



***EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICOTICA DE LOS TRIAZOLES,
TETRAHIDROFURANOSYL- 1,2,3 – TRIAZOL, EN CINCO ESPECIES DE
CANDIDA ATCC DE IMPORTANCIA CLÍNICA***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

INFORME FINAL

BOGOTÁ D.C

2018



***EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICOTICA DE LOS TRIAZOLES,
TETRAHIDROFURANOSYL- 1,2,3 – TRIAZOL, EN CINCO ESPECIES DE
CANDIDA ATCC DE IMPORTANCIA CLÍNICA***

CRISTIAN ANDRES PASTRANA GOMEZ

PhD. CARMEN CECILIA ALMONACID URREGO

ASESORA INTERNA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

INFORME FINAL

BOGOTÁ D.C

2018

DEDICATORIA

El presente trabajo de grado es dedicado a mi padre, quien me brindo todos los medios necesarios para poder llegar a alcanzar este objetivo en mi vida.

A todo el resto de mi familia y amigos que estuvieron de alguna u otra manera aportando una ayuda para que este proyecto fuese posible.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarme todos los recursos académicos, por medio del cuerpo de profesores donde me enseñaron el camino de la investigación.

A la profesora PhD. Carmen Cecilia Almonacid Urrego que es hoy día nuestra decana de la Facultad de Ciencias de la Salud del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, por haberme brindado la confianza de hacer parte del proyecto con el grupo de investigación ECZA, por su apoyo y estar siempre en todo el proceso de la elaboración del proyecto y sus conocimientos como investigadora.

Al Dr. Cristian Layton Tovar por su asesoría, recomendaciones para el presente proyecto, ya que hizo parte en la síntesis de los compuestos triazólicos y miembro del grupo de investigación ECZA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Al Dr. Eric Cuevas Yañez, Dr. Bayardo Velasco Montejo, del Centro de Investigación de Química Sustentable (CIQS) y al Dr. Hugo Mendieta Zerón de la Asociación Científica Latina ASCILA, por el desarrollo, elaboración y entrega al grupo de investigación ECZA los cuatro compuestos triazólicos que se emplearon en el presente proyecto.

Al profesor PhD. Julián Esteban Muñoz por asesorarme, brindarme apoyo, colaboración y esfuerzo en este proyecto.

A la Dra. Claudia Marcela Parra de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. por cederme gentilmente las cepas de *Candida* ATCC.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS.....	7
1. ANTECEDENTES	8
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1 GENERALIDADES DE LAS LEVADURAS.....	13
2.1.1 Enfermedades causadas por levaduras.....	14
2.2 LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA	15
2.2.1 Características microbiológicas del género <i>Candida</i>	15
2.2.2 Taxonomía del género <i>Candida</i>	16
2.2.3 Características metabólicas	17
2.2.4 Factores de virulencia.....	17
2.3 CANDIDIASIS	18
2.3.1 TIPOS DE CANDIDIASIS	19
2.4 EPIDEMIOLOGIA DE LA CANDIDIASIS A NIVEL MUNDIAL Y EN COLOMBIA.....	21
2.5 AGENTES ANTIFÚNGICOS	26
2.5.1 Clasificación de los antifúngicos	27
2.5.2 Estructura de los antifúngicos	28
2.6 RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS	34
2.6.1 Resistencia a Azoles	35
2.6.2 Resistencia a Equinocandinas.....	35
2.6.3 Resistencia a Polienos	35
2.7 CEPAS DE REFERENCIA CANDIDA ATCC.....	36
2.7.1 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	36
2.7.2 <i>Candida albicans</i> ATCC 90028.....	37

2.7.3	<i>Candida glabrata</i> ATCC 26512.....	37
2.7.4	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019.....	38
2.7.5	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258.....	38
2.8	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	39
2.8.1	Método de dilución en microplaca para levaduras de la CLSI (M27-S4) 40	
2.8.2	Preparación del inóculo.....	41
2.8.3	Inóculo para <i>Candida spp.</i>	41
2.8.4	Inoculación, incubación y lectura de la placa.....	42
2.8.5	Control de pureza del cultivo.....	42
2.8.6	Puntos de corte de la sensibilidad de <i>Cándida spp.</i> frente al FLC	42
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	44
3.1	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	44
3.2	TIPO DE ESTUDIO.....	44
3.3	UNIVERSO.....	44
3.4	MUESTRA.....	44
3.5	HIPOTESIS.....	47
3.6	VARIABLES.....	48
3.6.1	Variable independiente.....	48
3.6.2	Variable dependiente.....	48
3.6.3	Indicadores.....	48
3.7	MATERIALES.....	48
4.	PROCESAMIENTO.....	49
4.1	Medio RPMI 1640.....	49
4.2	Preparación del inóculo.....	50
4.3	Preparación de la solución madre y diluciones de los cuatro compuestos antifúngicos en las microplacas.....	51
4.4	Preparación de la solución madre y las diluciones seriadas del Fluconazol en las microplacas.....	53
4.5	Incubación, Interpretación y Lectura de las microplacas.....	56
4.6	Recolección y análisis de datos.....	57
5.	RESULTADOS.....	58

6. DISCUSIÓN	68
7. CONCLUSIONES.....	71
8. RECOMENDACIONES.....	72
9. ANEXOS	73
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1.	Evolución	histórica	de	los	
antifúngicos.....						26
FIGURA 2.		Las cuatro clases más comunes de agentes antifúngicos sistémicos utilizado en el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas y su mecanismo de acción.....				27
FIGURA 3.		Estructura de la Anfotericina B.....				28
FIGURA	4.	Estructura			del	
Ketoconazol.....						29
FIGURA	5.	Estructura			del	
Voriconazol.....						29
FIGURA 6.		Estructura del Fluconazol.....				30
FIGURA	7.	Estructura			del	
Itraconazol.....						30
FIGURA 8.		Estructura del Ravuconazol.....				30
FIGURA	9.	Estructura			del	
Posaconazol.....						30
FIGURA 10.		Estructura de la Anidulafungina.....				31
FIGURA 11.		Estructura de la Caspofungina.				32
FIGURA 12.		Estructura de la Micafungina.....				32

FIGURA 13. Estructura de los compuestos triazólicos sintetizado en el CIQS (Centro de Investigación de Química Sustentable).....46

FIGURA 14. Esquema del método Microplaca de la CLSI documento M27 – S4, para antifúngicos insolubles en agua, diluyente dimetil sulfóxido (DMSO).....51

FIGURA 15. Esquema del método Microplaca de la CLSI documento M27 – S4, para antifúngicos solubles en agua.....54

LISTA DE GRAFICAS

GRAFICA 1. Frecuencia de microorganismos aislados en no UCI en adultos. Informe GREBO 2017.....23

GRAFICA 2. Frecuencia de microorganismos aislados en UCI en adultos. Informe GREBO, 2017.....23

GRAFICA 3. Frecuencia de microorganismos en UCI en pediátricos y neonatos. Informe GREBO, 2017.....23

GRAFICA 4. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - $\mu\text{g/mL}$) de *Candida albicans* ATCC 90028 frente a los cuatro compuestos triazólicos.....58

GRAFICA 5. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - $\mu\text{g/mL}$) de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a los cuatro compuestos triazólicos.....59

GRAFICA 6. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - $\mu\text{g/mL}$) de *Candida glabrata* ATCC 26512 frente a los cuatro compuestos triazólicos.....60

GRAFICA 7. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - $\mu\text{g/mL}$) de *Candida krusei* ATCC 6258 frente a los cuatro compuestos triazólicos.....61

GRAFICA 8. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - $\mu\text{g/mL}$) de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente a los cuatro compuestos triazólicos.....62

GRAFICA 9. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - $\mu\text{g/mL}$) de las cepas de *Candida* ATCC frente al Fluconazol.....64

GRAFICA 10. Comparación de las CMI's entre los cuatro compuestos triazólicos y el Fluconazol.....65

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Especies más frecuentes del género *Candida* en infecciones micóticas.....16

TABLA 2. Tipos de Candidiasis.....19

TABLA 3. Distribución porcentual de las especies de *Candida* por regiones – Estudio SENTRY.....24

TABLA 4. Mecanismo y tipo de acción de los antifúngicos.....32

TABLA 5. Tasa de resistencia de Fluconazol en <i>Candida</i> sp. de cuatro años de evaluación.....	34
TABLA 6. Puntos de corte del Fluconazol para especies de <i>Candida</i> spp.....	43
TABLA 7. Cepas de <i>Candida</i> ATCC a evaluar <i>in vitro</i>	44
TABLA 8. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua, diluyente DMSO.....	50
TABLA 9. Diluciones de antifúngicos solubles en agua (FLUCONAZOL), diluyente medio RPMI 1640.....	53
TABLA 10. Interpretación de resultados.....	55
TABLA 11. CMI's de las cepas de <i>Candida</i> ATCC.....	66
TABLA 12. Criterios de susceptibilidad de las cepas de <i>Candida</i> ATCC frente a los cuatro compuestos triazólicos.....	66

LISTA DE FOTOGRAFIAS

FOTOGRAFIA 1. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.....	57
FOTOGRAFIA 2. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.....	58
FOTOGRAFIA 3. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Candida glabrata</i> ATCC 26512 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.....	59

FOTOGRAFIA 4. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida krusei* ATCC 6258 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.....60

FOTOGRAFIA 5. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.....61

FOTOGRAFIA 6. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 26512 y *Candida krusei* ATCC 6258 frente al Fluconazol a las 24 horas.....63

FOTOGRAFIA 7. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente al Fluconazol a las 24 horas.....63.

LISTA DE IMÁGENES

IMAGEN 1. Los cuatro compuestos triazólicos.....45

IMAGEN 2. Medio RPMI 1640 LONZA®.....48

IMAGEN 3. Escala 0,5 McFarland de las cepas de *Candida* ATCC.....49

IMAGEN 4. Fluconazol.....52

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. METODO DE REFERENCIA PARA DILUCIÓN, ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD DE LEVADURAS CON ANTIFÚNGICOS, M27 – S4 DEL 2012, CLSI.....	72
ANEXO 2. CERTIFICADO DE ANALISIS DEL MEDIO RPMI 1640 CON L-GLUTAMINA SIN BICARBONATO DE SODIO.....	73
ANEXO 3. COMPONENTES Y FORMULACIÓN DEL MEDIO RPMI 1640 CON L-GLUTAMINA Y SIN BICARBONATO DE SODIO.....	74
ANEXO 4. FOTOS DE LAS CEPAS DE CANDIDA ATCC EN MEDIO SABOURAUD.....	75
ANEXO 5. INSERTO DEL FLUCOBAY – BAYER® (FLUCONAZOL).....	76
ANEXO 6. FOTGRAFIAS DEL FLUCOBAY – BAYER® (FLUCONAZOL).....	77
ANEXO 7. FOTOGRAFIAS DEL PROCEDIMIENTO DE LAS DILUCIONES LOS TRIAZOLES A, B, C, D.....	78
ANEXO 8. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD EN CROMagar® DE LAS CEPAS DE CANDIDA ATCC EN LAS MICROPLACAS.....	79

INDICE DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

DMSO: Dimetilsulfóxido

EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

FLC: Fluconazol

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

MOPS: Ácido Morfolino Propano Sulfónico

S: Sensible

SDD: Sensibilidad Dosis Dependiente.

R: Resistente

RPMI: Roswell Park Memorial Institute



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO

***EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICOTICA DE LOS TRIAZOLES,
TETRAHIDROFURANOSYL- 1,2,3 – TRIAZOL, EN CINCO ESPECIES DE
CANDIDA ATCC DE IMPORTANCIA CLÍNICA***

RESUMEN

Las infecciones fúngicas han tenido un incremento en las últimas décadas y han presentado un problema de trascendencia económica y social donde las instituciones de salud y su personal han tenido dificultad en su atención, la aparición de resistencia en ciertas cepas de *Candida spp.* lo que ha llevado a que los tratamientos con agentes antifúngicos especialmente de la clase de los triazoles presente un fracaso en este tipo de infecciones.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de cuatro compuestos triazólicos (tetrahidrofuranosyl-1,2,3 – triazol), empleando la técnica de microdilución en microplaca propuesto por el CLSI documento M27-S4 del año 2012 para levaduras del género *Candida* ATCC, determinar su concentración mínima inhibitoria y criterios de susceptibilidad.

Se emplearon cuatro compuestos triazólicos y cinco cepas de *Candida* ATCC: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028 , *Candida glabrata* ATCC 26512, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 . Las cepas fueron expuestas a concentraciones de 16 µg/mL – 0,03 µg/mL, frente a los

cuatro compuestos triazólicos sintetizados en el CIQS (Centro de Investigación de Química Sustentable), siguiendo la técnica de microdilución en microplaca como lo establece el CLSI, utilizando como antifúngico control al Fluconazol e incubando las placas a 35°C por 24 horas. La concentración mínima inhibitoria de los compuestos oscilan entre 0,125 µg/mL – 16 µg/mL, comparado con el Fluconazol que fue de 2 µg/mL – 16 µg/mL.

Los derivados triazólicos sintetizados en el CIQS muestran un efecto antifúngico eficaz *in vitro* en las cepas de *Candida* ATCC, por lo que se recomienda llevar a cabo estudios microbiológicos *in vivo* para asegurar la eficacia de estos compuestos en infecciones fúngicas desarrollada por *Candida spp.*

Palabras claves: Antifúngico, Concentración mínima inhibitoria, CLSI, Triazol, ATCC, *Candida spp.*

Estudiantes: Cristian Andrés Pastrana Gómez

Docente: PhD. Carmen Cecilia Almonacid Urrego



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO

***EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL SENSITIVITY OF THE TRIAZOLES,
TETRAHYDROFURANOSYL-1,2,3 – TRIAZOL, IN FIVE CANDIDA ATCC
SPECIES OF CLINICAL SIGNIFICANCE***

SUMMARY

Fungal infections have increased in recent decades and have presented a problem of economic and social significance, where health institutions and their staff have had difficulty in their care, the emergence of resistance in the strains of *Candida* sp. That has led to treatments with antifungal agents, specially the class of azoles, present a failure in this type of infections.

The objective of this work is to evaluate the *in vitro* antifungal activity of four triazole compounds (tetrahidrofuranosyl-1,2,3- triazol) , using the microplate microdilution technique proposed by the CLSI document M27-S4 of the year 2012 for yeast of *Candida* genus, determine its minimum inhibitory concentration and susceptibility criteria.

Four triazole compounds and five strains of *Candida* ATCC were used: *Candida albicans* 10231 ATCC, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 26512, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258. Strains were exposed to concentrations of 16 µg/mL – 0,03µg/mL, compared to the four triazoles synthesized in the CIQS (Sustainable Chemistry Research Center),

following the microplate microdilution technique as established by the CLSI, using Fluconazole as antifungal control and incubating the plates at 35°C for 24 hours. The minimum inhibitory concentration of the compounds ranged between 0,125 µg/mL – 16 µg/mL, compared with Fluconazole which was 2 µg/mL – 16 µg/mL.

The triazole derivatives synthesized in the CIQS show an effective antifungal effect *in vitro* in the strains of *Candida* ATCC, for which it is recommended to carry out microbiological studies *in vivo* to ensure the efficacy of these compounds in fungal infections developed by *Candida spp.*

Keywords: Antifungal, Minimum Inhibitory Concentration, CLSI, Triazole, ATCC, *Candida spp.*

Student: Cristian Andrés Pastrana Gómez

Teaching: PhD. Carmen Cecilia Almonacid Urrego

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas representan una de las causas más significativas en personas con enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, donde las levaduras son las de mayor reporte de infección en pacientes inmunocomprometidos. Al buscar nuevas formas de combatir este tipo de infecciones los investigadores se ven enfrentados a grandes retos debido a que las levaduras poseen o adquieren formas de resistencia a los antifúngicos, aún a los de alto grado de efectividad, que conllevan a que un alto porcentaje de las personas que padecen una infección micótica no presenten mejoría en su estado de salud. Debido a esto, las infecciones por levaduras han adquirido una gran importancia en las últimas décadas no solo por su mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos, sino también por su alta morbilidad y mortalidad (1).

Así mismo, el uso indiscriminado de antifúngicos como el fluconazol, en el tratamiento y prevención en pacientes infectados por VIH o pacientes sometidos a quimioterapia, ha conducido a la disminución de la susceptibilidad a este fármaco en levaduras altamente patógenas. Paralelamente a esto se ha observado un incremento en la aparición de nuevas especies patógenas difíciles de diagnosticar y tratar, que tienen gran interés para el área clínica. El reporte diario en las centrales de atención para la salud (hospitales, clínicas, institutos) de hongos patógenos para la salud humana, resistencia a medicamentos y el alto índice de morbilidad y mortalidad, hace que se ofrezcan diferentes alternativas para desarrollar nuevos antifúngicos con alta susceptibilidad en estos microorganismos (2).

Las infecciones fúngicas, en especial la candidiasis, se han constituido en una importante causa de morbi-mortalidad en personas inmunocomprometidas. Diferentes estudios demuestran que la *Candida albicans*, que es el agente más común, y las *Candida no albicans*, han incrementado su presencia en esta clase de pacientes originando en ellos infecciones locales e invasivas. Como una de las estrategias para el tratamiento de este tipo de patologías se ha adoptado el

incremento progresivo de la concentración del principio activo presente en los agentes antifúngicos, práctica que ocasiona que los tratamientos sean menos efectivos por generación de factores de resistencia a los mismos, y que provoca un alto nivel de toxicidad en las personas que se ve reflejado en un retraso en su recuperación y en la presencia de efectos colaterales. Así mismo, se ha evidenciado la aparición de cepas resistentes a los diferentes antimicóticos utilizados en la farmacoterapia, problema que ha ido en aumento en las últimas décadas y que está ocasionando un problema en el área de la salud ya que dificulta el tratamiento de los pacientes con este tipo de infecciones (3,4).

Este proyecto es la continuación de un macroproyecto que está desarrollando la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) en cooperación con la Universidad Autónoma de México (UNAM), el Centro de Investigación de Química Sustentable (CIQS), el Centro de Investigación de Ciencias Médicas (CICMED) y el Semillero ECZA adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, con el fin de diseñar fármacos antifúngicos de la familia de los Triazoles para el tratamiento de pacientes con infección de origen micótico. El CIQS, CICMED, sintetizaron cuatro compuestos antifúngicos de la familia de los triazoles y los llamaron: Tetrahydrofuranosyl-1,2,3-Triazoles.

En esta segunda fase el grupo de investigación ECZA estudiará la susceptibilidad de estos triazoles en cinco especies de *Candida* ATCC, comparada con la susceptibilidad al Fluconazol, que es el antifúngico de elección en este tipo de patologías.

En Colombia existen pocas investigaciones dirigidas al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos que permitan enfrentar los problemas de salud ocasionados por este tipo de hongos, por ende este proyecto está dirigido a evaluar la eficacia y los perfiles de susceptibilidad de los triazoles Tetrahydrofuranosyl - 1,2,3 – Triazol, en diferentes especies de *Candida* ATCC , con el fin de aportar a las ciencias médicas una nueva alternativa para el tratamiento de infecciones fúngicas originadas por levaduras.

OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar la sensibilidad *in vitro* de cinco cepas de *Candida* ATCC, frente a cuatro nuevos antifúngicos de la familia de los triazoles.

ESPECÍFICOS

- Conocer la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de cada una de las cinco cepas de *Candida* ATCC frente a los cuatro nuevos compuestos triazólicos.
- Determinar entre las cinco cepas de *Candida* ATCC cual presenta mejor susceptibilidad *in vitro* frente a los cuatro nuevos compuestos triazólicos.
- Comparar los puntos de corte de sensibilidad *in vitro* de los nuevos triazoles con el fluconazol, antifúngico de elección y distribución comercial para tratamiento de micosis.
- Conocer cuál de los cuatro compuestos triazólicos “tetrahidrofuranosyl- 1,2,3 – triazol” presenta mejor sensibilidad antimicótica *in vitro* entre ellos frente a cinco cepas de *Candida* ATCC.
- Determinar los criterios de susceptibilidad *in vitro* de las cinco cepas de *Candida* ATCC frente a los cuatro nuevos compuestos triazólicos.

1. ANTECEDENTES

En 1843, Robin asignó el nombre de *Oidium albicans* a un hongo que causaba lesiones orales a pacientes, desde entonces *Candida albicans* ha recibido más de 100 nombramientos sinónimos, los dos nombres que han persistido son *Monilla albicans* empleada por Zoft en 1890 y *Candida albicans* por Berkhout en 1923. En 1861 Zenker describió el primer caso documentado de *Candida* infectando órganos y en 1940 se describió el primer caso de endocarditis candidiásica. El período de mayor interés en la historia de las infecciones por *Candida* comenzó en la década de los 40 cuando se generalizó el uso de los antibióticos, desde entonces se han producido manifestaciones no documentadas con anterioridad de infecciones por *Candida* y ha aumentado de forma considerable la incidencia de casi todas las candidiasis. Según la OMS en las últimas décadas *Candida spp* ha sido el cuarto microorganismo aislado con más frecuencia en los hemocultivos de los pacientes hospitalizados y explica el 8 – 15% de todas la sepsis nosocomiales (5,6).

El primer antifúngico se reportó a finales de la década de los 50 con el antifúngico polieno Anfotericina B, producto del microorganismo bacteriano *Streptomyces nodosus*, medicamento que se implementa actualmente y que posee un amplio espectro de acción en los hongos causantes de enfermedades y es de elección para el tratamiento de infecciones micóticas en pacientes inmunocomprometidos (7).

Los primeros azoles se desarrollaron en el año 1967, el Clotrimazol y Miconazol, que son compuestos heterocíclicos aromáticos en los que al menos uno de los carbonos del anillo es sustituido por el nitrógeno, oxígeno o azufre, utilizándose como tratamiento de uso tópico y sistémico contra infecciones micóticas. Desde entonces se han desarrollado diferentes antifúngicos que comparten la misma estructura del anillo pirrol (azol básico) (8).

En 1981 apareció el ketoconazol, el primer azol oral que salió al mercado. A pesar de que representó un avance importante, su escasa penetración en el líquido cefalorraquídeo, sus efectos adversos antiandrogénicos y las potenciales

interacciones con fármacos que se metabolizan por el citocromo P- 450, limitaban su papel (9).

Los triazoles aparecen en la década de los 90 siendo el Itraconazol el primer antifúngico oral con actividad sobre un amplio espectro en hongos (10). Los triazoles han sido uno de los recursos terapéuticos más implementados para el tratamiento de infecciones causadas por hongos, sin embargo el cambio de la epidemiología de las candidiasis invasivas ha ocurrido a favor de un aumento de infecciones debidas a *Candida* no albicans, algunas de ellas resistentes a fluconazol en las que el tratamiento empírico de este triazol no ha sido el más ideal (11,12).

Al inicio de la década pasada apareció la primera equinocandina antifúngica, la caspofungina y el penúltimo triazol el voriconazol, este último mostró más actividad *in vitro* e *in vivo* frente a algunas cepas de *Candida* no albicans resistentes a antifúngicos, especialmente a *Candida krusei* (13), caspofungina particularmente representó un importante avance en el tratamiento de las candidiasis. La segunda equinocandina, micafungina salió en 2005 y la última la anidulafungina se introdujo al mercado en 2007; en 2006 la FDA aprobó su uso y en 2007 la Agencia Europea del Medicamento (EMA) autorizó sus usos para el tratamiento de la candidiasis invasiva (14).

El triazol de última generación salió en 2007, el posaconazol, que juega todavía un papel importante en el manejo de la candidiasis invasiva incluyendo infecciones causadas por especies menos sensibles como *Candida krusei* (15,16).

Múltiples factores han influenciado en el cambio clínico epidemiológico de las micosis invasivas en pacientes hospitalizados, entre ellos el aumento de pacientes que reciben antibióticos de amplio espectro, el tratamiento con inmunosupresores, pacientes con VIH – SIDA , quimioterapias y trasplantes de órganos. Por otro lado, el incremento de métodos de diagnóstico terapéuticos invasivos, quirúrgicos y el implante de catéteres vasculares, siguen siendo factores significativos en la creciente incidencia de las infecciones invasivas por *Candida* (17).

Los cambios epidemiológicos de las candidiasis, la capacidad de los agentes antifúngicos y el incremento de las resistencias a estos, han creado múltiples controversias que van dirigidas en la selección de un tratamiento óptimo. De las numerosas clases de antifúngicos disponibles, tres son los agentes primarios en el tratamiento de las candidemias: los polienos, los triazoles y las equinocandinas, estas clases varían en sus características tales como mecanismo de acción, espectro antifúngico, efectos adversos, indicaciones clínicas y vía de administración. Para la elección del fármaco esencial es indispensable conocer la epidemiología del hospital en relación con este tipo de infecciones fúngicas, sin embargo es vital identificar la levadura a nivel de especie, es recomendable determinar su patrón de sensibilidad y fundamental conocer el estado clínico del paciente y saber si esta recibiendo profilaxis con antifúngicos o no (18).

En el estudio realizado por Sandi y colaboradores en 2013, se menciona que la mortalidad aumenta a causa de infecciones por especies de *Candida* no albicans y que se ha elevado el número de casos de resistencia a antifúngicos, convirtiéndose en un problema por las pocas alternativas de fármacos disponibles actualmente en el mercado (19).

De acuerdo a investigaciones relacionadas con el cambio de epidemiología, Zomoridian y colaboradores en el 2011 indican que existe un número elevado de pequeñas mutaciones en las levaduras que se aíslan por pérdida de ADN mitocondrial o mutación en el ADN genómico y plantean que esta puede ser la causa de la resistencia al tratamiento antifúngico (20).

En Colombia la candidiasis ocupa el cuarto lugar de todas las infecciones asociadas al cuidado de la salud, en donde se destacan las infecciones por *Candida no albicans* (4), las cuales en las últimas décadas han reportado diversos tipos de resistencia, especialmente al grupo de los azoles (12).

Debido al alto uso e implementación de estos fármacos en personas que presentan dichas infecciones fúngicas, se han reportado muchos casos de resistencia y un duro tratamiento para mejorar la calidad de vida del paciente (11,21,22). Con base en esto también se describe una serie de reportes de alta incidencia en Colombia

de infecciones por diferentes especies de *Candida*, en donde se ha presentado un alto nivel de susceptibilidad a fármacos utilizados para el tratamiento de estos tipos de infecciones micóticas en hallazgos encontrados desde 2012 hasta la fecha (3,4).

En un estudio realizado en la Universidad de Caldas (Colombia) en el año 2013, se evaluó la sensibilidad antimicótica de diferentes levaduras aisladas en pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales donde se observó que la levadura *Candida albicans* presentó menor sensibilidad al fluconazol y al itraconazol con respecto a otras levaduras (*C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. candidum*, *C. glabrata*). Así mismo se encontró que el 42% de las levaduras aisladas (n:18) presentaron resistencia al fluconazol y el 67% (n: 29) al itraconazol, demostrándose mayor resistencia en las especies *C. albicans* (todos los aislamientos), *C. krusei* (7 de 9 aislamientos) y *C. tropicalis* (7 de 13 aislamientos) (23).

En el año 2014 en el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY a cargo de Michael Phaller y colaboradores, se realizó un estudio global entre los años 2010 y 2011 comparando las actividades de las tres equinocandinas (Anidulafungina, Caspofungina, Micafungina) y cuatro triazoles (Fluconazol, Posaconazol, Voriconazol, Itraconazol) probados contra una colección de 3.418 aislamientos clínicos. Los resultados mostraron que 3.017 aislamientos correspondían a *Candida* spp. (21 especies), 125 a levaduras no pertenecientes al género *Candida*, 146 a cepas de *Aspergillus* spp. (9 especies) y 40 a aislamientos de hongos filamentosos diferentes al género *Aspergillus*. Utilizando el método de la CLSI. *Candida albicans* y *Candida glabrata* fueron las únicas levaduras que presentaron resistencia a caspofungina, anidulafungina y micafungina, con un porcentaje del 3.5% y 9.6% respectivamente. La resistencia al fluconazol entre aislamientos de *Candida albicans* fue del 0.4%, *Candida tropicalis* 1.3%, *Candida parapsilosis* 2.1%, *Candida glabrata* 8.8% (24).

En el año 2016 en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de Ecuador (INSPI) a cargo de la Dra. Jenny Guerrero y colaboradores, se realizó un estudio de identificación y susceptibilidad de infecciones producidas por *Candida* en centros de salud, hospitales y clínicas del Ecuador., en donde se evaluaron 100

cepas de *Candida albicans* y no albicans desde enero del 2007 hasta abril del 2016. Para la determinación de susceptibilidad antifúngica se usó la técnica de microdilución colorimétrica Sensititre Yeast One ante varios antifúngicos como: Anidulafungina, Anfotericina B, Micafungina, Caspofungina, 5-flucitocina, Posaconazol, Voriconazol, Itraconazol y Fluconazol. Sus resultados reportaron que de acuerdo con los puntos de corte del CLSI 2008, se encontró resistencia a Fluconazol e Itraconazol en un 16% en *Candida glabrata* y el 5% de *Candida tropicalis* presentaron resistencia a los triazoles y no se encontró resistencia en las 100 cepas de *Candida albicans* (25).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE LAS LEVADURAS

Las levaduras son microorganismos que pueden vivir en diversos hábitats y con múltiples fuentes de energía, sin embargo, los carbohidratos son los más importantes. Desde el punto de vista estructural las levaduras son entidades microbiológicas independientes por lo general unicelulares, con membrana y pared celular, esta última siempre conformada por quitina, y cuyo citoplasma contiene vacuola y núcleo. Así mismo son microorganismos unicelulares que presentan dos formas de reproducción: asexual o anamórfica y sexual o telemórfica. La pluricelularidad se presenta cuando la levadura forma estructuras elaboradas como pseudomicelio (unión de varias células), la mayoría de las levaduras son mesófilas, con temperatura de crecimiento entre 20-48°C, con un promedio de 30-37°C, generalmente las levaduras se desarrollan en medios neutros y ligeramente ácidos, su rango óptimo de pH es entre 4.5-6.5 debido a que en su metabolismo llegan a acidificar más su entorno, la mayoría de los géneros son aeróbicos, salvo a aquellos que llevan a cabo procesos de fermentación, los cuales son anaeróbicos o anaerobios facultativos (26).

Las levaduras son los hongos más aislados a nivel clínico, ellos son ubicuos en la naturaleza y forman parte de la flora normal del cuerpo, lo que dificulta determinar su significado clínico en un aislado (26).

Las infecciones fúngicas han adquirido gran importancia a lo largo de las dos últimas décadas, debido al aumento de la edad, la gravedad y la inmunodepresión de los pacientes hospitalizados (trasplante de órganos sólidos o medula ósea, neutropénicos, VIH, UCI), al uso de diferentes métodos invasivos diagnósticos y terapéuticos (nutrición parenteral, intubación orotraqueal, catéteres endovasculares, cirugías) y de múltiples ciclos de antibióticos de amplio espectro (27,28).

2.1.1 Enfermedades causadas por levaduras

Los hongos oportunistas causantes de micosis dependen principalmente del factor predisposición y del agente etiológico y son capaces de ocasionar enfermedades de tipo superficial, cutáneas, subcutáneas, profundas y sistémicas, clasificándose de esta forma desde el punto de vista clínico con base en su localización anatomoclínica o por los factores de virulencia del hongo (26).

Los hongos levaduriformes que causan este tipo de infecciones pertenecen al género *Candida* y *Cryptococcus*, donde *Candida* es el agente etiológico con un mayor índice de infecciones de este tipo (12).

Candida albicans hace parte de la flora normal de la piel, en la última década ha sido de mayor importancia clínica por ser causantes de infecciones fúngicas y de mayor incidencia en personas que padecen diabetes, individuos sometidos a tratamiento quimioterapéutico, pacientes con SIDA, pacientes neutropénicos o presentando diversos cuadros clínicos y asociado directamente al estado inmunológico del paciente (29).

La levadura con más interés y aislamiento clínico es *Candida*, un microorganismo unicelular perteneciente al Phylum *Ascomicotina* que origina la infección conocida como Candidiosis o Candidiasis, que a su vez puede afectar cualquier tejido y ser generada por diferentes especies de levaduras del género *Candida*, de las que se han identificado **190 especies** aproximadamente (26).

La candidiasis es una de las más frecuentes infecciones fúngicas determinadas en pacientes inmunosuprimidos, la constante terapia hacen que estas especies presenten resistencia a estos fármacos ocasionando infecciones invasivas severas. De las 190 especies de *Candida* que se conocen **15 son agentes de infecciones graves**: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*; *Candida pelliculosa*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida inconspicua* y *Candida norvegensis*, y la *Candida* emergente multiresistente *Candida auris*, el 90% de las infecciones son causadas

por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* (30). A su vez *Candida albicans*, una levadura con una característica polimórfica, es decir se puede presentar de forma filamentosa formando pseudohifas y la forma levaduriforme, es la levadura que más presenta aislamiento por infecciones fúngicas (31).

Las candidemias son infecciones nosocomiales graves, rápidamente progresivas, con elevada mortalidad, dificultad en el diagnóstico precoz y refractariedad al tratamiento, además estas infecciones conllevan alta morbilidad, prolongación de la estancia hospitalaria y alto costo hospitalario (27,28).

2.2 LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA

2.2.1 Características microbiológicas del género *Candida*

Candida es un organismo unicelular dentro del cual se han identificado aproximadamente 190 especies, de las cuales 15 tienen interés médico, aislándose *Candida albicans* en 40 a 80% de los casos. *Candida spp.* son levaduras que no producen pigmentos de melanina y su forma puede variar según la especie: globosa, ovoides, elípticas y cilíndricas, su reproducción asexual o anamórfica es por blastoconidios (holoblástica) y la mayoría de las especies patógenas pueden formar pseudohifas a excepción de *Candida glabrata*. Las especies de *Candida* son levaduras cosmopolitas ya que tienen la capacidad de adaptarse a diferentes medios y se encuentran formando parte de la flora normal de piel, tracto gastrointestinal flora vaginal y boca, colonizando desde los primeros días de nacimiento, pero en condiciones extremas como el pH ácido del estómago, no es posible encontrarlas de forma normal (32).

El género *Candida* es ureasa negativo, no forma cápsula, pigmentos en almidón, su capacidad fermentativa la hace distinguible de la mayoría de las especies de este género y solo algunas tienen metabolismo oxidativo. *Candida spp.* son levaduras ligeramente redondas de 2 – 6 x 3 – 9 μm reproduciéndose por gemación (33).

2.2.2 Taxonomía del género *Candida*

Clase: *Ascomycetes*

Subclase: *Blastomycetidae*

Familia: *Saccharomycetes*

Orden: *Cryptococcal*

Género: *Candida*

Especies: *albicans, krusei, parapsilosis, tropicalis, glabrata, guilliermondii.*

En la tabla 1 se puede observar las especies más frecuentes del género *Candida* que causan algún tipo de infección nosocomial (34).

Tabla 1. Especies más frecuentes del género *Candida* en infecciones micóticas.

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

Fuente: (34)

2.2.3 Características metabólicas

Para las especies de *Candida* es fundamental la capacidad de adaptación al medio para consumir nutrientes del huésped que ayudan a la supervivencia y la división celular, siendo el metabolismo parte importante para su patogenicidad (35). Su crecimiento y multiplicación depende de la asimilación de hidratos de carbono, una vez atravesada la barrera primaria *Candida* utiliza el ciclo del ácido tricarbóxico para invadir mucosas y mediante la gluconeogénesis llegan al torrente sanguíneo (36).

2.2.4 Factores de virulencia

Candida spp. presenta algunas características que pueden aportar a su patogenicidad, entre las que se mencionan a continuación:

2.2.4.1 Dimorfismo de levadura a micelio

También llamado morfogénesis, el cambio de levadura a pseudohifa es una de las más características importantes en el momento de expresar su patogenicidad (37). *Candida albicans* tiene la capacidad de cambiar su morfología de levadura y pseudohifa. Su forma de levadura le permite fijarse a las células endoteliales y así llegar al torrente sanguíneo (38).

Su cambio morfológico está correlacionado a la densidad celular, ya que si es menor de 10^6 células/mm habrá crecimiento de pseudohifas, su forma filamentosa depende también de la superficie de donde se una, si es a las células del hospedero o superficies abióticas se activarán EFG1, CPH1, Ras 1 y CYR1, genes responsables de la filamentación que bajo una nutrición limitada, niveles bajos de oxígeno y peptidoglucanos bacterianos presentes en el suero humano ayudarán al desarrollo de las pseudohifas. Así mismo, la forma de pseudohifa ayuda a *Candida* a eludir a los fagocitos e invadir los vasos sanguíneos (39,40).

2.2.4.2 Secreción de proteinasas

La enzima aspartil proteinasa (SAPs) pertenece al grupo de enzimas degradativas que bien puede ser secretada por algunas de las especies del género *Candida* o pueden estar unidas a la pared celular. Su función es hidrolizar proteínas secretadas por el hospedero frente a una infección, entre ellas el colágeno, mucina fibronectina, e inmunoglobulinas, atravesando así la barrera del tejido conjuntivo para facilitar la colonización en invasión de los tejidos. Así también las especies del género *Candida*, en mayor proporción *Candida albicans*, secretan fosfolipasas que dañan las membranas de las células (39,41,42).

2.2.4.3 Capacidad de adhesión a tejidos

La adhesión es un proceso que requiere de fuerzas pasivas como interacciones hidrófobas o fuerzas de Van de Waals lo que permite el contacto de célula a célula. Entre las principales adhesinas se encuentran la secuencia tipo aglutinina ALS que consta de ocho proteínas (ALS1 – 7 y ALS9), de las cuales la adhesina ALS3 es de las más importantes en la expresión de genes de adhesión (37,38).

2.3 CANDIDIASIS

La candidiasis es una infección con manifestaciones clínicas muy variables, de evolución aguda, subaguda y crónica, en las que la levadura puede presentar diferentes focos de infección, afectando de manera particular las mucosas (vagina, boca), piel y órganos (pulmones, intestinos) (43), sin embargo hace parte de la flora normal de la piel, boca, flora vaginal, y el tracto gastrointestinal (32). La candidemia es una de las infecciones nosocomiales de la sangre y se asocia con una mortalidad significativa (3). La candidiasis es una de las enfermedades infecciosas más frecuentes que atacan al hombre, cuyo nivel de gravedad está muy

relacionado con el factor de predisposición con el que se asocia, sin embargo en pacientes inmunodeprimidos la diseminación se asocia a una alta mortalidad. Las causas que favorecen la aparición de la candidiasis son: alteraciones de la flora gastrointestinal, enfermedades inmunodeficientes, diabetes mellitus y medicamentos o tratamientos médicos tales como antibióticos de amplio espectro, radioterapia y quimioterapia (44,45).

Las especies del género *Candida* son uno de los principales agentes causales de infecciones fúngicas, especialmente en fúngemias nosocomiales (33).

2.3.1 TIPOS DE CANDIDIASIS

La candidiasis origina un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varían desde infecciones superficiales o cutáneas hasta la candidiasis invasiva. A continuación se muestra la tabla 2 con los diferentes tipos de candidiasis y los factores de riesgo predisponentes (46).

Tabla 2. Tipos de Candidiasis. Fuente: (46).

TIPOS DE CANDIDIASIS		
Candidiasis	Presentación clínica	Factores de riesgo
Superficiales (cutáneas y mucosas)	Orofaringitis	Radioterapia para el cáncer de cabeza y cuello, uso de corticoides, prótesis dental, edades extremas
	Esofagitis	Cáncer
	Vulvovaginitis	Infección por VIH, diabetes mellitus, uso de antibióticos, uso de corticoides, anticonceptivos orales, embarazo.
	Cutánea	Enfermedad vascular, humedad y maceración cutánea.
	Cutánea congénita	Prematuridad, progenitora con dispositivo intrauterino

	Mucocutánea crónica	Enfermedades endocrinológicas, deficiencia en linfocitos T
Invasoras	Candidemia	Infección por VIH con recuentos bajos de CD4, uso prolongado de antibióticos, terapia inmunosupresora, insuficiencia renal, quemaduras graves, alteración de la integridad intestinal, edades extremas, diabetes mellitus.
	Urinaria	Cirugía urológica, diabetes mellitus, sonda urinaria.
	Neumonía	Aspiración
	Endocarditis	Enfermedad valvular, abuso de fármacos intravenosos, antecedentes de endocarditis bacteriana, cirugías mayores.
	Pericarditis	Presencia de catéteres intravasculares, cirugía torácica.
	Sistema nervioso central	Cirugía en el sistema nervioso central
	Ocular	Cirugía ocular
	Huesos y articulaciones	Inyecciones intraarticulares, trauma o cirugías.
	Abdominal	Cirugía abdominal, pancreatitis, perforaciones recurrentes, trasplante de órganos.

2.4 EPIDEMIOLOGIA DE LA CANDIDIASIS A NIVEL MUNDIAL Y EN COLOMBIA

La epidemiología de la infección por *Candida* ha cambiado durante los últimos años, encontrando variaciones en las especies aisladas y patrones de resistencia al tratamiento antimicótico lo cual implica nuevos retos en el diagnóstico temprano. Las especies de *Candida* no albicans han emergido tanto como colonizadoras como causante de infección sistémica, constituyendo un 35% - 65% de las infecciones por *Candida* en la población, siendo la más comunes *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, la virulencia y la patogenicidad de algunas de estas especies han mostrado un aumento importante en la mortalidad, además de implicar un reto terapéutico ante el aumento de resistencia a los tratamientos usados (47).

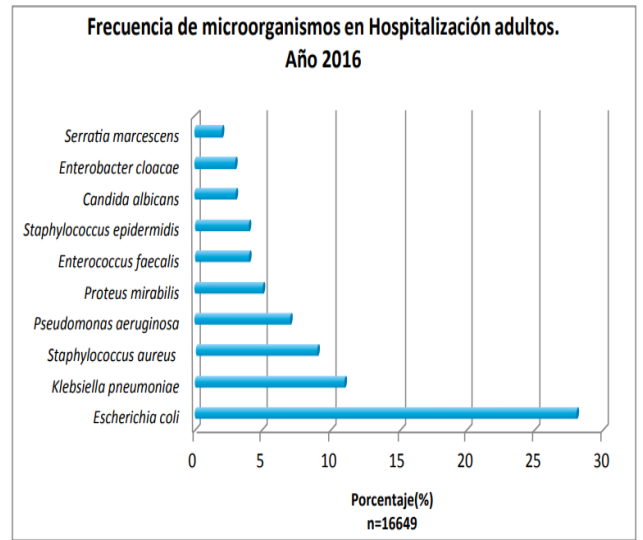
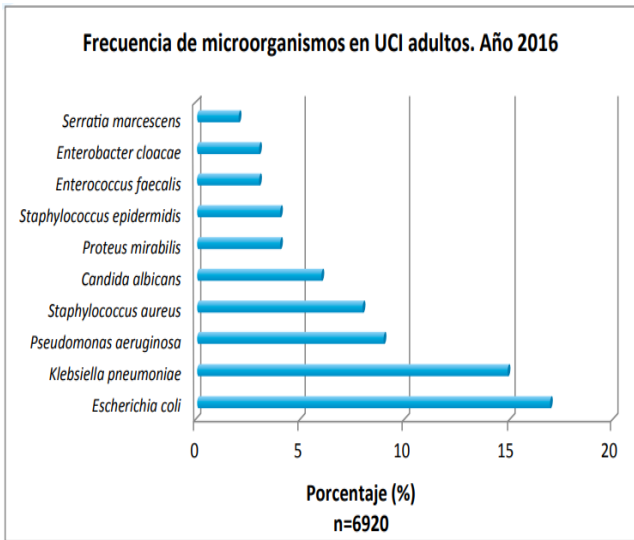
La distribución geográfica de las infecciones por *Candida spp.* es universal, siendo la micosis con mayor incidencia en el mundo, ya que más del 50% de este tipo de infecciones es producida por *Candida albicans* (30,43).

La incidencia de infecciones por *Candida* tanto en las Unidades de Cuidado Intensivo como en el ámbito hospitalario ha aumentado de forma dramática durante las últimas dos décadas siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, así como el incremento en los costos de la atención intrahospitalaria. La candidemia representa aproximadamente un 15% al 30% de todas las infecciones nosocomiales ocupando el cuarto lugar con una mortalidad cercana al 40% (48).

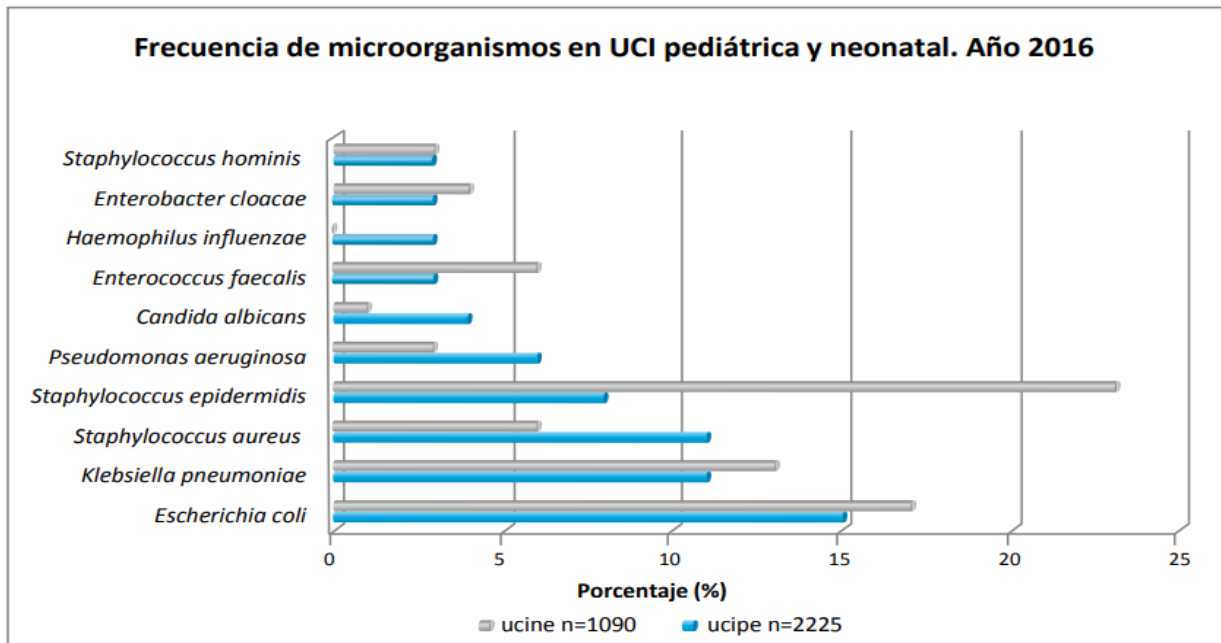
La epidemiología de la infección por *Candida* ha tenido un giro dramático en los últimos años, existen múltiples estudios llevados a cabo en Estados Unidos, Francia, España y Suiza, que muestran una tasa de infección que varía desde 1,2 a 25 casos por 100.000 admisiones (1).

En Colombia la candidiasis ocupa el cuarto lugar de todas las Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud (IACS) teniendo una alta notoriedad en infecciones por *Cándida* no albicans (4), en las últimas décadas se han reportado

diversos tipos de resistencia por parte de estas levaduras, especialmente a los antifúngicos que pertenecen en el grupo de los azoles (12). En Colombia específicamente en Bogotá existe el grupo GREBO (Grupo para el Control de la Resistencia Antimicrobiana en Bogotá) el cual tiene como un objetivo conocer el comportamiento de la resistencia microbiana, en el año 2017 el GREBO realizó un informe sobre la frecuencia de microorganismos aislados en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) y en servicios no UCI (servicios de hospitalización excepto urgencias), de los resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2016, donde incluyó datos obtenidos de las 36 instituciones de alta complejidad de Colombia (29 para Bogotá y 7 de otras ciudades: Armenia, Ibagué, Neiva, Manizales, Popayán, Tunja y Valledupar), encontrando que la infección por *Candida* se encontró dentro de las 10 primeras causas de infección representando aproximadamente un 3% de todas las infecciones nosocomiales, donde el análisis completa dos componentes: el componente pediátrico (incluye el análisis pediátrico y neonata) y el componente adulto (49). Ver Gráfica 1,2,3.



Gráfica 1. Frecuencia de microorganismos aislados en no UCI en adultos. Informe GREBO 2017. (49).



Gráfica 3. Frecuencia de microorganismos en UCI en pediátricos y neonatos. Informe GREBO, 2017. (49).

Otro estudio realizado por GREBO, en ocho hospitales entre 2001 y 2002 mostró 1.194 aislamientos micóticos, siendo los hongos más frecuentemente aislados en

Unidad de Cuidado Intensivo (UCI) *Candida albicans* (57%), *Candida tropicalis* (14%), *Candida guilliermondi* (5%), *Trichosporon spp.* (3%) y *Candida spp.* en 7% (49).

En la última década se ha observado cambios respecto a las especies de *Candida* aisladas como productoras de infección y aunque *Candida albicans* es la más prevalente, otras especies como *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, han adquirido un lugar importante, dependiendo del tipo de paciente, edad, país y estudio. Dentro del estudio SENTRY antes mencionado, se encontró una prevalencia diferente de especies de *Candida* como causantes de infección al comparar los diferentes países (ver Tabla 3) (50).

Tabla 3. Distribución porcentual de las especies de *Candida* por regiones – Estudio SENTRY. Fuente: (50).

Especie	USA	Canadá	América Latina	Europa
<i>C. albicans</i>	55	60	45	58
<i>C. glabrata</i>	21	12	6	10
<i>C. parapsilosis</i>	11	16	25	19
<i>C. tropicalis</i>	9	6	16	7
<i>C. krusei</i>	2	2	1	1
<i>Candida sp.</i>	2	4	7	5

Candida albicans conserva el primer lugar en todos los países participantes, sin embargo se observa una alta incidencia de otras especies, por ejemplo, en Estados Unidos existe una alta incidencia de *Candida glabrata*, secundaria a la selección por la utilización de fluconazol como profilaxis y manejo empírico. En el resto de países se encuentra mayor incidencia *Candida parapsilosis*, la cual se ha relacionado con el uso de catéteres intravenosos y nutrición parenteral (50).

La importancia al determinar la especie de *Candida* encontrada como causante de infección radica en el tratamiento, ya que el inicio de tratamiento empírico sin contar con un aislamiento microbiológico puede significar un riesgo para el paciente y aumento de la resistencia (2).

La mortalidad por infección asociada a *Candida* llega hasta el 50%, la cual es mayor en pacientes con enfermedad crónica, edad avanzada, enfermos oncológicos y pacientes críticos. Los factores relacionados con mortalidad en UCI son un APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation Scoring System) alto, enfermedad renal aguda, y candidemia persistente que no responde a manejo (51).

La importancia de esta infección radica en la alta prevalencia y en el gasto que representa la atención de este padecimiento, sobre todo en casos de infecciones nosocomiales, además de su tasa de mortalidad elevada que va en aumento cada año especialmente la candidiasis sistémica, principalmente en pacientes que están comprometidos inmunológicamente (52).

2.5 AGENTES ANTIFÚNGICOS

Un agente antifúngico o antimicótico es aquella sustancia natural, sintética o semi sintética que posee la capacidad de producir una alteración en la estructura de una célula fúngica, donde consigue inhibir su crecimiento al alterar su metabolismo o capacidad de supervivencia. Las diferentes maneras de utilización de los antifúngicos para dichas infecciones han evolucionado en los últimos cincuenta años mejorando su funcionalidad, el espectro de acción, manejo y tiempo de tratamiento (10).

El primer antifúngico se reportó a finales de la década de los 50 con el antifúngico polieno Anfotericina B, producto del microorganismo bacteriano *Streptomyces nodosus*, un medicamento que se implementa hoy en día y que posee un amplio espectro de acción en los hongos o levaduras causantes de enfermedades y de elección para el tratamiento de infecciones micóticas para pacientes inmunocomprometidos (7). Durante toda la década de los 90 se incorporaron los primeros triazoles y las formulaciones lipídicas de Anfotericina B. Ya en el siglo XXI aparecieron nuevos triazoles y un nuevo grupo de agentes antifúngicos las equinocandinas (Figura 1) (8,10,53).

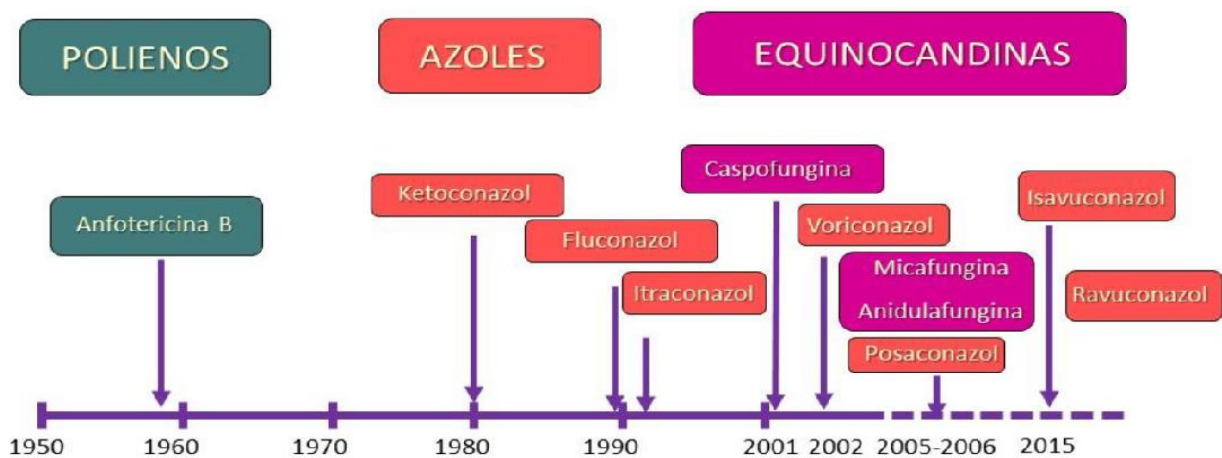


Figura 1. Evolución histórica de los antifúngicos. Fuente: (8)

2.5.1 Clasificación de los antifúngicos

Los antimicóticos presentan una gran variedad de compuestos con diferentes estructuras y mecanismos de acción. Pueden clasificarse por su naturaleza química, de acuerdo a su origen (sustancias producidas por organismos vivos o derivación de síntesis química) y su espectro de acción (amplio o restringido). El sitio o el foco de acción (membrana celular, pared fúngica, ARN, ADN), se limitan principalmente a tres dianas presentes en la célula fúngica. (14).

En la actualidad hay cuatro importantes clases de agentes antimicóticos que se usan para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas como lo son: los Polienos, Triazoles, Pirimidinas análogas y las Equinocandinas (54). Los polienos y triazoles se dirigen a los componentes claves de la formación de la membrana de la célula fúngica, la pirimidina análoga, flucitosina inhibe la síntesis de ADN y ARN, lo que interrumpe la síntesis de proteínas y la división celular, las equinocandinas son una clase de agentes antifúngicos recientemente descubierta que interfieren en la biosíntesis de la pared celular, cada una de estas clases de agentes antifúngicos presentan características farmacocinéticas y farmacodinámicas únicas (55). En la Figura 2 se muestran las cuatro clases de agentes antifúngicos más comunes utilizados para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas y su mecanismo de

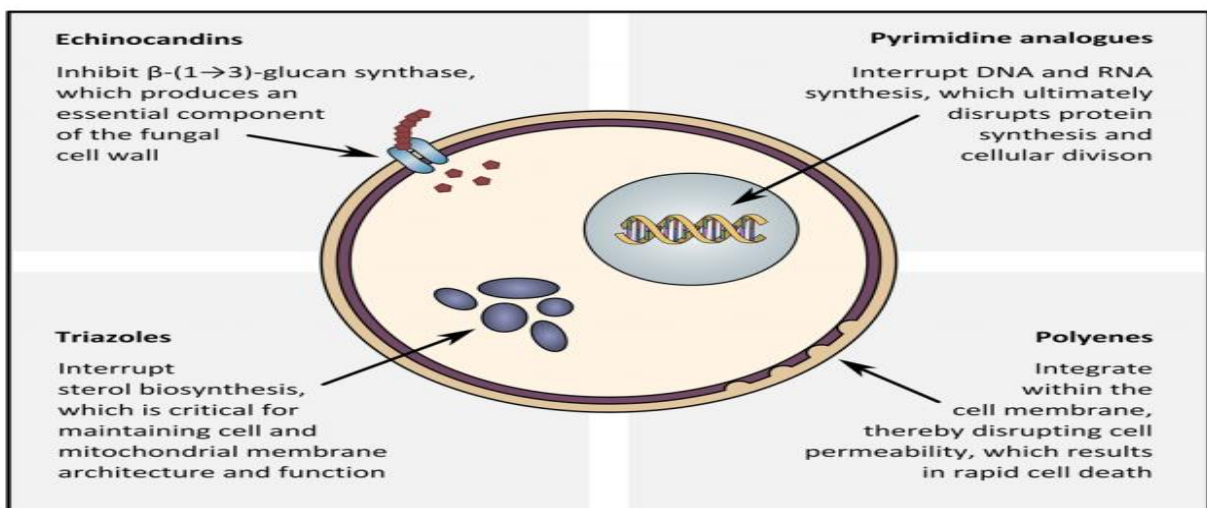


Figura 2. Las cuatro clases más comunes de agentes antifúngicos sistémicos utilizado en el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas y su mecanismo de acción.

Fuente: (48).

Figura 3. Estructura de la Anfotericina B. Fuente: (60).

2.5.2.2 Azoles

Los antifúngicos azólicos o azoles son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que posee 2 o 3 nitrógenos, en vista de esta última característica los azoles se dividen en imidazoles (Clotrimazol, Miconazol, Ketoconazol, Setaconazol) y triazoles (Itraconazol, Ravuconazol, Albaconazol, Posaconazol y Fluconazol) (9,29).

Los triazoles presentan una amplia actividad antifúngica y son bien tolerados, su mecanismo de acción es interrumpir la síntesis de ergosterol a través de la inhibición de la enzima C-14- α -desmetilasa que forma parte del citocromo P450 y es la responsable de la transformación del lanosterol a ergosterol. Esta inhibición metabólica produce la acumulación de methylesteroles dentro de la membrana celular, que son tóxicos para la célula fúngica, aumentando la permeabilidad de la membrana e induciendo la muerte del hongo o la inhibición de su crecimiento. Dependiendo de la especie y del compuesto antimicótico involucrado, los triazoles son generalmente fungistáticos, mientras que el voriconazol y el itraconazol son fungicidas (61–64). En la figura 4 – 9 se muestran las estructuras químicas de los azoles que más se emplean en los tratamientos contra infecciones por *Candida*.

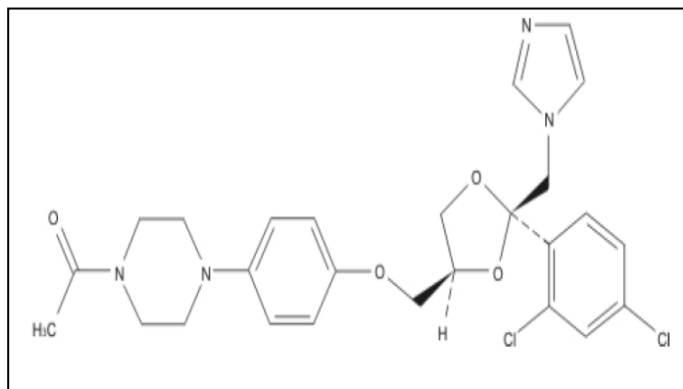


Figura 5. Estructura del Ketoconazol.
Fuente: (60).

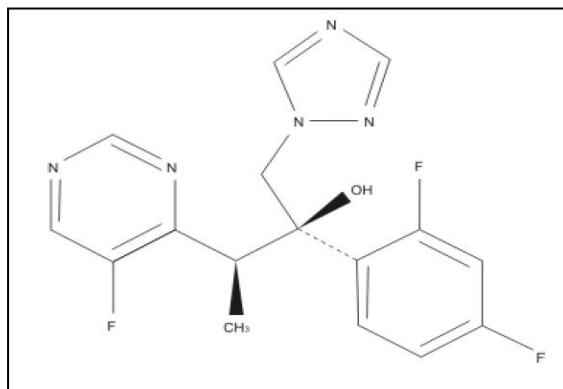


Figura 4. Estructura del Voriconazol.
Fuente: (60).

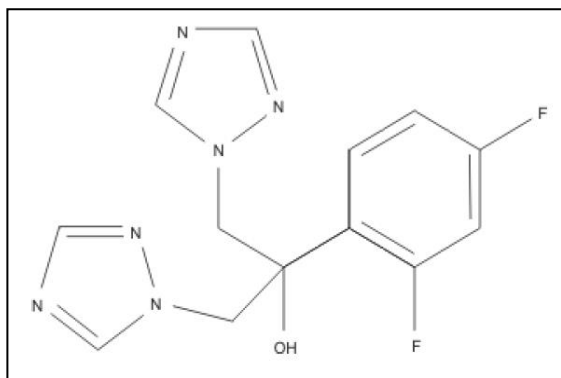


Figura 7. Estructura del Fluconazol.
Fuente: (60).

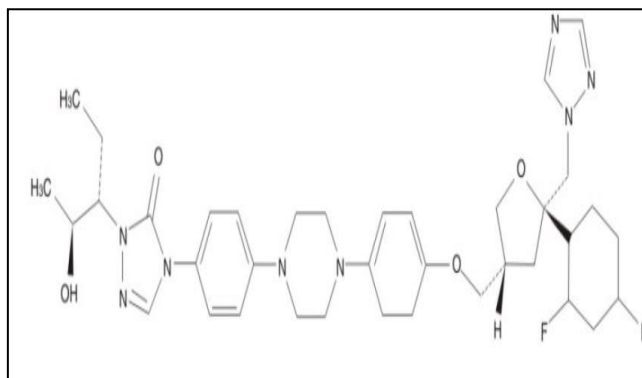


Figura 6. Estructura del Itraconazol.
Fuente: (60).

2.5.2.3 Equinocandinas

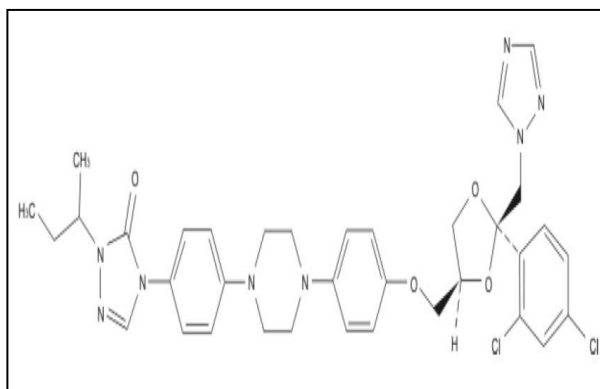
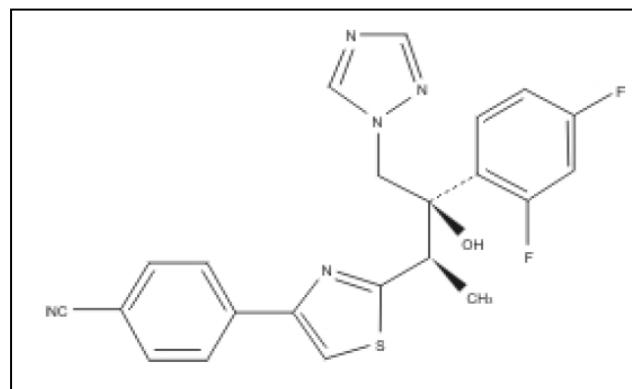
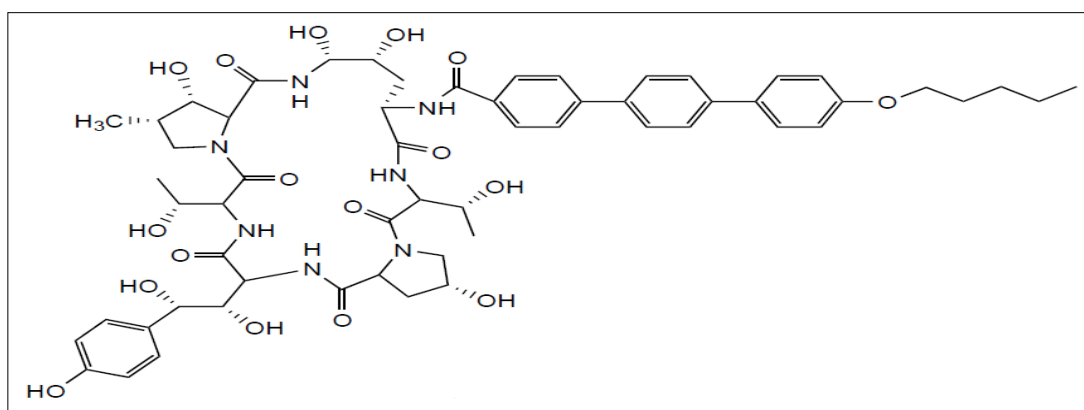


Figura 8. Estructura de Posaconazol.
Fuente: (60).

Figura 9. Estructura del Ravuconazol.
Fuente: (60).

Las equinocandinas constituyen el grupo más reciente de antifúngicos, el cual posee una buena toxicidad selectiva que permite su utilización a dosis elevadas con pocos efectos adversos sobre los pacientes. Son lipopéptidos semisintéticos cíclicos anfífilos con una cadena lateral aminoacil-lipídica, producidos mediante síntesis química a partir de derivados sintetizados por *Glarea lazayensis* confiriéndole diferentes propiedades físico – químicas y una de las características es introducirse en la capa lipídica de la membrana fúngica (65). El objetivo de las equinocandinas es el complejo de proteínas responsables de la síntesis de la pared celular, el polisacárido 1,3- β -glucano que se encuentra en la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos y es responsable, junto con la quitina, de la morfología y rigidez de la pared(28,39). Las equinocandinas más importantes son Caspofungina, Anidulafungina y Micafungina, estos compuestos son muy utilizados en casos de candidiasis, pero es necesario conocer la especie que está ocasionando la micosis ya que la dosificación varía de acuerdo al agente aislado es decir *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* son más sensibles a estos compuestos en dosis menores que *C. parapsilosis*, *C. guillermondi* y *C. lusitaniae* (66). En las figuras 10 – 12 se muestran las estructuras químicas de las equinocandinas.



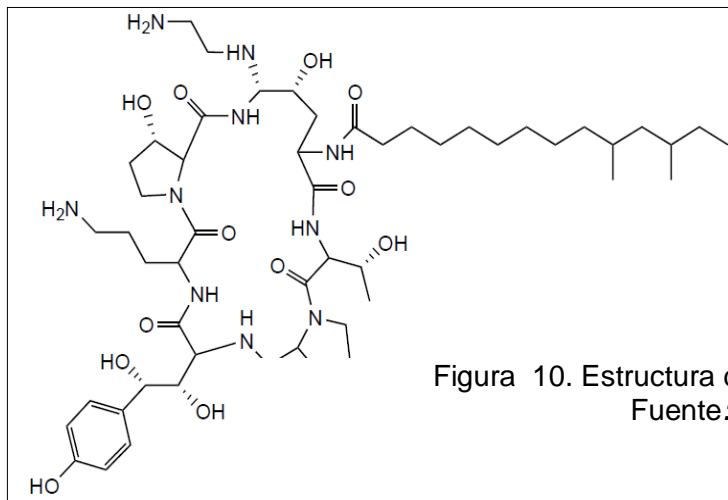


Figura 11. Estructura de la Caspofungina.
Fuente: (60).

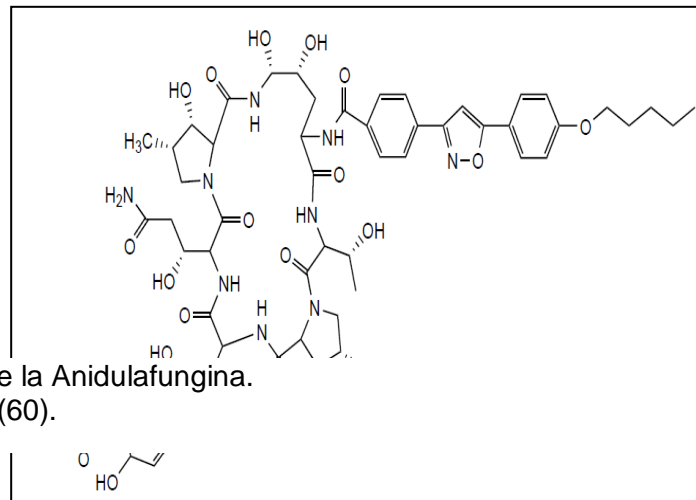


Figura 10. Estructura de la Anidulafungina.
Fuente: (60).

Figura 12. Estructura de la Micafungina.
Fuente: (60).

En la tabla 4 se detalla los mecanismos de acción y el tipo de actividad que se presenta en las infecciones fúngicas por *Candida*.

Tabla 4. Mecanismo y tipo de acción de los antifúngicos.
Fuente: (41 – 44).

Mecanismo y tipo de acción de los antifúngicos utilizados en el tratamiento de infecciones fúngicas

Clase	Antifúngico	Mecanismo de acción	Actividad en <i>Candida</i>
Polienos	Anfotericina B Nistatina	Alteración de las propiedades de barrera de la membrana celular y efectos de las vías de oxidación intracelulares.	Fungicida

Pirimidinas	Fluorocitosina	Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleídos	Fungistática
Azoles, imidazoles	Miconazol Ketoconazol	Inhibición de la síntesis de ergosterol al interactuar con la 14-alfa-demetilasa.	Fungistática
Azoles, triazoles	Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol	Inhibición de la síntesis de ergosterol al interactuar con al 14-alfa-demetilasa. Tiene una afinidad superior a la de los imidazoles por las enzimas fúngicas.	Fungistática
Equinocandinas	Caspofungina Anidulafungina Micafungina	Inhibición de la síntesis de glucano al interactuar con la 1,3-beta-glucanosintetasa.	Fungicida

2.6 RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

En la última década, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, por lo que se ha registrado un elevado número de resistencias por especies de *Candida*. Los mecanismos de resistencia dependen de las características propias de las especies de *Candida* ya sean intrínsecas o extrínsecas (21,24).

La resistencia microbiológica depende de mecanismos innatos en el que todas las cepas son resistentes, un ejemplo es *Candida krusei* que es intrínsecamente resistente a los azoles. La resistencia primaria se presenta antes de la exposición con el fármaco antifúngico y está relacionada estrechamente con las características intrínsecas de cada especie, a su vez, los mecanismos de resistencia secundarios se muestran después de haber tenido contacto con el antifúngico (23).

La resistencia de las especies de *Candida* a los principales antifúngicos son todavía poco frecuentes en general, frente a Anfotericina B, tradicionalmente las resistencias son raras con *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* (15). Un estudio global evaluó la prevalencia de resistencias de *Candida* frente a Fluconazol durante cuatro años, ver Tabla 5.

Tabla 5. Tasa de resistencia de Fluconazol en *Candida spp.* de cuatro años de evaluación.
Fuente: (15)

Especies de <i>Candida spp.</i>	Tasas de resistencia (%)
<i>C. albicans</i>	0,8 – 1,5
<i>C. parapsilosis</i>	2,8 – 4,0
<i>C. tropicalis</i>	3,1 – 4,3
<i>C. glabrata</i>	14,4 – 22,8
<i>C. krusei</i>	56.5 – 71,3

2.6.1 Resistencia a Azoles

La resistencia que presentan las especies de *Candida* se debe principalmente a varios mecanismos, la susceptibilidad reducida o resistencia que se genera mediante bombas de eflujo las cuales son codificadas por genes como MDR o CDR y tienden a disminuir la concentración de fármaco antifúngico, mutaciones en el gen codificador de la enzima blanco (ERG11) lo que implica la unión imposible con los azoles, ante la presencia de bombas de eflujo y mutaciones en el ergosterol-11. La resistencia a Fluconazol y Voriconazol es mayor y genera una capacidad casi nula para unirse a los azoles, el hecho de ser fungistático se relaciona directamente con la capacidad de desarrollar resistencia secundaria, porque siempre quedan poblaciones que no mueren con el fármaco y comienzan a generar mecanismos para defenderse del mismo (67,68).

2.6.2 Resistencia a Equinocandinas

Entre los mecanismos utilizados por los microorganismos para generar resistencia se encuentra la respuesta al estrés adaptativo en el cual aumentan los niveles de quitina en la membrana celular con presencia de crecimiento a elevadas concentraciones, mutaciones adquiridas en los genes de Fsk1 y Fsk2 como causantes en la resistencia de *Candida glabrata*, además de mutaciones intrínsecas en el gen FKS, las mismas que se asocian a *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondi* (21).

2.6.3 Resistencia a Polienos

La resistencia a anfotericina B es poco frecuente, aunque se han detectado cepas de levaduras y de hongos filamentosos con mecanismos de resistencia, estos mecanismos son pocos conocidos, aunque la mayor parte de ellos están relacionados con el descenso en la cantidad de ergosterol de la membrana o un

aumento de los fosfolípidos que reduce la interacción del fármaco con los esteroides. Estas alteraciones se han asociado con mutaciones en los genes ERG2 y ERG3 que codifican enzimas que participan en la vía de síntesis del ergosterol. En los últimos años se han propuesto otros mecanismos de resistencia a anfotericina B relacionados con el efecto oxidativo que presenta el polieno en el interior celular (22,69).

2.7 CEPAS DE REFERENCIA CANDIDA ATCC

La American Type Culture Collection o en sus siglas en inglés ATCC es una organización que recolecta microorganismos de referencia los cuales presentan ciertas características propias de cada cepa, implementadas en el desarrollo de la investigación, donde la cepa suministrada proviene de un cultivo puro y se le ha realizado convenientes pruebas como: Morfológicas, Bioquímicas, Moleculares. Es una organización en la que participan actualmente 21 sociedades científicas, en la actualidad mantiene colecciones de: Bacteriología, Cultivos celulares, Plásmidos, Ácidos nucleicos y Genotecas, Micología, Botánica y Virología (70).

2.7.1 *Candida albicans* ATCC 10231

Es una cepa aislada de un hombre con broncomicosis, se desconoce la región geográfica en la que fue aislada, la ATCC recomienda la utilización de esta cepa para pruebas *in vivo* en invasividad y crecimiento en ratones como modelo experimental (71); esta cepa ATCC presenta las siguientes características fenotípicas:

- a) Presenta como propiedad antigénica Serotipo A – Proteínas extracelulares (proteínas aspárticas – aspartil proteinasa : Factor de virulencia que facilita la adherencia de las levaduras a las células epiteliales, invasión del huésped e interfiriendo en los mecanismos de defensa del huésped) (72).
- b) Morfología: En agar Sabouraud después de dos días a 25°C en una atmósfera aeróbica, las colonias son de color crema, brillantes y lisas. Las colonias más viejas muestran una estructura tipo filamentos en el margen y

pueden tener crestas o carpetas. Las células son ovoides (3.0 – 6.0 x 4.0 – 8.0 µm) en gemación. En cultivos más antiguos las células se alargan y forman pseudohifas ramificadas similares en cadenas (73).

- c) Produce ácido farnesoico, una sustancia auto reguladora capaz de regular la transición morfológica.
- d) Produce tryptophol, una sustancia que induce el sueño en los humanos (74)
- e) Produce Poliaminas oxidasas, sustancias que participan en la transformación, el proceso metabólico, regulación de la virulencia como la síntesis de toxinas como putrescina, espermidina (75)
- f) Produce estrogen-binding protein (Proteína unión al estrógeno) (76).
- g) Produce DNA-Topoisomerasa (77).

Pruebas: Control de calidad, Pruebas de esterilidad, Pruebas de susceptibilidad antifúngica (71).

Panel de susceptibilidad: Resistencia (Anidulafungina, Voriconazol, Itraconazol, Fluconazole), Sensible (Micafungina, Caspofungina, 5- Flucitosina) (71).

2.7.2 *Candida albicans* ATCC 90028

Es una cepa aislada en sangre de un hombre en el estado de IOWA, EE.UU. La ATCC, recomienda la utilización de esta cepa para el ensayo de susceptibilidad antifúngica *in vitro* desarrollado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (71). Esta cepa ATCC presenta las siguientes características fenotípicas:

- a) Produce colagenasa, es una metalproteínasa que rompe los enlaces peptídicos de los colágenos.
- b) Morfología: Después de dos días en agar Sabouraud a 30°C, las colonias son blancas, lisas, butíferas, las células globosas a ovoidal. No se observa pseudohifas.

Panel de susceptibilidad: Resistencia: (5-Flucitosina), Sensible: (Micafungina, Caspofungina, Anidulafungina, Voriconazol, Itraconazol, Fluconazol) (71).

2.7.3 *Candida glabrata* ATCC 26512

Es una cepa aislada de la placenta de un bovino por medio de un estudio científico en 1972 sobre abortos bovinos. Es una cepa que emplea para estudiar su

patogenicidad en ratones hembra que están en embarazo. La cepa se encuentra en estudio por la ATCC (78).

2.7.4 *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Es una cepa aislada de un bebe en Puerto Rico, presentaba enfermedad celíaca o esprue (Enfermedad tropical que se caracteriza por dolor de garganta, ulceración en la boca y enteritis crónica). Este microorganismo es una cepa de control de la CLSI para las pruebas de susceptibilidad antifúngica (71). Esta cepa ATCC presenta las siguientes características fenotípicas:

- a) Produce lipasas (79).
- b) Produce esterases (80).
- c) Degrada hydroxybezoate, ya que esta sustancia posee propiedades fúngicas o bactericidas (81).
- d) Degrada el phenol, ya que este compuesto aromático es un potente fúngica o bactericida (81).

2.7.5 *Candida krusei* ATCC 6258

Es una cepa aislada del esputo de un paciente con broncomicosis en Sri Lanka. La CLSI emplea esta cepa en las pruebas de susceptibilidad antifúngica, ensayos de control de calidad (71). Esta cepa presenta las siguientes características fenotípicas:

- a) Produce esterases (80).
- b) Morfología: Después de 4 días en medio agar Sabouraud a 37°C con atmosfera aeróbica, la colonia es blanca, lisa y suave. Las células son ovoides a cilíndrica, las pseudohifas están ausentes (71).

2.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos constituyen una herramienta importante para la predicción del éxito o fracaso terapéutico y por lo tanto suponen el punto de partida para la elección del fármaco. Actualmente existe un método estandarizado de referencia basado el método de microdilución en placa o MIC para estudiar la sensibilidad *in vitro* de los antifúngicos frente a levaduras de mayor importancia clínica, este método es reproducible y adaptable a un laboratorio asistencial de tal manera que permita detectar su susceptibilidad. Este método, desarrollado por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), es una de las metodologías más empleadas para realizar las pruebas de sensibilidad que permiten obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) que corresponde a la mínima concentración de antifúngico capaz de inhibir el crecimiento del hongo. Esta prueba es útil ya que permite detectar la aparición de cepas resistentes, realizar estudios epidemiológicos y comparar la susceptibilidad de nuevos agentes antifúngicos con los ya existentes (71,82).

Para su estandarización el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI antes NCCLS) realizó en 1985 una encuesta a los distintos laboratorios para poder conocer qué pruebas de sensibilidad antifúngica realizaban habitualmente y cómo las realizaban, además se les solicitó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a unas series 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 hasta 512 veces mayores (71,82).

Como consecuencia de esta realidad el CLSI creó un subcomité para el estudio y estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en 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, en el que se incorporan los puntos de corte del fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina y las CMI para las cepas control de calidad. En el año 2008 se publicó un nuevo documento, el M27-A3, donde se incluyen los valores de la CMI para voriconazol, ravuconazol y posaconazol para las cepas de control calidad. En el año 2012 se publica un cuarto documento que se complementa con los puntos de corte para las equinocandinas y la validación a las 24 horas conocido como M27-S4, método de microdilución en placa estandarizado (MIC) (documento M27-S4; CLSI, 2012) para realizar las pruebas de sensibilidad frente a levaduras con los últimos fármacos comercializados hasta el momento (71,82).

2.8.1 Método de dilución en microplaca para levaduras de la CLSI (M27-S4)

En los antifúngicos solubles en agua (Fluconazol, 5-Fluorocitosina, Caspungina, Micafungina) se debe preparar una solución calculando la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración diez veces superior a la concentración más alta del antifúngico. En los antifúngicos insolubles en agua (Anfotericina B, Anidulafungina, Itraconazol, Ketoconazol, Posaconazol, Ravuconazol, Voriconazol) se utiliza como diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO) (71,82).

Se recomienda seguir el método de las diluciones aditivas y los pasos a seguir son diferentes si el antifúngico es soluble o no en agua. Para el caso de los antifúngicos solubles en agua las concentraciones a ensayar están comprendidas entre 64 y 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de la solución madre se prepara la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la final, usando al medio RPMI como diluyente. Seguidamente se realiza una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 mL de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A los tubos controles de esterilidad y crecimiento se les adiciona solamente 5 mL de

medio RPMI, y al de crecimiento se le adiciona el inóculo sin agente antifúngico (71,82).

En el caso de los antifúngicos insolubles en agua se realizan las mismas diluciones seriadas para obtener concentraciones a ensayar entre 16 µg/mL– 0,03 µg/mL. A partir de la solución madre se preparan las soluciones con una concentración 100 veces mayor a la final deseada pero utilizando DMSO como diluyente (71,82).

Seguidamente se realiza una dilución 1/50 tomando 100 µL de cada tubo y se transfieren a otro tubo que contiene 4,9 mL de RPMI, con lo que la concentración del antifúngico es dos veces mayor que la concentración final deseada (32 µg/mL – 0,06 g/mL) y la de DMSO, 2%. El tubo de control estéril contiene 5 ml de RPMI 1640 y el tubo de control de crecimiento 4,9 mL de RPMI más 0,1 mL de DMSO, ambos sin adición del antifúngico a evaluar. En ambos casos las soluciones comprenden un total de 10 tubos de los cuales se incorporan 100 µL de cada uno de estos a los pocillos de la placa del 2 – 11 de manera decreciente y en los pozos 1 y 12 se colocan los controles de esterilidad y crecimiento respectivamente. Una vez llenas las placas se cierran y envuelven convencionalmente con una bolsa de plástico o con papel de estaño para evitar la evaporación y se congelan a -70°C hasta el momento de su uso, teniendo la misma fecha de caducidad que el fármaco a evaluar (71,82).

2.8.2 Preparación del inóculo

Si la levadura ha estado almacenada o congelada, antes de realizar la prueba de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pases en medio de agar glucosado de sabouraud (SDA) (71,82).

2.8.3 Inóculo para *Candida spp.*

Se prepara tocando con el asa de cultivo de 2 a 5 colonias de 1 mm y de 24 horas de crecimiento en la placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (0,85%). Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de

onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 – 5×10^6 UFC/mL, posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de 1×10^3 – 5×10^3 UFC/mL). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas con el antifúngico. La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^3$ (71,82).

2.8.4 Inoculación, incubación y lectura de la placa

La placa debe encontrarse a temperatura ambiente, descongelada en caso de haberlo estado previamente, se inoculan 100 μ L de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12. La columna n°1 que contiene 200 μ L de RPMI, se utiliza para control de esterilidad del medio. La columna n° 12 no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos. Las placas se inoculan a 35°C durante 24 horas (71,82).

2.8.5 Control de pureza del cultivo

Es conveniente hacer un control del inóculo utilizado; para ello se siembran 10 μ L del pocillo control (n°12) en una placa de CHROMagar® y a las 24 horas se cuentan las UFC. De esta forma se controla la pureza, densidad del cultivo y se comprueba la identificación de la cepa (71,82).

2.8.6 Puntos de corte de la sensibilidad de *Cándida spp.* frente al FLC

En la tabla 6 se reportan los puntos de corte establecidos por el CLSI en el documento M27-S4 para especies del género *Candida* frente al Fluconazol, principal antifúngico utilizado en el tratamiento de la micosis.

Tabla 6. Puntos de corte del Fluconazol para especies de *Candida* sp.

Fuente: (71).

Agente antifúngico	Especies	MIC - rango ($\mu\text{g/mL}$)		
		S	SDD	R
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. glabrata</i>	-	≤ 32	≥ 64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	≥ 8

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los cuatro compuestos Triazólicos tienen un elevado efecto antifúngico frente a levaduras de importancia clínica como *Candida* sp. en comparación con el Fluconazol, el antifúngico que más se utiliza como parte de tratamiento de este tipo de enfermedades?

3.2 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio experimental – observacional cuantitativo, donde se estudiará la susceptibilidad *in vitro* de cuatro nuevos antifúngicos de la naturaleza química de los triazoles, sobre las siguientes especies ATCC de levaduras pertenecientes al género *Candida*: *albicans*, *glabrata*, *parapsilosis*, y *krusei*.

3.3 UNIVERSO

Está conformado por levaduras del genero *Candida* spp. donde comprende más de 190 especies.

3.4 MUESTRA

Las muestras empleadas en este estudio no fueron sacadas de un análisis estadístico, se escogió ciertas cepas de manera de conveniencia ya por estudios previos y por lo que son cepas de referencia, certificadas ATCC, lo cual cada cepa presentan ciertas características genotípicas propias de cada levadura, y se le han realizado convenientes pruebas como: Morfológicas, Bioquímicas, Moleculares, para su identificación. Las cepas ATCC empleadas son de importancia clínica, ya que fueron aisladas de pacientes que presentaban infecciones fúngicas por *Candida*.

- *Candida albicans* ATCC 10231: Aislada de un paciente con broncomicosis.
- *Candida albicans* ATCC 90028: Aislada de un paciente con candidemia

- *Candida glabrata* ATCC 26512: Aislada de la placenta de una paciente que presentaba abortos.
- *Candida krusei* ATCC 6258: Aislada del esputo de un paciente que presentaba broncomicosis.
- *Candida parapsilosis* ATCC 22019: Aislada de un bebé que presentaba enfermedad celiaca.

Tabla 7. Cepas de *Candida* ATCC a evaluar *in vitro*. (Ver anexo).
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

Cepa	Código	Empleada
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 26512	Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i>

Los cuatro triazoles a los que se evaluaron su actividad antifúngica (Tetrahidrofuranosyl- 1,2,3 – triazol) fueron sintetizados en el Centro de Investigación en Química Sustentable (CIQS) a cargo del Dr. Erick Cuevas Yañez de la Universidad Autónoma del estado de México, el Dr. Bayardo Velasco Montejo de la Universidad Autónoma de México, junto con el Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) a cargo del Dr. Hugo Mendieta Zerón de la Universidad Autónoma del Estado de México, con el apoyo del Dr. Cristian Layton Tovar, estudiante del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, pertenecientes al semillero ECZA en el año 2014, donde realizó su pasantía en el Centro de Investigación de Química Sustentable de la UAEMex por medio de la Asociación Científica Latina ASCILA.

Se realizó la evaluación de la sensibilidad de los cuatro triazoles con el objetivo de determinar si poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas de *Candida* ATCC mencionadas anteriormente por el método M27-S4 del CLSI del

2012, y conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas. Para realizar la comparación de los cuatro triazoles nuevos, se empleó como antifúngico de control el Fluconazol que es el antifúngico con mayor distribución comercial e implementación para la micosis desarrollada por *Candida*. En la figura 13 se muestran la estructura química de los cuatro nuevos triazoles y en la Imagen 1 los cuatro compuestos triazólicos empleados en este proyecto.

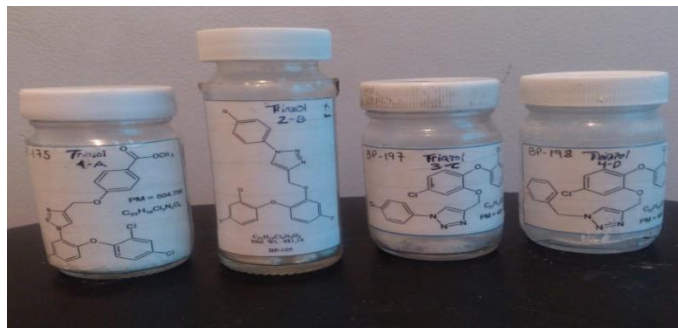


Imagen 1. Los cuatro compuestos triazólicos Antifúngicos sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica por el Dr. Cristian Layton Tovar, Dr. Erick Cuevas Yañez, Dr. Bayardo Velasco Montejo y el Dr. Hugo Mendieta Zerón, en el Centro de Investigación en Química Sustentable (CIQS).

Fuente: Pastrana Cristian, 2018

Figura 13. Antifúngicos sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica por el Dr. Cristian Layton Tovar, Dr. Erick Cuevas Yañez, Dr. Bayardo Velasco Montejó y el Dr. Hugo Mendieta Zerón, en el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (CCIQS) y Centro de Investigación en Ciencias Médicas (CICMED) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).
"Tetrahydrofuranosyl-1,2,3-triazoles".



3.5 HIPOTESIS

Los triazoles poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas especies de levaduras del género *Candida*, si los cuatro compuestos triazólicos a evaluar son sometidos a la metodología propuesta por el CLSI M27-S4 en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* por microdilución, al ser derivados de la familia de los triazoles deberán actuar como antifúngicos e inhibir el crecimiento micológico bajo condiciones determinadas.

3.6 VARIABLES

3.6.1 Variable independiente

Cuatro antifúngicos triazólicos sintetizados en el CIQS y en el CICMED de la UAEM.

3.6.2 Variable dependiente

Las perfiles de susceptibilidad de las cinco especies del género *Candida* ATCC, (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*), y sus concentraciones mínimas inhibitorias frente a los cuatro compuestos triazólicos.

3.6.3 Indicadores

Prueba de susceptibilidad y determinación de la concentración mínima inhibitoria.

3.7 MATERIALES

- Medio RPMI 1640, con Ácido Morfolino Propano Sulfónico (MOPS).
- Dimetil sulfoxido (DMSO).
- Microplacas de poliestireno de 96 pocillos
- Fluconazol (Flucobay) Bayer®.
- Solución salina 0.85%.
- Agua esterilizada.
- Tubos.
- Asas estériles.
- Medio Agar Sabouraud.
- Medio CHROMagar® *Candida*.

4. PROCESAMIENTO

4.1 Medio RPMI 1640

Se empleó el medio de cultivo RPMI 1640 para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *Candida* ATCC frente a los cuatro compuestos triazólicos, este es un medio sintético con glutamina y sin bicarbonato sódico (LONZA®), tamponado con Ácido Morfolino Propano Sulfónico (MOPS) 0,164M (LONZA®), con un pH $7 \pm 0,1$, 0,2 % de glucosa y como indicador el rojo de fenol, donde el medio de cultivo contiene todos los factores nutricionales para el desarrollo metabólico de la levadura. (Ver ANEXO 1, 2 e Imagen 1)

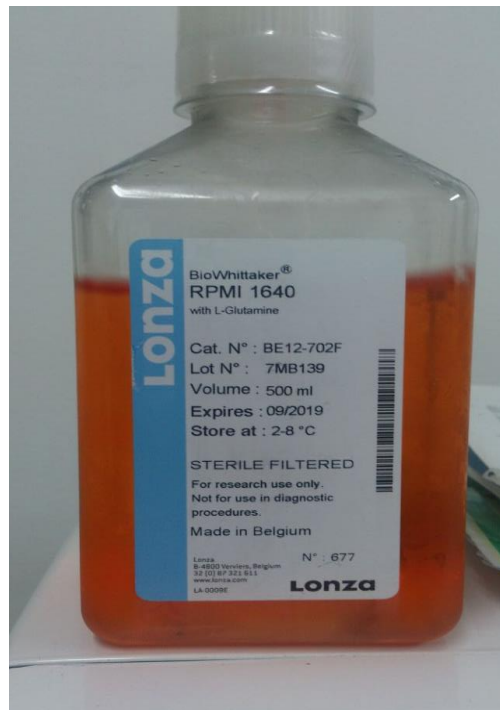


Imagen 2. Medio RPMI 1640 LONZA®.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

4.2 Preparación del inóculo

Inoculo de las cepas de *Candida* ATCC:

1. El inóculo de cada cepa de *Candida* ATCC se preparó tocando con el asa estéril de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de un cultivo de 48 horas de crecimiento en medio de agar sabouraud. (Ver ANEXO 3)
2. Cada cepa de *Candida* ATCC se resuspendió en un tubo con solución salina al 0.85%, previamente rotulado, se mezcló por 15 segundos en un vórtex hasta que tuviera una apariencia homogénea y sin grumos.
3. Se ajustó a 0,5 en la escala de McFarland con un nefelómetro. Esta solución tiene una concentración aproximada de $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. (ver imagen 1)
4. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI 1640 LONZA® (concentración de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL), y se mezcló por 5 segundos en un vórtex. Esta última dilución es la que se utilizó para inocular en las microplacas con el antifúngico.



Imagen 3. Escala 0,5 McFarland de las cepas de *Candida* ATCC
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

4.3 Preparación de la solución madre y diluciones de los cuatro compuestos antifúngicos en las microplacas

Los cuatro nuevos triazoles evaluados son insolubles en agua por lo que se siguió la metodología del CLSI documento M27-S4, para antifúngicos insolubles en agua, utilizando Dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente (71). Se siguieron los siguientes pasos:

1. La solución madre se preparó pesando 0.016 g de polvo de cada antifúngico y se diluyeron con 10 mL de DMSO para obtener una concentración de 1600 µg/mL. A continuación se realizaron diluciones dobles seriadas según la metodología del CLSI, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua, diluyente DMSO.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración final	Tubo
N°2	1600 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	800 µg/mL	N°3
N°3	800 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	400 µg/mL	N°4
N°4	400 µg/mL	500 µL	500µL de DMSO	200 mL	N°5
N°5	200 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	100 µg/mL	N°6
N°6	100 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	50 µg/mL	N°7
N°7	50 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	25 µg/mL	N°8
N°8	25 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	12,5 µg/mL	N°9
N°9	12,5 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	6,25 µg/mL	N°10
N°10	6,25 µg/mL	500 µL	500 µL de DMSO	3,12 µg/mL	N°11

2. Seguidamente se realizó una dilución 1/50 tomando 100 µL de cada tubo y se transfirió a otro tubo que contenía 4,9 mL de RPMI 1640 LONZA®; posteriormente se inoculó 100 µL de cada tubo en las placas de manera decreciente, es decir, del contenido del tubo n°2 se tomaron 100 µL y se llenaron los pocillos de la columna n°2 (2A-2H), y así hasta el tubo n°11. Los pocillos de la columna n°1 se llenaron con 100 µL de RPMI (control de esterilidad) y los pocillos

de la columna n°12 se llenaron con 100 μ L de disolución entre el medio RPMI 1640 (4,9mL) más DMSO (100 μ L) (control de crecimiento de la cepa). Se tenía por cada antifúngico a evaluar una microplaca. En la figura 14 se muestra el método de micro dilución en microplaca para la evaluación de la susceptibilidad de los antifúngicos insolubles en agua, de la CLSI documento M27-S4 del 2012.

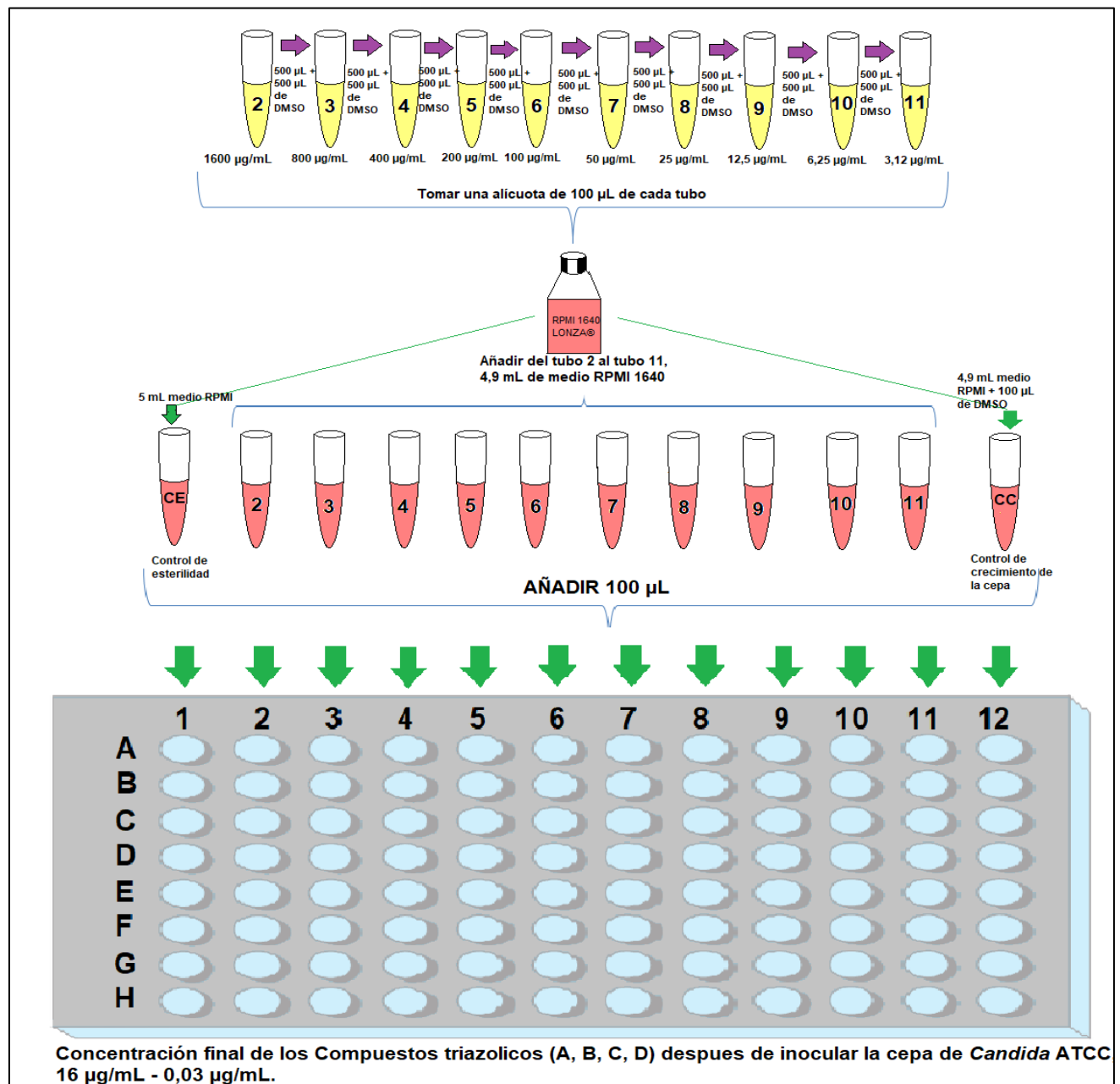


Figura 14. Esquema del método Microplaca de la CLSI documento M27 – S4, para antifúngicos insolubles en agua, diluyente dimetil sulfóxido (DMSO).
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

4.4 Preparación de la solución madre y las diluciones seriadas del Fluconazol en las microplacas.

El antifúngico que se empleó como control y comparación contra los cuatro compuestos triazolicos fue el Fluconazol, precedente de la casa comercial BAYER® con nombre comercial Flucobay® con una pureza del 82.4% (Ver imagen 2 e ANEXO 4 y 5).

Para preparar la solución stock (1280 µg/mL), primero se pesó 0,016 g de polvo de Flucobay® de la casa comercial Bayer®, y se disolvió en 12,5 mL de agua destilada estéril, para obtener una concentración de 1280 µg/mL (la cantidad suficiente de polvo para obtener una concentración 10 veces superior a la concentración más alta del antifúngico), ya que las concentraciones a ensayar son comprendidas entre 64 µg/mL y 0,12 µg/mL.



Imagen 4. Fluconazol.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018

Se realizó el método de las diluciones dobles seriadas como se muestran en la Tabla 9, como se indica en el documento M27 S4 de la CLSI, a partir de la solución madre (1280 µg/mL), se prepara la serie de diluciones utilizando como diluyente el medio RPMI 1640 LONZA®.

Tabla 9. Diluciones de antifungicos solubles en agua (FLUCONAZOL), diluyente medio RPMI 1640.

Fuente: Pastrana Cristian, 2018

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración final	Tubo
N°1	1280 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	640 µg/mL	N°2
N°2	640 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	320 µg/mL	N°3
N°3	320 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	160 µg/mL	N°4
N°4	160 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	80 µg/mL	N°5
N°5	80 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	40 µg/mL	N°6
N°6	40 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	20 µg/mL	N°7
N°7	20 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	10 µg/mL	N°8
N°8	10 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	5 µg/mL	N°9
N°9	5 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	2,5 µg/mL	N°10
N°10	2,5 µg/mL	500 µL	500 µL RPMI 1640	1,25 µg/mL	N°11

Se utilizaron los tubos N°2 al N°11 ya que son las concentraciones 10 veces superior a la concentración final deseada que se empleó en la microplaca. Al terminar las diluciones todos los tubos contenían 1 mL, excepto el tubo N°2 con 2 mL, de este último se desechó 1 ml.

Seguidamente se realizó una dilución 1/5, añadiendo a todos los tubos 2,5 mL de medio RPMI 1640 LONZA®, donde las concentración del Fluconazol quedo de 128 µg/mL a 0,25 µg/mL, posteriormente se inoculó 100 µL de cada tubo en las placas de manera decreciente, es decir, del contenido del tubo n°2 se tomaron 100 µL y se llenaron los pocillos de la columna n°2 (2A-2H), y así hasta el tubo n°11. Los pocillos de la columna n°1 se llenaron con 100 µL de RPMI 1640 LONZA® (control de esterilidad) y los pocillos de la columna n°12 se llenaron con 100 µL de medio RPMI 1640 LONZA® (control de crecimiento de la cepa).

En la Figura 15 se muestra el esquema del proceso de las diluciones seriadas del Fluconazol y el método para la evaluación de la susceptibilidad en microplaca de la CLSI documento M27 – S4 del 2012.

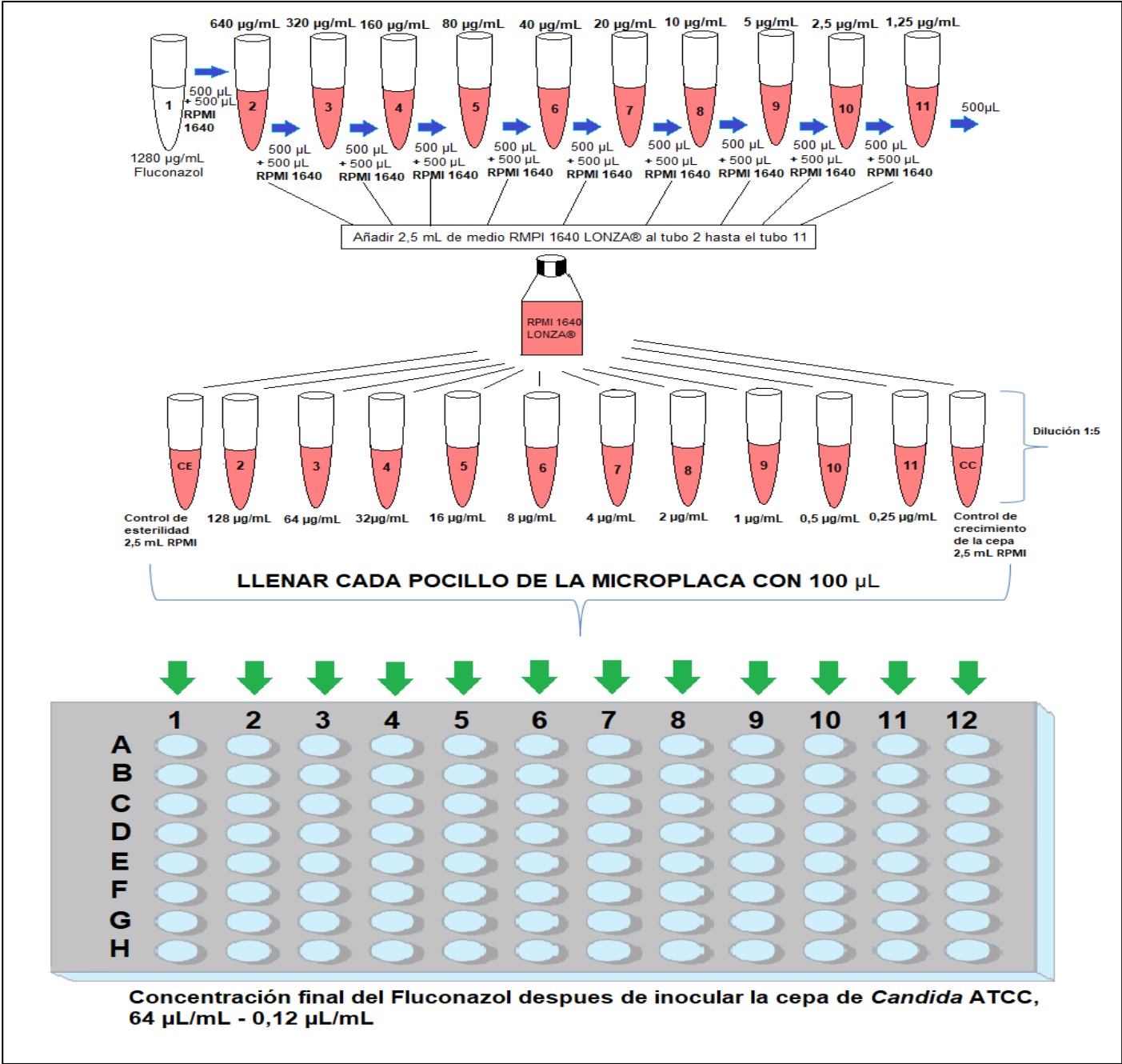


Figura 15. Esquema del método Microplaca de la CLSI documento M27 – S4, para antifúngicos solubles en agua. Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

4.5 Incubación, Interpretación y Lectura de las microplacas

Se tomó la micro placa con el antifúngico ya con las previas diluciones como se muestra en ítem 3.8.3, se rotulo cada microplaca de 96 pocillos con el nombre respectivo de cada cepa de *Candida* ATCC, se tomó la suspensión de cada levadura como se indica en el ítem 3.8.2 y se tomó 100 µL de cada levadura en suspensión y se inoculó en cada pocillo de la micro placa y se mezcló con cuidado por 5 segundos en el vórtex.

Se cubrió cada microplaca con una lámina adhesiva, evitando arrugas, posteriormente se incubaron las micro placas a 37°C durante 24 horas y 48 horas.

Los resultados fueron interpretados cuando el pocillo del control de crecimiento de la microplaca cambio de color rojo a morado, la lectura se hizo de manera visual, observándose un color morado claro en los pocillos que hubo crecimiento.

La concentración más baja de antifúngico a la que se produjo cambio de color de rojo a morado claro, se tomó el anterior pocillo el de concentración más alta sin cambio de color, como la concentración mínima inhibitoria de cada compuesto triazólico, donde produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ($\geq 50\%$), después de 24 horas de incubación.

En la tabla 10 se destaca diferentes situaciones para la interpretación de resultados, tomado del CLSI documento M27-S4 (71).

Tabla 10. Interpretación de resultados. Fuente: (71).

	Concentración de cada pocillo µg/mL					
	32	16	8	4	2	1
SITUACIÓN A	R	R	R	M	M	M
SITUACIÓN B	M	M	M	M	M	M
SITUACIÓN C	R	R	R	R	R	R
SITUACIÓN D	M	M	M	R	M	M
SITUACIÓN E	R	R	M	M	R	R
R (ROJO): Indicador de crecimiento negativo						
M (MORADO): indicador de crecimiento positivo.						

- **SITUACIÓN A:** Pauta de crecimiento típica. El punto final de la CMI es 8 $\mu\text{g}/\text{MI}$.
- **SITUACIÓN B:** Crecimiento en todos los pocillos, el punto final de la CMI es $> 32 \mu\text{g}/\text{MI}$.
- **SITUACIÓN C:** No hay crecimiento en ningún pocillo, el punto final de la CMI es $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$.
- **SITUACIÓN D:** Pocillo saltado. La CMI es $> 32 \mu\text{g}/\text{mL}$. Si se produce más de un salto en una columna los resultados de la prueba no son válidos.
- **SITUACIÓN E:** Pocillo saltado doble. La prueba debe repetirse.

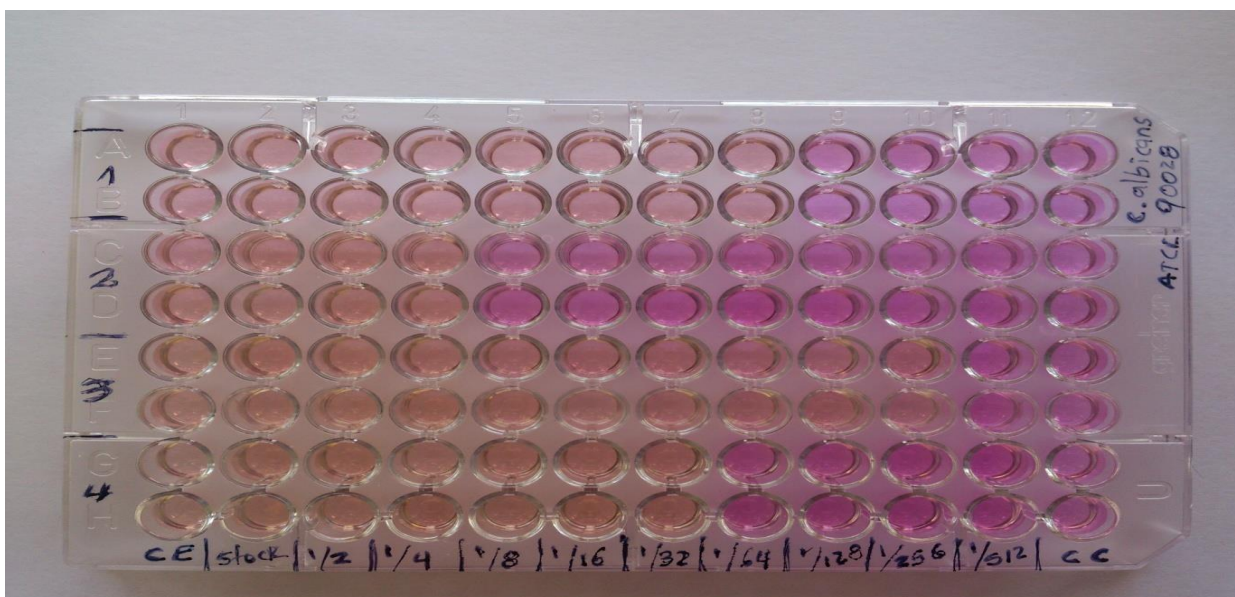
4.6 Recolección y análisis de datos

Una vez obtenidos los resultados, se realizó una tabulación de los mismos en el programa informático Excel, en el cual se representó por medio graficas indicando la CMI de cada variable.

5. RESULTADOS

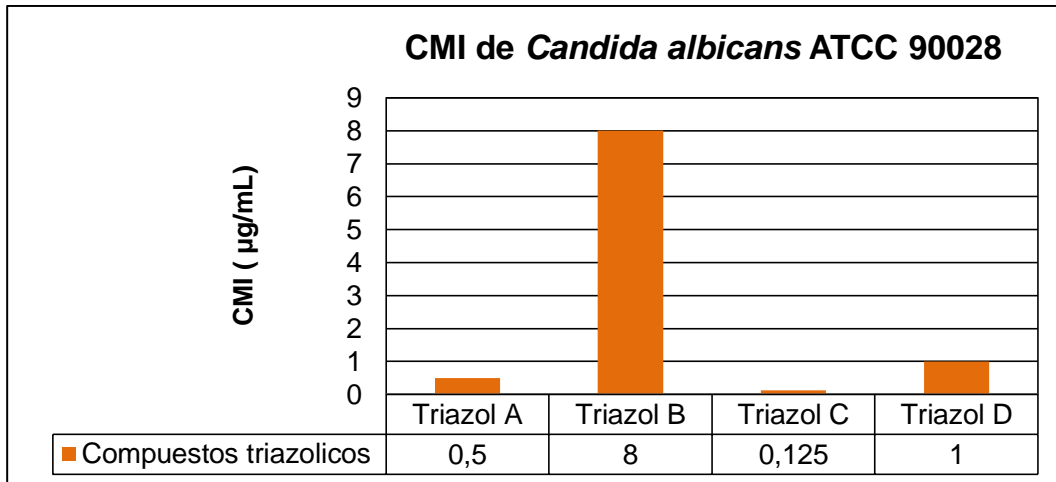
Se utilizaron cinco cepas de levaduras del género *Candida* ATCC, como se indica en la tabla 5 y se realizaron las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, bajo la metodología descrita anteriormente, cada una de las cepas fueron evaluadas con los cuatro compuestos triazólicos, del mismo modo con el fluconazol como control. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas de acuerdo con los criterios establecidos por la CLSI donde se recomienda que la lectura se realice a las 48 horas, no obstante a las 24 horas resultados mostraron una buena definición en la lectura visual, sin manifestar cambios después de ese tiempo, lo que permite definir la confiabilidad y mejorar la correlación clínica, se obtuvieron los siguientes resultados:

En la Fotografía 1 se muestran las diferentes CMI de *Candida albicans* ATCC 90028 ante los cuatro antifúngicos triazólicos mediante el método propuesto por la CLSI. Frente al Triazol C presento una CMI de 0,125 µg/mL, y al Triazol B una CMI de 8 µg/mL. En la Gráfica 4 se representa la CMI de *Candida albicans* ATCC 90028 frente a los cuatro triazoles.



Fotografía 1. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 90028 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.

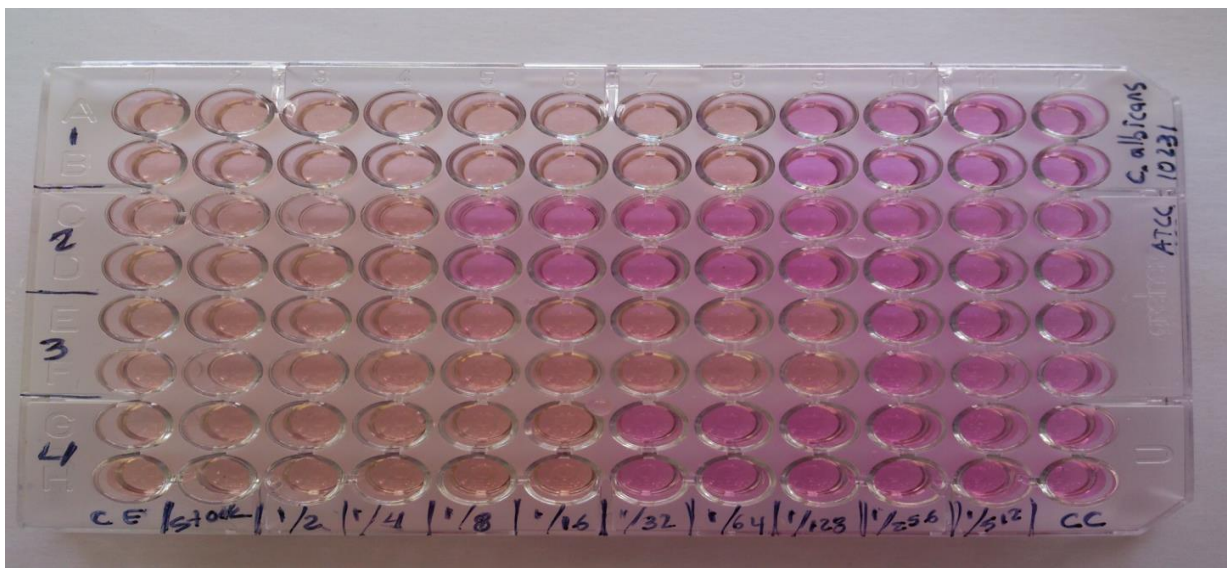
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.



Gráfica 4. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - µg/mL) de *Candida albicans* ATCC 90028 frente a los cuatro compuestos triazolicos.

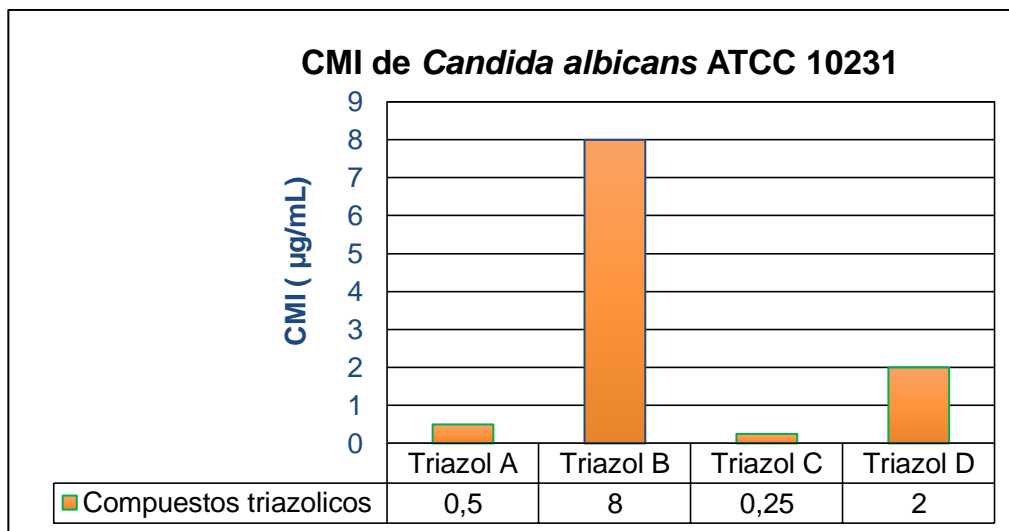
Fuente: Pastrana Cristian, 2018

En la Fotografía 2 se muestran las diferentes CMI de *Candida albicans* ATCC 10231 ante los cuatro antifúngicos triazólicos mediante el método propuesto por la CLSI. Frente al Triazol C presento una CMI de 0,25 µg/mL, y al Triazol B una CMI de 8 µg/mL. En la Gráfica 5 se representa la CMI de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a los cuatro triazoles.



Fotografía 2. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.

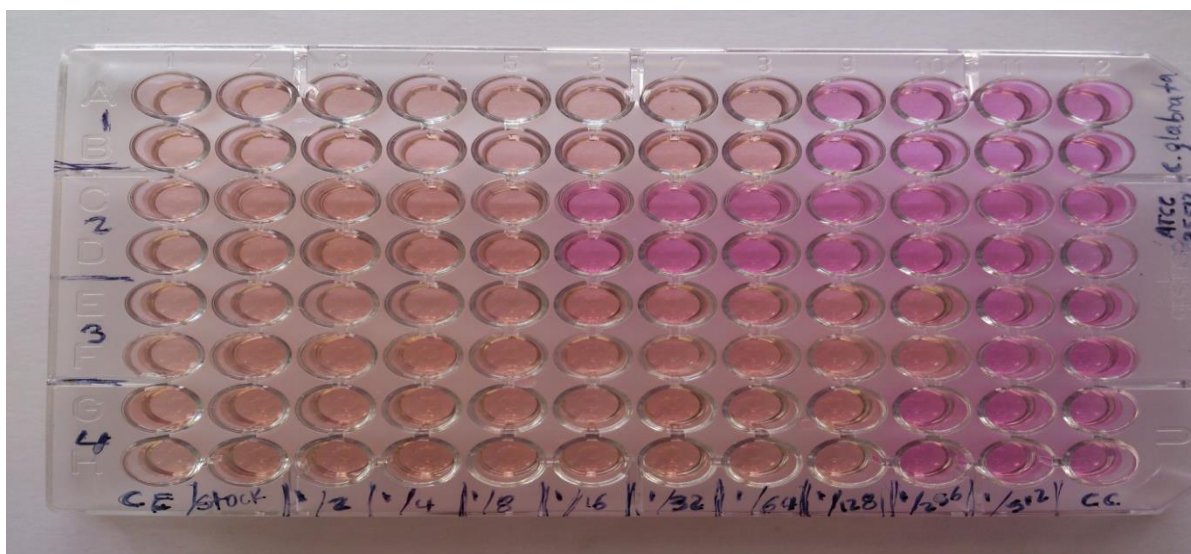
Fuente: Cristian Pastrana, 2018



Gráfica 5. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - µg/mL) de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a los cuatro compuestos triazolicos.

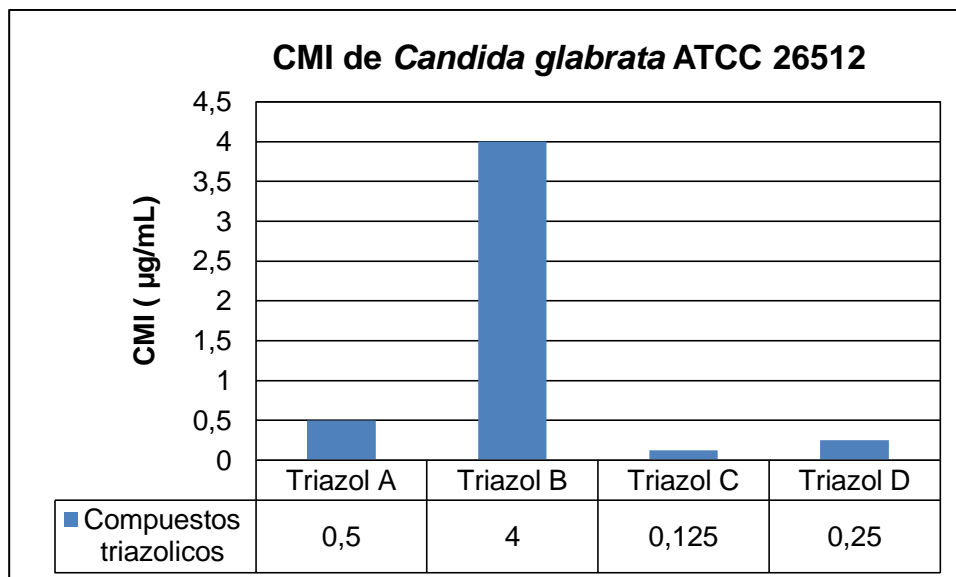
Fuente: Cristian Pastrana, 2018

En la Fotografía 3 se muestran las diferentes CMI de *Candida glabrata* ATCC 26512 ante los cuatro antifúngicos triazólicos mediante el método propuesto por la CLSI. Frente al Triazol C presento una CMI de 0,125 µg/mL, y al Triazol B una CMI de 4 µg/mL. En la Gráfica 6 se representa la CMI de *Candida glabrata* ATCC 26512 frente a los cuatro triazoles.



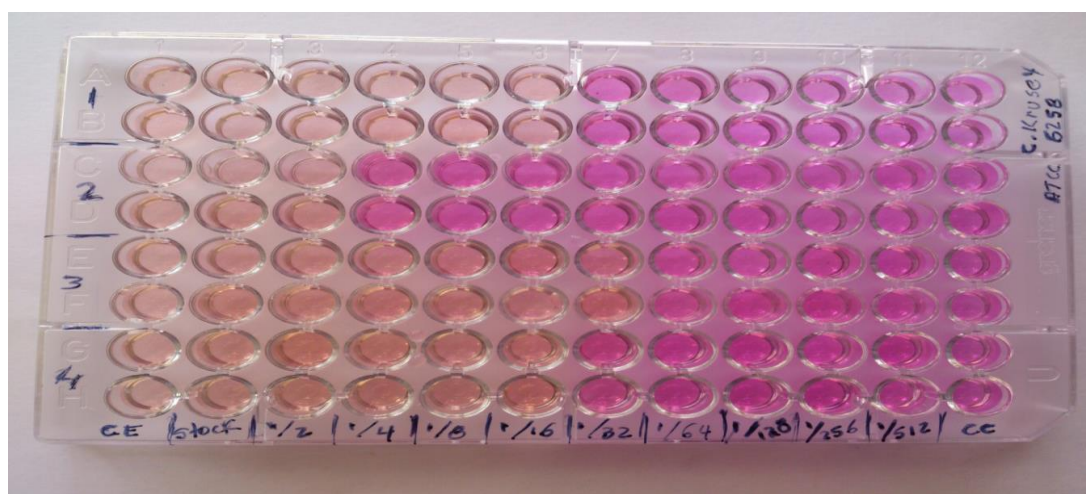
Fotografía 3. . Susceptibilidad *in vitro* de *Candida glabrata* ATCC 26512 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.

Fuente: Cristian Pastrana, 2018

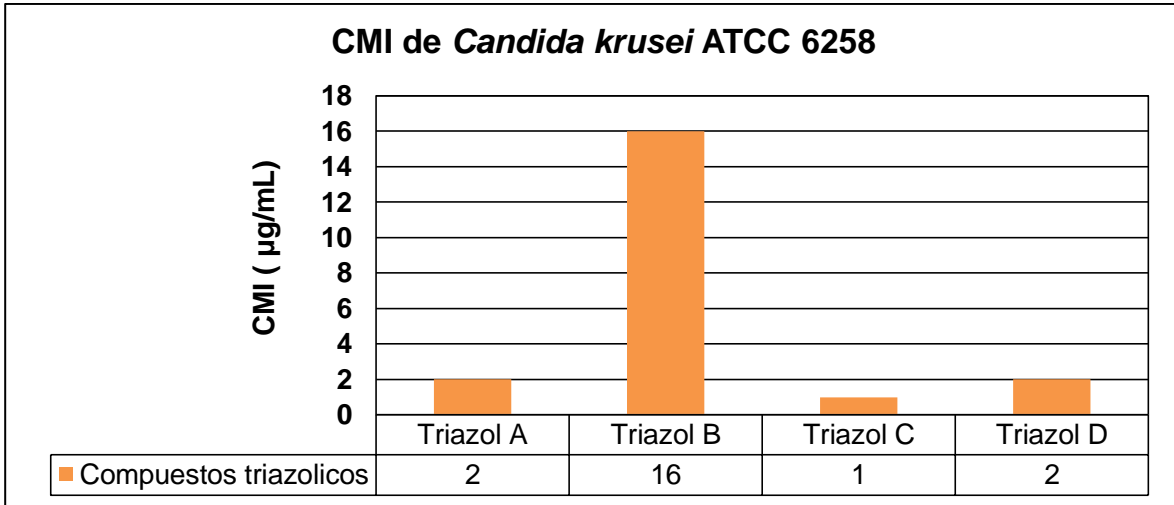


Gráfica 6. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - µg/mL) de *Candida glabrata* ATCC 26512 frente a los cuatro compuestos triazolicos.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018

En la Fotografía 4 se muestran las diferentes CMI de *Candida krusei* ATCC 6258 ante los cuatro antifúngicos triazólicos mediante el método propuesto por la CLSI. Frente al Triazol C presento una CMI de 1 µg/mL, y al Triazol B una CMI de 16 µg/mL. En la Gráfica 7 se representa la CMI de *Candida krusei* ATCC 6258 frente a los triazoles.



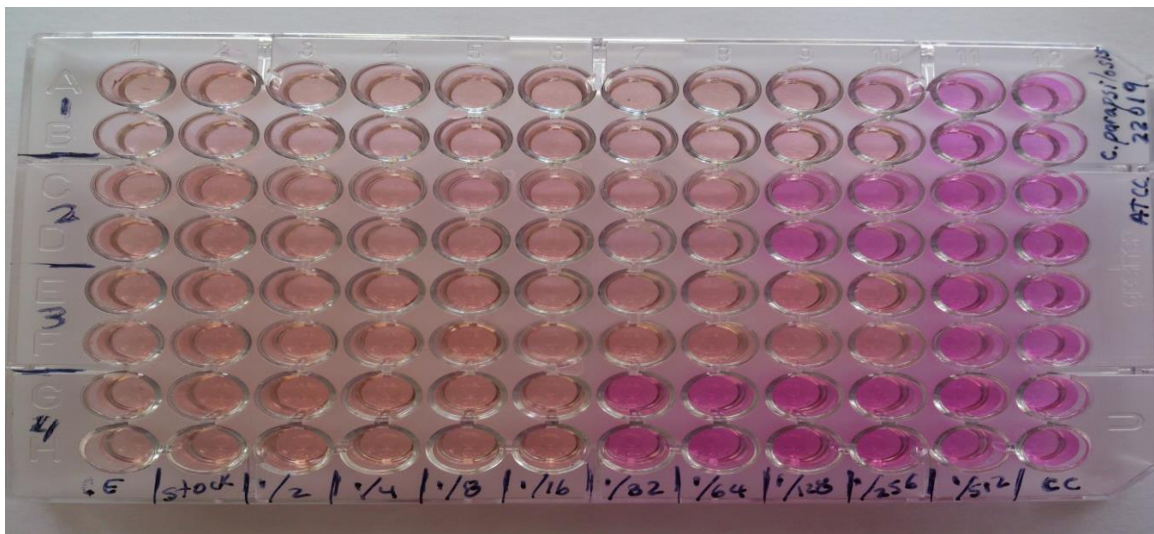
Fotografía 4. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida krusei* ATCC 6258 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018



Gráfica 7. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - µg/mL) de *Candida krusei* ATCC 6258 frente a los cuatro compuestos triazolicos.

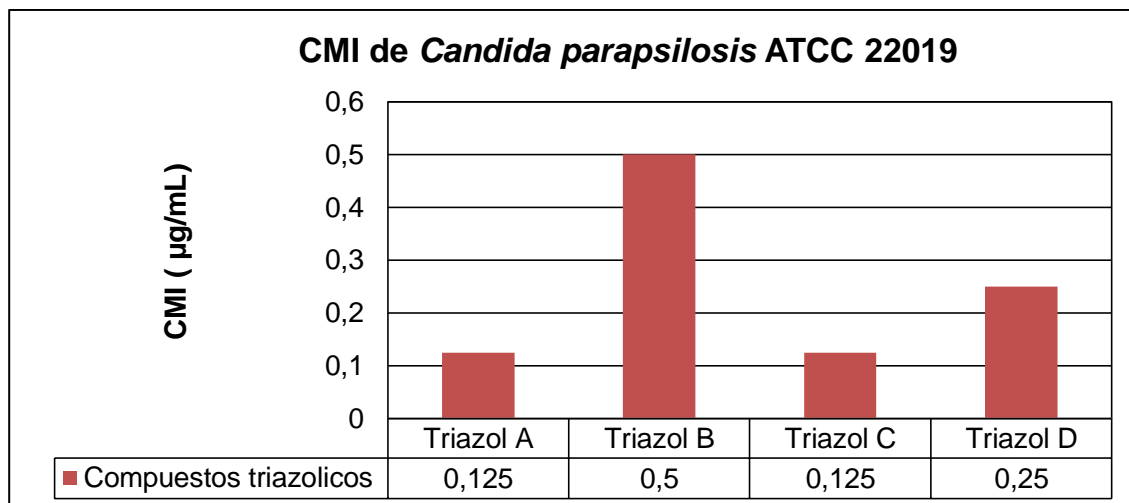
Fuente: Pastrana Cristian, 2018

En la Fotografía 5 se muestran las diferentes CMI de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ante los cuatro antifúngicos triazólicos mediante el método propuesto por la CLSI. Frente al Triazol A y C presento una CMI de 0,125 µg/mL, y al Triazol B una CMI de 5 µg/mL. En la Gráfica 8 se representa la CMI de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente a los triazoles.



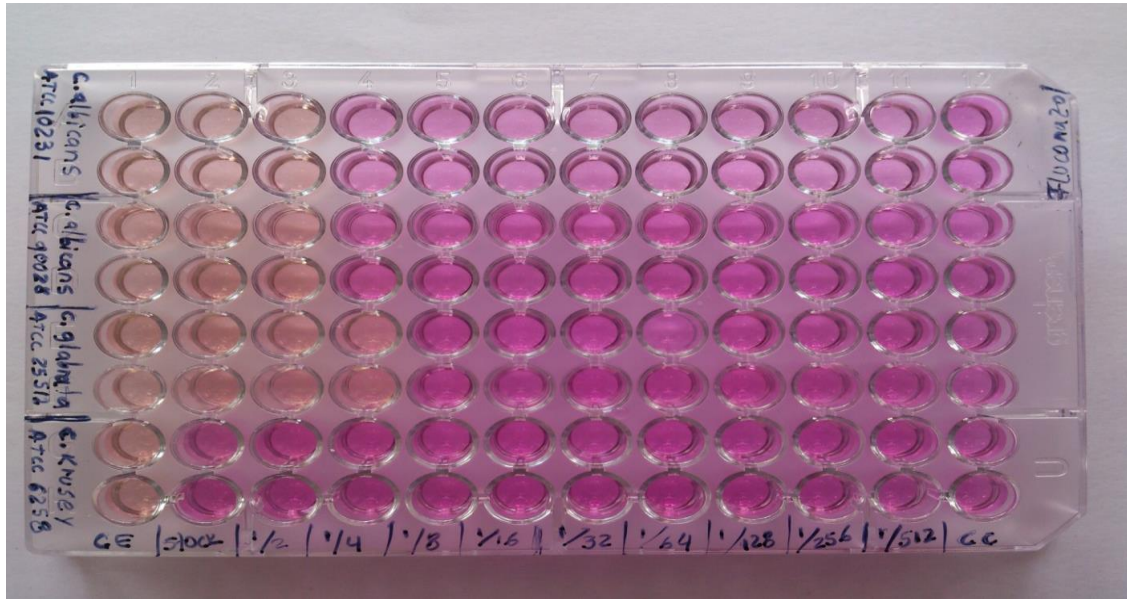
Fotografía 5. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente a los cuatro triazoles en microplaca a las 24 horas.

Fuente: Pastrana Cristian, 2018



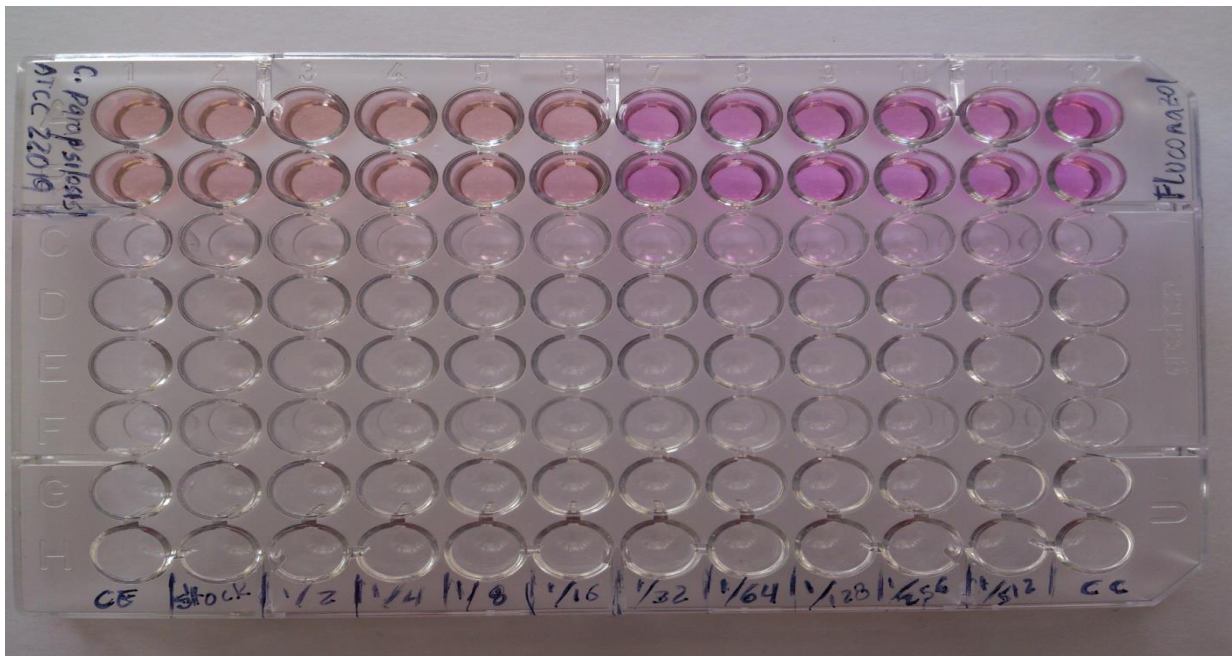
Gráfica 8. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - µg/mL) de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente a los cuatro compuestos triazolicos.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018

En la Fotografía 6 y 7 se muestran las diferentes CMI de *Candida albicans* ATCC 90028 (16 µg/mL), *Candida albicans* ATCC 10231 (16 µg/mL), *Candida glabrata* ATCC 26512 (8 µg/mL), *Candida krusei* ATCC 6258 (0 µg/mL), *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (2 µg/mL), frente al Fluconazol mediante el método propuesto por la CLSI. En la Gráfica 9 se representa gráficamente la CMI de las cepas de *Candida* ATCC frente al Fluconazol.



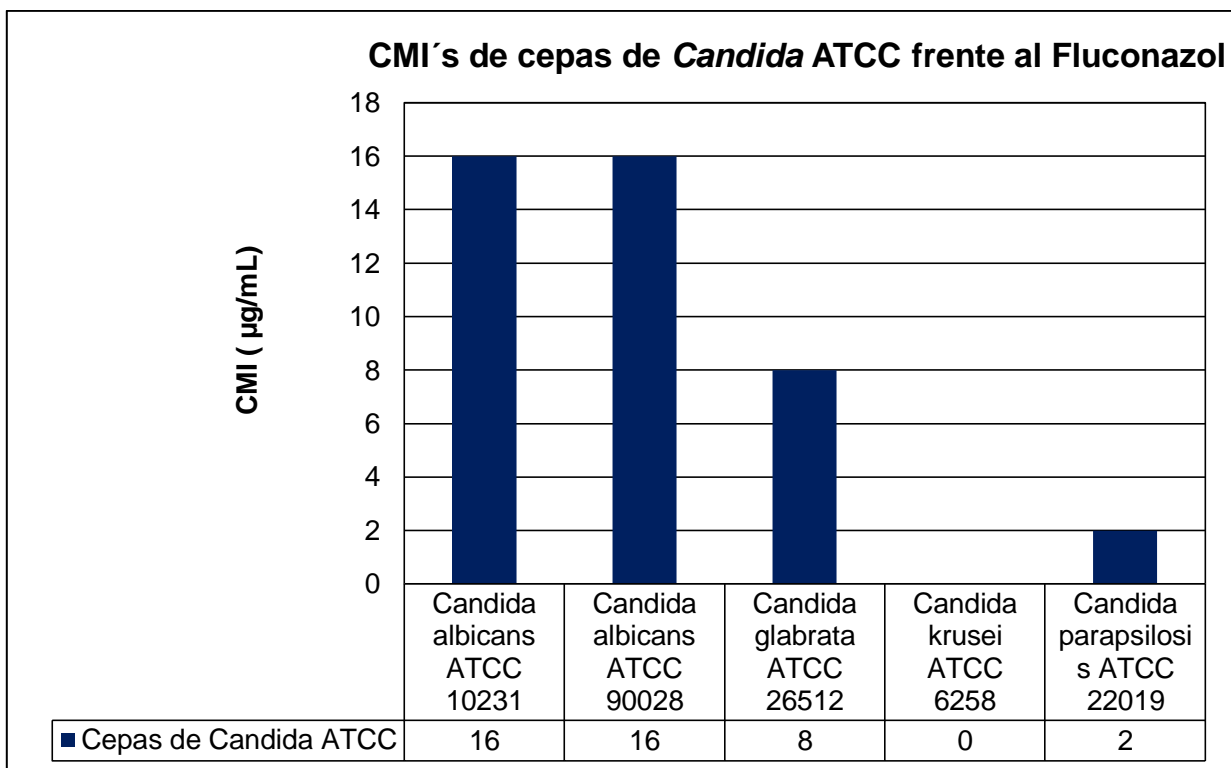
Fotografía 6. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 26512 y *Candida krusei* ATCC 6258 frente al Fluconazol a las 24 horas.

Fuente: Pastrana Cristian, 2018.



Fotografía 7. Susceptibilidad *in vitro* de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 frente al Fluconazol a las 24 horas.

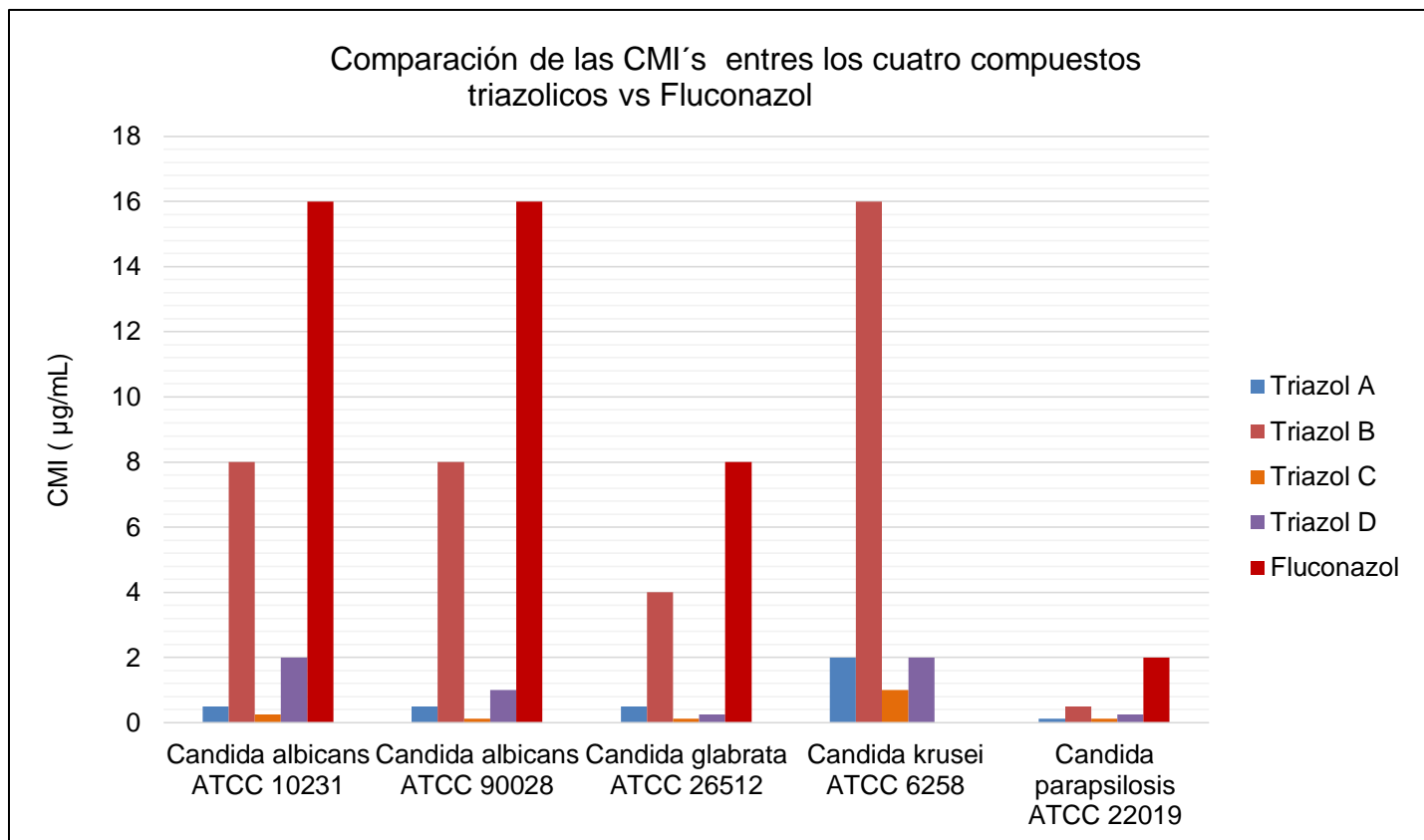
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.



Gráfica 9. Concentración Mínima inhibitoria (CMI - µg/mL) de las cepas de *Candida* ATCC frente al Fluconazol.

Fuente: Pastrana Cristian, 2018

En la gráfica 10 se muestra las diferentes CMI' obtenidas mediante el método de microdilución en microplaca del CLSI documento M27-S4 del 2012 de cada una de las especies de *Candida* ATCC, ante los cuatro compuestos triazólicos y el FLC.



Gráfica 10. Comparación de las CMI's entre los cuatro compuestos triazolicos y el Fluconazol.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

En la tabla 11 se reportan las CMI de cada especie de las levaduras del género *Candida*, ante los cuatro compuestos triazólicos y del control Fluconazol, lo cual nos indica que el antifúngico Fluconazol está dentro de los estándares de CMI aceptables por el CLSI, documento M27 – S4.

Tabla 11. CMI's de las cepas de *Candida* ATCC.
Fuente: Pastrana Cristian, 2018

Antifúngico \ Cepa ATCC	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida glabrata</i> ATCC 26512	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
Triazol A	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	0,125 µg/mL
Triazol B	8 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL	0,5 µg/mL
Triazol C	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL	1 µg/mL	0,125 µg/mL
Triazol D	2 µg/mL	1 µg/mL	0,25 µg/mL	2 µg/mL	0,25 µg/mL
FLUCONAZOL	16 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	0 µg/mL	2 µg/mL

En la tabla 12 se reporta los criterios de susceptibilidad, la sensibilidad (S), la sensibilidad dependiente de la dosis (SDD) y la resistencia (R), de cada una de las cepas de *Candida* ATCC, de acuerdo a las CMI's de cada especie de levaduras frente a cada compuesto triazólico.

Tabla 12. Criterios de susceptibilidad de las cepas de *Candida* ATCC frente a los cuatro compuestos triazólicos. Fuente: Pastrana Cristian, 2018.

Especies	Agentes antifúngicos	Rango de CMI (µg/mL)		
		S	SDD	R
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	TRIAZOL A	≤ 0,5	1	≥ 2
	TRIAZOL B	≤ 8	16	≥ 32
	TRIAZOL C	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1
	TRIAZOL D	≤ 1	2	≥ 4
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	TRIAZOL A	≤ 0,5	1	≥ 2
	TRIAZOL B	≤ 8	16	≥ 32
	TRIAZOL C	≤ 0,25	0,5 - 1	≥ 2
	TRIAZOL D	≤ 2	4	≥ 8
<i>Candida glabrata</i> ATCC 26512	TRIAZOL A	≤ 0,5	1 - 2	≥ 4
	TRIAZOL B	≤ 4	8	≥ 16
	TRIAZOL C	≤ 0,125	0,25 - 1	≥ 2
	TRIAZOL D	≤ 1	2	≥ 4
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	TRIAZOL A	≤ 2	4	≥ 8
	TRIAZOL B	≤ 16	32	≥ 64
	TRIAZOL C	≤ 1	2	≥ 4
	TRIAZOL D	≤ 2	4	≥ 8
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	TRIAZOL A	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1
	TRIAZOL B	≤ 0,5	1	≥ 2
	TRIAZOL C	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1
	TRIAZOL D	≤ 0,25	0,5 - 1	≥ 2

6. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad in vitro en microplaca para las distintas especies de *Candida* ATCC, se puede observar que el comportamiento es característico en cada especie para cada uno de los compuestos problema comparados con el Fluconazol como control, el cual cumplió con los rangos de CMI para estas especies de *Candida*, aplicando la metodología propuesta por la CLSI del documento M27 - S4 y poder así predecir el comportamiento de estas nuevas moléculas en desarrollo, precediendo que el diseño de su síntesis por medio de la técnica *click chemistry*, va por buen camino ya que se puede apreciar notoriamente que el compuesto A, C y D, poseen buena actividad antifúngica en las especies de *Candida* ATCC, y en comparación al Fluconazol.

Los compuestos triazólicos A, C y D presentaron buenos resultados de CMI en comparación con el compuesto D evaluado, ya que, en las cinco especies de *Candida* estudiadas las CMI's se encontraron dentro de los rangos de sensibilidad establecidos por el CLSI.

Al comparar los compuestos A, C y D en su efectiva inhibitoria frente el Fluconazol, el mejor de estos compuestos fue el C, ya que presentaba CMI's muy debajo al Fluconazol, sin embargo el compuesto A y D presento CMI's más elevadas que el compuesto C, su efectividad de inhibición fue muy buena ya que en comparación con el Fluconazol su CMI's eran más bajas. Lo que indica que estos compuestos pueden llegar a ser tan bueno como un antimicótico comercial aplicándolos a una correcta dosis terapéutica, no sin antes haber hecho estudios previos de toxicidad, farmacodinamia y farmacocinética.

Los compuestos A, C y D al ser de la familia de los triazoles presentan cierta similitud con el Fluconazol en su estructura, es interesante saber que estas moléculas presentan dentro de sus grupos funcionales la presencia de un halógeno como lo es en este caso el Cloro (Cl), según Gregory Valdés y colaboradores (2005) (10), debido a esto, se podría plantear un posible mecanismo para estos

compuestos, su acción antifúngica será semejante a la de los triazoles, inhibiendo la síntesis del ergosterol, liberando el halógeno y estableciendo punto de reconocimiento sobre la membrana celular de la levadura, aumentando la permeabilidad de esta y ocasionando la muerte celular.

Según Carrillo Muñoz y colaboradores (2001) (68), durante la revisión de la actividad biológica de nuevas estructuras describe que el hallazgo de nuevas moléculas antifúngicas requiere un conocimiento exhaustivo de las dianas potenciales para minimizar el riesgo de tanto efectos adversos como es la resistencia. La ausencia de actividad de dichas moléculas estaría explicada por falta de sitios diana en las células o la expulsión del antifúngico.

Con base a los estudios reportados por Quindós y colaboradores (2014) (52), a pesar que *Candida albicans* sigue siendo la especie con mayor incidencia clínica del genero *Candida*, se ha venido cambiando la epidemiología clínica de candidiasis invasiva donde muestran un incremento causadas por especies *no albicans*, existiendo poco datos de la eficacia de los fármacos antifúngicos disponibles frente a *Candida no albicans*, además estas especies tienen en común su particular perfil de sensibilidad antifúngica ya que la mayoría de ellas son resistentes o muestran una baja sensibilidad frente a los antifúngicos, dato que se confirmó en este estudio con *Candida krusei* y *Candida glabrata* al evaluar su sensibilidad in vitro ante el Fluconazol y con base a lo expuesto anteriormente se consideró interesante llevar a cabo estudio experimentales para evaluar la actividad in vitro de cuatro compuestos triazolicos ante *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ya que estas especies han reportado mayor presencia en infecciones por *Candida*, presentando con éxito una baja susceptibilidad ante estas cepas, tomando como alternativas para el tratamiento de infecciones por hongos y contribuir al control de la resistencia microbiana.

En el desarrollo de métodos estandarizados constituyen un gran avance en la terapia de infecciones fúngicas sobre todo aquellas que comprometen la vida de un paciente, es necesario seguir a detalle la metodología propuesta por el método estandarizado por la CLSI, ya que muchas veces en esta prueba puede verse

afectada la determinación de una correcta CMI por variables como el tiempo y la temperatura de incubación, medio de cultivo adecuado donde en este caso es el RPMI 1640 con MOPS, tamaño del inóculo, implementos de trabajo estériles y áreas de trabajo desinfectadas.

7. CONCLUSIONES

Al realizar el ensayo *in vitro* de la evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *Candida* ATCC frente a los cuatro compuestos triazólicos por medio de la técnica estandarizada de microdilución en microplaca por la CLSI documento M27-S4, presentaron una sensibilidad *in vitro* alta frente a los compuestos triazolicos A, B, C, D, obteniendo valores de concentración mínima inhibitoria en rangos muy bajos.

Candida parapsilosis ATCC 22019 fue la cepa que presento mejor susceptibilidad frente a los compuestos triazólicos A, B, C, D, con CMI's más bajas ante las demás cepas de *Candida* ATCC.

Los cuatro compuestos triazólicos A, B, C, D, presentaron una sensibilidad *in vitro* más efectiva y puntos de corte de sensibilidad bajos en comparación con el Fluconazol.

El compuesto triazólico C, fue el triazol que mejor presento actividad antimicótica *in vitro* frente a las cinco cepas de *Candida* ATCC.

La técnica microdilución en microplaca establecido por la CLSI documento M27-S4 para evaluar la susceptibilidad *in vitro* en medio RPMI 1640 de levaduras frente a antifúngicos, demostró ser un método eficaz para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de los cuatro compuestos triazólicos, representado una gran importancia en el área de la salud, por el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades micoticas especialmente por *Candida spp.* ya que es la levadura más aislada en los casos clínicos y asi disminuir la tasa de incidencia por infecciones micoticas.

8. RECOMENDACIONES

A pesar que estos cuatro compuestos triazólicos demostraron buena actividad antifúngica *in vitro* frente a las cepas de *Candida* ATCC, aún no se pueden ser utilizados en la terapia antifúngica, por lo que se sugiere llevar a cabo estudios *in vivo* orientados a determinar la toxicidad, farmacodinamia, farmacocinética de los compuestos para determinar si son aptos para el uso clínico como agentes terapéuticos.

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1 METODO DE REFERENCIA PARA DILUCIÓN, ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD DE LEVADURAS CON ANTIFÚNGICOS, M27 – S4 DEL 2012, CLSI.

Propiedad Reservada - INCLIPSE Universidad Autónoma
Revisión de Calidad de Calidad

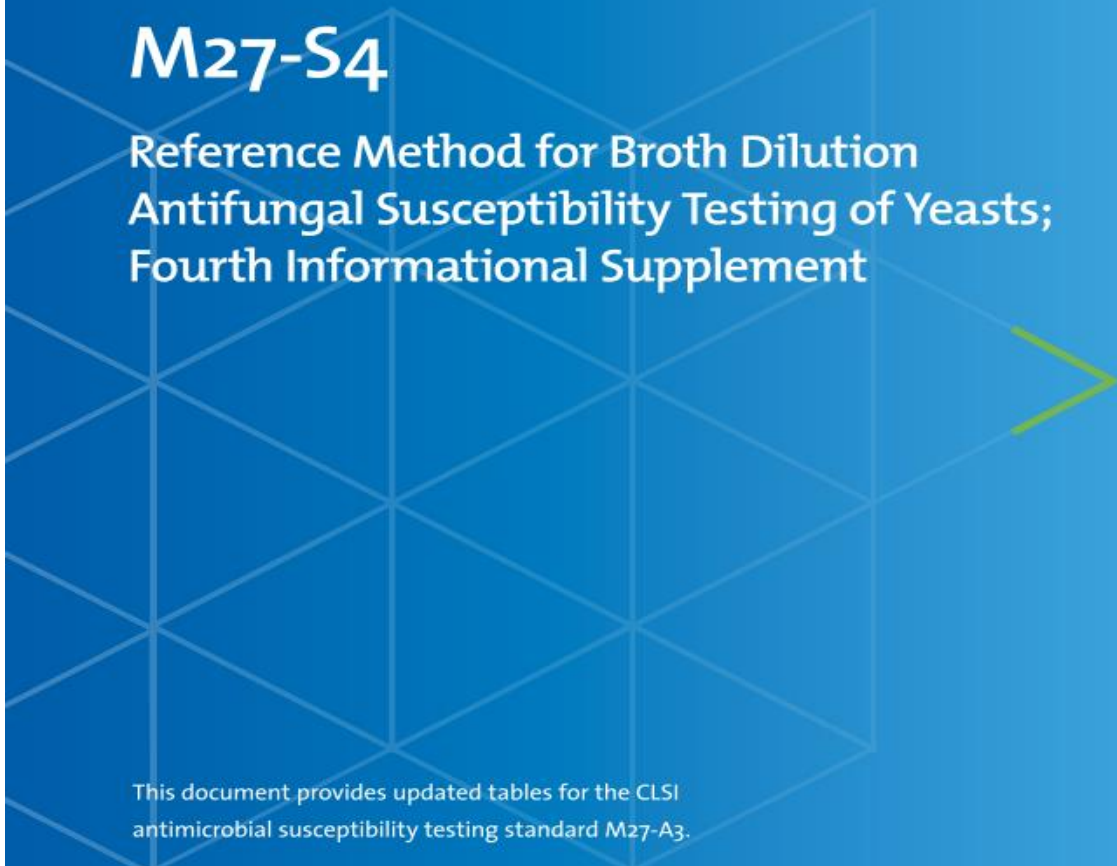


CLINICAL AND
LABORATORY
STANDARDS
INSTITUTE®

December 2012

M27-S4

Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement



This document provides updated tables for the CLSI antimicrobial susceptibility testing standard M27-A3.

An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process.

This document is protected by copyright.
Published On 12/31/2012.

9.2 ANEXO 2. CERTIFICADO DE ANALISIS DEL MEDIO RPMI 1640 CON L-GLUTAMINA SIN BICARBONATO DE SODIO

Lonza Verviers SPRL
Parc Industriel
de Petit-Rechain
B-4800 Verviers, Belgium
Tel +32 87 32 16 11
Fax +32 87 35 19 67
VAT No: BE463 156 786
RPM: Verviers – Bruxelles

Lonza

Printed on, 16-Feb-2018 17:02

Page 1 / 1

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Code:	BE12-702F	Lot Number:	7MB139
Product:	RPMI 1640 w/ L-Glutamine 500ml	Manufacture Date:	08-Sep-2017
		Expiration Date:	08-Sep-2019

TEST (Method)	SPECIFICATIONS		Results
	Min.	Max.	
pH @ 20-25°C (EP)	6.90	7.30	7.03
Osmolality (mOsm/kg)	271	295	282
Endotoxin	***	<=1.000	< 0.010 EU/ml
Sterility (EP and USP)	Negative	Negative	Negative

This product was manufactured aseptically according to the requirements of ISO:9001 using a validated sterile filtration method and tested where appropriate using EP methodology or approved alternative methods. This product is intended for research use only.

It is the end user's responsibility to ensure that the final product meets the requirements of the application for which it is to be used. Test results are determined using Lonza's currently approved protocols.

This product is manufactured using exclusively raw material of non-animal origin based on our supplier declaration on file in our quality system.

This lot has been reviewed by Quality Assurance in compliance with requirements of Lonza's Quality System.

This document was generated from a validated Part 11-compliant electronic system and thus handwritten signatures are not required.

For Technical Assistance, call +32 87 32 16 11 E- Mail: techsup.europe@lonza.com

9.3 ANEXO 3. COMPONENTES Y FORMULACIÓN DEL MEDIO RPMI 1640 CON L-GLUTAMINA Y SIN BICARBONATO DE SODIO

RPMI w/o Sodium
Bicarbonate

04-525

Description	CAS #	Chemical Formula	Concentration		Molarity	
			g/L	mg/L	mM	uM
Sodium Chloride	7647-14-5	NaCl	6.000	6.000E+03	102.669	1.027E+05
L-Glutamine	56-85-9	C5H10N2O3	0.300	300.000	2.053	2.053E+03
MOPS CELL CULTURE GRADE FREE ACID	1132-61-2	C7H15NO4S	34.535	3.453E+04	165.000	1.650E+05
Ca(NO3)2.4H2O	13477-34-4	Ca(NO3)2, 4H2O	0.100	100.000	0.423	423.460
Choline Chloride	67-48-1	HOCH2CH2N(CH3)3Cl	3.000E-03	3.000	2.149E-02	21.485
D-Biotin (Vitamin H) (00129)	58-85-5	C10H16N2O3S	2.000E-04	0.200	8.187E-04	0.819
D-Calcium Pantothenate (Vitamin B5)	137-08-6	C18H32CaN2O10	2.500E-04	0.250	5.246E-04	0.525
D-Glucose anhydrous	50-99-7	C6H12O6	2.000	2.000E+03	11.101	1.110E+04
Folic Acid	59-30-3	C19H19N7O6	1.000E-03	1.000	2.266E-03	2.266
Glutathione Reduced	70-18-8	C10H17N3O6S	1.000E-03	1.000	3.254E-03	3.254
Glycine	56-40-6	HO2CCH2NH2	1.000E-02	10.000	0.133	133.209
Potassium Chloride	7447-40-7	KCl	0.400	400.000	5.366	5.366E+03
L-Arginine Hydrochloride (00095)	1119-34-2	C6H14N4O2 • HCl	0.242	241.860	1.148	1.148E+03
L-Asparagine Monohydrate	5794-13-8	NH2COCH2CH(NH2)COOH • H2O	5.681E-02	56.810	0.378	378.405
L-Aspartic Acid	56-84-8	HO2CCH(NH2)CH2CO2H	2.000E-02	20.000	0.150	150.263
L-Cysteine Monohydrochloride Monohydrate	7048-04-6	C3H7NO2S • HCl • H2O	6.519E-02	65.190	0.371	371.241
L-Glutamic Acid	56-86-0	C5H9NO4	2.000E-02	20.000	0.136	135.962
L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate	5934-29-2	C6H9N3O2 • HCl • H2O	2.027E-02	20.270	9.671E-02	96.708
L-Hydroxyproline	51-35-4	C5H9NO3	2.000E-02	20.000	0.153	152.520
L-Isoleucine	73-32-5	HO2CCH(NH2)CH(CH3)CH2CH3	5.000E-02	50.000	0.381	381.185
L-Leucine	61-90-5	HO2CCH(NH2)CH2CH(CH3)2	5.000E-02	50.000	0.381	381.185
L-Lysine Monohydrochloride	657-27-2	C6H14N2O2 • HCl	4.000E-02	40.000	0.219	218.998
L-Methionine	63-68-3	HO2CCH(NH2)CH2CH2SCH3	1.500E-02	15.000	0.101	100.536
L-Phenylalanine	63-91-2	HO2CCH(NH2)CH2C6H5	1.500E-02	15.000	9.080E-02	90.805
L-Proline	147-85-3	C5H9NO2	2.000E-02	20.000	0.174	173.717
L-Serine	56-45-1	HO2CCH(NH2)CH2OH	3.000E-02	30.000	0.285	285.442
L-Threonine	72-19-5	HO2CCH(NH2)CH(OH)CH3	2.000E-02	20.000	0.168	167.898
L-Tryptophane	73-22-3	C11H12N2O2	5.000E-03	5.000	2.448E-02	24.482
L-Tyrosine Disodium Salt, Dihydrate	122666-78-9	C9H9NO3Na2 • 2H2O	2.883E-02	28.830	0.110	110.379
L-Valine	72-18-4	HO2CCH(NH2)CH(CH3)2	2.000E-02	20.000	0.171	170.794
Magnesium Sulfate Anhydrous	7487-88-9	MgSO4	4.883E-02	48.830	0.406	405.666
Myo-Inositol	87-89-8	C6H12O6	3.500E-02	35.000	0.194	194.272
Sodium Phosphate Monobasic, Anhydrous	7558-80-7	NaH2PO4	0.800	800.490	6.671	6.671E+03
Niacinamide (Nicotinamide)	98-92-0	C6H6N2O	1.000E-03	1.000	8.189E-03	8.189
P-Aminobenzoic Acid	150-13-0	C7H7NO2	1.000E-03	1.000	7.292E-03	7.292
Phenol Red	34487-61-1	C19H14O5S	5.100E-03	5.100	1.355E-02	13.549
Pyridoxine Monohydrochloride	58-56-0	C8H11NO3	1.000E-03	1.000	4.864E-03	4.864
Riboflavin (Vitamin B2)	83-88-5	C17H20N4O6	2.000E-04	0.200	5.314E-04	0.531
Thiamine Monohydrochloride (Vitamin B1)	67-03-8	C12H18N4OSCl2	1.000E-03	1.000	2.965E-03	2.965
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	68-19-9	C63H88CoN14O14P	5.000E-06	5.000E-03	3.689E-06	3.689E-03

9.4 ANEXO 4. FOTOS DE LAS CEPAS DE CANDIDA ATCC EN MEDIO SABOURAUD.

Candida albicans ATCC 10231 en medio Agar Sabouraud.

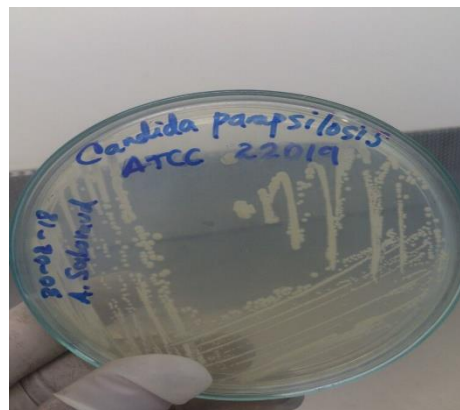
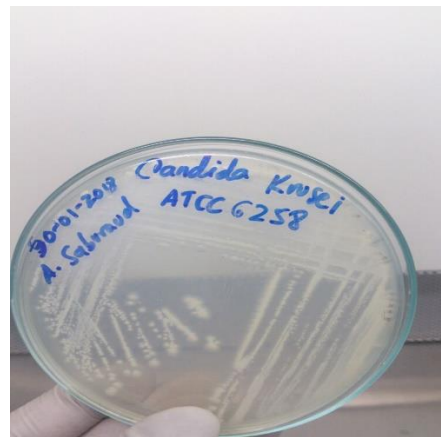


Candida albicans ATCC 90028 en medio Agar Sabouraud.



Candida glabrata ATCC 26512 en medio Agar Sabouraud.

Candida krusei ATCC 6258 en medio Agar Sabouraud.



9.5 ANEXO 5. INSERTO DEL FLUCOBAY – BAYER® (FLUCONAZOL).

Candida prapsilosis ATCC 22019 en medio Agar Sabouraud.

¡IMPORTANTE! Léase cuidadosamente.

BAYER

Flucobay®

Principio activo: fluconazol
Cápsula

FLUCOBAY® cápsulas 150 mg; contiene por cápsula: 150 mg de fluconazol y excipientes c.s.

INDICACIONES

Fluconazol está indicado en el tratamiento de:

- Candidiasis genital (vaginosis por *Candida* y balanitis por *Candida*) aguda y recurrente. También debe considerarse el tratamiento de las parejas de los pacientes con candidiasis genital sintomática.
- Dermatitis infecciosas incluyendo *Tinea pedis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *pitiriasis versicolor*, *Tinea unguium* (onicomicosis) e infecciones de la piel debidas a *Candida*.

Deben obtenerse muestras para cultivo de hongos y realizarse otros estudios de laboratorio relevantes (serología, histopatología) antes de comenzar el tratamiento con el fin de aislar e identificar el microorganismo causal. Puede instaurarse el tratamiento antes de disponer del resultado de los cultivos y de los otros estudios de laboratorio pero, una vez que se disponga de estos resultados, el tratamiento antifúngico debe ajustarse adecuadamente.

POSOLÓGIA Y MÉTODO DE ADMINISTRACIÓN

Adultos. La dosis recomendada de fluconazol para candidiasis vaginal es 150 mg como dosis oral única.

Para el tratamiento de infecciones dérmicas, incluyendo *Tinea pedis*, *corporis*, *cruris* e infecciones por *Candida*, la dosis recomendada es 150 mg una vez a la semana. La duración del tratamiento es generalmente 2-4 semanas, pero para la *Tinea pedis* puede requerirse un tratamiento de 6 semanas.

Para la *Tinea versicolor*, la dosis recomendada es de 300 mg una vez a la semana durante dos semanas.

Para la *Tinea unguium*, la dosis recomendada es de 150 mg una vez a la semana. El tratamiento debe continuarse hasta que la uña afectada sea sustituida (por crecimiento no infectado de la uña). El crecimiento de las uñas de los dedos de las manos y de los pies normalmente requiere de 3-6 meses y de 6-12 meses, respectivamente. Sin embargo, la tasa de crecimiento ungueal puede variar ampliamente según la edad y la persona. Después del tratamiento satisfactorio a largo plazo, las uñas permanecen ocasionalmente desfiguradas en las infecciones crónicas.

Niños. Debido a su única presentación como cápsulas de 150 mg, no se puede dosificar adecuadamente en función de mg/kg de peso corporal. FLUCOBAY® no debe ser utilizado en niños menores de 18 años a menos que sea indicado por su médico.

Adultos mayores: Es más probable que los pacientes adultos mayores tengan una función renal disminuida, por tanto, se ha de tener precaución para ajustar la dosis con base en la depuración de creatinina. Puede ser útil controlar la función renal. (Ver a continuación "POSOLÓGIA Y MÉTODO DE ADMINISTRACIÓN/Insuficiencia renal").

Insuficiencia renal. No es necesario un ajuste de dosis en pacientes con insuficiencia renal a quienes se les administra un tratamiento con dosis única. En los pacientes con la función renal alterada que recibirán dosis múltiples de fluconazol, las dosis normales de carga o iniciales de fluconazol deben administrarse el primer día de tratamiento y las dosis siguientes deben ajustarse en función de la depuración de creatinina (CrCl):

- CrCl más de 50 mL/minuto: el 100% de la dosis estándar recomendada.
- CrCl menos de 50 mL/minuto y no sometido a diálisis: la dosis debe reducirse a la mitad. FLUCOBAY® se presenta sólo como cápsulas de 150 mg, por tanto, es imposible reducir la dosis a la mitad. FLUCOBAY® cápsulas está contraindicado en este tipo de pacientes.
- Pacientes en hemodíalisis regular: el 100% de la dosis estándar recomendada después de cada sesión de diálisis.

Estos son ajustes sugeridos de la dosis que se basan en la farmacocinética después de la administración de dosis múltiples. Pueden ser necesarios más ajustes en función de la condición clínica.

Cuando la creatinina sérica es la única medida disponible de la función renal, la fórmula siguiente (basada en el sexo, el peso y la edad del paciente) debe usarse para estimar la depuración de creatinina en adultos:

Varones: $\frac{\text{Peso (kg)} \times (140 - \text{edad})}{72 \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}}$

Mujeres: 0,85 x valor anterior

CONTRAINDICACIONES

- Fluconazol está contraindicado en los pacientes que han mostrado hipersensibilidad a fluconazol, a cualquiera de sus excipientes o a azoles relacionados como clotrimazol y bifonazol.
- La coadministración de cisaprida, levometadil o terfenadina está contraindicada en los pacientes que reciben fluconazol.
- Debido al potencial teratogénico, el uso de FLUCOBAY® está contraindicado durante el embarazo y en las mujeres en edad fértil, a menos que se esté usando un anticonceptivo adecuado.
- El fluconazol se excreta en la leche humana a concentraciones similares al plasma. Por tanto, el uso de fluconazol está contraindicado en las madres lactantes.
- Debido al potencial de toxicidad grave, incluyendo vasoespasmos, que puede ocurrir con concentraciones plasmáticas aumentadas de derivados ergóticos, el uso concurrente de fluconazol y derivados ergóticos está contraindicado.

Dado que FLUCOBAY® es producido sólo como cápsulas de 150 mg, lo que no permite adaptar la dosis a las necesidades individuales, FLUCOBAY® cápsulas está contraindicado en los pacientes que vayan a recibir dosis múltiples de fluconazol y tengan simultáneamente una depuración de creatinina inferior a 50 mL/minuto y no estén recibiendo diálisis.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES ESPECIALES PARA SU USO

Debido a su presentación única como cápsulas de 150 mg, que no permite dosificar adecuadamente en función de mg/kg de peso corporal, FLUCOBAY® no debe ser utilizado en niños menores de 18 años a menos que sea indicado por su médico.

Es más probable que los pacientes adultos mayores tengan una función renal disminuida, por tanto, se ha de tener precaución para ajustar la dosis con base en la depuración de creatinina (Ver "POSOLÓGIA Y MÉTODO DE ADMINISTRACIÓN/Insuficiencia renal"). Puede ser útil controlar la función renal.

El fluconazol debe utilizarse con precaución en los pacientes con la función renal o hepática alterada. Se han observado anomalías en las pruebas de la función hematológica, hepática y renal en pacientes con enfermedades subyacentes graves como SIDA o enfermedad maligna. El fluconazol se ha asociado con casos raros de toxicidad hepática grave, incluyendo muerte, principalmente en pacientes con condiciones médicas subyacentes graves. En los casos de hepatotoxicidad asociada a fluconazol, no se ha observado ninguna relación clara con la dosis diaria total, la duración del tratamiento, el sexo o la edad del paciente. La hepatotoxicidad por fluconazol ha sido usualmente reversible, aunque no siempre, al interrumpir el tratamiento. Los pacientes que desarrollan pruebas de función hepática anormales durante el tratamiento con fluconazol deben ser monitorizados para vigilar el desarrollo de un daño hepático más grave. El uso de fluconazol debe interrumpirse si se presentan signos y síntomas clínicos consistentes con enfermedad hepática que puedan atribuirse a fluconazol. En casos raros, los pacientes han desarrollado trastornos cutáneos exfoliativos durante el tratamiento con fluconazol. En pacientes con enfermedades subyacentes graves (predominantemente SIDA y enfermedad maligna), estas han ocasionado raramente un desenlace mortal. Los pacientes que desarrollen erupciones durante el tratamiento con fluconazol deben ser monitorizados estrechamente y el uso del fármaco suspenderse si las lesiones progresan. Algunos azoles, incluyendo el fluconazol, han sido asociados con prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma. Durante la experiencia posterior a la comercialización ha habido casos raros de prolongación del intervalo QT y torsades de pointes en pacientes que toman fluconazol. La mayoría de estos informes incluían pacientes gravemente enfermos con múltiples factores de riesgo no claramente identificados, como cardiopatía estructural, anomalías electrolíticas y medicaciones concomitantes que pueden haber contribuido. Fluconazol debe ser administrado con precaución a pacientes con estas situaciones potencialmente proarrítmicas.

INTERACCIÓN CON OTROS MEDICAMENTOS Y OTRAS FORMAS DE INTERACCIÓN

El fluconazol puede interferir con el metabolismo de algunos fármacos si se administran concomitantemente, principalmente por inhibición de las isoenzimas CYP3A4 y CYP2C9 del citocromo P450.

Fármacos antiarrítmicos. Pueden ocurrir casos de prolongación del intervalo QT y/o torsades de pointes después del uso concomitante de fluconazol con antiarrítmicos de la clase I como aprindina, flecainida, lorcainida y propafenona; antiarrítmicos de la clase II incluyendo ajmalina, disopiramina, hidroquinidina, pimenoil, prajmalina, procainamida, quinidina y todos los antiarrítmicos de la clase III, incluyendo amiodarona, bretilo, ibutilida y sotalol.

Fármacos conocidos por prolongar el intervalo QT a dosis terapéuticas. El uso concomitante de estos fármacos con fluconazol puede aumentar el riesgo de cardiotoxicidad (prolongación del QTc, torsades de pointes, síncope, paro cardíaco). Teóricamente, interacciones farmacodinámicas pueden ocurrir con fármacos como amisulprida, bepridil, clorquinina, dolasetrón, droperidol, enflurano, eritromicina, fluoxetina, foscarnet, gemfibrozilo, halofantrina, haloperidol, levofloxacino, lidoflazina, mefloquina, octreotida, pentamida, fenotiazinas (p. ej., clorpromazina, mesoridazina, proclorperazina, tioridazina, trifluoperazina) pimozida, probucol, risperidona, sertindol, espiramicina, sulfametoxazol, sultoprida, telitromicina, antidepresivos tricíclicos (p. ej., amitriptilina, amoxapina, desipramina, dibenzapina, doxepina, imipramina, nortriptilina, trimipramina), trimetoprima, vasopresina, ziprasidona, zolmitriptán y zotepina.

Otros tipos de interacción pueden ser dobles, tanto farmacocinética con respecto a la inhibición del metabolismo del fármaco, mediada por fluconazol, como farmacodinámica con respecto a cardiotoxicidad. Estos tipos de interacciones pueden incluir el uso concomitante de astemizol, cisaprida, claritromicina, isradipina, levometadil, quetiapina y terfenadina (Ver CONTRAINDICACIONES).

Derivados ergóticos. Debido al potencial de toxicidad grave, incluyendo vasoespasmos, que puede ocurrir con concentraciones plasmáticas aumentadas de derivados ergóticos (dihidroergotamina, meslato de ergoloido, ergonovina, ergotamina, metilergonovina, metisergida), el uso concurrente de fluconazol y derivados ergóticos está contraindicado. El fluconazol y los derivados ergóticos son metabolizados por las enzimas 3A4 del citocromo P450 y la competición por el metabolismo podría ocasionar un aumento de la concentración plasmática del derivado ergótico.

Cimetidina. El uso concomitante de cimetidina puede ocasionar una disminución de la absorción gastrointestinal de fluconazol. Debe considerarse un aumento de la dosis de fluconazol en los pacientes que reciben cimetidina concomitante.

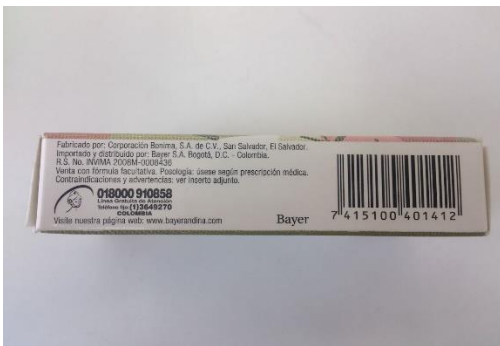
Losartan. CYP2C9 y CYP3A4 intervienen en el metabolismo de losartan a su metabolito activo, el ácido carboxílico E-3174, que es responsable de la mayor parte del antagonismo del receptor de la angiotensina II que ocurre con el tratamiento con losartan. Se demostró que fluconazol inhibe significativamente la conversión de losartan a su metabolito. Se recomienda la monitorización de los pacientes para el control continuo de su hipertensión.

Fentanilo, metadona. La coadministración de fluconazol puede causar disminución de la depuración de fentanilo o metadona y el posterior aumento o prolongación de los efectos opioides (depresión del SNC, depresión respiratoria). Puede ser necesario ajustar la dosis del opioide.

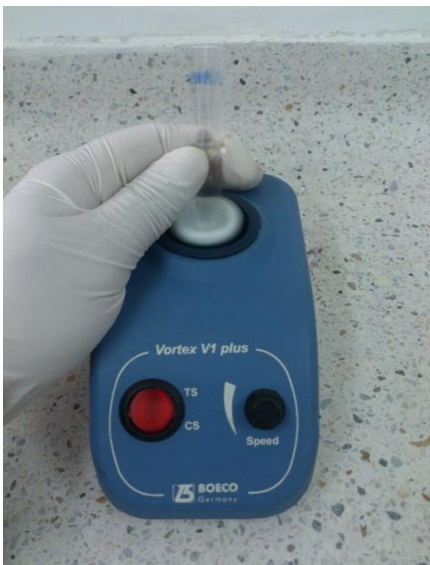
Hipoglucemiantes orales. Una hipoglucemia clínicamente significativa puede precipitarse por el uso de fluconazol con hipoglucemiantes orales; se ha reportado una muerte por hipoglucemia en asociación con el uso combinado de fluconazol y gliburida. El fluconazol reduce el metabolismo de tolbutamida, gliburida y glibizida y aumenta la concentración plasmática de estos u otros hipoglucemiantes orales sulfonilúreas. Las concentraciones de glucosa en sangre deben monitorizarse cuidadosamente y la dosis de la sulfonilúrea debe ajustarse si fuera necesario.

Anticoagulantes cumarínicos. El tiempo de protrombina puede estar aumentado en los pacientes que reciben fluconazol y anticoagulantes cumarínicos concomitantes. En la experiencia poscomercialización, como con otros antifúngicos azólicos, se han notificado epistaxis de sangre (hematomas, epistaxis, sangrado gastrointestinal, hematuria

9.6 ANEXO 6. FOTGRAFIAS DEL FLUCOBAY – BAYER® (FLUCONAZOL).

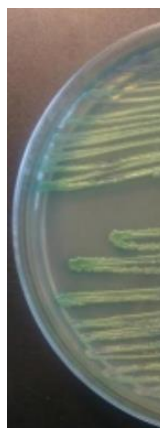


**9.7 ANEXO 7. FOTOGRAFIAS DEL PROCEDIMIENTO DE LAS DILUCIONES
LOS TRIAZOLES A, B, C, D.**



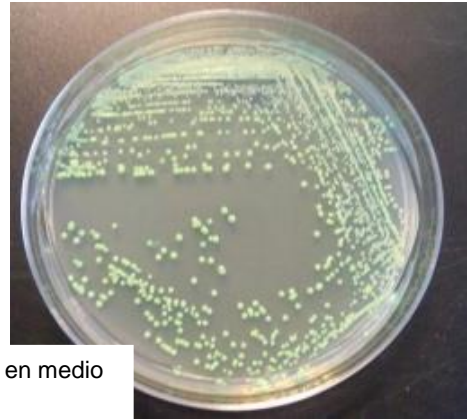
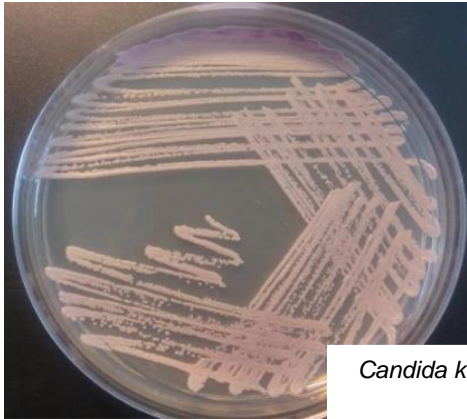
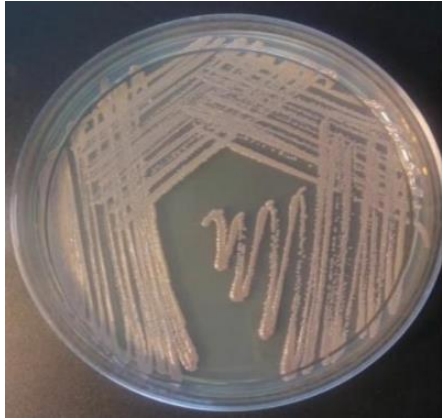


**9.8 ANEXO 8. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD EN CROMagar®
DE LAS CEPAS DE CANDIDA ATCC EN LAS MICROPLACAS.**



Candida albicans ATCC 10231 en medio CROMagar®.

Candida glabrata ATCC 26512 en medio CROMagar®.



Candida krusei ATCC 6258 en medio CROMagar®.



REFERENC

IAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16(5):445–52.
2. Gómez Quintero CH. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*. 2010;14:S172–80.
3. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2010;14(11):e954–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.04.006>
4. Arias A, Valderrama M, Parra D, Marín J, Mazo L, Montoya C. Caracterización clínica y epidemiológica de los pacientes con infección del tracto urinario asociadas al cuidado de la salud. *Investig Educ en Enferm* [Internet]. 2012;30(1):28–34. Available from: http://0-www.index-f.com.llull.uib.es/new/cuiden/extendida.php?cdid=675775_1
5. Pemán J, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: Results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(1):23–30.
6. Bustamante CI. Treatment of *Candida* infection: a view from the trenches! *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2005;18(6):490–5. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001432-200512000-00004>
7. THOMPSON M. L. Antifúngicos. *Rev Chil infectología* [Internet]. 2002 [cited 2017 Apr 21];19:S22–5. Available from:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en

8. Med LINEJ, Berg D, Bechel K, Plempel M, Regel E. Antimycotic sterol biosynthesis inhibitors. 1986;33(1984).
9. Chen SCA, Sorrell TC. Antifungal agents. *Med J Aust* [Internet]. 2007;187(7):404–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908006>
10. Gregorí Valdés BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cuba Farm* [Internet]. 2005;39(2). Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf>
11. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Mech Antifung Resist azoles Candida albicans A Rev* [Internet]. 2016;27(3):127–36. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=118581964&lang=es&site=ehost-live>
12. Wiederhold NP, Patterson TF, Srinivasan A, Chaturvedi AK, Fothergill AW, Wormley FL, et al. Repurposing aurano-fin as an antifungal: In vitro activity against a variety of medically important fungi. *Virulence* [Internet]. 2016;In press(2):138–42. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2016.1196301>
13. Ostrosky-Zeichner L, Oude Lashof AML, Kullberg BJ, Rex JH. Voriconazole Salvage Treatment of Invasive Candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22(11):651–5.
14. Diomedi P. A. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chil infectología*. 2004;21(2):89–101.
15. Deck DH, Guglielmo BJ. Pharmacological advances in the treatment of invasive candidiasis. *ExpertRevAntilfectTher*. 2006;4(1744–8336

(Electronic):137–49.

16. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48(3):201–5.
17. Slavin MA, Szer J, Grigg AP, Roberts AW, Seymour JF, Sasadeusz J, et al. Guidelines for the use of antifungal agents in the treatment of invasive *Candida* and mould infections (vol 34, pg 192, 2004). *Intern Med J*. 2004;34(5):301.
18. Gavaldà J, Ruiz I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección fúngica invasiva por *Candida* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2003;21(9):498–508. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72995-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72995-4)
19. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(PART1):10–24.
20. Zomorodian K, Rahimi M, Pakshir K, Motamedi M, Ghiasi M, Rezashah H. Determination of antifungal susceptibility patterns among the clinical isolates of *Candida* species. *J Glob Infect Dis*. 2011;3(4):357.
21. Beyda ND, Lewis RE, Garey KW. Resistencia a equinocandinas en especies de *Candida*: Mecanismos de susceptibilidad reducida y alternativas terapéuticas. *Ann Pharmacother*. 2012;46(7–8):1086–96.
22. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: Importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter*. 2010;23(4):169–76.
23. Caldas CDEM, Pérez-cárdenas JE, Henao CC. Hongos Aislados De

Pacientes Con Micosis Ungueal En La Antimycotic Sensitivity of Different Isolated Fungi Species in Patients With the Onychomycosis in Manizales-Caldas-Colombia. 2013;(2):26–39.

24. Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: Application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic . J Clin Microbiol. 2013;51(8):2571–81.
25. Guerrero Miranda JE. ESCUELA DE BIOANÁLISIS Disertación Previa a la obtención del Título de Bioquímica Clínica Título Identificación , susceptibilidad y distribución de especies de Cándida obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. 2016; Available from: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12484>.
26. Castañón Olivaes L. CANDIDIASIS [Internet]. Recursos en Micología - UNAM. 2016. Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
27. Simarro E, Requena L, Canteras M. Fungemias nosocomiales en un hospital general: epidemiología y factores pronóstico. Estudio prospectivo 1993-1998. Epidemiology. 2001;304–7.
28. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133–63.
29. Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry The biology and chemistry of antifungal agents : A review. Bioorg Med Chem [Internet]. 2012;20(19):5678–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>
30. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Ther Clin Risk Manag . 2014;10:95–105.
31. Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Kurzatkowski W. Ultrastructure of

- Candida albicans* Pleomorphic Forms: Phase-Contrast Microscopy, Scanning and Transmission Electron Microscopy. *Pjm.microbiology.pl.* 2012;61(2):129–35.
32. Herwald SE, Kumamoto CA. *Candida albicans* niche specialization: Features that distinguish biofilm cells from commensal cells. *Curr Fungal Infect Rep.* 2014;8(2):179–84.
 33. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(1):33–9.
 34. Cantón E, Viudes Á, Experimental UDB, Investigación C De, *Candida* DELG, España E, et al. Forum micológico Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam.* 2001;51–5.
 35. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic response of *Candida albicans* to farnesol under hyphae-inducing conditions. *FEMS Yeast Res.* 2012;12(8):879–89.
 36. Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol [Internet].* 2014;22(11):614–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.001>
 37. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence [Internet].* 2013;4(2):119–28. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.22913>
 38. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*- epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence [Internet].* 2015;6(4):338–46. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2015.1012981>
 39. De la Calle Rodriguez N, Santa Velez C CCN. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Rev CES Med [Internet].* 2012 [cited 2017 Sep 12];26(1):43–55.

Available from:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052012000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es

40. Shareck J, Nantel A, Belhumeur P. Conjugated linoleic acid inhibits hyphal growth in *Candida albicans* by modulating Ras1p cellular levels and downregulating TEC1 expression. *Eukaryot Cell*. 2011;10(4):565–77.
41. Paniagua Contreras LG, Monroy Pérez E, Pineda Olvera J, Negrete Abascal E, Vaca Pacheco S. Caracterización genotípica de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes no inmunocomprometidos. *Rev Med Hosp Gen Mex [Internet]*. 2010;73(2):94–101. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/h-gral/hg-2010/hg102d.pdf>
42. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Dos Santos JD, Jorge AOC, Junqueira JC. Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Brazilian J Oral Sci*. 2013;12(3):199–204.
43. Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: Experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis [Internet]*. 2011;15(11):e759–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.06.006>
44. Shorr AF, Tabak YP, Johannes RS, Sun X, Spalding J, Kollef MH. Candidemia on presentation to the hospital: development and validation of a risk score. *Crit Care [Internet]*. 2009;13(5):R156. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19788756> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2784380>
45. Kindo A, Giri S. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol*. 2012;30(3):270.
46. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-

- Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2015;62(4):e1–50.
47. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002;50(4):243–60.
 48. N. B, S. B, D. V. Deep-seated *Candida* infections in the intensive care unit. *Netherlands J Crit Care* [Internet]. 2011;15(4):184–90. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L362861616%5Cnhttp://www.nvic.nl/download.php?id=765>
 49. Leal AL, Álvarez CA. Boletín [Internet]. Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2016 Componente pediátrico y adulto. Bogotá; 2017. p. 24. Available from: <http://www.grebo.org/>
 50. Pfaller MA, Jones RN, Doern G V, Sader HS, Hollis RJ. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species : Frequency of Occurrence 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(7):1886–9.
 51. Galván B, Mariscal F. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2006;23(1):12–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1130140606700055>
 52. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2014;31(1):42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>
 53. Xie F, Ni T, Zhao J, Pang L, Li R, Cai Z, et al. Design, Synthesis, and in vitro Evaluation of Novel Antifungal Triazoles. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2017; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X17303098>
 54. Steinbach WJ. Antifungal agents in children. *Pediatr Clin North Am*.

2005;52(3):895–915.

55. Stockmann C, Constance JE, Roberts JK, Olson J, Doby EH, Ampofo K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals in children and their clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(5):429–54.
56. Gallis H a, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*. 1990;12(2):308–29.
57. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: A role for polyenes. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):457–65.
58. Jones E, Goldman M. Lipid formulations of amphotericin B. *Cleve Clin J Med*. 1998;65(8):423–7.
59. Warner WA, Sanchez R, Dawoodian A, Li E, Momand J. The C2'–OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Binding the Primary Sterol of Human But Not Yeast Cells. *Natl Institutes Heal*. 2013;80(4):631–7.
60. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272–9.
61. Díaz A, Garcés C. Uso actual de los antifúngicos triazoles en niños. *Infectio* [Internet]. 2012;16(Supl 3):82–93. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70031-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70031-0)
62. MacCallum DM, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(4):1476–83.
63. Rivas, Ana Maria. Cardona N. Antimicóticos de uso sistémico: ¿Con que opciones terapéuticas contamos? *Rev CES Med* [Internet]. 2013;23(1):61–76. Available from: <http://www.redalyc.org/html/2611/261121006007/>
64. Mohr J, Pharm D, Johnson M, Pharm D, Cooper T, Pharm D, et al. Current Options in Antifungal Pharmacotherapy. *Pharmacother Publ Inc*.

2008;28(5):614–45.

65. Cantón E, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. In vitro activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(7):3108–11.
66. Simitsopoulou M, Peshkova P, Tasina E, Katragkou A, Kyrpitzis D, Velegriaki A, et al. Species-Specific and Drug-Specific Differences in Susceptibility of *Candida* Biofilms to Echinocandins : Characterization of Less Common. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2562–70.
67. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med [Internet].* 2012;125(1 SUPPL.):S3–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
68. Muñoz AC, Tur C, Estivill D. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997. 1997;14:50–4.
69. Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1553–5.
70. CLARK WA, GEARY DH. The Story of the American Type Culture Collection- Its History and Development (1 899-1 973). *Adv Appl Microbiol.* 1974;17:295–309.
71. Supplement FI. M27-S4 Reference Method for Broth Dilution. 2012.
72. Wagner T, Borg-V. Zepelin M, Rüchel R. Ph-dependent denaturation of extracellular aspartic proteinases from *Candida* species. *Med Mycol.* 1995;33(4):275–8.
73. Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological

- transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4664–8.
74. Lingappa BT, Prasad M, Lingappa Y, Hunt DF, Biemann K. Phenethyl Alcohol and Tryptophol: Autoantibiotics Produced by the Fungus *Candida albicans*. *Science* (80-) [Internet]. 1969;163(3863):192–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.163.3863.192>
75. Isobe K, Tani Y, Yamada H. Differential Determination Procedure for Putrescine, Spermidine and Spermine with Polyamine Oxidase from Fungi and Putrescine Oxidase. *Agric Biol Chem* [Internet]. 1981;45(3):727–33. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00021369.1981.10864563>
76. Burshell A, Stathis PA, Do Y, Miller SC, Feldman D. Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* [Internet]. 1984;259(6):3450–6. Available from: <http://www.jbc.org/content/259/6/3450.short>
77. Shen LL, Baranowski J, Fostel J, Montgomery DA, Lartey PA. targets for the discovery of antifungal drugs . *DNA Topoisomerases from Pathogenic Fungi : Targets for the Discovery of Antifungal Drugs*. 1992;36(12):2778–84.
78. Knudtson WU, Wohlgemuth K, Kirkbride C, Robl M, Kieffer M. Necropsy Findings Histological Findings. 1973;(1152):175–8.
79. Briand D, Dubreucq E, Galzy P. Functioning and Regioselectivity of the Lipase of *Candida Parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in Aqueous Medium: New Interpretation of Regioselectivity Taking Acyl Migration into Account. *Eur J Biochem*. 1995;228(1):169–75.
80. Aktas E, Yigit N, Ayyildiz a. Esterase activity in various *Candida* species. *J Int Med Res* [Internet]. 1978;30(3):322–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854187>
81. Middelhoven WJ, Coenen A, Kraakman B, Sollewijn Gelpke MD. Degradation of some phenols and hydroxybenzoates by the imperfect ascomycetous yeast

Candida parapsilosis and *Arxula adenivorans*: Evidence for an operative gentisate pathway. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 1992;62(3):181–7.

82. Cantón E, Msrtin E, Espinel-ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2007;15:1. Available from: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>