

**CARACTERÍSTICAS FARMACODINÁMICAS ANTIFÚNGICAS DE LA
ANFOTERICINA B Y EL FLUCONAZOL DE AISLAMIENTOS DE
Candida albicans Y Candida parapsilosis**

ADRIANA PATRICIA GUTIÉRREZ MARTÍNEZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

BACTERIÓLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
Bogotá, 2004**

NOTA DE ADVERTENCIA

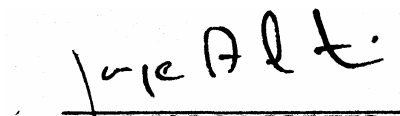
ARTÍCULO 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946: "La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en su trabajo de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque los trabajos no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

**CARACTERÍSTICAS FARMACODINÁMICAS ANTIFÚNGICAS DE LA
ANFOTERICINA B Y EL FLUCONAZOL DE AISLAMIENTOS DE
Candida albicans Y Candida parapsilosis**

ADRIANA PATRICIA GUTIÉRREZ MARTÍNEZ

APROBADO


**DRA PILAR RIVAS
MICÓLOGA INC
DIRECTORA**


**DR JORGE CORTES
INFECTÓLOGO INC
CODIRECTOR**


**DRA ALBA ALICIA TRESPALACIOS
MICROBIOLOGA PUJ
ASESORA**

**CARACTERÍSTICAS FARMACODINÁMICAS ANTIFÚNGICAS DE LA
ANFOTERICINA B Y EL FLUCONAZOL DE AISLAMIENTOS DE
Candida albicans Y Candida parapsilosis**

APROBADO

Sonia Cuervo

DRA SONIA CUERVO

JURADO

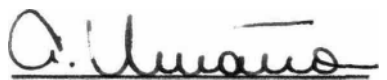
Roberto Tamara

DR ROBERTO TAMARA


JURADO

**CARACTERÍSTICAS FARMACODINÁMICAS ANTIFÚNGICAS DE LA
ANFOTERICINA B Y EL FLUCONAZOL DE AISLAMIENTOS DE
Candida albicans Y Candida parapsilosis**

APROBADO



**DRA ANGELA UMAÑA
DECANA ACADÉMICA**



**DRA AURA ROSA MANASCERO
DIRECTORA DE LA CARRERA**

Después de mucho tiempo y de tantos esfuerzos,
se termina esta gran etapa de mi vida; por eso
quiero
dedicarles este trabajo a todos los que
estuvieron
a mi lado y me apoyaron hasta el final.

A Dios porque me dio la vida, la salud
y unos padres maravillosos
que nunca dejaron de creer en mí.

A mis padres, porque sin su apoyo
y sin su ayuda incondicional,
no hubiera llegado a donde estoy ahora.

A mis hermanos y a mis sobrinos,
por darme ánimo para salir adelante.

A Vladimir por hacer que confiara en mi misma,
por su verdadero amor y a su familia por
permitirme ser un miembro más de ella.

A Carolina, mi gran amiga,
que aunque está lejos, nunca se olvidó de mí
y siempre me dio fuerzas para seguir.

A la Facultad de Bacteriología de la
Pontificia Universidad Javeriana,
por formarme no solo
como una buena profesional,
sino como una gran persona.

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa su agradecimiento a:

Dra Pilar Rivas. Micóloga Laboratorio Clínico INC, Bogotá.

Dr Jorge Cortés. Infectólogo INC, Bogotá.

Dra Alba Alicia Tres Palacios. Microbióloga PUJ, Bogotá.

Dra Maria Cristina Paredes. Coordinadora Laboratorio Clínico. INC, Bogotá.

Dra Maria Mercedes Bravo. Inmunología. INC, Bogotá.

Dra Sonia Isabel Cuervo. Infectóloga. INC, Bogota.

Dr Roberto Tamara. Infectólogo. Hospital San Ignacio, Bogota.

Dra Johana Osorio. Infectóloga. INC, Bogotá.

Yency Reina y Fernanda Ramírez. Estudiantes IX Semestre Bacteriología
Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá.

Al Instituto Nacional de Cancerología por su gran colaboración

Y a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la
realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 EPIDEMIOLOGÍA	3
2.2 GENERALIDADES	5
2.3 LA PARED CELULAR Y LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE LA CANDIDA ALBICANS	6
2.4 PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE CANDIDA	7
2.4.1 Mecanismos	7
2.4.1.1 Adherencia	8
2.4.1.2 Dimorfismo	8
2.4.1.3 Frecuencia alta de mutación (switching)	8
2.4.1.4 Interferencia con la fagocitosis	9
2.4.1.5 Interferencia con el sistema inmune	9
2.4.1.6 Interferencia con el sistema de complemento	9
2.4.1.7 Sinergismo con bacterias	10
2.4.2 Factores moleculares	10
2.4.2.1 Proteinasas	10
2.4.2.2 Anafilotoxinas	11
2.4.2.3 Toxinas	11
2.4.2.4 Nitrosaminas	11
2.4.2.5 Metabolitos ácidos	12
2.4.2.6 Fosfolipasas	12
2.5 IMPORTANCIA DE C. ALBICANS Y OTRAS ESPECIES DE CANDIDA COMO PATÓGENOS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS	12

2.6 FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN FÚNGICA	15
2.7 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	16
2.7.1 Polienos	17
2.7.1.1 Anfotericina B	17
2.7.1.2 Mecanismo de acción	18
2.7.1.3 Farmacocinética y farmacodinamia	18
2.7.1.4 Efectos adversos	20
2.7.1.5 Resistencia a polienos	21
2.7.1.6 Mecanismos de resistencia	22
2.7.1.7 Importancia médica de la resistencia a Anfotericina B	23
2.7.2 Derivados del imidazol y del triazol	24
2.7.2.1 Fluconazol	24
2.7.2.2 Mecanismos de acción	25
2.7.2.3 Farmacocinética	26
2.7.2.4 Efectos adversos	26
2.7.2.5 Mecanismos de resistencia	27
2.7.2.6 Importancia clínica de la resistencia a los imidazoles y triazoles	28
2.8 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA	30
2.8.1 Método de microdilución del NCCLS	32
2.8.2 Métodos para determinar la actividad fungicida	33
2.8.3 Factores microbiológicos	35
2.8.4 Fenómeno Eagle o efecto paradójico	35
2.8.5 Persistencia	35
2.8.6 Tolerancia	36
2.8.7 Concentración fungicida mínima (CFM)	36
2.8.8 Curva de muerte	37
3. OBJETIVOS	38
4. HIPÓTESIS	39

5. VARIABLES Y DEFINICIONES	40
6. DISEÑO METODOLÓGICO	41
6.1 TIPO DE ESTUDIO	41
6.2 DISEÑO DE LA MUESTRA	41
6.2.1 Población	41
6.2.2 Criterios de inclusión	41
6.3 PROCEDIMIENTOS	42
6.3.1 Polvo base de antifúngicos	42
6.3.2 Preparación de las soluciones madre	42
6.3.3 Medio de cultivo	42
6.3.4 Preparación de las diluciones de los antifúngicos	43
6.3.4.1 Fármaco soluble en DMSO – Anfotericina B	43
6.3.4.2 Fármaco soluble en DMSO al 10% - Fluconazol	43
6.3.5 Preparación de las diluciones de los agentes antifúngicos para el test de susceptibilidad	44
6.3.6 Preparación del inóculo	45
6.3.7 Llenado de microplacas	45
6.3.8 Inoculación de placas	46
6.3.9 Incubación de las placas	47
6.3.10 Lectura de la CMI	48
6.3.11 Anfotericina B	49
6.3.12 Fluconazol	49
6.3.13 Concentración fungicida mínima (CFM)	50
6.3.14 Curvas de muerte	51
6.3.14.1 Medio de cultivo	51
6.3.14.2 Inóculo	51
6.3.14.3 Antifúngicos	52
6.3.14.4 Tubo control de crecimiento	52
6.3.14.5 Incubación	52
6.3.15 Difusión en agar con disco y E-test	54

6.3.15.1 Inóculo	54
6.3.15.2 Incubación	55
6.3.16 Límite de cuantificación	56
6.3.16.1 Inóculo	56
6.3.16.2 Incubación	56
7. RESULTADOS	57
8. DISCUSIÓN	69
9. CONCLUSIONES	74
10. RECOMENDACIONES	75
11. IMPLICACIONES ÉTICAS	76
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	85

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Procedimiento de referencia para las pruebas de susceptibilidad antifúngica para levaduras del NCCLS. Documento M27-A	33
TABLA 2. Rangos de referencia de CMI de aislamientos de control de calidad de microdilución en caldo.	48
TABLA 3. Guía de interpretación para test de susceptibilidad in Vitro de aislamientos levaduriformes usado por el NCCLS.	49
TABLA 4. CMI de fluconazol y anfotericina B contra los aislamientos probados.	57

LISTA DE GRAFICAS.

	Pág.
GRAFICA 1. C. parapsilosis ATCC 22019 contra fluconazol	60
GRAFICA 2. C. albicans ATCC90028 contra fluconazol	60
GRAFICA 3. C. albicans H1766 contra fluconazol	61
GRAFICA 4. C. parapsilosis H1516 contra fluconazol	61
GRAFICA 5. C. albicans H1499 contra fluconazol	62
GRAFICA 6. C. parapsilosis ATCC 22019 contra anfotericina B	63
GRAFICA 7. C. albicans ATCC90028 contra anfotericina B	63
GRAFICA 8. C. albicans H1766 contra anfotericina B	64
GRAFICA 9. C. parapsilosis H1516 contra anfotericina B	64
GRAFICA 10 C. albicans H1499 contra anfotericina B	65

GRAFICA 11. Curva dosis respuesta <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 contra Anfotericina B y fluconazol	66
GRAFICA 12. Curva dosis respuesta <i>C. albicans</i> ATCC 90028 contra Anfotericina B y fluconazol	67
GRAFICA 13. Curva dosis respuesta <i>C. albicans</i> H1766 contra Anfotericina B y fluconazol.	67
GRAFICA 14. Curva dosis respuesta <i>C. parapsilosis</i> H1516 contra Anfotericina B y fluconazol.	68
GRAFICA 15. Curva dosis respuesta <i>C. albicans</i> H1499 contra Anfotericina B y fluconazol.	68
GRAFICA 16. Tubo germinal	89
GRAFICA 17. Tubo germinal	89
GRAFICA 18. Clamidospora	91
GRAFICA 19. Clamidospora	91

LISTA DE ANEXOS.

	Pág.
ANEXO 1. Preparación del medio de cultivo (RPMI-1640 tamponado con 0,165 mol/l MOPS, 1 litro).	85
ANEXO 2. Panel para la identificación rápida de levaduras Dade Microscan.	87
ANEXO 3. Tubo germinal.	88
ANEXO 4. Búsqueda de clamidospora terminal.	90
ANEXO 5. Preparación del medio sabouraud dextrosa.	92

RESUMEN

Este estudio fue diseñado para examinar pruebas de susceptibilidad antifúngicas. Fueron determinadas curvas de muerte para 5 aislamientos de varias especies de *Candida* probadas contra fluconazol y anfotericina B; fueron utilizados dos aislamientos de *Candida albicans* (H1766 – H1499), un aislamiento de *Candida parapsilosis* (H1516) y dos muestras ATCC de *Candida albicans* 90028 y *Candida parapsilosis* 22019.

Las curvas de muerte se realizaron en medio RPMI 1640 tamponado con MOPS (ácido morpholinepropanesulfónico) a pH 7.0 e incubación de 35°C.

Antes de la prueba, se evaluó la existencia de efecto remanente. Las curvas de muerte fueron realizadas con cada aislamiento, usando un inóculo inicial de aproximadamente 10^5 UFC/ml, e incubación a 35°C.

Se observó un significativo efecto remanente con anfotericina B; sin embargo este fue eliminado por el método de filtración. El fluconazol exhibió una actividad fungistática con concentraciones relacionadas con efectos de crecimiento observados sobre un reducido rango de concentraciones. La anfotericina B exhibió actividad fungicida, con elevación de la actividad sobre un amplio rango de concentraciones.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El aumento en el porcentaje de infecciones fúngicas oportunistas, en las últimas décadas, junto al incremento del número cada vez más frecuente de reportes de resistencia de cepas de levaduras a los agentes antifúngicos disponibles y los que se encuentran en investigación, ha despertado un gran interés en el estudio de métodos de susceptibilidad antimicótica in vitro y de pruebas para determinar las características farmacodinámicas antifúngicas de estos antifúngicos que sean clínicamente relevantes.

El paciente oncológico es muy susceptible a adquirir infecciones microbianas por lo que es sometido con frecuencia a tratamientos antibióticos de amplio espectro que inducen la aparición de diferentes grados de resistencia. El conocimiento de las características farmacodinámicas de los antifúngicos estudiados, unido a los resultados obtenidos por el método de la concentración mínima inhibitoria de las pruebas de susceptibilidad in vitro, ayudan a establecer el comportamiento de los antifúngicos durante cada una de las etapas de infección fúngica y provee de herramientas para predecir y controlar el curso del tratamiento terapéutico.

El tipo de farmacodinamia determina el mejor modo de administración de un antibiótico. Los medicamentos dependientes de la concentración se benefician de administraciones en intervalos de dosificación prolongados, mientras que los antibióticos independientes de la concentración deben ser administrados de tal forma que los intervalos de dosificación sean cortos y que el tiempo del nivel del antibiótico que supere la concentración

mínima inhibitoria sea el máximo posible. En este estudio se pretende establecer cual es el comportamiento farmacodinámico del fluconazol y la anfotericina B, frente a cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* para determinar el potencial de administración de estos medicamentos.

2. MARCO TEÓRICO

En los últimos 20 años se ha observado un aumento progresivo de infecciones invasivas y sistémicas causadas por hongos, siendo estas infecciones causa importante de morbilidad y mortalidad, principalmente en pacientes hospitalizados e inmunodeprimidos. Las levaduras del género *Candida* son los principales agentes asociados a estos cuadros y al ser parte de la flora normal del hombre son considerados patógenos oportunistas. En la década de los 90, se observó además, un cambio en el patrón de los agentes etiológicos, asociado probablemente a la aparición de especies y selección de cepas menos susceptibles a determinados fármacos antifúngicos. Por tal motivo, el diagnóstico específico del agente y la determinación del perfil de susceptibilidad *in vitro* trae consecuencias prácticas para el personal médico, en la elección rápida y certera de una mejor conducta terapéutica. (1-3)

El incremento en la población de pacientes inmunocomprometidos o con otros factores de riesgo (edades extremas, antibioterapia de amplio espectro, etc.), ha determinado un aumento en la incidencia de infecciones fúngicas sistémicas en las últimas décadas. Asociado esto, al uso creciente de drogas antifúngicas ha contribuido a la aparición de levaduras con resistencia secundaria a los antifúngicos, lo cual ha hecho necesario el desarrollo de métodos estandarizados para evaluar el comportamiento de dichos fármacos. (4)

2.1 EPIDEMIOLOGÍA.

El género *Cándida* está formado por 163 especies, de las cuales aproximadamente 10 son responsables de las infecciones en el hombre, describiéndose además, a la *C. albicans* como la especie más importante

debido a su patogenicidad y virulencia. Estos agentes son de distribución mundial y forman parte de la flora normal del hombre y animales, colonizando mucosas del tracto intestinal (50 a 70%), boca (30 a 50%), vagina (5 a 30%) y piel (4 a 7%). Sin embargo, su presencia en manos del personal de salud es muy superior, con frecuencia de 20% en el personal médico y hasta 80% en el de enfermería. (5)

C. albicans es el patógeno más comúnmente aislado en el hombre y es el causante de 78 % de todas las infecciones micóticas nosocomiales. Otras, con importancia clínica incluyen a: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *C. guilliermondii*. (6)

Observando el comportamiento de las infecciones micóticas a lo largo de la historia, se observa que estas han aumentado en forma alarmante en los últimos años. En Estados Unidos de Norteamérica, por ejemplo, en 1950 la prevalencia de micosis diagnosticada postmortem fue de 10% y se incrementó a 40% en la década de los 70's. Recientemente se reporta una alta prevalencia en estudios postmortem en síndromes aplásicos (40%), leucemia mielocítica aguda (14%), linfomas no Hodgkin de alto grado (11%), enfermedad de Hodgkin (10%) y leucemia mieloblástica crónica (90%). (7)

En la década del 80 la incidencia de infección hematógena por *Candida* se incremento en los grandes y pequeños hospitales. Paralelamente la proporción de infecciones nosocomiales por *Candida* se elevó de 2% en 1980 a 5% entre 1986 y 1989, reportándose como la cuarta causa de infección hematógena intrahospitalaria, sólo precedida por el

Staphylococcus coagulasa negativo, Staphylococcus aureus y Enterococcus. (8)

En 1992, un estudio multicéntrico europeo (EPIC) que incluyó 1417 unidades de cuidado intensivo en las que se obtuvieron 10,038 reportes de pacientes, la prevalencia de infección por hongos fue de 17.1%, de un total de 4501 pacientes con infecciones diversas. (9)

En el Instituto Nacional de Cancerología se ha asociado un porcentaje de infección fúngica debida a Candida sp de un 4 – 6 % siendo la C. albicans la levadura con mayor implicación. (10)

En un estudio realizado en Cali, Colombia, (11) se pudo ver que Candida albicans fue el hongo más aislado (34.8%); esta levadura como parte de la flora normal del ser humano, aprovecha la alteración en las defensas inmunitarias del individuo para causar enfermedad.

2.2 GENERALIDADES

Aunque las enfermedades causadas por hongos no son causa frecuente de muerte, afectan a millones de personas en todo el mundo. En algunas enfermedades malignas como el Hodgkin, en las leucemias y en enfermos con quemaduras extensas, se adquieren con facilidad sobreinfecciones producidas por hongos.

El género *Candida* se cultiva en un medio de agar Sabouraud (alto contenido en glucosa) el cual es adicionado con un antibiótico, generalmente cloramfenicol al 0,5 mg/mL, este medio de cultivo es utilizado para la mayoría de las especies de hongos. Los cultivos de *Candida* crecen en rangos de temperatura entre 20 y 40°C, y entre rangos de pH de 2 y 8. (12)

A temperaturas menores a 33°C, se favorece el crecimiento de células de levadura germinativas, las cuales son de forma ovoide aproximadamente de 3x5 µm, y la formación de una yema ocurre en la región polar de la célula, dando origen a una célula hija. A temperaturas elevadas alrededor de 37°C, y a un pH alrededor de 7, nos encontramos que una morfología micelial es la constante, y esta morfología se genera a través de la formación de tubos germinales. La *C. albicans* al igual que otras especies de *Candida*, metaboliza los carbohidratos vía glicólisis, por el camino de la pentosa-fosfato y el ciclo de los ácidos cítricos. (12)

2.3 LA PARED CELULAR Y LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE LA *Candida albicans*.

C. albicans tiene una pared celular bastante compleja compuesta por beta-glucanos, manoproteínas y una pequeña cantidad de quitina. El mayor componente son los carbohidratos que conforman alrededor del 80-90 % del peso húmedo de la célula, un 2 % de lípidos y un 3-6 % de proteínas. Su capacidad de colonización, sus componentes antigénicos y productos secretados tales como la hidrolasa, ciertas "toxinas", y la proteinasa, se consideran factores importantes de virulencia de esta especie. La estructura más extensa es una capa fibrilar, inmediatamente

por debajo de ella hay una gruesa capa de manan a la que sigue una capa de beta-glucanos, luego una capa de quitina-beta-glucanos y finalmente en contacto con la membrana plasmática se encuentra otra capa de manan. Por debajo de la pared celular del hongo se encuentra la membrana celular cuya estructura física es muy similar a la de una célula procariótica animal, sin embargo su diferencia estriba de que en vez de colesterol, contiene ergosterol un esteroide que la diferencia y que permite una acción específica de quimioterápicos sobre el hongo. (12)

2.4 PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS DE Candida. (12)

Hay innumerables estudios sobre patogenicidad y virulencia de las especies de Candida, y todos los estudios concluyen que no es un solo factor, sino varios, los que permiten que este microorganismo sea agente de enfermedades que varían desde infecciones superficiales hasta cuadros invasivos que son fatales.

El factor que más contribuye a la virulencia de la Candida es su habilidad para persistir en la mucosa de individuos sanos, y de hecho gran parte de los factores patogénicos asociados a esta levadura son aquellos que contribuyen a la supervivencia de la misma en condiciones ambientales extremas.

2.4.1 Mecanismos (12)

Los factores de virulencia de la *C. albicans* más relevantes y en los cuales coinciden la mayoría de los autores son los siguientes:

- Adherencia
- Dimorfismo

- Frecuencia alta de mutación
- Interferencia con la fagocitosis.
- Interferencia con el sistema inmune.
- Interferencia con el sistema de complemento.
- Sinergismo con bacterias.

2.4.1.1 Adherencia

La persistencia de *Candida* spp en las superficies mucosas, requiere de la capacidad de adherencia a las superficies epiteliales. Las interacciones hidrofóbicas y uniones electrostáticas están involucradas en la adherencia, a pesar de que en gran parte, el proceso está determinado por uniones tipo lectinas, las que corresponden a proteínas de la pared del hongo con los terminales hidrocarbonados de las glicoproteínas de las células del huésped.

2.4.1.2 Dimorfismo

La *C. albicans* forma hifas verdaderas a 37°C y blastosporas bajo 30°C; entre estas temperaturas, se forman pseudohifas. Se ha observado que ambos tipos celulares (hifas y blastosporas) pueden ser vistos en la misma lesión micótica. ⁽¹²⁾

2.4.1.3 Frecuencia alta de mutación (switching)

La mayoría de las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* presentan un cambio fenotípico que involucra, la morfología colonial, el tamaño y la forma de las blastoconidias, es un cambio reversible. ⁽¹²⁾

2.4.1.4 Interferencia con la fagocitosis

La primera reacción del organismo frente a la invasión por *Candida* es la fagocitosis, la que primariamente es llevada a cabo por los polimorfonucleares (PMN). Algunas cepas de *C. albicans* producen péptidos ácidos que inhiben la adhesión de las hifas a los fagocitos, también evaden la destrucción intracelular en los fagosomas, ya que las hidrolasas ácidas del hongo, compiten con las hidrolasas ácidas de los fagocitos. (12)

2.4.1.5 Interferencia con el sistema inmune

Se ha observado un efecto superior de algunos mecanismos del sistema inmune por parte de la *C. albicans*. Una fracción polisacárida de la pared ha demostrado inhibir la proliferación de los Linfocitos T, y también de las Interleukinas 1 y 2. El factor inhibidor es termolábil y tiene un peso molecular bajo de aproximadamente 10.000. (12)

2.4.1.6 Interferencia con el sistema de complemento

Se ha determinado que existe unión de las proteínas del complemento C3b a *C. albicans* y *C. stellatoidea*, no existiendo esta unión con otras especies de *Candida*. Este mecanismo podría proveer a *C. albicans* de mecanismos para evadir las defensas del hospedero.

2.4.1.7 Sinergismo con bacterias

C. albicans es el hongo más frecuentemente encontrado entre la flora residente normal de las mucosas humanas, es antagonizada por bacterias anaeróbicas y también ciertos *Streptococcus*; sin embargo mantiene una relación sinérgica con la *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, la relación con este último microorganismo se demuestra claramente en la queilitis angular.

2.4.2 Factores moleculares ⁽¹²⁾

2.4.2.1 Proteinasas

Las proteinasas son secretadas por todas las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* en grado variable, cada cepa de levadura segrega un tipo de proteinasa específica para esa cepa. Existe una amplia evidencia experimental que indica que la actividad proteolítica de *C. albicans* y la *C. tropicalis* se expresa durante la infección en humanos. Esto se ha logrado determinar a través de la detección de altos títulos de anticuerpos contra esta enzima en pacientes con candidiasis; del mismo modo, antígenos de las enzimas han sido detectados en tejidos humanos infectados.

El papel de las proteinasas es ejercer una alta toxicidad sobre células mononucleares humanas y también degradar ciertas proteínas presentes en la saliva como: lactoferrina, lactoperoxidasa y mucina tanto como lo es la IgA secretora sub-tipo A2, la cual es resistente a la degradación por proteasas de bacterias patógenas tales como *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

2.4.2.2 Anafilotoxinas

Ciertas cepas de *Candida* son capaces de producir sustancias capaces de unirse a la membrana celular de los basófilos y eosinófilos, lo cual produce degranulación de estas células y la liberación de sustancias vasoactivas.

(12)

2.4.2.3 Toxinas

Se han identificado algunas toxinas de alto peso molecular producidas por *C. albicans* como lo es una candidoxina de 75 kDa. También se ha identificado una manoproteína de la pared celular del hongo de aproximadamente 50kDa, que puede afectar al sistema del complemento. Se ha descrito un grupo de toxinas de la *C. albicans* de bajo peso molecular (PM 164) provenientes del citoplasma de la célula.

2.4.2.4 Nitrosaminas

Una acción poco conocida de *C. albicans* fue sugerida por Broschinski y Col. 1986, (13) y se refiere a la producción de nitrosaminas carcinogénicas por parte de esta levadura, lo importante de este fenómeno es que la *C. albicans* coloniza las leucoplasias bucales. *C. albicans* aisladas de tales lesiones pre-cancerosas, tienen particularmente un alto poder de transformación del nitrito de sodio y de ciertas aminos de la saliva, en nitrosaminas.

2.4.2.5 Metabolitos ácidos

Productos ácidos finales son producidos por las *Candidas* a consecuencias del metabolismo de los carbohidratos; en este proceso se forman ácidos carboxílicos de cadena corta del tipo pirúvico, isovalérico, fórmico y propiónico. Se ha visto que tales ácidos ejercen un fuerte efecto citopático en cultivos de células epiteliales "in vitro".

2.4.2.6 Fosfolipasas

Este tipo de enzimas sólo han sido detectadas en la *C. albicans* y están relacionadas con el crecimiento de la levadura y en consecuencia con la reestructuración y síntesis de la membrana celular del hongo.

2.5 IMPORTANCIA DE *Candida albicans* Y OTRAS ESPECIES DE *Candida* COMO PATÓGENOS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS ⁽¹⁴⁾

En cuanto a posibilidades diagnósticas, seguras, y confiables, la candidiasis desarrolla una complejidad particular al presentarse la dificultad en su diagnóstico, especialmente en el paciente gravemente enfermo, debido a que puede cursar con manifestaciones clínicas inespecíficas, o puede tener una infección sistémica en ausencia de crecimiento del hongo en hemocultivos.

Los pacientes con cáncer son susceptibles a infecciones por agentes oportunistas; siendo los principales factores predisponentes: trastornos de la inmunidad, ruptura de las barreras naturales de defensa, modificación del equilibrio de la flora saprofita y la contaminación del ambiente. ⁽⁶⁾

En las últimas cuatro décadas, numerosos trabajos han documentado un incremento en el porcentaje de infección fúngica entre pacientes oncológicos y no oncológicos. De las infecciones fúngicas que ahora con frecuencia acompañan el tratamiento para el cáncer, las más comunes son debidas a las especies de *Candida*. (14)

Una variedad de factores justifica el incremento en la frecuencia de infecciones por *Candida*. El control del choque séptico y la disminución de la mortalidad en la bacteremia por gram negativos han incrementado la probabilidad de sobreinfección fúngica. Regímenes más intensos para el tratamiento del cáncer se usan y ellos están asociados con una neutropenia más profunda y daño en la mucosa. La tasa de trasplantes de médula ósea ha aumentado. El uso de antibióticos de amplio espectro suprime la flora endógena. La colocación de catéteres venosos centrales ha sido parte de la rutina del cuidado de soporte durante la terapia para el cáncer. La hiperalimentación parenteral ha sido un complemento de los regímenes de quimioterapia intensiva. Además, la infección del virus de la inmunodeficiencia humana durante los 80, condujo a un incremento sustancial en el número de individuos que manifestaron una deficiencia profunda de la inmunidad mediada por células. Una proporción elevada de estos pacientes tiene neoplasias tales como linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi y ciertos carcinomas de células escamosas, y muchos son vulnerables a patógenos fúngicos. (14)

C. albicans es la especie más frecuentemente aislada de huéspedes humanos. Es aislada comúnmente del tracto digestivo pero también puede ser recuperada de la vagina o de la piel. El índice de infección varía; es más alto en los ancianos, pacientes que están recibiendo

antibióticos, pacientes sometidos a cirugía, con dispositivos mecánicos y con ciertas enfermedades tales como Diabetes Mellitus, inmunodeficiencia mediada por células adquirida o congénita, o condiciones asociadas con trauma de la mucosa o maceración del tejido. (14)

La colonización con especies de *Candida* frecuentemente no va acompañada por enfermedad. Sin embargo, con la supresión de las defensas del huésped, pueden desarrollarse infecciones invasivas. El tratamiento para el cáncer presenta un riesgo de infecciones por *Candida* en asociación con neutropenia, daño de las barreras mucosas, sobrecrecimiento fúngico después de la terapia con antibióticos de amplio espectro, y supresión de inmunidad mediada por células debido a la enfermedad de base o al uso de corticosteroides u otros agentes. (14)

C. albicans ha sido la causa más común de infecciones sistémicas en pacientes con enfermedades neoplásicas. Sin embargo, una proporción significativa de casos ha sido atribuida a otras especies de *Candida*. Esta proporción ha variado mucho, rangos de 14 a 100%; alrededor del 46% de todas las infecciones sistémicas por *Candida* son debidas a otras especies de *Candida*. (14)

C. albicans esta implicada en la mitad de las infecciones. *C. tropicalis* es la especie no *albicans* mas frecuentemente implicada en un cuarto de las infecciones. *C. glabrata* y *C. parapsilosis* se encuentran en segundo y tercer lugar asociados a especies no *albicans* con 8 y 7% de las infecciones, respectivamente. *C. krusei* esta implicada en el 4% de los

casos y las demás especies están involucradas alrededor del 1% de los casos. (14)

2.6 FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN FÚNGICA (15)

El diagnóstico de infección sistémica debida a *Candida* en el paciente gravemente enfermo es a menudo difícil, dado que su manifestación clínica es variable y no específica. El enfermo puede sufrir sólo fiebre y leucocitosis no explicable o desarrollar choque séptico. Por ello, se han descrito varios factores de riesgo que hacen a un paciente grave susceptible de desarrollar una infección debido a este hongo. Conocer estos factores de riesgo permite también mantener en observación de manera intencional a un subgrupo de pacientes e iniciar en ellos la terapéutica temprana sin esperar a que desarrollen candidemia y/o candidiasis diseminada.

Los factores de riesgo para el desarrollo de candidemia y candidiasis diseminada son: neutropenia, catéteres venosos centrales, colonización en dos o más regiones por *Candida* spp, uso de antibióticos de amplio espectro y hemodiálisis.

Otros factores de riesgo que se han relacionado también con el desarrollo de infección por *Candida* son: días de estancia en la UCI, ventilación mecánica, transfusión masiva, diabetes mellitus, esteroides y/o inmunosupresores, alimentación parenteral y colocación de sonda de Foley. (15)

2.7 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Entre las décadas de 1960 y 1970 hubo una alta mortalidad entre pacientes con candidemia debido a que no se reconocía la enfermedad y no recibían el tratamiento oportuno. Durante esas décadas se restringió el tratamiento con Anfotericina B a los pacientes con enfermedad diseminada y grave, pero por lo regular fallecían porque el tratamiento se les administraba demasiado tarde, además de que ocurrían un gran número de complicaciones relacionadas con el uso de la Anfotericina B y por la falta de experiencia al utilizar este antifúngico. (16)

El concepto de la enfermedad se fue modificando paulatinamente cuando se empezó a conocer más acerca de la epidemiología clínica y la patogenia de las infecciones provocadas por *Candida* en el ambiente hospitalario, así como la alta mortalidad relacionada con la candidemia, la cual Wey (23-24) demostró claramente en 1988, y corroboró, en un trabajo clínico y epidemiológico publicado en 1992.

En la actualidad las infecciones por *Candida* en el paciente crítico deben diagnosticarse y tratarse tempranamente, con base en los conocimientos de la patogénesis, la importancia de la colonización, los factores de riesgo y la interpretación de cultivos microbiológicos. Además se tiene un mayor conocimiento y experiencia en el uso de la Anfotericina B y sus análogos en presentación lipídica, así como de la introducción de otros antifúngicos de acción sistémica, como el fluconazol. (17)

Con excepción de la 5-fluorocitocina, el fluconazol y la anfotericina B se emplean para atacar directamente el ergosterol, uno de los mayores componentes lipídicos de la membrana plasmática de los hongos. Este contribuye a una gran variedad de funciones celulares, importantes para preservar la fluidez e integridad de la membrana así como para funciones propias de muchas enzimas de unión de membrana incluyendo la quitin – sintetasa, básica para el crecimiento y división celular. (18)

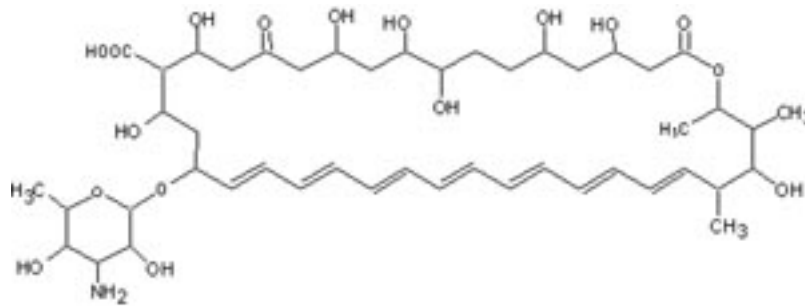
2.7.1 Polienos

Son una clase de medicamentos antifúngicos que atacan la membrana, incluyendo el ergosterol; en este grupo están la anfotericina B y la nistatina. (19)

La especificidad de estos medicamentos por los hongos es debida a la existencia de esteroides en la membrana plasmática de los mismos. La unión de estos antifúngicos a la membrana celular afecta a los sistemas de transporte de las pequeñas moléculas. De esta forma, los microorganismos son incapaces de concentrar metabolitos y se produce una pérdida de iones y azúcares. Probablemente debido a la pérdida de constituyentes vitales para la actividad enzimática se inhibe la respiración y la glicólisis. Los efectos letales de estos fármacos son el resultado final del daño producido en el metabolismo de la membrana. (10)

2.7.1.1 Anfotericina B

Es un compuesto poliénico que tiene actividad contra la mayoría de las especies de *Candida*. (16)



2.7.1.2 Mecanismo de acción (20)

La Anfotericina B es fungistática y fungicida dependiendo de la concentración obtenida en los líquidos corporales y la susceptibilidad de los hongos. La droga actúa por unión a los esteroides en la membrana celular de los hongos susceptibles (ergosterol), que da como resultados cambios en la permeabilidad de la membrana permitiendo la salida de los componentes intracelulares. Las membranas de las células de los mamíferos también contienen esteroides y se ha sugerido que el daño para la célula humana y para los hongos puede ser un mecanismo común compartido.

2.7.1.3 Farmacocinética y Farmacodinamia (16-20)

El promedio de las concentraciones plasmáticas máximas, varía de 0.5 a 2 $\mu\text{g/mL}$ que se encuentran en adultos que reciben dosis repetidas de aproximadamente 0.5 mg/kg/día. Después de una caída inicial rápida la meseta de la concentración plasmática es de aproximadamente 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Una vida media de eliminación de aproximadamente 15 días sigue a una vida media plasmática de 24 horas. Los datos farmacocinéticos en bebés y niños pequeños son limitados.

La Anfotericina B que circula en plasma se fija a las proteínas en más del 90% y es dializable en forma deficiente. Aproximadamente dos tercios de las concentraciones plasmáticas concurrentes se han detectado en los líquidos de pleura inflamada, peritoneo, sinovial y humor acuoso. Las concentraciones en el LCR rara vez exceden el 2.5% de la concentración plasmática o no son detectables. Una escasa cantidad penetra en el humor vítreo o en el líquido amniótico normal. Aunque no es conocida en forma completa la distribución tisular, el hígado parece ser el principal tejido de almacenamiento. La Anfotericina B es eliminada lentamente en su forma biológicamente activa por los riñones en un 2 a 5% de las dosis administradas. Después de suspender el tratamiento la droga puede ser detectada en la orina por 3 a 4 semanas. Debido a la lenta desaparición del medicamento. La eliminación por la bilis puede ser una importante vía de eliminación. No se conocen los detalles de otras vías metabólicas. Los niveles sanguíneos no son alterados por enfermedad renal o hepática.

Debe prepararse en solución glucosada al 5%, ya que en soluciones electrolíticas puede precipitarse. En relación con la dosis de prueba, algunos autores no la recomiendan. Por lo regular, la dosis diaria se infunde en cuatro horas, pero un estudio demostró que no hay diferencia significativa entre el tiempo de infusión de una hora y el de cuatro, excepto que con el esquema de infusión rápida se detectó mayor incidencia de escalofríos y fiebre. La premedicación con acetaminofén, difenhidramina, hidrocortisona y heparina no modifica en todos los casos el desarrollo de los escalofríos y la fiebre. (16-20)

2.7.1.4 Efectos adversos

Se puede mejorar la tolerancia con la administración de aspirina, otros antipiréticos (acetaminofén), antihistamínicos o antieméticos. Pequeñas dosis de corticoesteroides pueden ayudar a reducir las reacciones febriles.

Las reacciones adversas más comúnmente observadas son:

- Generales: Fiebre, malestar general y pérdida de peso
- Gastrointestinales: Anorexia, náuseas, vómitos, diarreas, dispepsia, dolor cólico hipogástrico, pruebas anormales hepáticas, ictericia e insuficiencia hepática.
- Hematológicas: Anemia normocítica normocrómica.
- Locales: Dolor en el sitio de la inyección con o sin flebitis o tromboflebitis
- Músculo esqueléticas: Dolor generalizado incluyendo mialgias y artralgias
- Neurológicas: Cefalea, convulsiones, tinnitus, neuropatía periférica
- Renales: Azoemia, aumento de creatinina sérica, hipocalcemia, acidosis tubular renal y nefrocalcinosis. Todo esto mejora con la interrupción del tratamiento, pero si se reciben dosis acumulativas grandes (> 5g) puede haber lesión permanente e insuficiencia renal aguda.

Entre los efectos colaterales más importantes están la fiebre, los escalofríos, las náuseas, el vómito, la hipotensión, que puede ser grave, y la nefrotoxicidad. Los mecanismos de daño debido a la anfotericina B pueden tener relación con el efecto tóxico directo, la reacción de hipersensibilidad o la liberación de citoquinas. (21)

Un gran número de pacientes que reciben anfotericina B desarrollan nefrotoxicidad, que se caracteriza por un grave deterioro tubular,

manifestado por una disfunción de la permeabilidad de la membrana y depleción de sodio con alteración en la retroalimentación glomérulo-tubular y en el aporte de electrolitos y agua en el túbulo distal, así como una disminución de la producción de eritropoyetina y vasoconstricción intrarrenal. La nefrotoxicidad se incrementa cuando el paciente se encuentra hipotenso, depletado de volumen y recibiendo inotrópicos, aminas presoras, aminoglucósidos y ciclosporina. Se ha demostrado que la precarga con solución salina y/o el uso de pentoxifilina pueden disminuir la toxicidad relacionada con la anfotericina B. (21-22)

El uso de este fármaco en el paciente crítico debe realizarse con mucha cautela, y evitarse, si es posible, en los pacientes con deterioro hemodinámico que necesiten dosis altas de inotrópicos y aminas presoras, con depleción importante del volumen intravascular o con una baja reserva renal y hepática. En el caso de estos pacientes se cuenta con otras alternativas, como la anfotericina B en vehículo lipídico y el fluconazol. Si no se dispone de estos antifúngicos, se recomienda ajustar la dosis y monitorear estrictamente el desarrollo de los efectos adversos. (22-23)

2.7.1.5 Resistencia a polienos

Reportes de la resistencia a anfotericina B son limitados, pero aparecen en pacientes severamente inmunocomprometidos, especialmente en pacientes oncológicos. Como factores específicos para desencadenar resistencia, se han reportado exposición previa a polienos y exposición a quimioterapia citotóxica, como las causas principales para el desarrollo de la resistencia a Anfotericina B. Las especies en las que se ha encontrado resistencia a la Anfotericina B incluyen *Candida spp* y *Cryptococcus*

neoformans, de pacientes que han recibido agentes antimicóticos de tipo azoles. Se piensa que la causa de esta resistencia es debida a una alteración en los componentes de la membrana celular de estos hongos.

(19)

La mayoría de los hongos patógenos oportunistas son inhibidos, in vitro, por concentraciones de Anfotericina B de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o menos. Como estas concentraciones se alcanzan en sangre tras dosis habituales, la mayoría de los hongos se consideran sensibles a este compuesto por debajo de esta concentración. (24)

2.7.1.6 Mecanismos de resistencia (24)

La base bioquímica de la resistencia a los polienos es la sustitución del ergosterol por varios precursores que tienen grupos metilo en posiciones 4 y 14 y que están más cercanos al lanosterol. Se han postulado otras bases bioquímicas.

Las cepas resistentes desarrolladas en el laboratorio se han obtenido por diversos métodos que incluyen mutagénesis química, por luz ultravioleta, placas con gradientes de concentraciones, etc. En general, los aislamientos resistentes a los polienos tienen menor cantidad o carecen de ergosterol en la membrana.

Se ha propuesto la siguiente explicación para el desarrollo gradual de la resistencia en presencia de concentraciones crecientes de polienos y la desaparición de la misma tras su eliminación, en la que está implicado un solo gen. Cualquier hongo continuamente esta produciendo mutaciones puntuales que determinan un grado mínimo o máximo de resistencia a la Anfotericina B.

Generalmente, a mayor resistencia menor viabilidad de las mutantes por disminución en el contenido de ergosterol. En este contexto existe una presión selectiva continua en contra de las mutantes más resistentes y a favor de las menos resistentes. Así, el aumento sucesivo del grado de resistencia durante el proceso de exposición gradual a anfotericina B sería el resultado de la reproducción preferente de aquellas mutantes que tolerarían justamente esa concentración de anfotericina B pero no de aquellas con mayor grado de resistencia. Cuando se retira la Anfotericina B, las mutantes menos resistentes reaparecen y las más resistentes gradualmente desaparecen.

2.7.1.7 Importancia Médica de la resistencia a Anfotericina B ⁽²⁴⁾

La incidencia de resistencia primaria y secundaria es muy baja. La explicación hipotética a este hecho incuestionable podría ser:

La mayoría de los mutantes resistentes a la Anfotericina B son menos vigorosos que sus parientes sensibles. In vivo, este hecho significa que los mutantes resistentes son más vulnerables a las defensas del huésped. Esta situación se ha comprobado en modelos animales de experimentación. Por tanto, las posibilidades de supervivencia de un mutante resistente en un huésped son incluso menores que en un medio de cultivo, excepto cuando las defensas están muy comprometidas. Es más probable que las mutantes resistentes sobrevivan en pacientes neutropénicos que hayan sufrido un tratamiento prolongado con polienos. Este hecho se ha confirmado por los artículos que describen casos de resistencia secundaria.

En teoría, los pacientes que deberían ser vigilados, de forma estrecha, son los que están infectados por especies diferentes de *C. albicans* y

especialmente por *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. En el caso de *C. tropicalis* se ha demostrado que es más fácil la inducción de mutantes resistentes en el laboratorio. La Anfotericina B es poco fungicida frente a *C. parapsilosis* y además es una causa frecuente de endocarditis.

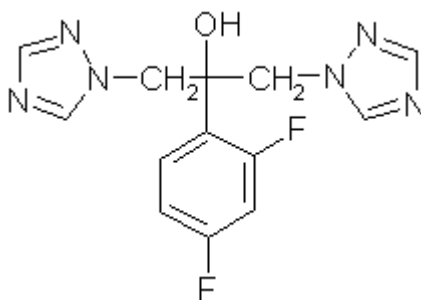
2.7.2 Derivados del imidazol y del triazol ⁽²⁴⁾

Los antifúngicos sintéticos derivados del imidazol y del triazol representan el avance más importante de los últimos años en el tratamiento de las micosis sistémicas oportunistas. Los imidazoles y triazoles comparten, a grandes rasgos, los mecanismos de acción y de resistencia, y por ello se suelen agrupar como derivados azólicos o azoles. No obstante, también existen numerosas diferencias entre los dos grupos de antifúngicos.

Entre todos los antifúngicos azólicos que se han sintetizado, tan solo dos imidazoles (miconazol y ketoconazol) y dos triazoles (fluconazol e itraconazol) se utilizan por vía oral o parenteral.

2.7.2.1 Fluconazol

Se trata de un antifúngico triazólico fluorado que se comporta de forma diferente desde el punto de vista farmacológico al resto de los imidazoles.



Los derivados del imidazol y del triazol actúan de forma primaria inhibiendo la biosíntesis del ergosterol, concretamente el paso de desmetilación del lanosterol en el carbono 14.

El blanco de los imidazoles y triazoles es, por tanto, la enzima lanosterol-14-alfa-desmetilasa, que es una de las especies del citocromo P450 (P450_{14DM}) localizado en el retículo endoplásmico.

2.7.2.2 Mecanismo de Acción

El fluconazol bloquea la síntesis de los esteroides porque inhibe el sistema enzimático del citocromo p-450. Tiene una vida media de 30 horas y se elimina básicamente por la orina. Es activo en contra de la mayor parte de las especies de Candida, excepto *C. krusei* y *C. glabrata*. (16)

La disminución del ergosterol y la acumulación de esteroides metilados alteran la estructura y funciones de la membrana celular, que se vuelve más permeable y vulnerable a daños posteriores. Diferentes sistemas enzimáticos unidos a la membrana, como los que participan en el transporte de nutrientes y en la síntesis de quitina, van a verse afectados. El resultado es la inhibición del crecimiento y, por tanto, los imidazoles y triazoles son primariamente fungistáticos, lo que limita su utilidad. A pesar de ello, el ketoconazol, fluconazol e itraconazol se utilizan con frecuencia como tratamiento de micosis sistémicas, incluso en pacientes inmunodeprimidos. Este carácter fungistático de los azoles, que implica en muchos casos largas terapias de mantenimiento, está directamente relacionado con el desarrollo de resistencia secundaria. (25)

2.7.2.3 Farmacocinética

El Fluconazol oral se absorbe casi por completo en las vías gastrointestinales y las concentraciones en plasma son esencialmente las mismas después de administrarlo por vía oral e intravenosa; la presencia de alimentos o la acidez gástrica no modifica su biodisponibilidad. Las concentraciones plasmáticas máximas son de 4-8 µg/mL después de dosis repetidas de 100 mg. El fluconazol penetra fácilmente en líquidos corporales, incluidos esputo y saliva. Penetra muy bien LCR (hasta 90% del nivel sérico), casi no se metaboliza en el hígado, y se elimina sin modificar en 80% por orina. En promedio 11 a 12% del fármaco está ligado a proteína. Su tiempo de vida media es de 25 a 30 horas. Las dosis deben reducirse en la insuficiencia renal. (20)

2.7.2.4 Efectos Adversos

A dosis mayores de 200 mg/día surgen a veces náuseas y vómitos. Las personas que reciben 800 mg/día pueden necesitar antieméticos, y a veces es necesaria la vía intravenosa para evitar emesis. Las personas que reciben el medicamento por más de 7 días, sea cual sea la dosis, presentan náuseas, cefalea, erupciones cutáneas, vómito, dolor abdominal y diarrea. La alopecia surge ocasionalmente. Se han señalado casos infrecuentes de muerte por insuficiencia hepática. (20)

Sus efectos colaterales son por lo común gastrointestinales; el más grave es la insuficiencia hepática aguda, con una incidencia de uno por cada 10,000 pacientes, que se relaciona con el uso de dosis mayores de 800 mg/día. Otro efecto colateral importante, aunque poco frecuente, es el

desarrollo del síndrome de Stevens-Johnson, que se observa en pacientes con SIDA. (26-27)

2.7.2.5 Mecanismos de Resistencia (19-24)

En una célula sensible, el azol alcanza el interior de la misma, por un mecanismo desconocido, para encontrarse con el blanco la lanosterol desmetilasa, que es el producto del gen ERG 11. Los primeros mecanismos implicados en la resistencia son aquellos referidos a la incapacidad del fármaco de alcanzar el interior celular, de los cuales se sabe poco. El segundo mecanismo implicado en la resistencia es la modificación del blanco, en este caso la lanosterol desmetilasa.

Cuando se altera esta enzima se acumulan esteroides 14α metilados. Las alteraciones genéticas relacionadas con la síntesis de la lanosterol desmetilasa están asociadas con el gen ERG11. Se han identificado las siguientes alteraciones genéticas:

- 1) Mutaciones puntuales en la región que codifica.

- 2) Aumento de la expresión del gen.

- 3) Amplificación del gen, es decir aumento en el número de copias del mismo.

4) Conversión o recombinación mitótica en microorganismos diploides.

También se han identificado alteraciones de otras enzimas involucradas en la síntesis del ergosterol.

En tercer lugar aparecen las bombas de expulsión de azoles que de forma general siempre están expresadas pero a un nivel bajo. Existen 2 tipos de bombas de expulsión que contribuyen a la resistencia a los triazoles e imidazoles:

1) Transportadores del cassette de unión del ATP (ATP binding cassette transporters, ABCT).

2) Facilitadores mayores (Major Facilitators, MF). Estas bombas usan como energía el gradiente de protones de la membrana. Estas bombas se ocupan de la expulsión activa de moléculas (hidrofóbicas o lipofílicas) que son tóxicas para las células y entre ellas están los azoles. Los MF no están tan bien estudiados como los ABCT.

2.7.2.6 Importancia clínica de la resistencia a los imidazoles y triazoles ⁽²⁴⁾

La dificultad que existe para interpretar y comparar los datos obtenidos in vitro sobre la resistencia o sensibilidad a los azoles impide llegar a conclusiones definitivas sobre la influencia que estos antifúngicos ejercen sobre la conversión de especies sensibles a especies menos sensibles o resistentes.

En pacientes neutropénicos el empleo profiláctico de fluconazol se ha relacionado con un aumento notable de infecciones debidas a *C. krusei*, que no responden al tratamiento con fluconazol. En un estudio realizado en una sola institución hospitalaria, ⁽²⁴⁾ se observó que, tras la aplicación con Anfotericina B y 5-fluorocitosina a pacientes colonizados por *C. krusei* que permanecían febriles, se producía un aumento de las fungemias debidas a *C. glabrata* que, aparentemente, estaba sustituyendo a *C. krusei* como patógeno resistente al fluconazol. En otros centros se han observado fenómenos similares debidos a otras especies resistentes a fluconazol como *Aspergillus fumigatus*.

El tratamiento de las diferentes formas de candidiasis superficiales con derivados azólicos suele ser de corta duración. En los pacientes inmunosuprimidos que requieren tratamientos más prolongados se dan las circunstancias que permiten el desarrollo de la resistencia secundaria en *C. albicans*. Los pacientes con candidosis mucocutánea crónica que tras recibir tratamientos prolongados con ketoconazol desarrollan resistencia secundaria a éste, probablemente representen una pequeña muestra de un fenómeno más general que podría haber ocurrido también en otras poblaciones de pacientes inmunodeprimidos, pero del que se desconoce la verdadera extensión. No obstante, la resistencia al ketoconazol no se desarrolla con facilidad dado el escaso número de fracasos terapéuticos que se han descrito tras muchos años de utilización.

La situación es diferente en la población de pacientes infectados por el VIH en especial, cuando se ha desarrollado el SIDA, la infección oral causada por *C. albicans* es un cuadro recidivante que suele precisar tratamientos con azoles, bien de larga duración, bien de numerosos ciclos para conseguir su remisión. El crecimiento de la población con SIDA

multitratada con azoles ha dado lugar a un aumento notable de las descripciones de casos de candidosis oral o esofágica que no responden al tratamiento con fluconazol. Ello no impide que las cepas resistentes puedan aparecer en otros contextos, por ejemplo, causando infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos, o, incluso, en individuos inmunocompetentes. El aislamiento de *C. albicans* con resistencia a fluconazol en pacientes no infectados por el VIH y que no han recibido azoles es especialmente preocupante y plantea nuevos interrogantes sobre el origen y diseminación de esta resistencia.

Los datos de actividad comparada de los diferentes azoles sobre las cepas sensibles y resistentes de *C. albicans* son muy escasos, y la resistencia cruzada entre azoles está en discusión. En el caso de las cepas resistentes al ketoconazol que han sido mejor estudiadas, se ha demostrado la resistencia cruzada a otros imidazoles y a los triazoles, tanto in vitro como in vivo en modelos experimentales de infección.

La resistencia cruzada a los azoles, se ha visto en pacientes con SIDA que habían desarrollado resistencia al Fluconazol y que podrían responder en algunos casos al ketoconazol o al itraconazol. Estos casos pueden deberse a cepas de *C. albicans* resistentes sólo al fluconazol. Aunque no está claro si se tratase de una resistencia independiente y específica a fluconazol o bien si la resistencia a los azoles es un fenómeno que afecta a todos los antifúngicos de esta familia, aunque las CMI (concentración mínima inhibitoria) de cada uno aumenten de forma diferente según el antifúngico, la cepa y la situación clínica de que se trate. Las infecciones causadas por estas cepas resistentes únicamente al fluconazol pueden responder no sólo al ketoconazol o itraconazol, sino también a dosis elevadas del propio fluconazol, aunque la mayoría de estos pacientes

acaban sufriendo recaídas causadas por cepas altamente resistentes a todos los azoles.

2.8 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA (1-2-24-28-29-30-31)

El método que describe este estándar está pensado para evaluar levaduras que causan infecciones invasoras. Estas levaduras abarcan todas las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. Esta metodología no se ha aplicado para evaluar la fase levaduriforme de los hongos dimórficos como *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Así mismo, el análisis de los hongos filamentosos causa problemas que no han sido evaluados en este procedimiento. El documento M27-A es un **"ESTÁNDAR DE REFERENCIA"**. Se ha desarrollado a través de un proceso de consenso para facilitar un acuerdo sobre la forma de evaluar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos.

La realización de pruebas de susceptibilidad antifúngica se han hecho importantes en el laboratorio como resultado de los siguientes factores: el incremento en la incidencia de infecciones fúngicas durante los últimos 15 años; el aumento en la frecuencia y el uso prolongado de agentes antifúngicos establecidos y en investigación; el incremento de la resistencia y la poca conciencia de la emergencia de la resistencia de agentes antifúngicos aprobados para uso clínico y la necesidad de desarrollar una confiable base de datos de los documentos de las relaciones entre los resultados in vitro y los resultados de la terapia clínica.

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica, siguen los mismos principios que las pruebas para agentes antibacterianos y proporcionan un resultado cuantitativo, la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI es el indicador de la actividad antimicrobiana in vitro del agente que se está probando. Una prueba antimicrobiana ideal, debe proporcionar confiable y fácilmente puntos de corte de la CMI que deben correlacionarse con los resultados in vivo de la respuesta clínica.

2.8.1 Método de microdilución del NCCLS ⁽²⁸⁾

Se ha demostrado que la prueba antifúngica de microdilución en caldo del NCCLS proporciona valores de CMI comparables con la prueba de macrodilución y que las discrepancias entre las dos pruebas no son estadísticamente significativas.

La prueba de microdilución es idéntica al método de referencia de macrodilución, con la excepción del volumen, siendo más fácil, conveniente y eficiente. La dilución 10X del fármaco esta además diluida 1: 5 y la suspensión del inóculo control esta diluida 1: 1000 hasta obtener el doble de la concentración de la prueba. Después cada microdilución es inoculada; el inóculo y la dilución del fármaco alcanzan la concentración final de la prueba.

Aunque el documento M27-T plantea que 48 horas de la microdilución proporcionan la más alta CMI de acuerdo con la CMI de la macrodilución, este acuerdo es dependiente de la especie y controvertido especialmente para el fluconazol. Ciertos estudios han reportado buena correlación de ambas CMIs de la microdilución con los resultados de la macrodilución, después de 24 horas y 48 de incubación, mientras que otros han concluido

que las CMI's obtenidas después de 48 horas de incubación se relacionan mejor entre sí.

PARÁMETROS	DESCRIPCIÓN
Metodología	Caldo de microdilución 0.2 mL del volumen final (100 µL de la dilución del inóculo y 100µL de concentración del fármaco 2x)
Preparación del inóculo	Cultivos de 24 h (<i>Candida spp</i>) y 48 h (<i>C. neoformans</i>) en agar sabouraud dextrosa
Suspensión del stock del inóculo	Ajustar espectrofotométricamente usando BaSO ₄ turbidez estándar (%T 530 nm): 1–5 x 10 ⁶ UFC/mL
Concentración del inóculo	0.5 – 2.5 x 10 ³ cel/mL
Medio de la prueba	RPMI 1640 taponado con 0.165 M MOPS (pH 7.0) a 25° C
Temperatura de incubación	35° C
Determinación del punto final	Anfotericina B: no visible la turbidez Azoles y 5- fluorocitocina: 80% de la reducción en la turbidez por comparación con el control de crecimiento > 80% de inhibición
Fármacos y control de calidad (CC)	Dos aislamientos para CC y corresponden a los rangos CC establecidos para procedimientos específicos para Anfotericina B, Flucitocina, Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol

TABLA 1. Procedimiento de referencia para las pruebas de susceptibilidad antifúngica para levaduras del NCCLS. Documento M27 –A (1-2-19-20-21-22-25)

2.8.2 Métodos para determinar la actividad fungicida (24-32-33)

La determinación de la sensibilidad o resistencia de un microorganismo a los antimicrobianos constituye una fase más del proceso de diagnóstico y tratamiento de las infecciones. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que, como su nombre indica, estima la actividad inhibitoria, del antimicrobiano ensayado.

La información que produce la CMI es suficiente para elegir un tratamiento correcto. Sin embargo, la respuesta de una infección a un antimicrobiano depende de la existencia de un estado inmunitario adecuado que termine eliminando los microorganismos que han sido inhibidos por la acción del fármaco.

Para ciertos antimicrobianos que poseen actividad bactericida o fungicida (aminoglucósidos, β - lactámicos, anfotericina B) puede ser necesario realizar otras determinaciones cuantitativas que evalúen la capacidad "MICROBICIDA" del mismo. A este tipo de análisis se le ha denominado Concentración Bactericida o Fungicida Mínima (CBM o CFM) y se puede determinar de 3 formas:

- 1) Estimar la Concentración Bactericida o Fungicida Mínima (CFM) partiendo de la realización de la CMI.

- 2) Estimar la dilución del suero que es capaz de matar al organismo causante de su infección, lo que se denomina Actividad Bactericida o Fungicida del Suero (ABS o AFS). Se entiende que el suero se ha obtenido de un paciente que está recibiendo tratamiento antimicrobiano.

- 3) Con una concentración fija del antimicrobiano se estima el número de microorganismos supervivientes en función del tiempo (en general 18-24 horas) lo que se denomina Curva de Muerte o Curva de Mortalidad. La concentración del antimicrobiano a ensayar se elige basándose en las concentraciones séricas alcanzadas tras dosis terapéuticas adecuadas.

2.8.3 Factores microbiológicos

Desde el comienzo del análisis de las interacciones entre bacterias y antimicrobianos, se observaron una serie de fenómenos complejos que siguen sin explicación. No se sabe, de forma cierta, si aparecen cuando interaccionan hongos y antifúngicos pero es importante que se conozcan por si se comprueba su existencia o por si se detectan otros diferentes.

2.8.4 Fenómeno Eagle o Efecto paradójico

Este fenómeno se conoce desde el comienzo del tratamiento con la penicilina y se refiere a la desconcertante aparición de microorganismos supervivientes por encima de la concentración bactericida. Se cree que obedece a la interferencia que la elevada concentración del antimicrobiano ejerce sobre la síntesis de proteínas, que impide el crecimiento del microorganismo y por tanto la acción letal del fármaco. No se ha comprobado que tenga ninguna implicación terapéutica. Sin embargo, es paradójico ver, que según va aumentando la concentración por encima de la CBM, hay más supervivientes.

2.8.5 Persistencia

Se refiere a la supervivencia de una pequeña proporción (generalmente menos del 0,1 % UFC del inóculo inicial) de células a pesar de la actividad letal del antimicrobiano. Este fenómeno, igual que el anterior, es especialmente aplicable a los β - lactámicos. Un dato importante que hay que señalar es que si este aislado se vuelve a analizar, permanece igual de sensible que el original. Los microorganismos persistentes son considerados formas metabólicamente inactivas, que al no estar en fase de crecimiento dinámico en el momento de la interacción del antimicrobiano con el microorganismo no son eliminadas.

2.8.6 Tolerancia

Es la habilidad del microorganismo para crecer en presencia de concentraciones elevadas de antimicrobiano, de forma que el efecto letal no se produce mientras que la CMI permanece idéntica. La definición aceptada para este fenómeno es la siguiente: el cociente entre la CMI y la CBM es ≥ 32 . Sin embargo, un procedimiento más adecuado para detectar estas cepas es la realización de curvas de muerte.

2.8.7 Concentración fungicida mínima (CFM)

Es la mínima concentración de antifúngico necesaria para provocar la muerte de la mayoría de los microorganismos viables.

Existe poco consenso en la definición de la CBM o CFM. Un concepto importante es que para antimicrobianos letales (fungicidas) la CFM tiene que ser similar a la CMI, sin embargo para los inhibidores (fungistáticos) el valor de la CFM será más elevado. Se ha considerado que un porcentaje de mortalidad del 99,99% es adecuado, o lo que es lo mismo un porcentaje de supervivencia de 0,01%. Sin embargo, no existe ningún dato convincente que apoye que este valor sea igual de correcto que, por ejemplo, un 99%. En la actualidad, el NCCLS define a la CBM, y por extensión nosotros definiremos a la CFM, como una disminución de 1000 veces ($-\log_{10} 3$) el número de UFC del inóculo original.

Se asume que un microorganismo es tolerante a la acción del antimicrobiano cuando el cociente CFM/CMI es ≥ 32 . Cuando se obtiene este dato, es evidente que el antimicrobiano no es letal para el microorganismo y por tanto aparece la controversia de si se puede obtener una respuesta clínica favorable. Al igual que ocurre con la

definición de la CBM o CFM este valor arbitrario no tiene mucha base científica y lo único que consigue es dividir, de forma artificial, a los microorganismos en sensibles y tolerantes.

2.8.8 Curva de muerte

Expresa el porcentaje de microorganismos muertos producido por una concentración fija del antifúngico en condiciones preestablecidas. Mide de una forma dinámica la capacidad de matar de un antimicrobiano. Este porcentaje se determina midiendo el número de células viables a intervalos periódicos de incubación.

Es la estimación de mortalidad de una población de microorganismos cuando se enfrenta a una concentración dada de un antimicrobiano. Para ello se incuba un inóculo conocido del microorganismo problema a una o varias concentraciones del antimicrobiano elegido. A tiempos determinados se evalúa el número de UFC/mL. La curva de mortalidad se representa mediante un gráfico. En las ordenadas está representado el número de UFC/mL en logaritmos y en las abscisas el tiempo en horas. Las curvas de muerte no se utilizan de forma rutinaria para seguimiento terapéutico, ni aún para el caso de los antibacterianos.

Se ha aplicado para la evaluación de nuevos fármacos, como guía en la evolución clínica de las endocarditis, en la determinación de la tolerancia y para establecer el sinergismo entre dos o más agentes antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar las características farmacodinámicas antifúngicas de la anfotericina B y el fluconazol de aislamientos de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

ESPECÍFICOS

Establecer el mecanismo de acción farmacodinámico de los antifúngicos en aislamientos de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

Describir el comportamiento farmacodinámico de la Anfotericina B.

Describir el comportamiento farmacodinámico del fluconazol.

4. HIPÓTESIS.

La actividad antifúngica depende de la concentración en la Anfotericina B; y el efecto antifúngico es independiente de la concentración para el fluconazol.

5. VARIABLES Y DEFINICIONES.

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	NIVEL OPERATIVO
Genero y especie de la cepa fúngica	Aislamiento de la cepa levaduriforme del tipo Candida sp con identificación completa de género y especie.	Nominal	C.albicans, C. parapsilosis, C. krusei
Test de Susceptibilidad Antimicótica	Prueba de microdilución en caldo (CMI): definida como la menor concentración de un antifungico que sustancialmente inhibe el crecimiento de organismos, detectado visualmente, según la metodología de referencia para determinar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos (Documento M27 A – NCCLS 1997)	Numérica Nominal	µg/mL Sensible Resistente
Curva de muerte	Expresa el porcentaje de microorganismos muertos producido por una concentración fija del antifungico en condiciones preestablecidas.	Nominal	Crecimiento en comparación con el tiempo. Ver procedimiento.
Tipo de antimicótico	Antifúngico recibido por más de 48 horas. Se medirá dosis acumulada para anfotericina y número de días para fluconazol.	Nominal	Anfotericina B, Fluconazol.
Difusión en agar con disco	Método para determinar la CMI de fluconazol en agar Mueller Hinton con azul de metileno (0.5 µg/ml) y 2% de glucosa.	Numérica Nominal	µg/mL Sensible Resistente
Concentración fungicida mínima (CFM)	Es la mínima concentración de antifungico necesaria para provocar la muerte de la mayoría de los microorganismos viables.	Nominal	µg/mL
E-test	Método del gradiente de la CMI en agar; usado para levaduras y mohos; método mas sensible para determinar resistencia a la anfotericina B	Numérica Nominal	µg/mL Sensible Resistente

6. DISEÑO METODOLÓGICO.

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio descriptivo en cepas ATCC y cepas aisladas de hemocultivos de pacientes oncológicos diagnosticados y con una infección micótica sistémica.

6.2 DISEÑO DE LA MUESTRA

6.2.1 Población

Los hongos seleccionados para el estudio incluyeron cepas tipo de la colección ATCC como control de la prueba: *C. albicans* ATCC 90028 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 y se escogieron dos cepas de *C. albicans* H1766 y H1499 y una cepa de *C. parapsilosis* H1516 de la colección del cepario de antifúngicos del laboratorio de micología del Instituto Nacional de Cancerología de hemocultivos de pacientes oncológicos diagnosticados y con una infección micótica sistémica.

6.2.2 Criterios de inclusión

Las cepas ATCC escogidas para control de calidad de la prueba de curva de muerte: *Candida albicans* ATCC 90028 y *Candida parapsilopsis* ATCC 22019.

6.3 PROCEDIMIENTOS (24-33)

6.3.1 Polvo base de antifúngicos

Se estandarizaron las soluciones madre de cada antimicrobiano basándose en la potencia de cada lote de antimicrobiano que se utilizó; para esto se utilizó la fórmula.

$$\text{Volumen (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potencia del antimicrobiano (mg/mL)}}{\text{Concentración (mg/mL)}}$$

El polvo base del antimicrobiano se pesó en una balanza analítica. Es recomendable que se pesen al menos 100 mg de polvo base.

6.3.2 Preparación de las soluciones madre

Las soluciones madre de los antifúngicos se prepararon a concentraciones de al menos 1280 µg/mL o 10 veces la concentración mayor ensayada. Se tuvo en cuenta la información del fabricante para determinar el grado de solubilidad al fármaco.

6.3.3 Medio de cultivo

Se ha recomendado un medio completamente sintético: RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y con un indicador de pH. (Anexo de preparación del medio) (Sigma chemical company, St Louis, Mo)

6.3.4 Preparación de las diluciones de los antifúngicos ⁽¹⁰⁾

6.3.4.1 Fármaco soluble en Dimetil sulfóxido (DMSO) - Anfotericina B:

La anfotericina B (Bristol Meyer Squibb Company, USA) se preparó agregando 10 mL de agua estéril al vial para obtener una concentración de 5000 $\mu\text{g/mL}$ y luego se realizaron diluciones para obtener una concentración de 1600 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.4.2 Fármaco soluble en DMSO al 10% - Fluconazol:

El fluconazol (Pfizer Inc, New York, N.Y.) (FCZ) se preparó pesando 10.24 mg del mismo y se suspendieron en 2 mL de DMSO al 10%, y se obtuvo una concentración de 5.120 $\mu\text{g/mL}$.



FOTO 1



FOTO 2

6.3.5 Preparación de las diluciones de los agentes antifúngicos para el test de susceptibilidad.

ESQUEMA PARA LA PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE FÁRMACOS PARA FLUCONAZOL ⁽³³⁾

TUBO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	FUENTE	VOLUMEN (mL) +	MEDIO (mL)	= CONCENTRACIÓN INTERMEDIA mg/mL	= CONCENTRACIÓN FINAL 1:10 mg/mL
1	5120	SN MADRE	1.0	7	640	64
2	640	TUBO 1	1.0	1.0	320	32
3	640	TUBO 1	1.0	3.0	160	16
4	160	TUBO 3	1.0	1.0	80	8
5	160	TUBO 3	0.5	1.5	40	4
6	160	TUBO 3	0.5	3.5	20	2
7	20	TUBO 6	1.0	1.0	10	1
8	20	TUBO 6	0.5	1.5	5	0.5
9	20	TUBO 6	0.5	3.5	2.5	0.25
10	2.5	TUBO 9	1.0	1.0	1.25	0.125
11	2.5	TUBO 9	0.5	1.5	0.625	0.0625
12	2.5	TUBO 9	0.5	3.5	0.3125	0.03125

ESQUEMA PARA LA PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE FÁRMACOS PARA ANFOTERICINA B

TUBO	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	FUENTE	VOLUMEN (mL) +	MEDIO (mL)	= CONCENTRACIÓN INTERMEDIA mg/mL	= CONCENTRACIÓN FINAL 1:10 mg/mL
1	1600	SN MADRE			1600	16
2	1600	SN MADRE	0.5	0.5	800	8
3	1600	SN MADRE	0.5	1.5	400	4
4	1600	SN MADRE	0.5	3.5	200	2
5	200	TUBO 4	0.5	0.5	100	1
6	200	TUBO 4	0.5	1.5	50	0.5
7	200	TUBO 4	0.5	3.5	25	0.25
8	25	TUBO 7	0.5	0.5	12.5	0.125
9	25	TUBO 7	0.5	1.5	6.25	0.025
10	25	TUBO 7	0.5	3.5	3.13	0.0313

6.3.6 Preparación del inóculo

Se utilizaron cepas repicadas 24 horas antes en agar Sabouraud - Dextrosa (Difco, BD) ®, a 35°C. (34)

- 1) Se rotuló un tubo de ensayo con 5 mL de solución fisiológica con "A"

- 2) Con la punta del asa se tomó la cepa a probar y se resuspendió.

- 3) Se mezcló con vórtex y se ajustó a la concentración del tubo 0.5 en la escala McFarland (Esto equivale a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/ mL)

- 4) Se tomó un tubo con 5 mL de solución fisiológica y se rotuló como "A2"

- 5) Se tomó un tubo con 9.5 mL de RPMI y se rotuló como "A3"

- 6) Se tomaron 100 µL del tubo "A2" y se pasaron al tubo "A3" (Dilución 1/20 en RPMI), esto corresponde a un inóculo de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL. Este inóculo final es diluido 1:2 cuando los pocillos se inoculan y por lo tanto el inóculo final es de $0.5 - 2.5 \times 10^3$ UFC/mL.

6.3.7 Llenado de microplacas

Se usaron placas de cultivo celular estériles (placas de 96 pocillos de fondo plano y tapa)

Las placas se cargaron del siguiente modo:

Se llenó la placa por columnas, de modo que las ocho filas de cada columna se cargaron con la misma concentración de antifúngico (para esto se utilizó una pipeta multicanal, de modo que se llenaran los pozos de las ocho filas de cada columna simultáneamente).

Para usar la pipeta multicanal fue necesario pasar las soluciones a una cubeta de plástico, de modo que todas las puntas de la pipeta pudieran cargarse al mismo tiempo.

Las columnas 11 y 12 se cargaron con 100 μ L de RPMI sin antifúngico, la columna 11 fue el control de crecimiento y la columna 12 el blanco de reactivos y control de esterilidad.

En la columna 10, se cargaron 100 μ L por pocillo de la dilución 10 (Tubo # 10). En la columna 9, se cargaron 100 μ L por pocillo de la dilución 9 (Tubo # 9).

Se continuó de este modo hasta la columna 1, en la que se cargaron 100 μ L por pocillo de la dilución 1 (Tubo # 1).

Luego se rotularon las placas con el antifúngico que se había cargado.

6.3.8 Inoculación de las placas

1) Se tomaron cada una de las placas (una con cada antifúngico), y se rotularon de manera que pudieran ser identificadas.

2) Se tomó el tubo "A3", se agito en el vórtex para homogeneizar y se colocó en una cubeta estéril.

3) Se tomó la pipeta multicanal (de 12 canales) y se ajustó en 100 μ L, luego se ajustaron las puntas estériles en los 11 primeros canales, dejando el canal 12 sin puntas.

4) Luego con la pipeta multicanal se cargaron 100 μ L del inóculo en los 11 pozos de la primera fila (Fila A) de todas las placas.

5) Finalmente se cargaron los ocho pozos de la columna 12 con 100 μ L de RPMI sin inóculo. Luego las microplacas se incubaron.

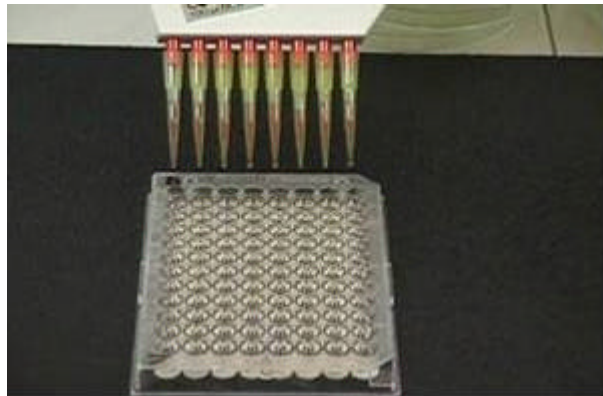


FOTO 3

6.3.9 Incubación de las placas

Las microplacas se incubaron en atmósfera de aerobiosis, en humedad a 35°C, durante 48 horas.

6.3.10 Lectura de la CMI

Lectura espectrofotométrica

Las microplacas se leyeron en un lector de microplacas (Multiskan MCC/340) ® que determinó la densidad óptica (a 405 nm) de cada pocillo.



FOTO 4

Se tomó el valor de densidad óptica del pozo 11 como 100% de crecimiento. Como punto final se tomó el 50% de inhibición respecto de este valor. Por lo tanto el valor de la CMI fue la concentración del último pozo (de izquierda a derecha) con un valor de densidad óptica menor que el 50% del valor del control de crecimiento (Este valor se calculó multiplicando el valor de densidad óptica del pozo 11, 100% de crecimiento, por 0.5)

CEPAS DE CONTROL DE CALIDAD	AGENTE ANTIFUNGICO	RANGOS CMI (µg/mL) 24 HORAS	RANGOS CMI (µg/mL) 48 HORAS
C. parapsilosis ATCC 22019	ANFOTERICINA B	0.25-2.0	0.5-4.0
	FLUCONAZOL	0.5-4.0	1.0-4.0
C. krusei ATCC 6258	ANFOTERICINA B	0.5-2.0	1.0-4.0
	FLUCONAZOL	8.0-64	16-128

TABLA 2. Rangos de referencia de CMI de aislamientos de control de calidad de microdilución en caldo. (31)

Para clasificar las levaduras en sensible (S), sensible dosis dependiente (SDD) y resistente (R) se emplearon los puntos de corte recomendados en el documento M27-A del NCCLS de 1997 para los azoles. ⁽³⁴⁾ Dado que el documento no establece puntos de corte para la anfotericina B, se consideraron aislamientos probablemente sensibles aquellos con CMI < 1 µg/mL, y como probablemente resistentes aquellos con CMI > 1 µg/ml ⁽³¹⁾

AGENTE ANTIFUNGICO	CMI (µg/mL)	INTERPRETACIÓN
ANFOTERICINA B	< 1 > 1	SENSIBLE RESISTENTE
FLUCONAZOL	< 8.0 16-32 > 64	SENSIBLE SDD RESISTENTE

Tabla 3. Guía de interpretación para test de susceptibilidad in Vitro de aislamientos levaduriformes usado por el NCCLS ⁽³⁴⁾

6.3.11 Anfotericina B

La CMI correspondió a aquel pozo en donde no se detectó ningún crecimiento en comparación con el pozo control.

6.3.12 Fluconazol

Se debería elegir una CMI que expresara un coeficiente de inhibición más que la ausencia visible de crecimiento, esto debido a que la inhibición del crecimiento no es completa y puede ser muy difícil elegir la CMI.

6.3.13 Concentración fungicida mínima (CFM)

La base de la determinación de la CFM es la CMI determinada previamente mediante microdilución.

1) Se prepararon los inóculos de la cepa problema y de la cepa control para determinar la CMI de anfotericina B y fluconazol en la forma habitual.

2) Se realizó por duplicado un recuento de colonias del inóculo de cada cepa. Se hicieron diluciones del inóculo original para que se pudieran contar en las placas entre 50-150 colonias.

3) Las placas se incubaron en atmósfera de aerobiosis a 35°C durante 48 horas.

4) Para determinar la CFM se tomó un volumen de 100 µL de cada celda o tubo con inhibición visible del crecimiento (obtenida a partir de la CMI) incluyendo el pozo de la CMI y aquel correspondiente a una dilución menor de la CMI y se sembró en placas de Sabouraud (Difco, BD) ®.

5) Se realizó el recuento de colonias.

Teniendo en cuenta la definición propuesta por el NCCLS para la CBM, se consideró la CFM como la menor concentración en la cual se produjo una disminución de 1000 veces del número de UFC del inóculo inicial; la CFM se consideró como la menor concentración en la cual no se obtiene ninguna colonia en la placa.

6.3.14 Curvas de muerte (33-35-36)

Cuando las curvas de muerte son utilizadas clínicamente se emplea una concentración de antimicrobiano que generalmente es el promedio de la concentración obtenida durante un tratamiento estándar.

Se realizaron los recuentos de colonias a intervalos periódicos de incubación, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas para Anfotericina B y 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas para fluconazol y luego los resultados obtenidos se llevaron a papel semilogarítmico, donde se registró el recuento de colonias en la ordenada (escala logarítmica) y el tiempo sobre la abscisa (escala aritmética).

6.3.14.1 Medio de cultivo

RPMI 1640 (Sigma) tamponado a pH 7 con 0,165 M de MOPS.

6.3.14.2 Inóculo

- 1) Se subcultivó durante 24 horas a 35°C en agar papa dextrosa.
- 2) Las colonias de estos cultivos se suspendieron en 9 mL de agua estéril ajustando la turbidez a 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL).
- 3) Se realizó una dilución 1:10 agregando 1 mL de la suspensión del inóculo a 9 mL de RPMI con o sin (control) del antifúngico a ensayar.
- 4) El inóculo inicial fue de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.

6.3.14.3 Antifúngicos

1) La concentración de antifúngicos a utilizarse fue equivalente a 2 X CMI.

2) La solución madre de cada antifúngico se preparó en DMSO. La concentración final de los mismos se realizó en RPMI + MOPS.

3) El resultado de las concentraciones de fluconazol en las soluciones probadas fue igual a las CMIs 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64.

4) Para anfotericina B, el resultado de las concentraciones fue igual a las CMIs 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16.

6.3.14.4 Tubo control de crecimiento

A cada cepa a estudiar frente a uno o más antifúngicos se le realizó un control de crecimiento (cepa sin enfrentarse con el antifúngico).

6.3.14.5 Incubación

1) Se incubó a 35°C durante 24 horas.

2) A las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas para Anfotericina B y a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas para fluconazol, se realizaron los respectivos recuentos de colonias. Para ello se procedió de la siguiente forma:

a) De cada tubo en estudio se tomaron 0,1 mL, previa agitación en vórtex durante 15 segundos para asegurar la correcta homogeneización, y se colocaron en tubos de 13 mm x 100 mm con tapa rosca, que contenían 0,9 mL de agua estéril. Luego se realizaron las siguientes diluciones seriadas: 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000.

b) De cada dilución se inocularon 30 μ L (previa agitación del tubo en vórtex durante 15 segundos) en placas de Petri (90 mm x 20 mm) que contienen agar papa dextrosa. Se dejó secar la gota antes de proceder a extenderla. De esta forma se evitó que se ejerciera algún tipo de acción residual del remanente de antifúngico transportado (carry-over).

c) Adicionalmente, cuando el recuento de colonias esperado era menor de 1000UFC/mL, una muestra de 30 μ L era tomada directamente de la solución probada y se diluía en 10 ml de agua estéril, luego se filtraba a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45 μ m; el filtro luego era sembrado en agar sabouraud dextrosa. Después de la incubación a 35°C por 24 horas se determinaba el número de UFC/mL en cada caja.

d) A cada cepa en estudio se le realizó la curva de muerte por duplicado, al igual que a la cepa control.

e) Las placas se incubaron a 35°C durante 24-48 horas.

f) Se determinó el número de colonias en cada placa y se calculó el número final de UFC/mL.

g) En el eje de ordenadas se representó el \log_{10} UFC/ml y en el eje de ordenadas el tiempo en horas.

h) Cada recuento realizado a cada tiempo determinado se representó por un punto. La unión de todos ellos produjo una curva dependiendo del comportamiento del antimicrobiano frente al microorganismo.

6.3.15 Difusión en agar con disco y E- test (4-24-37-38-39)

Estas pruebas fueron utilizadas para la rápida determinación de la susceptibilidad de las muestras al fluconazol y a la anfotericina B para correlacionar los resultados realizados por el método de microdilución.

6.3.15.1 Inóculo

1) Se subcultivaron durante 24 horas a 35°C en agar sabouraud dextrosa las muestras que iban a ser probadas.

2) Las colonias de estos cultivos se suspendieron en 5 ml de solución salina, se homogeneizaron con el vórtex y se ajustaron a la turbidez a 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL).

3) Se tomaron 100 μ L del inóculo y se sembraron en agar glucosa azul de metileno (Agar GMB) utilizando un escobillón estéril; la caja se sembró en tres direcciones para obtener crecimiento en toda la superficie y se dejó que la humedad se absorbiera de 10-15 minutos.

4) Para E-test se colocó una tira plástica de anfotericina B, con un par de pinzas apoyando sobre el agar la zona de menor concentración de antifungico (una vez colocadas no deben ser removidas, porque el antifungico se descarga en segundos)

5) Para la difusión en agar se utilizaron sensidiscos de 25 µg fluconazol, que se colocaron con unas pinzas.

6.3.15.2 Incubación.

Las cajas fueron incubadas a 35°C, y los resultados fueron registrados a las 24 horas.

Para la difusión en agar, la lectura de la CMI se realizó midiendo la zona de inhibición del crecimiento alrededor del sensidisco, con la ayuda del equipo BIOMIC PLATE READER.

Para el E-test, la lectura de la CMI se realizó observando la intersección entre el crecimiento del microorganismo y la zona de inhibición en forma de elipse.



FOTO 5

6.3.16 Límite de cuantificación ⁽³⁶⁾

El límite mas bajo de precisión detectable de UFC/mL o el límite de cuantificación fue determinado para cada uno de los 5 aislamientos.

6.3.16.1 Inóculo.

Una suspensión del hongo fue hecha en agua estéril con cada aislamiento y ajustada al McFarland 0,5 (aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 UFC/mL).

Una serie de diluciones usando agua estéril, fueron hechas con la suspensión del inóculo inicial para cada aislamiento. 30 μ L fueron removidos de cada suspensión y sembrados en agar sabouraud para la determinación del recuento de colonias.

6.3.16.2 Incubación.

Las cajas fueron incubadas a 35°C, y los recuentos de colonias fueron determinados después de 24 horas.

7. RESULTADOS

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA

La CMI de fluconazol fue $< 0.13 \mu\text{g/mL}$ para todos los aislamientos probados, por el método de microdilución. (Tabla 5)

Las CMI de anfotericina B fue de $0.25 \mu\text{g/mL}$ para la *C. parapsilosis* ATCC 22019, $0.13 \mu\text{g/mL}$ para la *C. albicans* ATCC 90028, $0.06 \mu\text{g/mL}$ para H1766, $0.13 \mu\text{g/mL}$ para H1516 y $0.25 \mu\text{g/mL}$ para H1499, por el método de microdilución. (Tabla 5)

Los datos obtenidos de la CMI por el método de microdilución, se correlacionaron adecuadamente con los resultados de difusión en agar con disco para fluconazol y E-test para anfotericina B (Datos no mostrados). Todas las muestras probadas fueron consideradas sensibles al fluconazol y a la anfotericina B. Los resultados del control de calidad estuvieron dentro del rango aceptable.

AISLAMIENTO	CMI FLUCONAZOL ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ANFOTERICINA ($\mu\text{g/mL}$)
C. parapsilosis ATCC 22019	< 0.13	0.25
C. albicans ATCC 90028	< 0.13	0.13
C. albicans H1766	< 0.13	0.06
C. parapsilosis H1516	< 0.13	0.13
C. albicans H1499	< 0.13	0.25

Tabla 4. CMI de fluconazol y anfotericina B contra los aislamientos probados.

LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

En el estudio realizado para anfotericina B y fluconazol, en la mayoría de los recuentos de colonias de los aislamientos probados no hubo crecimiento, (Concentración entre 1-16 µg/mL para Anfotericina B, y Concentración entre 1-4 µg/mL para Fluconazol) por lo tanto no se estableció un límite cuantificación real.

EFFECTO REMANENTE (CARRY-OVER)

No se observó efecto remanente (carry-over) con fluconazol por cualquiera de los métodos probados. Todas las muestras estuvieron por encima del 25% del promedio del recuento de colonias del control.

Mientras que para la anfotericina B, se observó un significativo efecto remanente (carry-over), el cual fue eliminado por el método de filtración (30-32-33) y también se observó la disminución del efecto residual cuando se dejó secar la gota antes de extenderla en los medios de cultivo al realizar la curva de muerte.

CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MÍNIMA

La actividad fungistática (< 99.9% de reducción en las UFC/mL comparadas con el control) fue observada para fluconazol en todos los aislamientos probados. Todas las muestras presentaron un crecimiento perceptible hasta 64 µg/mL, el cual tuvo recuentos por encima de 10⁶ UFC/mL.

La anfotericina B exhibió actividad fungicida (> 99.9% de reducción en las UFC/mL comparadas con el control) la CFM fue menor o igual a 1 µg/mL para todos los aislamientos probados.

CURVAS DE MUERTE

Se realizaron gráficas de las UFC/mL en comparación con el tiempo para fluconazol y anfotericina B (Gráficas 1-10)

El fluconazol exhibió actividad fungistática (< 99.9% de disminución en el \log_{10} del número de UFC/mL comparado con el inóculo inicial) contra cada uno de los aislamientos; sin embargo se observaron efectos distintos sobre el crecimiento.

En el aislamiento de *C. parapsilosis* ATCC 22019 se observó un aumento en el crecimiento a las 12 horas en todas las concentraciones de fluconazol probadas mayor que el observado con el control (Gráfica 1).

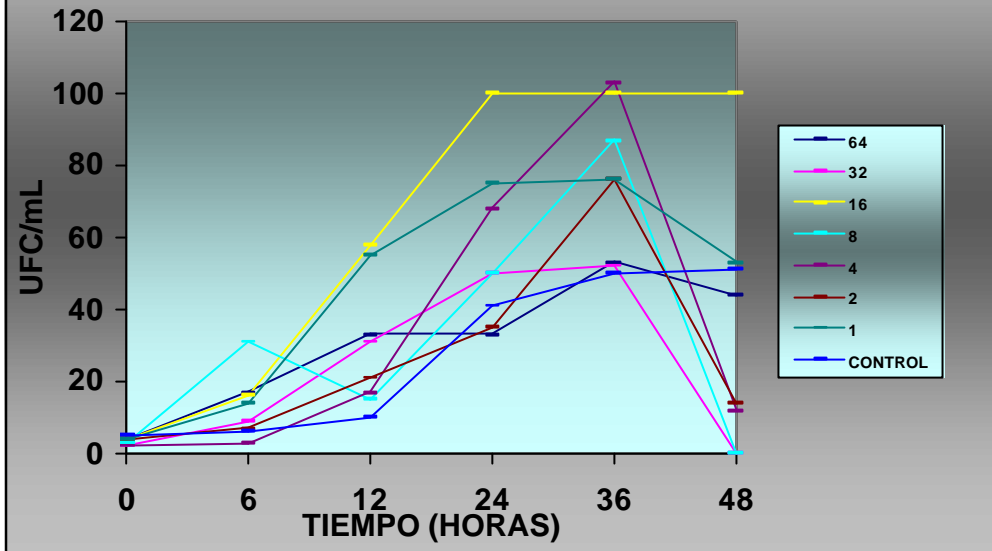
En el aislamiento de *C. albicans* ATCC 90028 se observó un aumento en el crecimiento a las 6 horas a concentraciones de fluconazol entre 1 X CMI hasta 16 X CMI por encima del control, luego se mantuvieron constantes (Gráfica 2).

El aislamiento de *C. albicans* H1766 presentó un aumento en el crecimiento a las 6 horas en todas las concentraciones por encima del control, menos en la concentración de 32 X CMI (Gráfica 3).

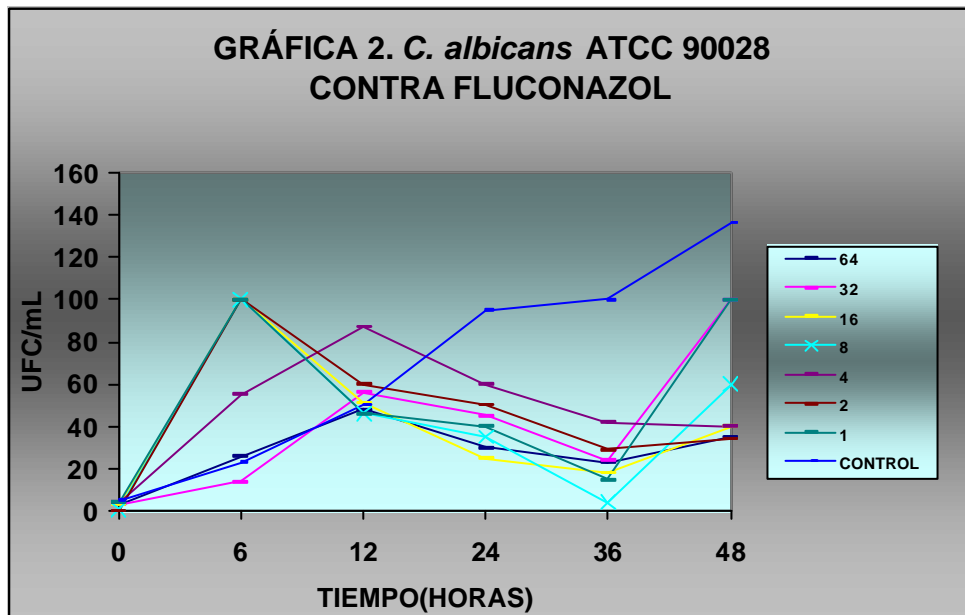
El aislamiento *C. parapsilosis* H1516 presentó un aumento en el crecimiento a las 6 horas en todas las concentraciones por encima del control, luego se mantuvieron constantes (Gráfica 4).

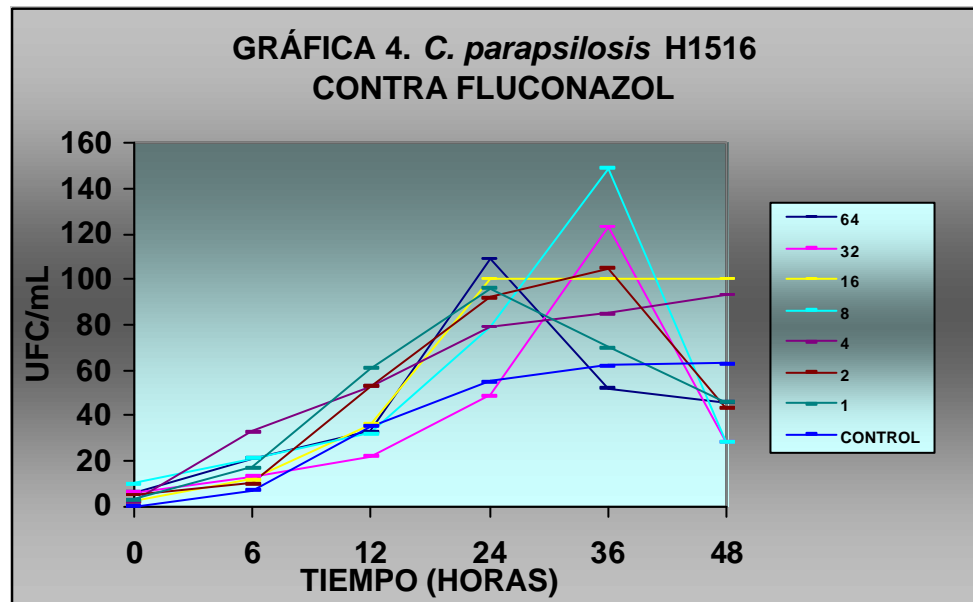
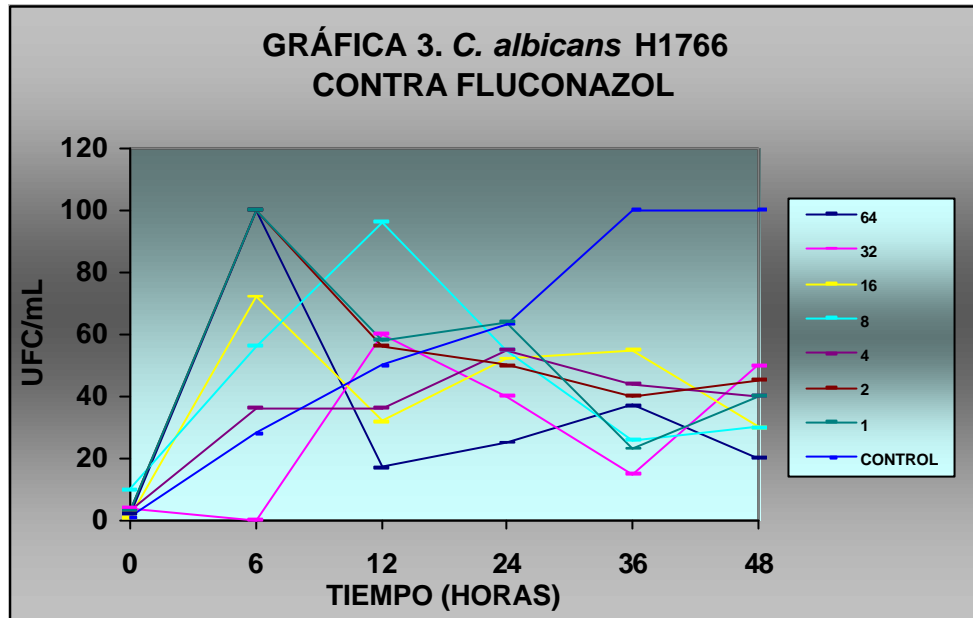
Por último el aislamiento de *C. albicans* H1499 presentó un aumento en el crecimiento por encima de las 6 horas a todas las concentraciones de fluconazol probadas, el cual estuvo por debajo del control (Gráfica 5).

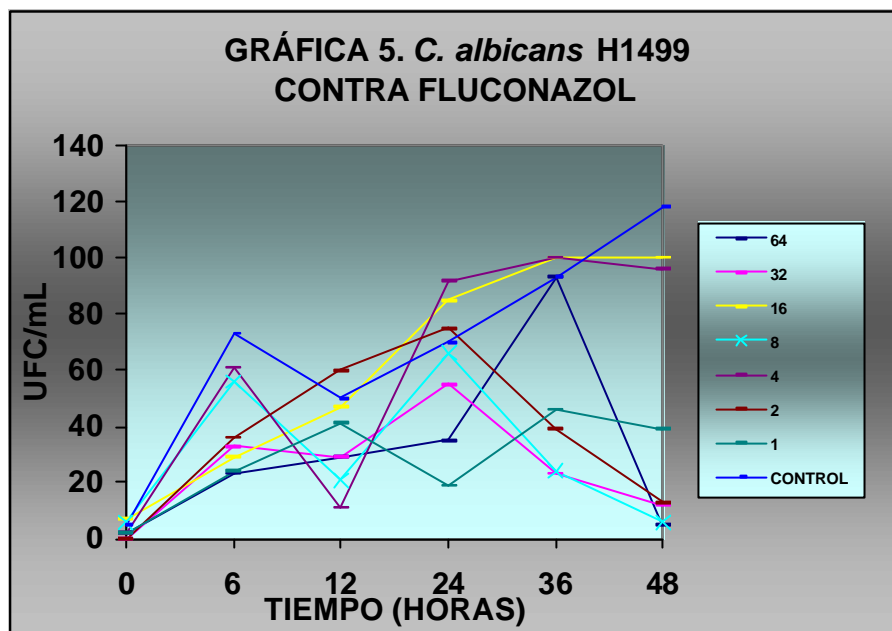
**GRÁFICA 1. *C. parapsilosis* ATCC 22019
CONTRA FLUCONAZOL**



**GRÁFICA 2. *C. albicans* ATCC 90028
CONTRA FLUCONAZOL**

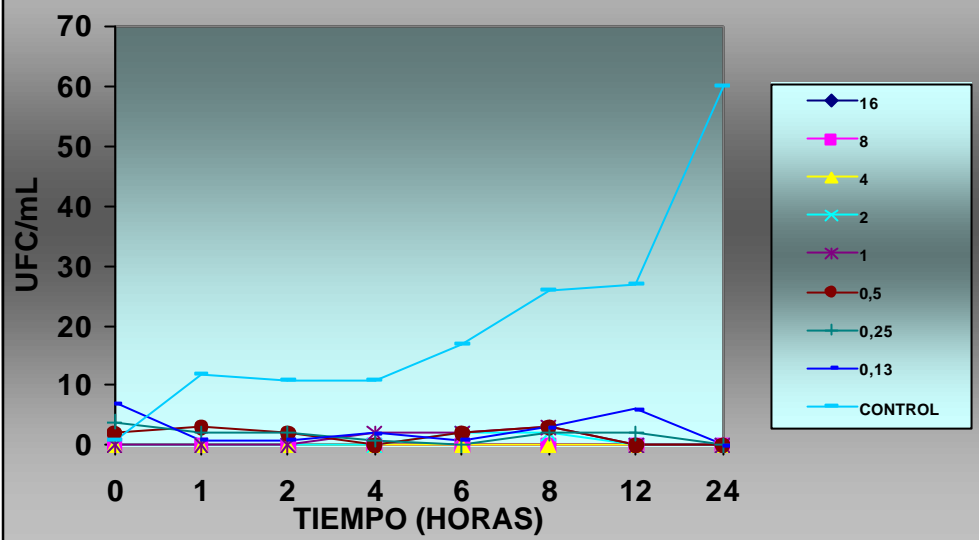




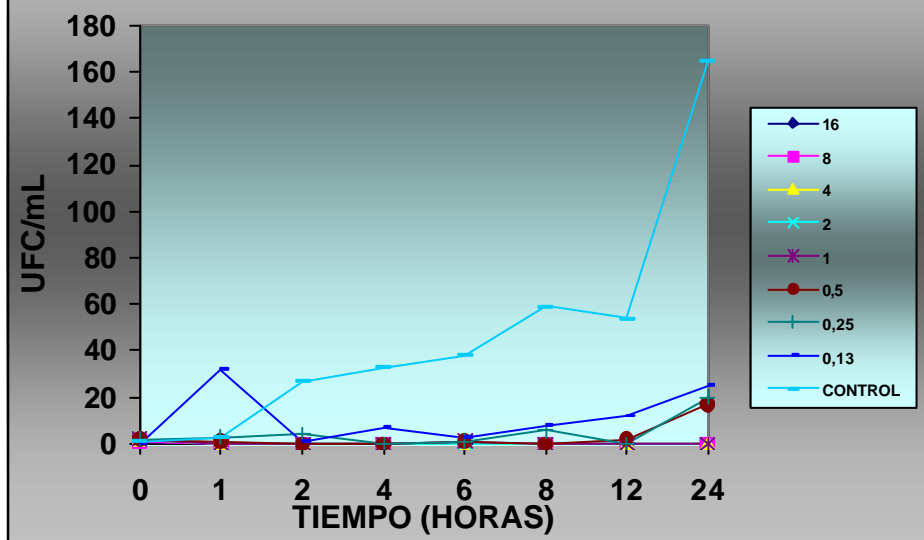


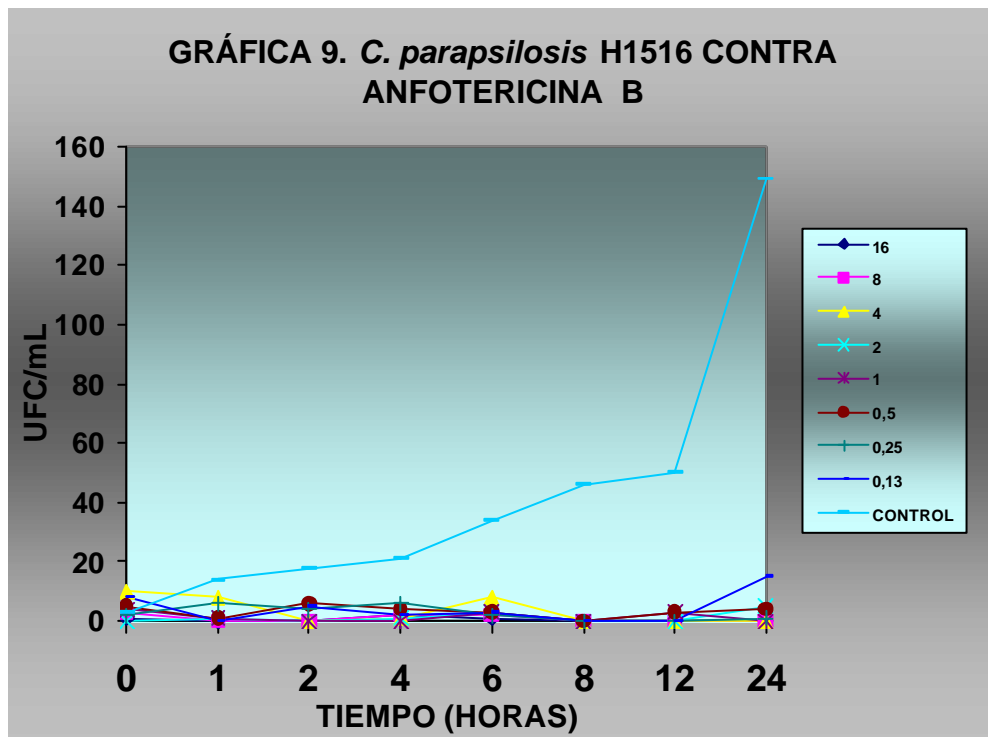
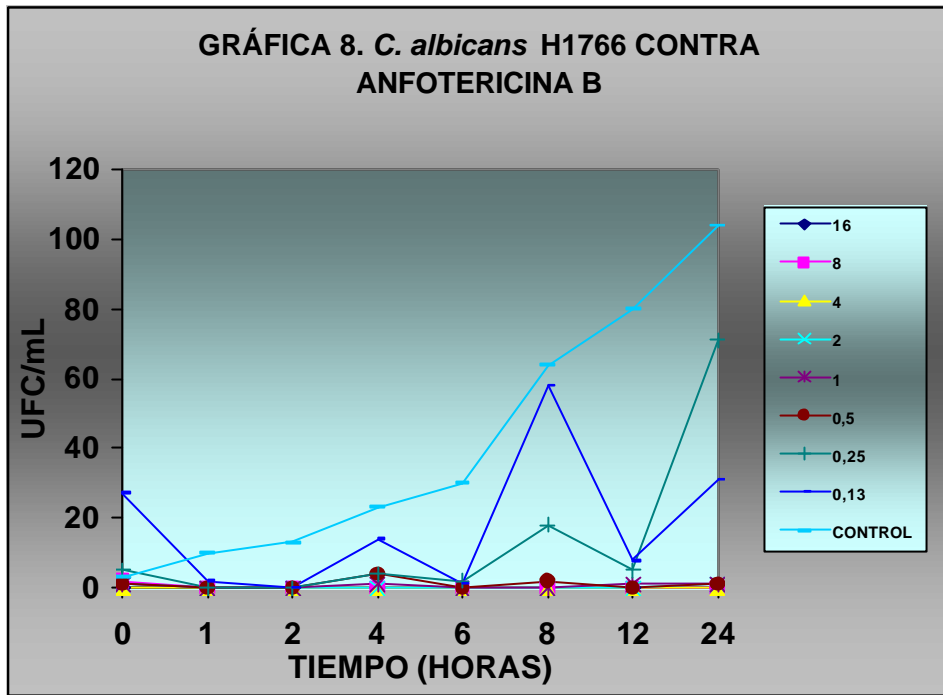
En contraste, una marcada actividad fungicida dependiente de la concentración (> 99.9% de disminución en el \log_{10} del número de UFC/mL comparado con el inóculo inicial) fue observada con anfotericina B. Los aislamientos de *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 90028 Y *C. parapsilosis* H1516 se mantuvieron constantes (Gráficas 6-7-9); los aislamientos de *C. albicans* H1766 y H1499 presentaron lecturas erráticas a una concentración de anfotericina B de 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 8 horas, lo cual pudo deberse a errores en el procedimiento, o a cepas tolerantes al antifungico. (Gráficas 8 y 10)

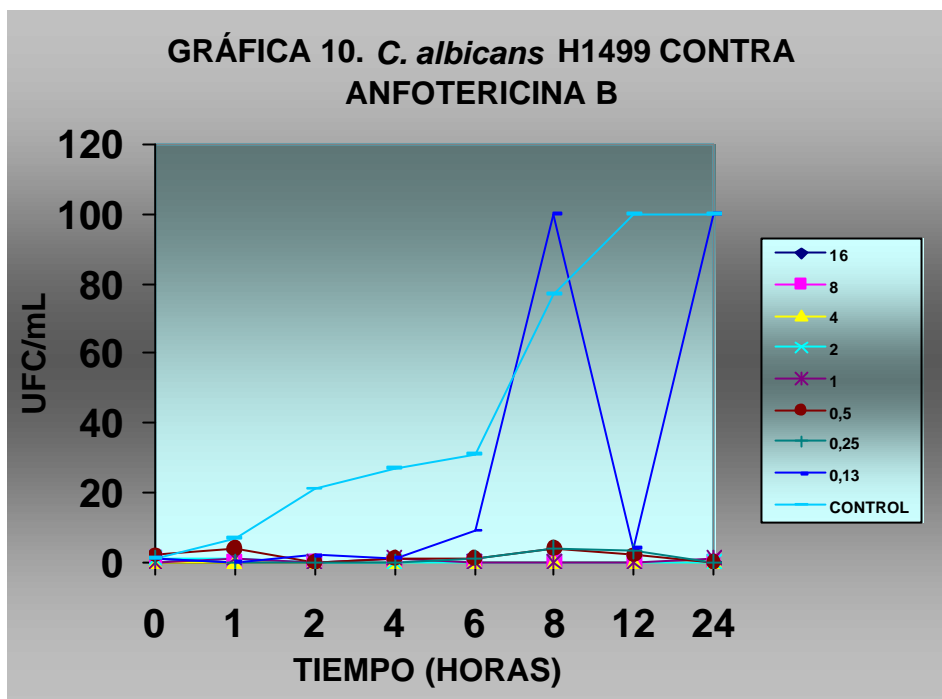
GRÁFICA 6. *C. parapsilosis* ATCC 22019 CONTRA ANFOTERICINA B



GRÁFICA 7. *C. albicans* ATCC 90028 CONTRA ANFOTERICINA B



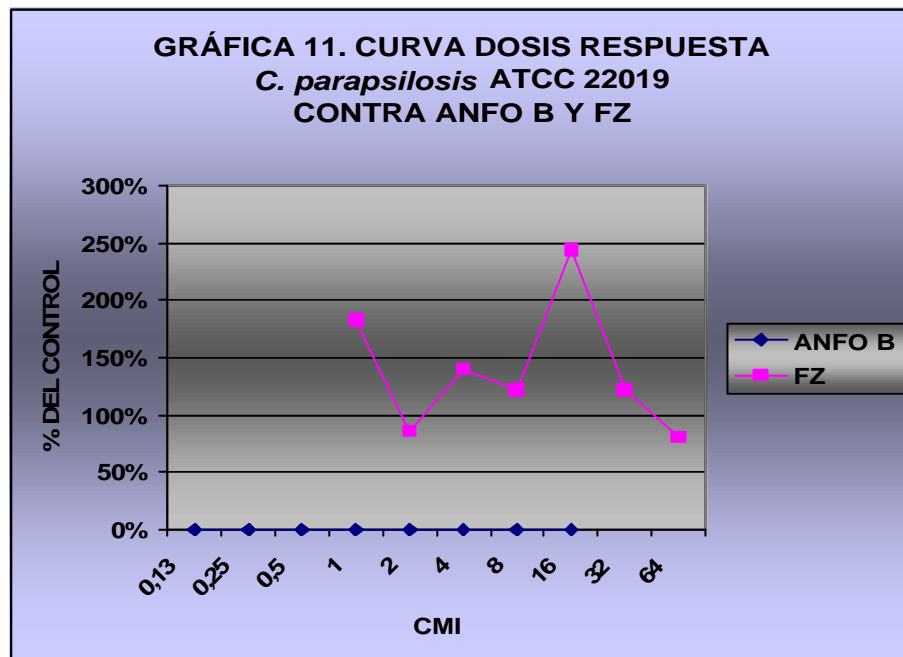




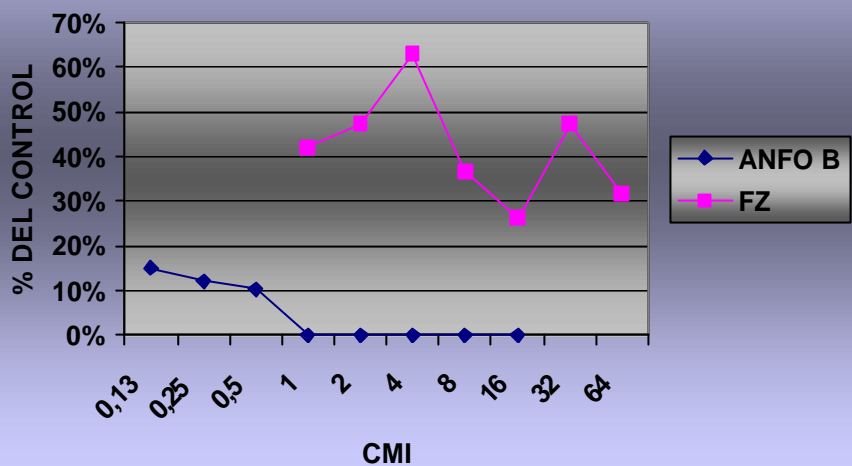
Se realizaron gráficas representativas de la diferencia en el porcentaje en el número de UFC/mL en comparación con la CMI de fluconazol y anfotericina B.

Para *C. parapsilosis* ATCC 22019 se observó un 100% de letalidad para anfotericina B en todas las concentraciones y un 15% de letalidad para fluconazol en la concentración de 2 µg/mL (Gráfica 11); en *C. albicans* ATCC 90028 se observó un 85% de letalidad en las concentraciones de 0.13 µg/mL, 0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL para anfotericina B y luego se mantuvo constante; un 70% de letalidad fue observado para fluconazol en la concentración de 16 µg/mL (Gráfica 12); en *C. albicans* H1766 se observó un 70% de letalidad en la concentración de 0.13 µg/mL para

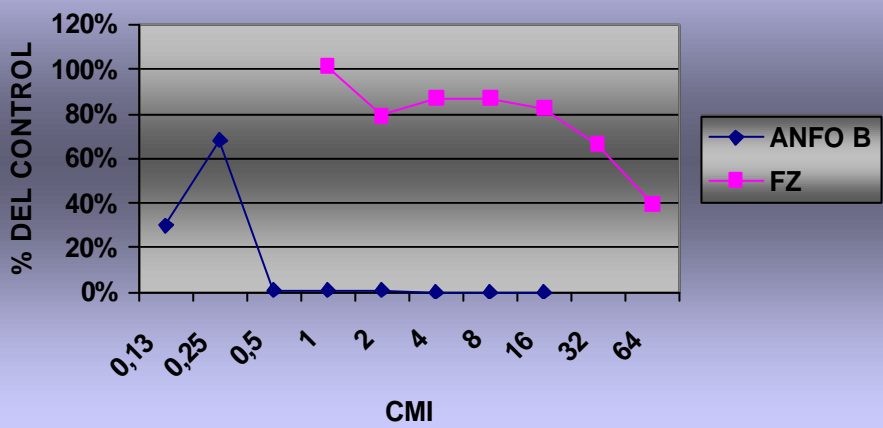
anfotericina B; para fluconazol se observó un 100% de letalidad en la concentración de 1 µg/mL que luego se mantuvo constante en las demás concentraciones (Gráfica 13); en *C. parapsilosis* H1516 se observó un 100% de letalidad para anfotericina B en todas las concentraciones probadas y un 10% de letalidad en la concentración de 32 µg/mL para fluconazol (Gráfica 14) Por último, para *C. albicans* H1499 se observó un 100% de letalidad para anfotericina B en todas las concentraciones probadas y un 75% de de letalidad en la concentración de 1 µg/mL para fluconazol.



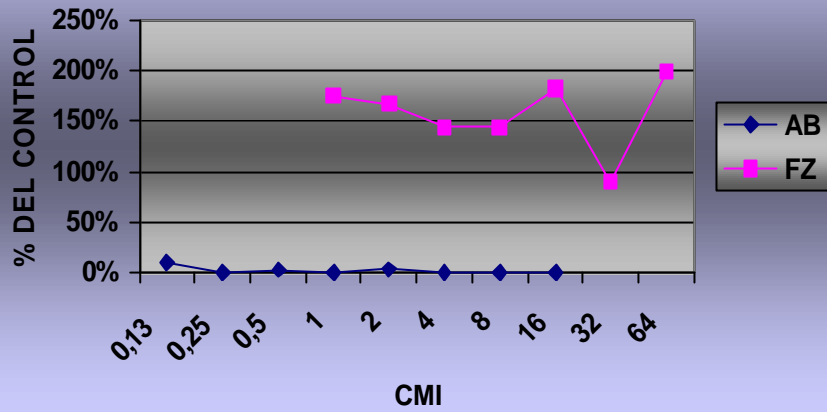
**GRÁFICA 12. CURVA DOSIS RESPUESTA
C. albicans ATCC 90028
 CONTRA ANFO B Y FLUCO**



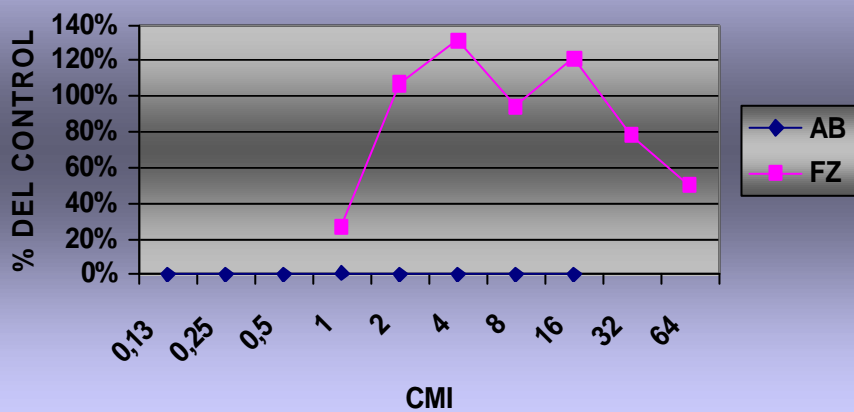
**GRÁFICA 13. CURVA DOSIS RESPUESTA
C. albicans H1766 CONTRA ANFO B Y FZ**



**GRÁFICA 14. CURVA DOSIS RESPUESTA
C. parapsilosis H1516 CONTRA ANFO B Y FZ**



**GRÁFICA 15. CURVA DOSIS RESPUESTA
C. albicans H1499 CONTRA ANFO B Y FZ**



8. DISCUSIÓN.

Como el interés clínico en hongos y terapias antifúngicas continua en crecimiento, hay una apremiante necesidad de aumentar nuestro entendimiento de las propiedades fungicidas y las características farmacodinámicas de estos agentes. A pesar de la relativa carencia de datos describiendo el uso de métodos de curvas de muerte para el estudio de hongos, en este proyecto se encontraron técnicas valiosas en la investigación de la dinámica de los antifúngicos basadas en los experimentos de Klepser y colaboradores. (35-36) Primero se estandarizó el método para realizar los estudios de curvas de muerte de fluconazol y anfotericina B y luego estos métodos se aplicaron para describir la respuesta de las características de la concentración in vitro de estos antifúngicos.

La metodología que se empleó para el estudio de estos agentes se basó en la adaptación de los procedimientos propuestos para curvas de muerte de agentes antibacterianos; sin embargo, para facilitar el estudio se realizaron varias modificaciones que se fundamentaron en las pruebas de susceptibilidad antifúngica in vitro. Esto ayudó a identificar condiciones de prueba específicas que afectan los resultados de la prueba, tales como el efecto remanente y el inóculo inicial; por esto es importante tener en cuenta los siguientes procedimientos cuando se realicen estudios de curvas de muerte antifúngicas (36):

- El inóculo inicial usado debe estar entre $1-5 \times 10^5$ UFC/mL.
- El RPMI 1640 tamponado a pH 7.0 con MOPS debe ser usado como medio de crecimiento.
- Las muestras de las curvas de muerte deben ser incubadas a 35°C.

- Debería evaluarse el efecto remanente (carry-over) antes de la realización de la prueba.

Desafortunadamente, debido a la carencia de la estandarización de un método para realizar e interpretar la CFM, una variedad de aproximaciones han sido usadas con resultados confusos. La gran parte de los estudios más recientes han utilizado el método de dilución en caldo para la determinación de la CMI, descrito en el documento del NCCLS M27-A para especies de *Candida* (24-33-35-36). El gran origen de la variación viene en el volumen probado de los tubos y en el criterio respecto a el porcentaje de células muertas que indicaría la CFM. Varios reportes han definido la CFM como el porcentaje de reducción en las UFC/mL del inóculo inicial igual o mayor al 99.9% (40).

El principal problema con estos estudios para levaduras es que usando el procedimiento del NCCLS M27- A, estas se inhiben por el tamaño de inóculo de 0.5×10^3 a 2.5×10^3 UFC/mL. Por el uso de este tamaño de inóculo, el número total de levaduras en la microdilución está entre 100 y 500 y determinar una reducción del 99.9% es mas difícil.

Además, cuando el procedimiento de la CFM es realizado sembrando 10 μ L en las cajas, no se puede determinar nada más que un 90% de disminución en las UFC/mL para el inóculo inicial. Aún si el volumen de la muestra probada, detecta una disminución del 99.9% en las UFC/mL, esto no sería posible. El uso de un criterio menos estricto para definir la CFM presenta el riesgo de clasificar un agente como fungicida cuando en realidad no lo es. (40)

Por eso en este proyecto se trabajo con un inóculo inicial de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL (McFarland 0.5), basados en los estudios de Klepser, como se mencionó anteriormente. Además, se sabe que la tolerancia en los efectos de muerte en los agentes antimicrobianos aumenta cuando se usa un inóculo grande y disminuye con un pequeño inóculo (40). El efecto residual fue evitado por el método de filtración, por esto es muy importante determinarlo al realizar la prueba. En este estudio todas las muestras fueron sensibles a los antifúngicos utilizados y se evaluaron aislamientos con un rango amplio de CMI para anfotericina B y un rango un poco mas estrecho para fluconazol, lo cual puede reflejar lo observado en la practica clínica. (10)

La actividad exhibida por un antimicrobiano es descrita por una curva de dosis respuesta. En esta curva de concentración en comparación con la actividad, un segmento de la curva puede ser identificado caracterizando la transición entre los niveles de actividad. Si el rango de concentraciones sobre esta transición es pequeño, el agente exhibe concentraciones independientes de la actividad. Inversamente, si el rango de concentraciones sobre la transición de la actividad es largo, el agente exhibe concentraciones dependientes de la actividad. En este estudio se describieron las características de la concentración-respuesta para anfotericina B y fluconazol probadas en 3 aislamientos clínicos (H1766, H1516 y H1499) y 2 cepas ATCC (C. parapsilosis ATCC 22019 y C. albicans ATCC 90028) en los cuales se presento una actividad fungistática independiente de la concentración para el fluconazol y una actividad fungicida dependiente de la concentración para la anfotericina B. (40)

En nuestro estudio se confirma el hallazgo de otros autores (33-35-36) de que el fluconazol es fungistático y su comportamiento farmacodinámico es independiente de la concentración, mientras que la anfotericina B es fungicida y dependiente de la concentración. Sin embargo, se ha debatido recientemente la utilidad de estos conceptos en el efecto de los antibióticos sobre las bacterias (41). Creemos que tiene mayor relevancia el mecanismo de acción farmacodinámico de los antimicrobianos.

La tendencia en los últimos años (42-43) ha sido la de modificar los regímenes de dosificación de antibióticos de acuerdo al perfil farmacodinámico: antimicrobianos dependientes de concentración se deben administrar menos veces al día en altas dosis, mientras que en los independientes se debe buscar optimizar el tiempo arriba de la CMI.

El conocimiento de la relación entre la concentración y el efecto post antifúngico prolongado puede proporcionar bases más racionales para las estrategias de dosificación antifúngica que resultaran en la maximización del efecto terapéutico y la minimización de los efectos adversos relacionados con el antifúngico.

De acuerdo a esto la anfotericina B debería administrarse una sola vez al día y el fluconazol en intervalos y dosis que aseguran un tiempo adecuado arriba de la CMI. Estudios recientes en quinolonas apoyan la validez de esta aproximación. (44-45)

Se requieren estudios para definir el impacto de esta formulación sobre la efectividad clínica de los antimicóticos, especialmente en los huéspedes inmunocomprometidos. Igualmente se deben definir los parámetros relevantes de los antimicóticos: área bajo curva/CMI, relación pico/CMI, tiempo arriba de CMI. De esta forma los resultados de laboratorio tendrían mayor aplicabilidad de la que tienen en el momento.

9. CONCLUSIONES

Una vez estandarizados los métodos para determinar la CFM y las curvas de muerte de los agentes antifúngicos conocimos el efecto farmacodinámico de los antifúngicos.

La anfotericina B es dependiente de la concentración y el fluconazol es independiente de la misma.

Las curvas de muerte permiten observar el comportamiento del antifúngico en el tiempo.

Se logro describir el comportamiento farmacodinámico de la Anfotericina B.

Se logro describir el comportamiento farmacodinámico del fluconazol.

Las características farmacodinámicas de los antifúngicos en contraste con los resultados obtenidos en la CMI, ayudan a establecer el comportamiento de los antifúngicos durante cada una de las etapas de la infección fúngica y provee de herramientas para predecir y controlar el curso del tratamiento.

10. RECOMENDACIONES

En el Instituto Nacional de Cancerología es importante seguir con los estudios de la utilidad de los índices farmacodinámicos.

Seria muy importante determinar el papel real del efecto post antifúngico y del efecto remanente.

Se requieren estudios para definir los parámetros relevantes de los antifúngicos. (AUC/CMI, Relación Pico/CMI, tiempo arriba de la CMI)

Hacen falta estudios que ayuden a predecir el impacto de la CMI o de las curvas de muerte sobre el desenlace con el paciente que recibe el tratamiento antifúngico.

11. IMPLICACIONES ÉTICAS.

El estudio fue considerado como una investigación sin riesgo (Artículo 11, numeral A) según la resolución No 008430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (Constitución 1991, Ley 23 1981).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ghannoum MA, Rex JH y Galgiani JN. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 1996;34:489–85
2. Rex JH, Phaller MA, Galgiani JH, Bartlett MS, Espinel A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro - in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997;24:235–47
3. Alvarado PD. Determinación del perfil de sensibilidad in vitro frente a antifúngicos en levaduras aisladas de micosis invasivas. [Tesis doctoral] Univ de Chile;2000
4. Tapia PC, León CE y Palavecino RE. Susceptibilidad antifúngica de levaduras mediante E test: comparación de 3 medios. *Rev med Chile* 2003;131:299– 302
5. Silva VV, Díaz MC, Febre N y col. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infectol* 2002;19:149-56

6. Castañeda PA, Yáñez VA, López VT y Valdes TF. Prevalencia y sensibilidad de *Candida albicans* en cultivos obtenidos en un hospital oncológico. *Gac Med Mex* 2000;136:193–99
7. Groil AH, Shan PM, Mentzel C, et al. Trends in the post mortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 1996;33:23-32
8. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:19-24
9. Solomkin JS, Flohr AB, Quie PG, Simmons RL. The role of candida in intraperitoneal infections. *Surgery* 1980;88:524-30
10. Rivas PJ. Determinación de la susceptibilidad antimicótica de aislamientos clínicos de *Candida spp* en pacientes con cáncer. [Tesis] Universidad de los Andes;2002
11. Castro LA, Gonzalez LA. Micosis en el hospital universitario del valle. *Col Med* 1995;26:150-53
12. Huerta MJ y Silva SN. El genero *Candida* y su importancia en patología bucal. *Rev Fac Odont Univ Chil* 1996;14:1-7

13. Samaranayake and Mac Farland candidiasis. Ed Butterworth y co. Ltd England,1992

14. Wingard JR. Importance of Candida species other than Candida albicans as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995;20:115–25

15. Wey SB, Motomi M, Phaller MA, et al. Risk factors for hospital acquired candidemia: a matched case control study. Arch Intern Med 1989;149:2349-53

16. Carrillo ER, Núñez MF y Alvarado MC. Candidiasis; una infección emergente en la terapia intensiva. Med Int Mex 2000;16:81–9

17. Bodey GP, editor. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment. New York Raven Pres 1993;371–406

18. Horne JT y Hollomon DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. FEMS Microbiol Lett 1997;149:141–9

19. White TC, Marr KA y Bauden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol 1998;11:382– 402

20. Antimicóticos sistémicos.

<http://www.geocities.com/ralv7/antimico.htm>

21. Solomkin JS, Flor A y Simmons RL. Candida infections in surgical patients Dose requirements and toxicity of amphotericin b. Ann Surg 1982;195:177– 85

22. Gallis HA, Drew RH y Pickard WW. Amphotericin b: a 30 years of clinical experience. Infect Dis 1990;12:308–29

23. Garbino J y Pittet D. Candida infections in the ICU. Clin Intensive Care 1997;8:18–200

24. III Curso Hispano Argentino de Micología Médica. Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio. Memorias. Buenos Aires Argentina 2000

25. Martino P, Girmenia C, Micozzi A, et al. Fungemia in patients with leukemia. Am J Med Sci 1993;306:225-32

26. Bodey GP. Azole antifungal agents. Clin Infect Dis 1992;14:161–9

27. Brammer KW, Farrow PR y Faulkner JK. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Infect Dis* 1990;12:318–26
28. Espinel IA. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol New* 1995;18:161–7
29. Barry AR y Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of candida species. *J Clin Microbiol* 1996;34:2154–7
30. Phaller MA, Rex JH y Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis* 1997;24:776–84
31. Phaller MA y Yu WL. Antifungal susceptibility testing. *Infect Dis Clin* 2001;15:1–32
32. Rex JH y Phaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? 2002;35:982–9
33. Rodero L, Cordoba S, Cahn P. Soria M, Lucarini M, Dawel G, et. al. Timed kill curves for *C. neoformans* isolated from patients with AIDS. *Med Mycol* 2000;38:201–7

34. National committee for clinical laboratory standard 1997 reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27A. National committee for clinical laboratory standards, Villanova, Pennsylvania.

35. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale y Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin b tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1997;41:1392-5

36. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME y Phaller MA. Influence of test conditions on antifungal time kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1207-12

37. Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC y Brown SD. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, etest and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1781-4

38. Barry AL y Brown SD. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1996;34:2154-7

39. National committee for clinical laboratory standard. Approved standard M2-A6. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 6th ed. Wayne, PA: National committee for clinical laboratory standards, 1997
40. Phaller MA, Sheehan DJ y Rex JH. Determination of fungicidal activities against yeast and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol.* 2004;17:268-80
41. Pankey GA y Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanism of action in the treatment of gram positive bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2004;38:864-70
42. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1-12
43. Jacobs MR. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7:589-96
44. Dunbar LM, Wunderink RG, Habib P, Smith LG, Tennenberg AM, Khashab MM et al. High dose, short course levofloxacin for community acquired pneumonia: a new treatment paradigm. *Clin Infect Dis.* 2003;37:752-80

45. Drusano GL, Preston SL, Fowler C, Corrado M, Weisinger B y Kahn J. Relationship between fluoroquinolone area under curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. J Infect Dis. 2004;189:1590-7

46. Dade B. Rapid yeast identification panel procedural manual. Dade Behring Inc West Sacramento California, revised December, 2000;2-4

47. Henry J. Diagnóstico y tratamiento clínico. Barcelona. 9na ed. Masson; 1993

48. Koneman E. Microbiología práctica y laboratorio. Buenos Aires. Médica Panamericana; 1997

49. <http://www.google.com>

**ANEXO 1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO (RPMI-1640
TAMPONADO CON 0,165 mol/L MOPS, 1 Litro)**

RPMI 1640	10,4g
Tampón MOPS	34,53 g

1. Disolver el medio en 900 ml de agua destilada estéril.
2. Añadir el tampón MOPS (ácido morfolino propanosulfónico) para alcanzar una concentración 0,165 mol/L
3. Agitar hasta disolver completamente.
4. Mientras se agita, ajustar el pH a 7 a temperatura ambiente (25°C) utilizando NaOH 1 mol/L.
5. Añadir el agua destilada estéril necesaria para alcanzar 1 litro de medio.
6. Esterilizar por filtración.
7. Almacenar a 4°C hasta su utilización.

TAMPONES

1. El medio de cultivo se debe tamponar a pH 7 a 25°C.

2. El tampón elegido no debe ser antagonista de los antimicrobianos empleados. Por ejemplo, el tampón Tris no es adecuado ya que es antagonista de la 5-fluorocitosina.
3. Es preferible utilizar tampones Zwitterion a otros que son capaces de atravesar la membrana celular. Por ejemplo no es recomendable utilizar tampones fosfato porque son capaces de atravesar las membranas celulares y producir reacciones inesperadas con los antifúngicos.
4. Un tampón que es adecuado es el ácido morfolino propanosulfónico (MOPS; 3(N-morpholino) propanesulfonic acid). La concentración final que se debe de utilizar es 0,165 mol/L.
5. Tras la finalización de la preparación del medio es imprescindible comprobar que el pH final está entre 6.9 – 7.1 a 25°C.
6. Se debe de realizar un control de calidad de cada lote de medio mediante la determinación de la sensibilidad de 2 cepas control de calidad.



FOTO 6

ANEXO 2. PANEL PARA LA IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE LEVADURAS DADE MICROSCAN ⁽⁴⁶⁾

Se utilizan pruebas convencionales modificadas y cromogénicas para la identificación de levaduras en muestras clínicas. El panel para la identificación de levaduras es una placa de microdilución de 96 pocillos, se utiliza para la identificación rápida de levaduras y especies afines aisladas de muestras clínicas.

PROCEDIMIENTO:

1. Realizar una suspensión con la colonia (sembrada anteriormente en agar sabouraud – dextrosa) de la levadura en agua estéril
2. Adicionar a cada uno de los pozos del panel 50 μ l de la suspensión.
3. Incubar 4 horas a 35 - 37°C.
4. Agregar una gota de peptidasa (BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY, HIS) y NaOH (AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, LELL, NGAL) en los pozos correspondientes indicados en el inserto.
5. Realizar la lectura en el MICROSCAN antes de 3 minutos después de adicionar los reactivos.

ANEXO 3. TUBO GERMINAL (47-48)

Se define como una extensión filamentosa de una célula de levadura que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula madre. El tubo germinal de *Candida albicans* ha sido descrito como un tubo sin constricción en el punto de origen en contraste con *Candida tropicalis*.

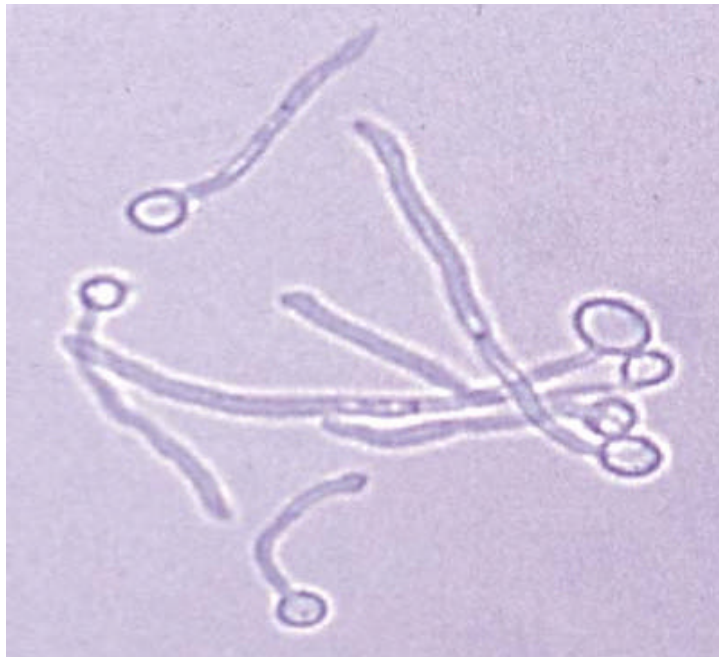
Es una prueba específica para la identificación de *C. albicans*. La prueba se basa en la germinación de las blastoconidias al incubarse en un medio rico en proteínas. El 95 al 97% de los aislamientos clínicos de *C. albicans* producen tubo germinal

PROCEDIMIENTO:

1. Hacer una suspensión ligera de una colonia, crecimiento de 18 a 24 horas en 0.5ml de suero humano.
2. La suspensión se incuba a 37°C por dos horas.
3. Colocar una gota de la preparación sobre un portaobjetos y colocar un cubreobjetos
4. Observar al microscopio con objetivo de 10x y 40x para determinar la presencia de tubos germinales. La prueba no es válida si se examina después de dos horas, por presentar falsos positivos.
5. Cada vez que se realiza la prueba debe incluirse como control positivo una cepa de *C. albicans*.



GRÁFICA 16. Tubo germinal ⁽⁴⁹⁾



GRÁFICA 17. Tubo germinal ⁽⁴⁹⁾

ANEXO 4. BÚSQUEDA DE CLAMIDOSPORA TERMINAL ⁽⁴⁷⁾

El medio utilizado para esta prueba es el agar harina de maíz (corn meal) mas tween 80, que se prepara disolviendo 17 g del agar en 1 litro de agua destilada.

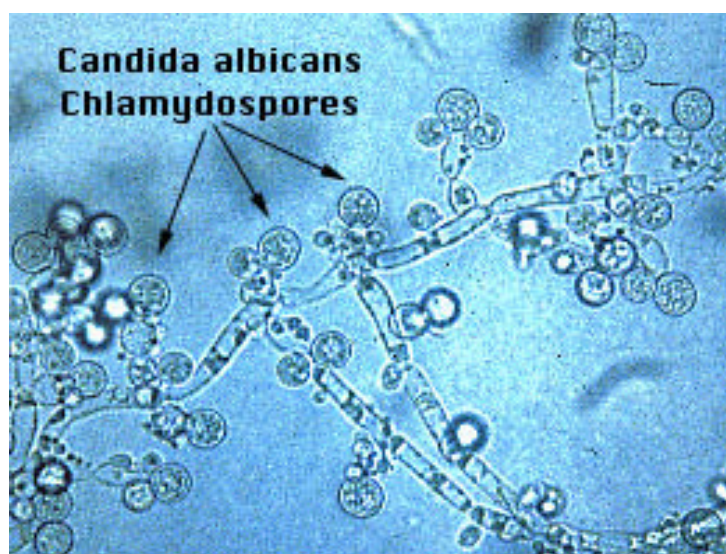
Las clamidosporas, características de la especie *C. albicans* son grandes, esféricas de 8 um – 12 um de diámetro, de pared gruesa y con distribución intercalar o terminal, y al madurar no germinal.

PROCEDIMIENTO.

1. Dividir una caja de corn meal en cuatro partes iguales, marcar por el revés. En cada caja sembrar tres levaduras problema y el control de *C. albicans*.
2. Rayar el agar diluyendo el inóculo con una línea de 1.5 cm, en seguida hacer otra línea del mismo tamaño. Extender uniendo las dos líneas anteriormente realizadas y cubrir con un cubreobjeto estéril.
3. Incubar a 25 – 28°C de tres a cinco días.
4. Usando un objetivo de 10x observar por los bordes de la lámina la formación de clamidospora germinal y pseudomicelio.



GRÁFICA 18. Clamidospora (49)



GRÁFICA 19. Clamidospora (49)

ANEXO 5. PREPARACIÓN DEL MEDIO SABOURAUD DEXTROSA.

FUNDAMENTO:

Se emplea para el aislamiento primario de la mayoría de los hongos patógenos para el hombre, lo mismo que para el mantenimiento de los cultivos.

REACTIVOS:

Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agar agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

PROCEDIMIENTO:

1. Mezclar los reactivos.
2. Disolver calentando con agitación constante.
3. Esterilizar a 120°C por 15 minutos.
4. Servir en tubos de ensayo o cajas de petri.
5. Dejar solidificar y almacenar en refrigeración.