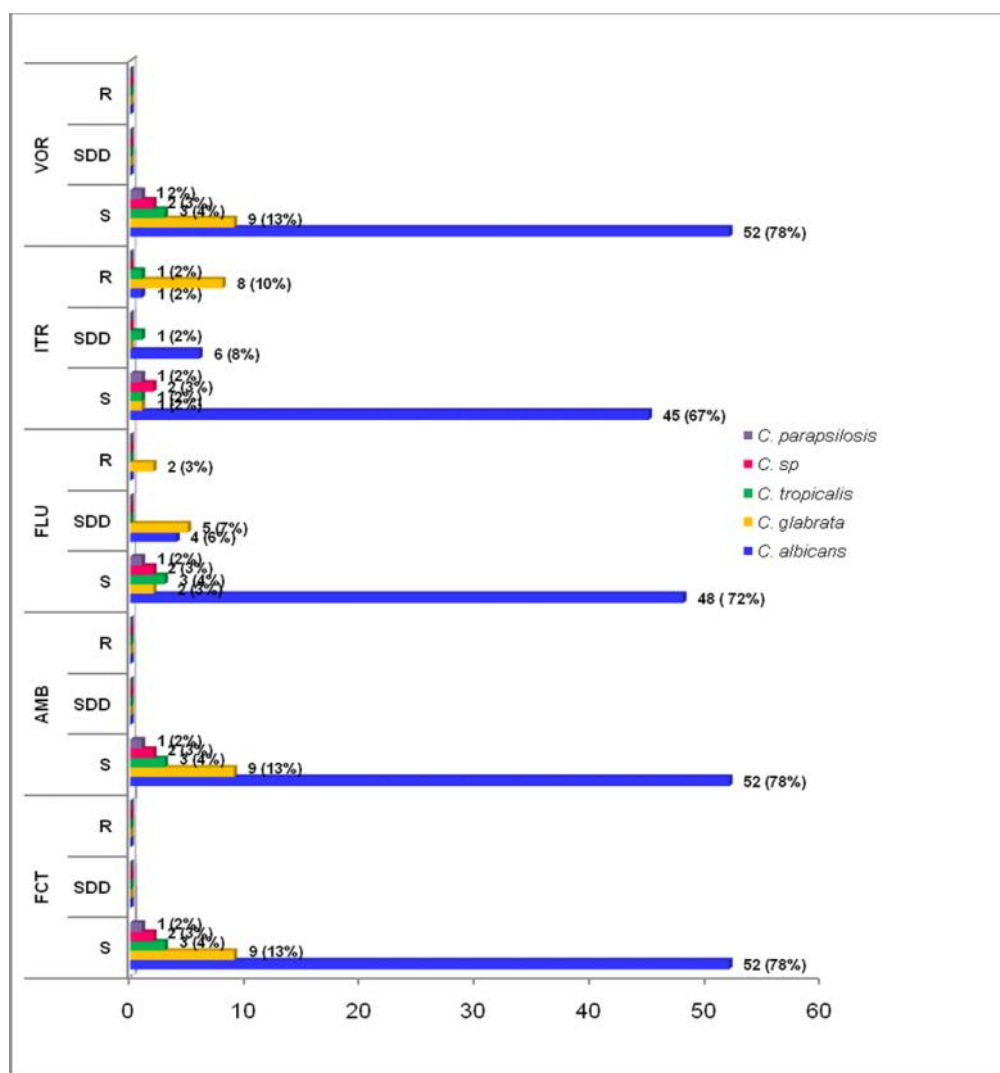
ANTIFÚNGICO	S ^a		SDD ^b		R ^c	
	ATB™ FUNGUS 3 n (%)	SENSITITRE® YEASTONE® n (%)	ATB™ FUNGUS 3 n (%)	SENSITITRE® YEASTONE® n (%)	ATB™ FUNGUS 3 n (%)	SENSITITRE® YEASTONE® n (%)
5-Flucitosina	67 (100%)	67 (100%)	*****	*****	*****	*****
Anfotericina B	67 (100%)	67 (100%)	*****	*****	*****	*****
Fluconazol	56 (83.58%)	64 (95.52%)	9 (13.43%)	3 (4.48%)	2 (2.98%)	*****
Itraconazol	50 (74.63%)	55 (82.09%)	7 (10.45%)	3 (4.48%)	10 (14.92%)	9 (13.43%)
Voriconazol	67 (100%)	67 (100%)	*****	*****	*****	*****

^aS: Sensible, ^bSDD: Susceptibilidad Dependiendo de la Dosis, ^cR: Resistente

Fuente: Datos experimentales

En la Gráfica 1, se muestra la sensibilidad a los antifúngicos de las distintas especies aisladas de *Candida*. Los aislamientos resistentes a fluconazol (FLU) e itraconazol (ITR) estuvieron representados por *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Algunas especies, presentaron sensibilidad dependiendo de la dosis, principalmente para fluconazol (*C. albicans* y *C. glabrata*) e itraconazol (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*).

Gráfica 1. Susceptibilidad antifúngica de los aislamientos de *Candida* provenientes de las personas viviendo con VIH/sida (PVVs) en el sistema ATB™ FUNGUS 3 (N=67).



Fuente: Datos experimentales

5-FC= 5-flucitosina, AMB= anfotericina B, FLU= fluconazol, ITR= itraconazol, VOR= voriconazol, S= susceptible, SDD= susceptible dependiendo la dosis, R= resistente

El **Cuadro 4** muestra el grado de concordancia entre los métodos utilizados (Sensititre[®] YeastOne[®] - ATB[™] FUNGUS 3) en las diferentes especies estudiadas, por medio del índice Kappa ponderado. El grado de concordancia para fluconazol (FLU) fue óptima para *C. albicans* (Kappa: 0.97), mientras que para las especies *no-albicans* fue buena (Kappa: 0.63) para ambos métodos. En el caso de itraconazol (ITR) el grado de concordancia fue buena para *C. albicans* (Kappa: 0.66) mientras que para las otras especies de *Candida* -*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida sp.*, *C. parapsilosis*- (Kappa: 0.86) presentó una concordancia óptima para ambos métodos. Sin embargo, al revisar el comportamiento de acuerdo con una especie-específica, se observó que en el caso particular de 5-FCT, AMB y VOR, *C. albicans* y las otras especies de *Candida*, para ambos métodos, mostraron una perfecta correlación.

Los datos correspondientes a la especificidad y sensibilidad diagnóstica para dos de los cinco antifúngicos evaluados se presentan en el **Cuadro 5**. Para fluconazol (FLU), la sensibilidad fue de 100% (IC₉₅= 50-100) y una especificidad de 98% (IC₉₅= 94-100), con un VPP de 50% (IC₉₅= 0-100), un VPN de 100% (IC₉₅= 99-100) y con una eficacia diagnóstica de 98% (IC₉₅= 95-95). Para el itraconazol (ITR), la sensibilidad y especificidad fue de 100% (IC₉₅= 94-100) y 98% (IC₉₅= 94-100) respectivamente, con un VPP de 90% (IC₉₅= 66-100), VPN de 100% (IC₉₅= 99-100) y una eficacia diagnóstica de 98% (IC₉₅= 94-100). Sin embargo, cabe destacar que con el sistema ATB[™] FUNGUS 3 no se observó ninguna cepa resistente a 5-flucitosina (5-FCT), anfotericina B (AMB) y voriconazol (VOR). La especificidad del método fue de 100% y VPPN de 96.3%, haciendo la salvedad de que esta prevalencia alta de cepas sensibles y baja de cepas resistentes conllevan a que dichas estimaciones pierdan valor.

Cuadro 4. Concordancia entre los métodos Sensititre® YeastOne® - ATB™ FUNGUS 3 para los agentes antifúngicos empleados (N=67).

Especie (n)	Antifúngico	Método	% CMI			Índice Kappa ^d	IC 95%
			S ^a	SDD ^b	R ^c		
<i>C. albicans</i> (52)	5- Flucitosina	SENSITITRE® YEASTONE®	100			1	
		ATB™ FUNGUS 3	100				
	Anfotericina B	SENSITITRE® YEASTONE®	100			1	
		ATB™ FUNGUS 3	100				
	Fluconazol	SENSITITRE® YEASTONE®	98.08	1.93		0.97	
		ATB™ FUNGUS 3	92.31	7.69			
	Itraconazol	SENSITITRE® YEASTONE®	98.08		1.92	0.66	(0.03-1.00)
		ATB™ FUNGUS 3	84.61	11.54	3.85		
	Voriconazol	SENSITITRE® YEASTONE®	100			1	
		ATB™ FUNGUS 3	100				
Otras especies [†] (15) (<i>no-albicans</i>)	5- Flucitosina	SENSITITRE® YEASTONE®	100			1	
		ATB™ FUNGUS 3	100				
	Anfotericina B	SENSITITRE® YEASTONE®	100			1	
		ATB™ FUNGUS 3	100				
	Fluconazol	SENSITITRE® YEASTONE®	80	13.33	6.66	0.63	(-0.01-1.00)
		ATB™ FUNGUS 3	53.33	33.33	13.33		
	Itraconazol	SENSITITRE® YEASTONE®	26.66	20	53.33	0.86	(0.61-1.00)
		ATB™ FUNGUS 3	33.33	6.66	60		
	Voriconazol	SENSITITRE® YEASTONE®	100			1	
		ATB™ FUNGUS 3	100				

^aS: Sensible, ^bSDD: Susceptibilidad Dependiendo de la Dosis, ^cR: Resistente
Fuente: Datos experimentales

^dÍndice Kappa Ponderado: la concordancia perfecta se refleja con un índice igual a 1
[†]Otras especies: *C. glabrata* (n=9), *C. tropicales* (n=3), *C. spp.* (n=2), *C. parapsilosis* (n=1)

Cuadro 5. Desempeño diagnóstico del ATB™ FUNGUS 3 para el estudio de sensibilidad al FLU e ITR (N=67).

	Sensibilidad (%) (IC=95%)	Especificidad (%) (IC=95%)	VPP ^g (%) (IC=95%)	VPN ^h (%) (IC=95%)	Eficacia diagnóstica (%)
FLU ^e	100 (50-100)	98 (94-100)	50 (0-100)	100 (99-100)	98 (95-92)
ITR ^f	100 (94-100)	98 (94-100)	90 (66-100)	100 (99-100)	98 (94-100)
^e FLU: fluconazol; ^f ITR: itraconazol Fuente: Datos experimentales		^g VPP: valor predictivo positivo ^h VPN: valor predictivo negativo			

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En personas inmunocomprometidas, las infecciones fúngicas oportunistas se han constituido en un serio problema médico (Fidel, J, Vázquez, J., Sobel, J., 1999; Golecka, M., Oldakowska-Jedynak, U., Mierzwinska E., 2006). Las especies de *Candida* suelen ser detectadas en la mucosa oral de 40% a 60% de la población general, pero diversos factores de riesgo, tales como ocurre en los pacientes con infección por VIH, incrementan su frecuencia, y la especie *C. albicans* es la causa principal. (Redding, S., Kirkpatrick, W., Dib, O., Fothergill, A., Rinaldi, M., Patterson, T., 2000) Si bien *C. albicans* sigue siendo la causa más común de candidemia, aproximadamente 35% de las candidiasis sistémicas han sido remplazadas por otras especies “no-albicans”, reportándose por tanto una emergencia de éstas (Fisher-Hoch, S., Hutwagner, L., 1995; Pfaller, M., Diekema, D., 2002; Wingard, J., 1995). Estas especies “no-albicans” generan dificultades terapéuticas, lo que conlleva al surgimiento de nuevos patrones de sensibilidad a los antifúngicos (Ghannoum, M., Rice, L., 1999; Mahayni, R., Vázquez, J., Zervos, M., 1995).

Por la necesidad de simplificar la metodología descrita en el documento M27-A2 para los laboratorios de rutina, se han desarrollado varias técnicas comerciales. Éstas permiten evaluar la susceptibilidad *in vitro*, siendo más económicas y más rápidas que el estándar de referencia.

Del grupo de pacientes en estudio, se aislaron 67 cepas de *Candida* obtenidas de 56 pacientes viviendo con VIH, de la “Clínica Luis Ángel García”, las cuales fueron aisladas de la mucosa oral. La frecuencia con la que se presentaron dichas especies fue la siguiente: *C. albicans* se aisló en un 78%, mientras que las especies *no- albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida spp.* y *C. parapsilosis*) se aislaron en un 22%. Los datos obtenidos en dicho estudio, concuerdan con los obtenidos en un estudio que se llevó a cabo en África del Sur, en el cual *C. albicans* fue la especie más comúnmente aislada (78.6%), seguida por las especies *no-albicans* (21.4%). En dicho estudio las especies *no-albicans* aisladas fueron: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* (Mrudula, J., Maeve, M., 2006, 1281). Estas especies también fueron aisladas en esta investigación, con excepción de *C. krusei*. En un estudio llevado a cabo en Colombia, se reportó a *C. albicans* como la principal especie aislada (87.5%), mientras que las especies *no-albicans* reportadas fueron *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Gutiérrez, C., De Bedout, C.,

Tobón, A., Cano, L., Arango, M., Tabares, A., Rastrepo, A., 2007). Estos datos son similares a los obtenidos en el presente estudio.

Según Aguirre Urizar JM, *et al*, 2004, Delgado W, *et al*, 1997 y Ramírez Amador VA, *et al*, 1996, la candidiasis eritematosa, la pseudomembranosa y la queilitis angular, son las formas más frecuentes de candidiasis entre los pacientes infectados por el VIH. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se encontró que las tres formas principales de manifestación oral fueron la pseudomembranosa, candidiasis eritematosa y queilitis angular.

En un estudio llevado a cabo en España se observó que la forma más común aislada fue la eritematosa seguida por la pseudomembranosa y queilitis angular, no encontrándose lesiones hiperplásicas. Estos resultados son semejantes con los de este estudio, excepto en que la pseudomembranosa fue la más aislada seguida de la eritematosa (Ceballos, A., Gaitán, L., Ruesga, M., Ceballos, L., Quindós, G., 1998).

De acuerdo con la literatura, el SIDA ataca a los adultos en sus años de plenitud laboral (personas que fueron infectadas de adolescentes o jóvenes), se concentra en el grupo de 25 a 45 años de edad y es más frecuente en hombres; aunque en algunas regiones las mujeres están siendo más vulnerables (Ashford, L., 2006). En Guatemala, los pacientes que viven con VIH/Sida y que manifiestan candidiasis oral, tienden a ser adultos jóvenes, económicamente activos y en su mayoría hombres (44/56, 78.6%), cuyas parejas corren el riesgo de ser infectadas (Samayoa, B., Arathoon, E., Anderson, M., Rodriguez, J., Quattrini, E., Gordillo, C., Cotton, L., 2003).

Los patrones de resistencia global obtenidos de las 67 cepas en estudio del género *Candida* por las metodologías Sensititre[®] YeastOne[®] - ATB[™] FUNGUS 3 con respecto a los agentes antifúngicos, demostraron que ambos métodos presentaron resistencia para itraconazol (ITR), no siendo así para fluconazol (FLU), en donde sólo el sistema ATB[™] FUNGUS 3 presentó resistencia. Así mismo, ambos métodos presentaron sensibilidad para 5-Flucitosina (5-FCT), Anfotericina B (AMB) y Voriconazol (VOR).

En cuanto al comportamiento especie-específica, *C. albicans* presentó resistencia a itraconazol (ITR) mientras que *C. glabrata* presentó resistencia a fluconazol (FLU) e itraconazol (ITR). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en México, en el cual reportaron resistencia a itraconazol (ITR) en los aislamientos de *C. albicans* y *C. glabrata*, así como resistencia a fluconazol (FLU) sólo para *C. glabrata* (Sánchez-Vargas,

L., Ortiz-López, N., Villar, M., Moragues, D., Aguirre, J., Cashat-Cruz, M., López-Ribot, J., Quindós, G., 2005).

Otro estudio realizado en Venezuela, demostró que *C. albicans* presentó resistencia a itraconazol (ITR) y fluconazol (FLU), siendo *C. glabrata*, la levadura que presentó mayor resistencia para ambos antifúngicos. Estas mismas especies presentaron resistencia a itraconazol y fluconazol en este estudio, exceptuando *C. albicans*, el cual no presentó ninguna resistencia a fluconazol (Dominguez, V., Borrero, L., Crespo, A., González, L., Hartmann, C., Sánchez, C., 2005).

Ninguna de las otras especies presentó resistencia a los antifúngicos estudiados. Solamente el 6% (4/67) de aislamientos de *C. albicans* y 7% (5/67) de *C. glabrata* presentaron susceptibilidad dependiendo de la dosis a fluconazol (FLU), mientras que para itraconazol solo el 8% (6/67) de aislamientos para *C. albicans* y el 2% (1/67) para *C. glabrata* presentaron susceptibilidad dependiendo de la dosis. En general los patrones de susceptibilidad obtenidos en la población guatemalteca, no difiere en mucho con los obtenidos en otros estudios.

La concordancia general entre el sistema ATB™ FUNGUS 3 y el método Sensititre® YeastOne® fue del 78%. Ambos métodos son comparables para la mayoría de los antifúngicos evaluados. Para los aislamientos de *C. albicans*, la concordancia fue buena (66%) (61-80%) para itraconazol (ITR), mientras que para las especies *no-albicans* la concordancia fue óptima (86%) (81-99%). En cuanto al fluconazol (FLU), sólo las especies *no-albicans* presentaron una concordancia buena (63%) (61-80%) para este antifúngico. Resultados semejantes a los de éste estudio -exceptuando que fluconazol (FLU) para los aislamientos de *C. albicans* presentó una concordancia buena-, se obtuvieron en estudios realizados en España y Estados Unidos, los cuales demostraron que la concordancia global entre el ATB™ FUNGUS 2 y el Sensititre® YeastOne® fue excelente. La concordancia por antifúngico cuando los resultados de ATB™ FUNGUS fueron comparados con los de Sensititre® YeastOne® fue óptima para 5-flucitosina (5-FCT) y anfotericina B (AMB), pero más baja para los triazoles (Eraso, E., Ruesga, M., Villar-Vidal, M., Carrillo-Muñoz, A., Espinel-Ingroff, A., Quindós, G., 2008; Torres-Rodríguez, J., Alvarado-Ramírez, E., 2007).

Algunas especies como *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, pueden presentar el fenómeno de crecimiento residual con los azoles, tales como fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol, lo que provoca una sobreestimación de la CIM y una fuente

importante de variabilidad (Cuenca-Estrella, M., Gómez-López, A., Mellado, E., Rodríguez-Tudela, J., 2005; Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., Gómez-López, A., Perkins, A., Buitrago, M., Rodríguez-Tudela, J., 2005). La concordancia reportada para los aislamientos de *C. albicans* y especies *no-albicans* para el fluconazol e itraconazol, pudieron verse afectados por dicho crecimiento residual; este hallazgo también fue informado por Cuenca-Estrella *et al.* en sus trabajos.

En este estudio se determinó el desempeño diagnóstico del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne® a través de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Los resultados obtenidos mostraron que el ATB™ FUNGUS 3 tuvo un desempeño diagnóstico bueno con respecto al método Sensititre® YeastOne®; la alta confiabilidad del método se determinó al observar los altos valores predictivos en general, así como también los altos valores de sensibilidad y especificidad para fluconazol (FLU) e itraconazol (ITR).

Con respecto al fluconazol (FLU), la sensibilidad diagnóstica obtenida, fue buena (100%) ($IC_{95\%}=50-100$), esto indicó que el sistema ATB™ FUNGUS 3 tuvo la capacidad de detectar el 100% de las cepas resistentes (verdaderos positivos) ante este antifúngico, mientras que la especificidad, indicó que el sistema ATB™ FUNGUS 3 tuvo la capacidad de detectar el 98% ($IC_{95\%}= 94-100$) de las cepas sensibles (verdaderos negativos). Si bien para el fluconazol (FLU), la sensibilidad diagnóstica fue buena, el VPP fue bajo (50%) ($IC_{95\%}= 0-100$), lo cual nos indicó que del 100% de cepas resistentes, sólo el 50% fue realmente resistente para ese antifúngico. Caso contrario con el VPN, el cual fue bueno (100%) ($IC_{95\%}= 99-100$). Cabe destacar el buen desempeño que se obtuvo a través del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al itraconazol (ITR), el cual está determinado por su buena sensibilidad y especificidad (100%-98%) ($IC_{95\%}= 94-100$), VPP (90%) ($IC_{95\%}= 66-100$) y VPN (100%) ($IC_{95\%}= 99-100$).

X. CONCLUSIONES

1. En comparación con *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida sp.* y *C. parapsilosis*, *C. albicans* fue el patógeno con mayor aislamiento en pacientes con VIH.
2. La 5-Flucitosina, Anfotericina B y el Voriconazol fueron los antifúngicos con mejor actividad en el tratamiento de las diferentes especies de *Candida*.
3. Aunque es necesario realizar más estudios, el ATB™ FUNGUS 3 ante 5-Flucitosina, Anfotericina B y Voriconazol, fue un método fiable en la resistencia de especies de *Candida* incluidas en el presente estudio.
4. El fenómeno de crecimiento residual que presentan algunas especies como *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* pudo afectar la baja concordancia cuando se evaluaron Fluconazol e Itraconazol como antifúngicos en este estudio.
5. Las especies de *Candida* y dependiendo del antifúngico utilizado, pudieron afectar la sensibilidad y especificidad del sistema ATB™ FUNGUS 3 con respecto al método Sensititre® YeastOne®.

XI. RECOMENDACIONES

1. Identificar prioritariamente las especies y resistencia antimicrobiana del género *Candida*, antes de iniciar un tratamiento antifúngico.
2. Implementar medidas de vigilancia epidemiológica para determinar las especies más importantes de *Candida* así como sus patrones de resistencia.
3. Capacitar al personal de laboratorio encargado de las pruebas de identificación y sensibilidad de las levaduras, para su realización e interpretación, así como mantener una buena comunicación con los médicos responsables de los pacientes que se puedan ver afectados por este tipo de infecciones, especialmente pacientes con VIH, en intensivo o pacientes con algún inmunocompromiso.
4. Establecer un sistema de monitoreo de la resistencia de las levaduras a los antimicóticos, en los aislamientos de pacientes con VIH, en intensivo o pacientes con algún inmunocompromiso, antes de iniciar el tratamiento y durante el mismo, para evitar recurrencias de candidosis.

XII. REFERENCIAS

- Adams D. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*; 150:2029-2035.
- Alexopoulos C. *et al.* (1996) *Introductory to mycology*. United States: John Wiley & Sons, Inc.; 21-48, 272-280.
- Anderson J. (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol*; 3:547-556.
- Arenas E. (2005) Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. *Rev Ciencia y Trabajo*; 15(1):52-67.
- Ashford L. (2006) Cómo se ven afectadas las poblaciones por el VIH y el Sida. *BRIDGE*, 2-4.
- Berrouane Y, Herwaldt L, Pfaller M. (1999) Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol*; 32(2):531-537.
- Bidart T. (2004) Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. *Revista Chilena de Infectología*, 22(2), 40-45.
- Ceballos, A., Gaitán, L., Ruesga, M., Ceballos, L., Quindós, G. (1998) Prevalencia de lesiones orales por *Candida* en una población con sida sometida a terapia antirretroviral altamente activa. *Revista Iberoamericana de Micología*; 15(1), 141-145.
- Cohen J & Powderly W. Cohen & Powderly (2004) *Infectious Diseases*. United States: Mosby. 1291.
- Coleman D, Rinaldi M, Haynes K, Rex J, Summerbell R, Anaissie E, *et al.* (1998) Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol*; 36:156-65.
- Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL., Perkins, A. (2005) Evaluation of the commercial method ATB F2 for the detection *in vitro* of antifungal resistance and its correlation with the reference method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST), and the micromethod of the NCCLS. Poster M-1601, 45 Annual ICAAC, New Orleans, September.
- Delgado W. Aguirre JM. (1997) Las micosis orales en la era del sida. *Rev Iberoam Micol*; 14, 14-22.

- Dick J, Merz W, Saral R. (1980) Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother*; 18:158-63.
- Diomedi A. (2004) Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Revista Chilena de Infectología*; 21(2), 89-101.
- Enoch D, Ludlam H, Brown N. (2006) Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Med Microbiol*; 55, 809-818.
- Espinel-Ingroff A. (2008) Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeast and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*; 25, 101-106.
- Espinel-Ingroff A. (1996) Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol News*; 18(21), 161-168.
- Espinel-Ingroff A. (1997) Clinical Relevance of antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am.*; 11, 929-944.
- Fothergill A, Rinaldi M, Sutton D. (2006) Antifungal susceptibility testing. *Infect Dis Clin N Am.*; 20, 699-709.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba, J, Garmendia G., Jiménez F. (1998) Life-threatening adverse event after amphotericin B lipid complex treatment in a patient treated previously with amphotericin B deoxycholate. *Clin Infect Dis.*; 26, 1016.
- Gregori B. (2005) Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*; 39(2), 1-15.
- Groll A, Piscitelli S, Walsh T. (1998) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol*; 44, 343-500.
- Henry J. (2005) *El Laboratorio en el diagnóstico clínico*. Henry. España: Marbán Libros. 1504.
- III Curso Hispano Argentino de Micología Médica. "Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio". *Memorias*. Buenos Aires Argentina. 2000.
- Maclure M. Misinterpretation and misuse of kappa statistic. *Am Epidemiol* 1987; 126, 161-169.
- Manual técnico para antibiograma de levaduras ATB™ FUNGUS 3. Biomérieux® S.A. Francia. Ref. 14-204.
- Manual técnico para antibiograma de levaduras Sensititre® YeastOne®. TREK Diagnostic Systems. United Kingdom. YST04_V1.2.

- Marcilla A, Valentín E, Sentandreu R. (1998) The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Internat Microbiol*; 1, 107-116.
- Mujica M., *et al.* (2004) Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. *Revista Argentina de Microbiología*; 36, 107-112.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard cv M27A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania. 1997.
- Odds F C, Bernaerts R. (1994) CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presuntive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*; 32, 1923-1929.
- Odds F. (2003) Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. *Mycologist*; 17(2), 51-55.
- Orozco AS., *et al.* (1998) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*; 42, 2645-2649.
- Paiz W. (2008) Determinación y caracterización de especies de *Candida* en personas viviendo con VIH/Sida que acuden a la Clínica Familiar "Luis Ángel García" del Hospital General San Juan de Dios. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia); 68.
- Pfaller M, Diekema D. (2007) Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*; 20(1), 133-163.
- Pfaller M, Yu W. (2001) Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am*; 15(4), 1227-61.
- Pfaller MA, Yu WL. (2001) Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am*; 15(4), 1227-61.
- Piemonte P, *et al.* (1996) *Emergency* of fluconazole-resistant infections by *Candida krusei* and *Candida glabrata* in neutropenic patients. *Rev Med Chil*; 124, 1149.
- Polak A. (1990) Mode of action studies. En: Ryley J, editor. *Chemotherapy of fungal Diseases*. Berlin: Springer-Verlag,; 153-182.
- Pontón J. (2008) La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol*; 25, 78-82.
- Procop G, Roberts G. (2004) Emerging Fungal Diseases: The importance of the host. *Clin Lab Med*; 24, 691-719.

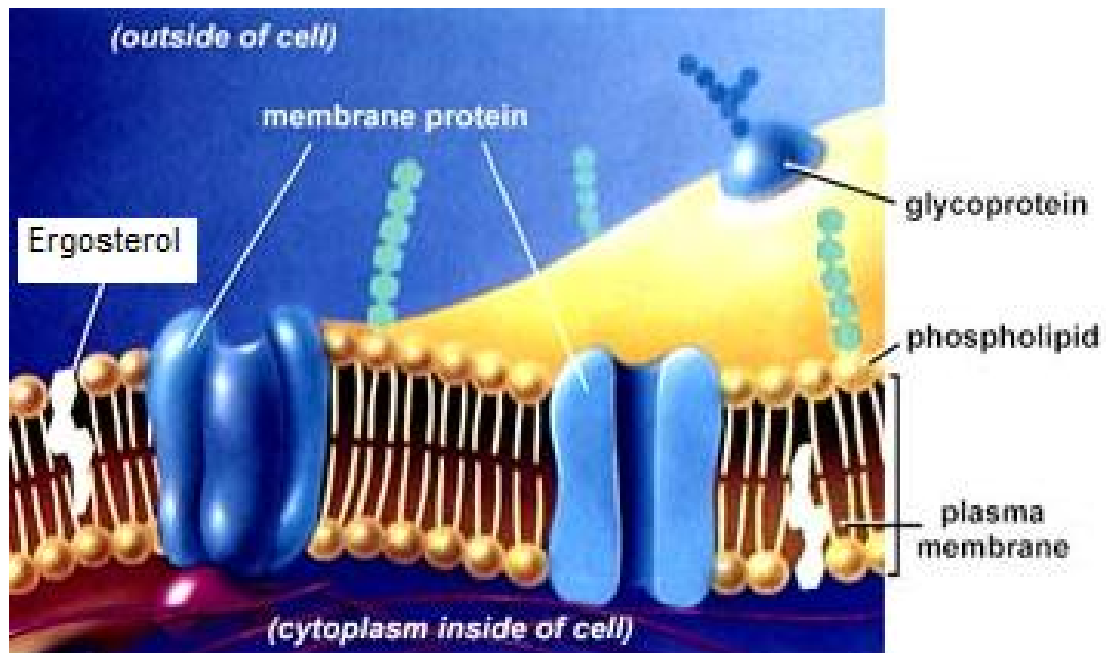
- Ramírez Amador VA, Esquivel Pedraza L, Ponce de León S. (1996) Prognostic value of oral candidosis and hairy leucoplaquia in 111 Mexican HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med*; 25, 206-211.
- Rex J, Bennett J, Sugar A, Pappas P, Van der Horst C, Edwards J, *et al.* (1994) A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med*; 331, 1325-1330.
- Rex J, Pfaller M, Galgiani J, Bartlett M, Espinel I, Ghannoum M *et al.* (1997) Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro- in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis*; 24, 235-247.
- Rex J, Pfaller M, Galgiani J, Bartlett M, Espinel I, Ghannoum M *et al.* (1997) Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro- in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis*; 24, 235-247.
- Rodríguez J, Cuenca M, Mellado E, Monzón A. (2003) Presente y futuro de la micología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21(2), 75-80.
- Runco R & Van Gelderen A. (2007) Candidiasis en pacientes HIV o con otras inmunodeficiencias secundarias en hospitales de la ciudad de Tucuman (Argentina). *Boletín Micológico*; 22, 75-80.
- Sanglard D. (2003) Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist*; 17(2), 74-78.
- Shepherd MG, Poulter RT, Sullivan PA. (1985) *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol*; 39, 579-614.
- Thompson G, Cadena J, Patterson T. (2009) Overview of antifungal agents. *Clin Chest Med*; 30, 203-215.
- Vanden H. (1997) Mechanisms of antifungal resistance. *Rev Iberoam Micol*; 14, 44-49.
- White T, Marr K, Bowden R. (1998) Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*; 11, 382-402.
- White T, Marr K, Bowden R. (1998) Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*; 11, 382-402.
- Yang Y, Lo H. (2001) Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect*; 34, 79-86.

XIII. ANEXOS

	PÀGINA
Anexo 1: Membrana celular de los hongos	47
Anexo 2: Esquema de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	48
Anexo 3: Desarrollo histórico de los antifúngicos	49
Anexo 4: Clasificación de los antifúngicos por su estructura	50
Anexo 5: Drogas antifúngicas y sus sitios de acción	51
Anexo 6: Ruta biosintética del ergosterol y los puntos de actividad de los agentes antifúngicos	52
Anexo 7: Mecanismos moleculares de resistencia a los agentes antifúngicos	53
Anexo 8: Agentes antifúngicos. Actividad contra los principales patógenos, modo de acción y mecanismos de resistencia	54
Anexo 9: Procedimiento para inoculación del sistema ATB™ FUNGUS 3	55
Anexo 10: Valoración del coeficiente <i>Kappa</i>	56

Anexo 1

Figura 1. Membrana celular de los hongos.



Tomado de: www.livehappy.livehealthy.com

Anexo 2

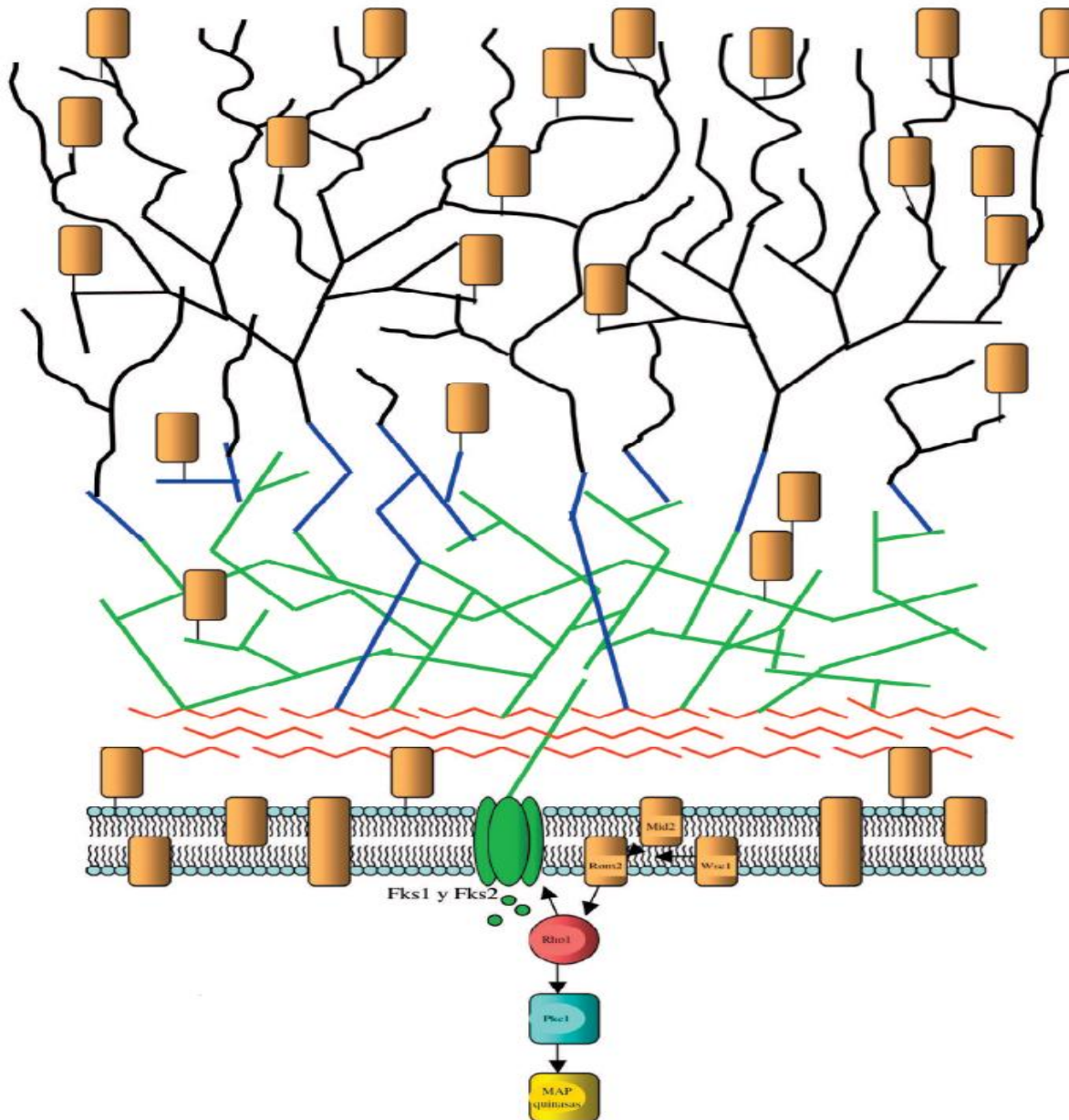
Figura 2. Esquema de la pared celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans*.

Figura. Esquema de la pared celular de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Los polisacáridos de la pared están representados en diferentes colores: quitina (rojo) β-1,3-D-glucano (verde), β-1,6-D-glucano (azul) y mananos (negro). Las proteínas están representadas por rectángulos de color naranja. Las subunidades de la β-1,3-D-glucano sintetasa en la membrana plasmática están coloreadas en verde.

Tomado de: Ponton J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología. 2008; 25:78-82.

Anexo 3

Cuadro 6. Desarrollo histórico de los antifúngicos

	Poliquetidos	Polienos	Azoles	Pirimidinas	Equinocandinas	Aliamnas
1950s	Griseofulvina	Anfotericina B Nistatina	Clormidazol			
1960s			Imidazoles tópicos	Flucitocina		
1970s			Imidazoles sistémicos		Cilofungina	
1980s			Triazoles sistémicos			Naftifina Terbinafine
1990s					Equinocandinas de amplio espectro	

Tomado de: Odds F. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. Mycologist. 2003; 17(2):51-55.

Anexo 4

Cuadro 7. Clasificación de los antifúngicos por su estructura

Estructura	Antifúngico
Polienos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
	Imidazol: miconazol, clotrimazol
Azoles	Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol
	Triazoles de 2da generación: variconazol, ravuconazol y posaconazol
Alaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: caspofungina, anidolofungina, micafungina
Pirimidinas Fluoradas	Flucitocina
Poliketidos	Griseofulvina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato

Tomado de: Gregori B. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm. 2005; 39(2); 1-15.

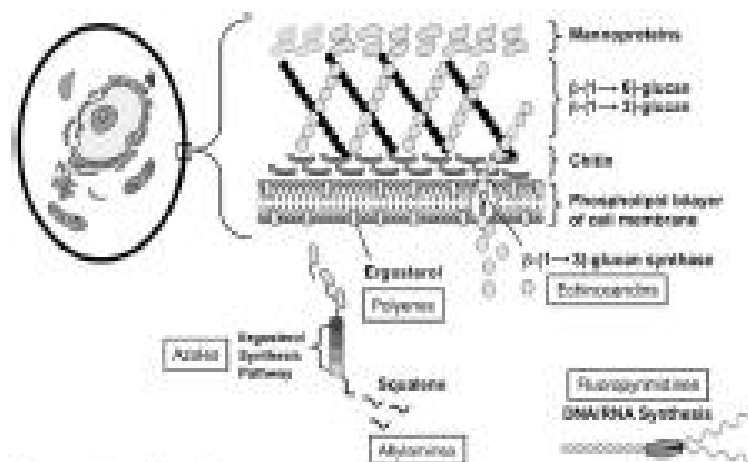
Anexo 5

Cuadro 8. Drogas antifúngicas y sus sitios de acción

Compuesto	Ejemplo de antifúngico	Sitio de acción
Alilaminas	Terbinafine	Síntesis del ergosterol, escualeno epoxidasa
Antimetabolitos	Flucitosina	Acido nucléico fúngico (ARN ó ADN)
Azoles	Fluconazol	Síntesis del ergosterol, lanosterol demetilasa
Equinocandinas	Caspofungina	Pared celular, síntesis de la β -1-3- glucano
Otros	Griseofulvina	Aparato mitótico fúngico

Tomado de: Anderson J B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. Nat Rev Microbiol 2005; 3:547-556.

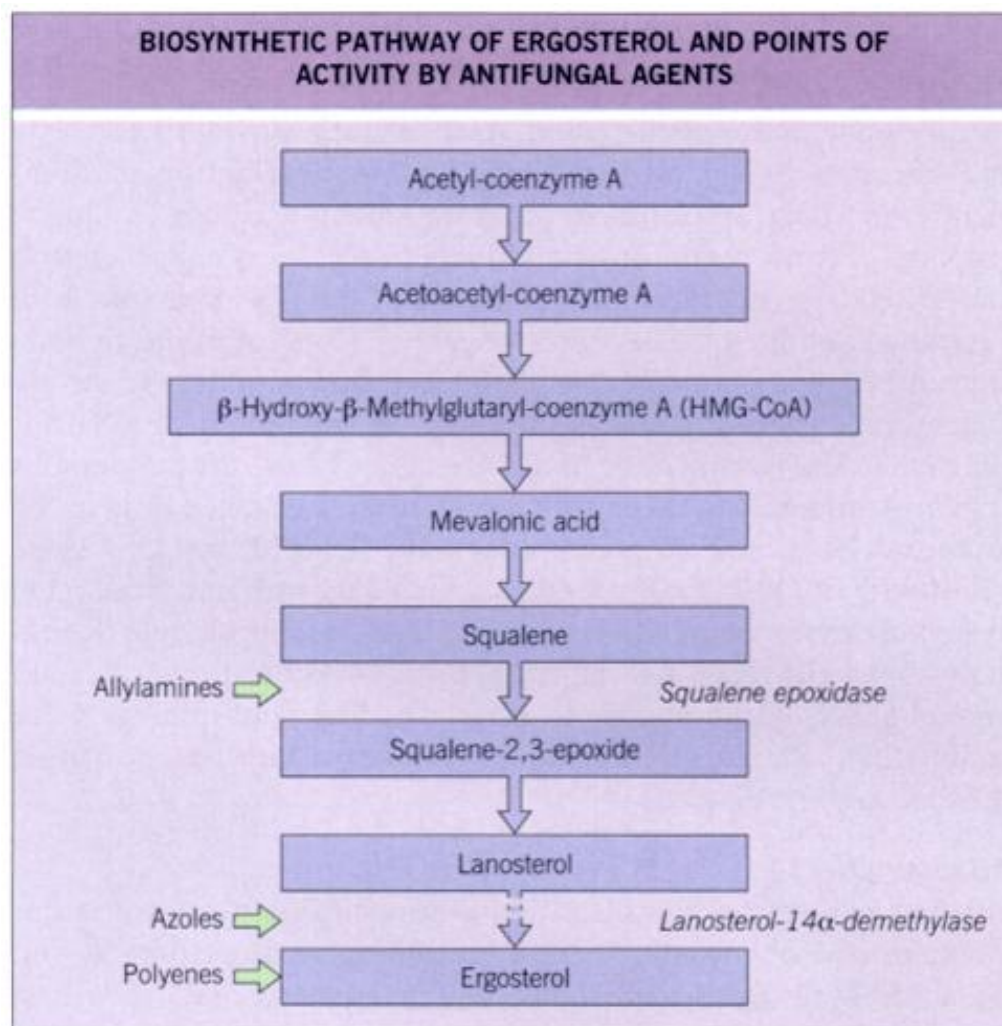
Figura 3. Drogas antifúngicas y sus sitios de acción



Tomado de: Thompson G, Cadena J, Patterson T. Overview of antifungal agents. Clin Chest Med 2009; (30):203-215.

Anexo 6

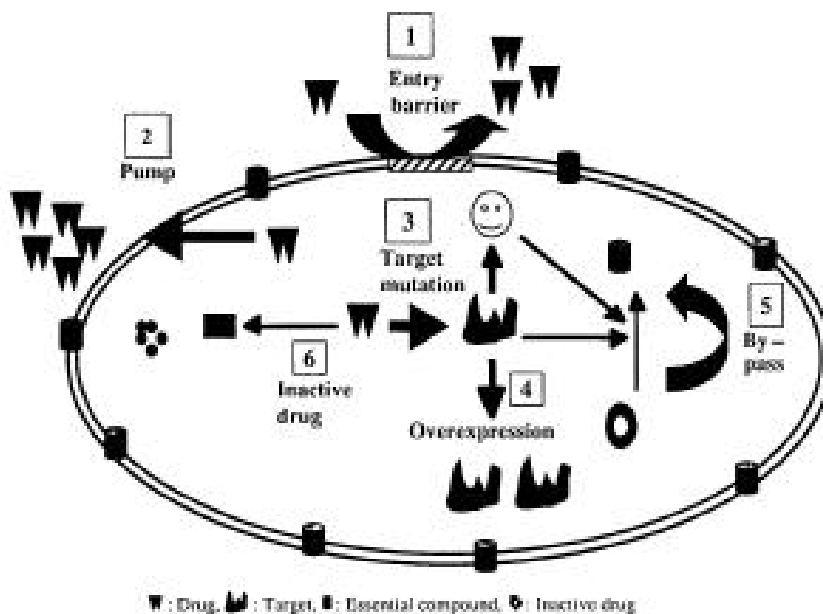
Figura 4. Ruta biosintética del ergosterol y los puntos de actividad de los agentes antifúngicos.



Tomado de: Cohen J & Powderly W. Cohen & Powderly: Infectious Diseases. United States: Mosby, 2004. 1291 p.

Anexo 7

Figura 5. Mecanismos moleculares de resistencia a los agentes antifúngicos.



¹ Alteraciones de la membrana celular y/o pared celular que previenen la entrada de la droga.

² Sobreexpresión de bombas de eflujo que reducen la acumulación de la droga en la célula.

³ Mutaciones en el sitio de acción de la droga que previenen su unión.

⁴ Sobreexpresión de los sitios de acción de la droga que provocan que la droga falle para inhibir completamente la reacción bioquímica

⁵ Mutaciones en los genes

⁶ Inactivación o degradación de la droga

Tomado de: Yang Y L, Lo H J. Mechanisms of antifungal agent resistance. J Microbiol Immunol Infect. 2001; 34:79-86.

Anexo 8

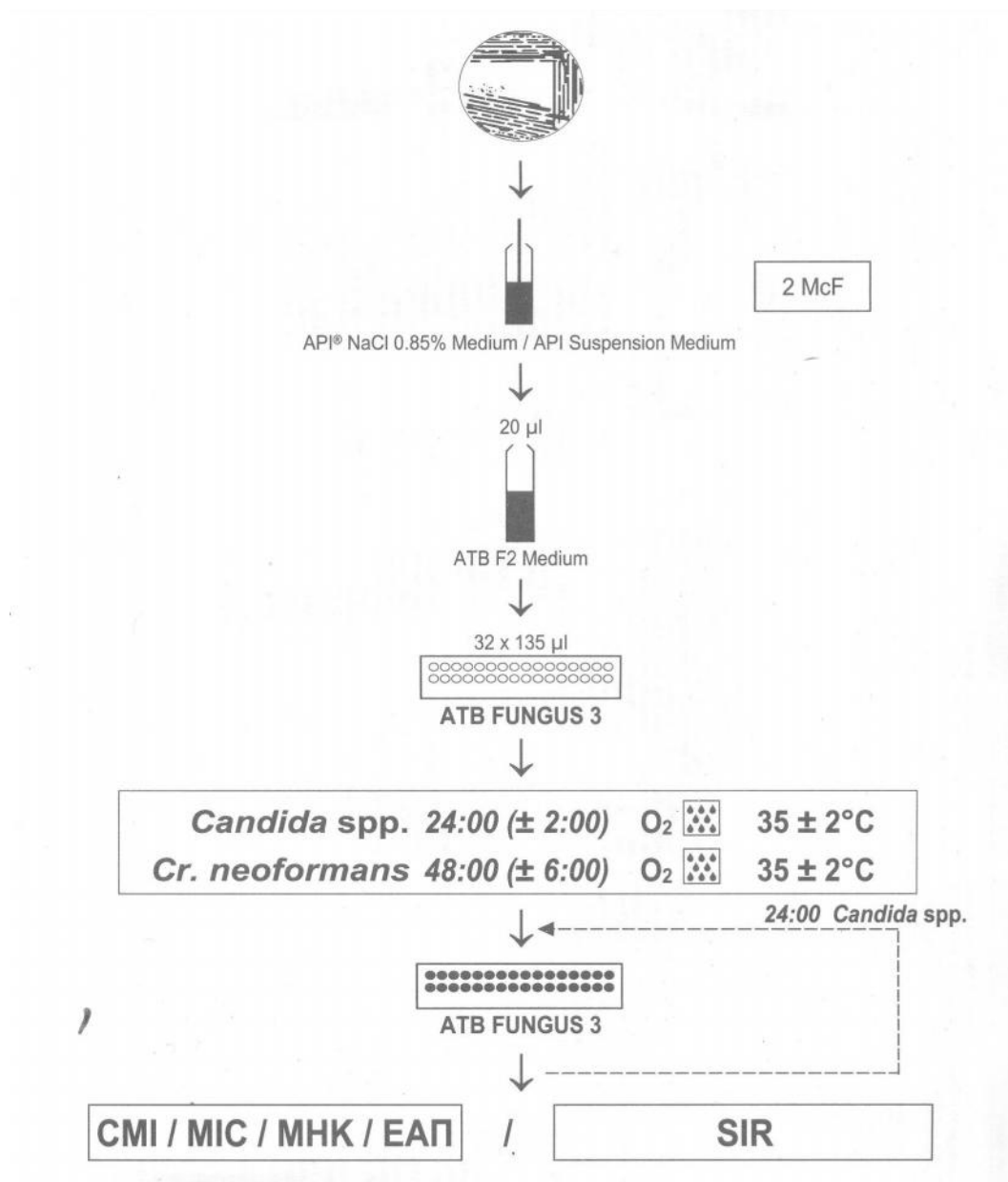
Cuadro 8. Agentes antifúngicos: actividad contra los principales patógenos, modo de acción y mecanismos de resistencia.

Antifúngico	Espectro	Modo de acción	Mecanismo de resistencia
Polienos			
Anfotericina B	Amplia actividad contra <i>Candida</i> spp. (excepto <i>C. lusitanae</i>), <i>C. neoformans</i> y hongos filamentosos (excepto <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. terreus</i> y <i>A. flavus</i>)	Unión al ergosterol y desestabilización de las funciones de la membrana	Alteración en pasos específicos de la vía de la biosíntesis del ergosterol
Análogos de las pirimidinas			
5-flucitosina	Actividad contra <i>Candida</i> spp. y <i>Cryptococcus</i> spp., sin embargo, hay una emergencia en la resistencia al utilizarlo como monoterapia	Debilitamiento de la biosíntesis de ácido nucléicos por formación de antimetabolitos tóxicos fluorinados	*Disminución del ingreso de 5-FC *Disminución de la formación de antimetabolitos tóxicos
Azoles			
Fluconazol	Activo contra <i>Candida</i> spp. y <i>Cryptococcus</i> spp., menos activo contra <i>C. glabrata</i> y no activo contra <i>C. krusei</i> . No presenta actividad contra hongos filamentosos.		*Aumento de eflujo por sobrerregulación de los genes transportadores de drogas
Itraconazol	Semejante a fluconazol, sin embargo es útil contra los hongos filamentosos	Inhibición del citocromo P450 14- α -lanosterol demetilasa	*Alteraciones en la diana por mutaciones
Voriconazol	Semejante a voriconazol, pero posee mejor actividad contra los hongos filamentosos, incluyendo <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> spp.		*Alteraciones en pasos específicos de la biosíntesis del ergosterol

Tomado de: Sanglard D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. Mycologist. 2003; 17(2):74-78.

Anexo 9

Figura 6. Procedimiento para inoculación del sistema ATB™ FUNGUS 3



Tomado de: Manual técnico para antibiograma de levaduras ATB™ FUNGUS 3. Biomérieux® S.A. Francia. Ref. 14-204

Anexo 10

Cuadro 9. Valoración del coeficiente *Kappa*.

Coeficiente <i>Kappa</i>	Fuerza de la concordancia
0.00	Malo
0.00-0.20	Pobre
0.21-0.40	Sufrible
0.41-0.60	Regular
0.61-0.80	Buena
0.81-0.99	Óptima
1.00	Perfecta

Tomado de: Maclure M. Misinterpretation and misuse of kappa statistic. American Journal of Epidemiology, 1987; 126; 161-169.