



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

TESIS:

“ESTUDIO SOBRE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y PERFIL DE
SENSIBILIDAD PARA ANTIFÚNGICOS EN ESPECIES DEL GÉNERO *Candida*
DE IMPORTANCIA MÉDICA”

“PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO”

PRESENTA:

pQ.F.B. CARLOS EDUARDO PÉREZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR:

Q.F.B. VIRGINIA LORA TÉLLEZ

ASESOR:

M.S.P. MARÍA DE LA CRUZ MENESES SÁNCHEZ

H. PUEBLA DE ZARAGOZA. OCTUBRE 2015.

Agradecimiento

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, Q.F.B. Virginia Lora Téllez, sin la cual habría sido imposible la realización de este trabajo.

Agradezco profundamente su tiempo, dedicación y esfuerzo hacia mi persona. También agradezco el haberme compartido sus conocimientos, así como sus sugerencias y consejos para desarrollarme como persona y como profesionalista.

Dedicatoria

A mis padres, por apoyarme durante toda mi formación profesional. Por su dedicación y su esfuerzo para que pudiera llegar hasta esta instancia.

Por sus consejos para que logre ser un buen profesionalista y, sobre todo, una mejor persona.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	4
Marco de referencia.....	20
Planteamiento del problema.....	22
Justificación.....	23
Objetivos.....	24
Diseño de investigación.....	25
Metodología.....	26
Material.....	28
Diagrama de trabajo.....	29
Resultados.....	30
Discusión.....	43
Conclusiones.....	47
Comentarios finales.....	48
Glosario.....	50
Anexos.....	55
Bibliografía.....	69

NOTA DE CONFIDENCIALIDAD DE DATOS

En la realización de este estudio, se respetó la confidencialidad en el manejo de datos concernientes al paciente; en estricto apego a las especificaciones del código de bioética que rige al Hospital para el Niño Poblano. Asimismo, el fundamento y propósito de dicho estudio se establece en beneficio de la salud de la población pediátrica atendida, al mejorar continuamente la calidad en el servicio otorgado y del cual se demanda derecho.

“La niñez es primero”
Hospital para el Niño Poblano.

Resumen

Se estudió una población total de 156 pacientes pediátricos con diagnóstico establecido de candidosis en diversidad clínica en el Laboratorio Clínico del Hospital para el Niño Poblano, durante el periodo de septiembre 2014 a enero 2015.

A las cepas levaduriformes previamente identificadas en género y especie, se les realizó resiembra en agar Sabouraud. De esta resiembra, se utilizó una asada para el perfil de sensibilidad a antifúngicos con ayuda del sistema semi-automatizado Vitek 2-Biomérieux™ y otra asada se utilizó para la prueba de formación de biopelícula.

Como resultado de estas pruebas, se encontró que las especies *Candida albicans* (57.05%), *Candida tropicalis* (18.58%) y *Candida parapsilosis* (11.53%) se aislaron con mayor frecuencia, además de formar biopelícula.

El tratamiento inicial que se aplicó a los pacientes consistió en fluconazol; debido a una evolución clínica no satisfactoria de los pacientes, se complementó el tratamiento con la adición de otro antifúngico. A consecuencia de que en algunos pacientes no funcionó el tratamiento complementario, se cambió por completo el esquema terapéutico del paciente, obteniéndose finalmente una evolución clínica satisfactoria. Pacientes con edades de 0 a 3 años y sexo masculino del servicio de unidad de cuidados intensivos fueron los más afectados por candidosis invasiva.

Introducción

Las micosis oportunistas son aquéllas producidas por hongos saprófitos inoos, los cuales sólo desarrollan capacidad de generar enfermedad al hospedero en condición de inmunocompromiso de éste último.

Al contrario que en las micosis primarias, las micosis producidas por hongos oportunistas tienen una distribución geográfica universal y su forma de presentación clínica es variable, dependiendo del tipo de infección que produzcan, el órgano afectado o el tipo de paciente.

Las micosis sistémicas oportunistas más frecuentes están producidas por diferentes especies de levaduras del género *Candida* (candidosis sistémica), por hongos filamentosos superiores (o tabicados) del género *Aspergillus* (aspergilosis sistémica), o por hongos filamentosos inferiores (no tabicados) del orden de los *Mucorales* (mucormicosis).

Las infecciones causadas por levaduras, en contraste con las producidas por hongos filamentosos, suelen tener un origen endógeno, a partir de la propia flora gastrointestinal o mucocutánea del hospedero, y se deben fundamentalmente a especies del género *Candida*.

Por otra parte, el origen exógeno de candidosis, aunque menos frecuente, se relaciona estrechamente con el uso de dispositivos artificiales de apoyo clínico.

Además de la capacidad de dimorfismo, el género *Candida* desarrolla otros factores de virulencia, tales como: **adhesinas**, que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedero o materiales plásticos; **proteinasas o fosfolipasas**, las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedero; **tigmotropismo**, que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos; además de la producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras. (6).

A su vez, el conocimiento acerca de la composición molecular y función bioquímica de biopelícula desarrollada por el género *Candida*, ha permitido definir esta facultad, como mecanismo de patogenicidad asociado a la evasión de la acción fungicida de los antifúngicos de elección terapéutica.

Las biopelículas son comunidades celulares, de una o varias especies de microorganismos, embebidas en una matriz polisacárida altamente hidratada, adheridas sobre superficies biológicas o inertes y comunicadas con el exterior mediante canales de agua. Estas estructuras biológicas son organizaciones muy heterogéneas con diferentes ambientes de pH, concentración de iones, oxígeno, carbono y nitrógeno; la matriz extracelular está formada por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. En las biopelículas maduras también se ha observado una disminución de los niveles de ergosterol, contribuyendo a la resistencia de los antifúngicos que actúan sobre esta diana. (51).

De acuerdo con los factores de virulencia antes mencionados, nos enfocamos en estudiar el desarrollo de biopelícula, ya que consideramos el principal factor que podría estar relacionado con el impedimento de una acción eficaz del tratamiento de elección y evitar una evolución clínica satisfactoria de los pacientes.

Marco teórico

Los agentes etiológicos relacionados frecuentemente a la patología de candidosis invasiva son:

Candida albicans: Patógeno predominantemente asociado a infección fúngica invasiva (IFI), de alta virulencia y de moderada-débil resistencia a la acción fungicida de los azoles y polienos.

Candida tropicalis: Se considera más virulenta que la especie *albicans* y aunque es sensible a polienos y azoles, puede presentar resistencia a la acción de fluconazol.

Candida parapsilosis: Es probablemente la única especie que muestra una incidencia global en aumento desde 1990, y siendo un colonizador frecuente de la piel, las infecciones por este patógeno oportunista se asocian estrechamente con el uso de dispositivos artificiales de soporte clínico.

Candida glabrata: Este hongo levaduriforme, aunque de baja incidencia en pacientes inmunocomprometidos, es causa de pielonefritis y otras infecciones graves. Se asocia a la mayor tasa de mortalidad entre las especies del género y es capaz de desarrollar resistencia secundaria a fluconazol posterior a la profilaxis antifúngica como factor de riesgo significativo.

Candida krusei: Se considera patógeno emergente responsable de fungemias y urosepsis, principalmente en hospederos inmunocomprometidos. Se caracteriza por su resistencia intrínseca a los azoles y también con potencial resistencia a anfotericina B.

Candida lusitanae: Aunque de excepcional incidencia, el nivel de patogenicidad de esta especie se relaciona a la resistencia intrínseca hacia anfotericina B.

La instauración generalizada de la terapia antifúngica empírica precoz en los episodios febriles de los pacientes neutropénicos y la profilaxis con fluconazol en la última década ha conducido a que especies de *Candida* no *albicans* y otras

levaduras como *Trichosporon asahii* estén en la actualidad frecuentemente asociadas a la etiología de las Infecciones Fúngicas Invasivas (IFI) en los pacientes oncológicos. Debido a la menor sensibilidad de los nuevos patógenos a los antifúngicos disponibles hasta ahora, este fenómeno tiene gran relevancia clínica.

Los procedimientos de trasplante, inmunosupresión, la utilización de dispositivos artificiales y estancias prolongadas en la unidad de cuidados intensivos ha incrementado la prevalencia de infecciones fúngicas. (10).

Candida albicans es el agente causal más común de infecciones intrahospitalarias, ya que el 40% de los pacientes se han contaminado con cepas de *Candida* a través de catéteres, produciendo fungemias con alta mortalidad. (4). Candidosis es la infección fúngica más común asociada con colonización de dispositivos médicos, teniendo dichas infecciones un origen endógeno. En un estudio realizado a 427 pacientes con candidosis, la tasa de mortalidad de los pacientes con estas infecciones fue alrededor del 41%. Por otra parte, 40% de los pacientes con colonización microbiana de catéteres intravenosos desarrollaron fungemia, con graves consecuencias que fueron desde sepsis severa hasta la muerte. La terapia antifúngica es necesaria en todos los casos de candidosis relacionadas con catéteres. Rose y colaboradores (10) realizaron un estudio en 1978, en el cual 4 de 26 pacientes fueron tratados con el retiro del catéter, pero sin terapia antifúngica sistémica; estos desarrollaron endoftalmitis, resultando en la pérdida de la visión en 3 de los pacientes.

BIOPELÍCULA

En la historia de la medicina, la documentación de la biopelícula se puede remontar a las descripciones de Leeuwenhoek de microorganismos sobre superficies dentales hasta la observación por Heukelekian y Heller (1940), quienes describieron que el crecimiento y la actividad para algunas bacterias marinas fueron mejoradas sustancialmente por incorporación de una superficie al caldo de cultivo. (52).

Los microorganismos se adhieren a superficies disponibles en muchos medios naturales, industriales y médicos y pueden desarrollar biopelículas extensas, que están envueltas en matrices poliméricas extracelulares. (12).

Jones y colaboradores (52) demostraron en 1969 que el material de la matriz circundante a los sésiles (células en las biopelículas) era lo que más tarde se conocería como un contraste de biopelículas, un polímero de varios azúcares. La tenacidad y resistencia a los desinfectantes convencionales, ahora conocida como características comunes de las biopelículas, fueron descubiertas por Characklis (22) en 1973. En general, el concepto de la estructura de la biopelícula antes de la llegada de herramientas moleculares y ópticas sofisticadas fue excesivamente simplificado y las biopelículas se percibían como “losas” del material de la matriz con células embebidas al azar. Sin embargo, imágenes de las biopelículas en cuarta dimensión utilizando un software (SCLM) revelaron una organizada arquitectura compleja, sugiriendo un enlace potencial para su función y comportamiento. La matriz extracelular puede incluir iones y nutrientes tomadas del medio ambiente y enzimas extracelulares tales como proteinasas, β -lactamasas, etc. (22).

Se ha sugerido que el grosor de la matriz extracelular (ECM) podría contribuir a la resistencia a los antimicrobianos por la prevención de la difusión de los fármacos a las células diana. Esta prevención puede deberse ya sea a obstrucción física en la difusión del fármaco o a la unión directa del fármaco por la ECM. Dado que la formación de la biopelícula de *Candida* está caracterizada por la presencia de una

matriz visible, se ha sugerido que este factor juega un papel importante en la resistencia antifúngica de biopelículas. (57).

Un estudio con microscopía confocal de barrido láser estableció que las biopelículas en ambientes naturales tienen una arquitectura única, aunque algunas características estructurales pueden considerarse universales. La aplicación de la microscopía confocal de barrido láser determinó que las biopelículas formadas sobre superficies sólidas y que se exponen a un flujo continuo de nutrientes, son capas altamente hidratadas compuestas de microcolonias embebidas en una matriz polimérica orgánica. (60). Las microcolonias están separadas por canales de agua que permiten a los líquidos fluir a través de la biopelícula. Por otra parte, los canales de agua entre las microcolonias proporcionan un medio de eliminación de los productos metabólicos finales. (15).

Las células dentro de las biopelículas están empaquetadas y tienen limitado acceso a los nutrientes y al oxígeno. Las diferencias en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno dentro de la estructura de la biopelícula afecta en la actividad metabólica entre las células. Además, las células dentro de la biopelícula secretan moléculas de señalización que controlan la formación de microcolonias de complicada arquitectura y función diversa. (50). La heterogeneidad estructural de la biopelícula proporciona una barrera efectiva que limita la penetración del antimicrobiano a lo largo de la capa biológica. La difusión cinética del compuesto antimicrobiano de un peso molecular relativo de 100 kDa a través de la biopelícula madura podría reducirse de un 60-80% en comparación con su acción contra las células planctónicas. (46).

Los sésiles se diferencian de sus homólogas planctónicas por las siguientes características:

1.- Existencia de una matriz extracelular formada por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, altamente hidratada y que confiere a la biopelícula un aspecto gelatinoso. La matriz es el soporte universal de la biopelícula y se ha demostrado que su producción aumenta con la edad de la

misma. Además, su composición varía en función de los microorganismos que la formen. En *Candida albicans* el principal componente de la matriz es la glucosa; sin embargo, en *Candida tropicalis* es la hexosamina.

2.- Expresión de genes específicos. Diversos estudios han demostrado la expresión de un patrón de genes diferentes en las células que forman parte de las biopelículas. Los tres tipos de combinaciones de genes *a/a*, *α/α* y *α/a* en *Candida* forman biopelículas densas en las que los heterocigotos, en promedio, son 28% más gruesos que sus contrapartes homocigotos, lo que causa que sean impermeables a los antifúngicos. (30, 7).

3.- Comunicación intercelular. En el interior de las biopelículas, las células se comunican mediante la síntesis de productos que difunden entre ellas. Estos productos aumentan conforme se incrementa la densidad celular y, a un determinado umbral, interaccionan con sus receptores y provocan la expresión de genes específicos, como los que expresan virulencia. En sésiles de *Candida albicans* se han identificado dos moléculas *quorum-sensing*, una (tiroso) favorece la formación de la biopelícula en las etapas iniciales y otra (farnesol) evita el desarrollo excesivo de la biopelícula madura.

4.- Mayor resistencia a las defensas del hospedero y a los antimicrobianos. Los microorganismos formadores de biopelículas también liberan antígenos que estimulan la producción de anticuerpos por parte del hospedero. No obstante, los microorganismos se encuentran protegidos por los polímeros de la matriz y eluden la acción del sistema inmune que, incluso, puede llegar a lesionar los tejidos sobre los que se encuentra la biopelícula. (30).

Se observan fases de diferenciación durante el proceso de formación de biopelícula para el caso de organismos levaduriformes como *Candida albicans*, que incluyen una **fase inicial (0-11 horas)** donde las células levaduriformes se adhieren sobre la superficie y comienzan a formar microcolonias; una **fase intermedia (12-30 horas)** en la cual se comienza a producir la matriz; y por último

una **fase de maduración (32-72 horas)** en la que la matriz recubre totalmente las levaduras. (9).

A estas tres fases suele seguir otra de **disgregación y dispersión** de las células de la biopelícula al medio. La disgregación hace que las células vuelvan a su estado de vida planctónico; por lo tanto, la biopelícula se convierte en un foco persistente de infección. (51).

Uno de los principales componentes en la estructura de la biopelícula es la sustancia extracelular polimérica o polisacáridos extracelulares (EPS), que forman la matriz de la biopelícula. EPS proporciona la matriz viscosa en la que las células están localizadas y también actúa como una capa protectora contra agentes potencialmente perjudiciales, así como una fuente de carbono y energía al momento de la privación de nutrientes. (31).

La química de EPS es compleja y, aunque los carbohidratos son a menudo los constituyentes principales, EPS comprende una amplia variedad de sustancias orgánicas tales como proteínas, ácidos húmicos y ácidos desoxirribonucleicos. Sin embargo, aún no es claro si las células extracelulares o ácidos nucleicos juegan un papel activo estructural o son, más pasivamente, los contenidos atrapados de células lisadas.

La fuerza y estructura de las biopelículas también pueden ser reguladas mediante la variación de la longitud de la cadena de los polímeros de EPS y por la modificación del polímero. Las biopelículas pueden ajustar las propiedades de su EPS en respuesta al cizallamiento hidrodinámico. Las biopelículas desarrolladas en condiciones de alto cizallamiento tenían una matriz de EPS más fuerte y subsecuentemente células más fuertemente adheridas que aquellas que crecieron bajo un cizallamiento más bajo. (52).

Típicamente, en las biopelículas los sustratos son transportados a través del líquido hacia la interfase líquida de la biopelícula, ya que se mueven a través de la matriz de la biopelícula y finalmente son consumidos por los microorganismos que viven dentro de la biocapa. La transferencia de masa y la reacción biológica

entonces pueden ser consideradas fenómenos consecutivos. En estos casos, el mecanismo más lento será el “paso limitante”, y controlará la tasa global de consumo del sustrato y la actividad biológica. (43).

Se considera además, que las biopelículas también se comportan como catalizadores. A diferencia de los catalizadores químicos, las biopelículas son capaces de crecer y modificar su estructura interna para adaptarse a las condiciones de operación. Por otra parte, son predominantemente matrices heterogéneas con racimos hechos de células y polímeros, distribuidas a través de una arquitectura tridimensional y rodeadas por canales de agua que en ocasiones se extienden desde la parte superior a la parte inferior de la biopelícula. En general, el contenido de agua de las biopelículas es de un 90-99%.

La habilidad de *Candida albicans* para crecer sobre superficies y formar biopelículas está asociada con su virulencia, ya que es un comensal de mucosas y de la superficie intestinal que puede servir como fuente para infecciones invasivas. (45).

Costerton y colaboradores (1987, 1994, 1999, 2001) han extendido el concepto de vida procariota en las biopelículas a una amplia variedad de ecosistemas microbianos que van de lo natural a lo artificial, incluyendo los propios humanos, los cuales han abierto un nuevo campo para considerar el papel de las biopelículas en la medicina y la industria. (10, 12).

Debido a la heterogeneidad de las biopelículas, las propiedades pueden cambiar drásticamente de un punto a otro dentro de la matriz y esto también aplica a los parámetros que cuantifican las tasas de transferencia de masa. (5).

El crecimiento de las células adheridas es uno de los mecanismos por el cual la biopelícula puede iniciar su desarrollo estructural. En el proceso de división celular, las células hijas pueden acumularse para formar microrracimos iniciales, pues con el crecimiento localizado y la proliferación puede diferenciarse subsecuentemente dentro de fenotipos arquitectónicos más complejos. (58). Mientras muchas condiciones ambientales y la naturaleza inherente del mismo

organismo definirían el crecimiento y la estructura de la biopelícula resultante, el tipo de fuente de energía y su disponibilidad, es decir, su transporte dentro de las células de la biopelícula son los principales factores a considerar. (52).

Los microorganismos que se adhieren en las biopelículas están protegidos de la acción germicida de los antimicrobianos. Cuando los microorganismos son removidos de una biopelícula, su susceptibilidad antimicrobiana generalmente es restaurada rápidamente. La capacidad para formar biopelículas protectoras es ampliamente distribuida en el mundo microbiano. Los mecanismos de resistencia que son desplegados en las biopelículas constituyen una defensa de amplio espectro que es efectiva contra muchos tipos de antimicrobianos.

Las células embebidas en la biopelícula se extraen y son preparadas para realizar la prueba de sensibilidad a antimicrobianos, siguiendo los lineamientos descritos por la norma de CLSI, con lo cual se demuestra que la biopelícula refleja un estado físico o fenotípico reversible.

La biopelícula está influenciada por factores como son: espesor de la biopelícula, la edad de la misma, densidad celular aérea, composición de la biopelícula y el genotipo. (57).

Aunque existen pocos datos experimentales, es probable que la presencia de partículas abióticas en las biopelículas incremente la resistencia a los agentes antimicrobianos, pero las partículas abióticas, tales como la corrosión de productos, precipitados, fibras y células muertas de un animal huésped, son constituyentes comunes de las biopelículas médicas y ambientales. Se cree que estas partículas mejoran la protección por la reducción difusiva del transporte y el incremento de la actividad de absorción. La dependencia de la capacidad antimicrobiana en la concentración del agente antimicrobiano es compleja. Uno de los conceptos utilizados desde hace mucho tiempo en la aplicación de agentes antimicrobianos es el tiempo-concentración o también conocida como regla CT. Esta regla postula que la eficacia de un tratamiento antimicrobiano es proporcional a la concentración de la dosis y también a la duración de la misma. Por ejemplo, la

regla establecería que 50 mg/L por 2 horas tendría el mismo efecto como 10 mg/L por 10 horas. Mientras esto es simple e intuitivo, la regla CT puede inducir al error, especialmente cuando las biopelículas están involucradas. No solo es raro que la dependencia de la concentración del agente antimicrobiano sea lineal, sino que la dependencia de la concentración del agente difiere entre las biopelículas y las células planctónicas. (22).

Un estudio realizado en 2002 por Adam y colaboradores (1) en la Universidad de Glasgow con biopelículas obtenidas en catéteres de especies mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus epidermidis* para determinar su susceptibilidad, indicó que los polímeros extracelulares producidos por *S. epidermidis* RP62A podía proteger a *Candida albicans* contra los azoles por la inhibición de la penetración en las biopelículas bacterianas-fúngicas. Inversamente, las células de *Candida albicans* en la biopelícula mixta aparentaban proteger a *Staphylococcus* contra vancomicina, sugiriendo que las células fúngicas pueden modular la acción de los antibióticos y que las bacterias pueden afectar la actividad antifúngica en las biopelículas bacterianas-fúngicas.

Casi sin ninguna excepción, las superficies con ambientes húmedos y acuosos han llegado a ser colonizados por microorganismos desarrollados como biopelícula. En medicina, las biopelículas están ampliamente implicadas en muchas infecciones crónicas. En estas situaciones, los agentes químicos y antibióticos forman un componente mayor de cualquier régimen control/erradicación. (22).

Los mecanismos que contribuyen al incremento de la resistencia de las biopelículas de *Candida* no han sido definidos, aunque varios factores se han sugerido. Uno de ellos incluye el papel de la matriz extracelular, el estado fisiológico de las células fúngicas, la presencia de bombas de expulsión y el desarrollo de fases de la formación de biopelícula. (57).

Las bombas de expulsión pueden afectar tanto intrínsecamente como a adquirir la resistencia a los antimicrobianos por la aplicación de la energía para limitar la concentración del compuesto citoplasmático a nivel subtóxico. (46).

El objetivo celular del fluconazol en *Candida albicans* es el citocromo P-450, una hemoproteína involucrada en el camino biosintético del ergosterol. Las alteraciones en la composición del esterol han sido relacionadas con la resistencia en las células planctónicas.

Dentro de un grupo de células en una biopelícula, la **difusión** es el mecanismo predominante en el transporte de solutos. Los nutrientes, productos metabólicos, biocidas y antimicrobianos se desplazan dentro y fuera de la biopelícula de acuerdo a la difusión. (56).

Una explicación para la susceptibilidad reducida de las biopelículas es que éstas tienen un crecimiento lento o nulo de células. Los microorganismos que no se desarrollan o que han entrado en una **fase estacionaria** son conocidos por ser menos susceptibles a una amplia variedad de agentes antimicrobianos. El crecimiento lento que ocurre en la biopelícula presumiblemente es el resultado de la depleción local de algunos nutrientes requeridos o aceptor de electrones. Otra versión acerca de este mecanismo protector es el microambiente alterado; por ejemplo, pH bajo o anoxemia, que establecida en regiones de la biopelícula directamente antagoniza la acción del antimicrobiano.

Existen dos mecanismos para la obtención de gradientes de nutrientes dentro de las biopelículas: el mecanismo directo proviene de investigaciones utilizando microelectrodos. Estos son sensores químicos en miniatura que se pueden introducir en la biopelícula para medir directamente la concentración local de oxígeno o amonio dentro de las capas de esta estructura; el mecanismo indirecto de la limitación de nutrientes en las biopelículas proviene de ingenieros que estudian las reacciones cinéticas de las mismas, como ocurre en el tratamiento de aguas residuales. (16).

Los investigadores observaron que los gradientes de concentración surgen de una interacción reacción-difusión. El sustrato está siendo consumido por una reacción

metabólica ya que se difunde dentro de la biopelícula. El balance de la reacción y la difusión permite el ingreso de los nutrientes a través de la biopelícula. (52).

Los microorganismos están equipados con numerosos sistemas genéticos y bioquímicos para responder al estrés ambiental. Estos sistemas incluyen respuestas adaptadas al estrés oxidativo, menor actividad de agua, daños en el ADN, inanición, entre otros.

La susceptibilidad antimicrobiana reducida de los microorganismos en las biopelículas se debe a una combinación de la depleción antimicrobiana a través de reacciones con los constituyentes de la biopelícula, pobre penetración antimicrobiana, crecimiento lento en la fase estacionaria en la biopelícula, respuestas adaptadas al estrés y la formación de células protectoras. Ninguno de estos mecanismos ofrece por sí mismo una explicación satisfactoria de la tenaz resistencia de los microorganismos de la biopelícula para diferentes tipos de agentes antimicrobianos; dicho de otra manera, es probable que las biopelículas formen una multicapa de defensa en las cuales dos o más de estos mecanismos operan simultáneamente.

Cuando los agentes antimicrobianos no penetran en la biopelícula es porque éstos son reactivamente neutralizados, ya que se difunden dentro de un grupo de células. Este fenómeno solo se puede manifestar cuando los microorganismos están agregados y ejercen su actividad colectiva neutralizante.

La formación de biopelícula es solo el comienzo para ser reconocido como un proceso multicelular desarrollado. Nuevas estrategias para controlar las biopelículas surgirán cuando la naturaleza multicelular de los mecanismos protectores de la biopelícula sean mejor comprendidos. (52).

Se estima que aproximadamente un 65% de las infecciones humanas están relacionadas con la formación de biopelículas. Los microorganismos capaces de formar biopelículas sobre dispositivos médicos son muy variados y, entre las levaduras patógenas para el hombre, las especies del género *Candida*, sobre todo *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* son las principales. (51).

Las biopelículas fúngicas comúnmente se encuentran en casos de infecciones invasivas relacionadas con catéteres, así como infecciones superficiales como estomatitis dental. La inserción de dispositivos como catéteres y reemplazos articulares en los pacientes proporciona a los microorganismos patógenos un sustrato sobre el que pueden formar biopelículas adherentes que consisten en capas de células embebidas en una matriz. (24).

Las infecciones relacionadas a catéteres son la principal causa de morbilidad y mortalidad entre pacientes hospitalizados, y las biopelículas microbianas formadas en las superficies de los catéteres están asociadas con un 90% de estas enfermedades. La mayoría de estas infecciones involucran la colonización de microorganismos en las superficies de los catéteres, los cuales eventualmente pueden estar cubiertos por una biopelícula. (17).

ANTIFÚNGICOS

Anfotericina B. Es producida por el actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Es un macrólido heptaeno. La molécula está formada por una porción hidrófila de carbonos hidroxilados, una porción hidrófoba que consta de siete átomos de carbono unidos por dobles enlaces (poliénicos) y una cadena lateral de micosamina que es una aminodesoxihexosa. (Ver figura 1). Puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección. (2).

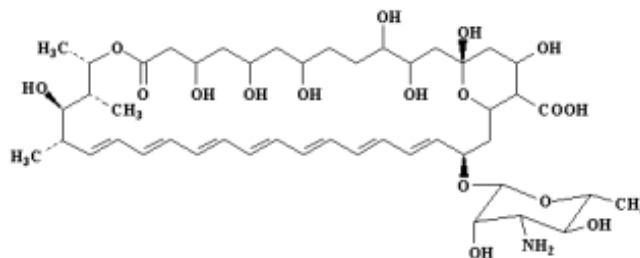


Figura 1. Estructura química de la Anfotericina B. (61).

Se fija ávidamente a los esteroides de la membrana de las células eucariotas pero no de las procariotas; como consecuencia se producen alteraciones en la estructura de la membrana y estas originan una despolarización de la misma y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes monovalentes. (18). Es activa frente a *Candida* spp., excepto en algunas cepas de *Candida lusitanae* y *Candida guilliermondii*. (11).

Flucitosina o 5-fluorocitosina. Es un derivado fluorado de la citosina (ver figura 2); en las células fúngicas se convierte en fluorouracilo por la acción de la enzima citosín desaminasa. Impide la síntesis de ADN del hongo. (2).

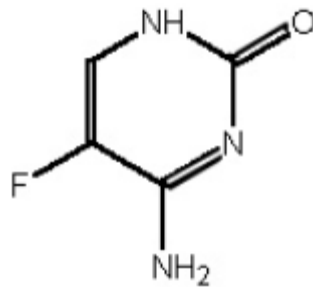


Figura 2. Estructura química de la flucitosina o 5-fluorocitosina. (26).

Fluconazol. Es activo frente a la mayoría de especies de *Candida* spp; sin embargo, gran parte de cepas de *Candida glabrata* y *Candida krusei* son resistentes (ver figura 3). (32,41).

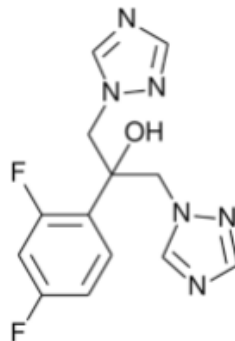


Figura 3. Estructura química del fluconazol. (3).

Voriconazol. Es el triazol con mayor espectro antifúngico. Es activo frente a todas las especies de *Candida*, y otros hongos diferentes (ver figura 4). (59).

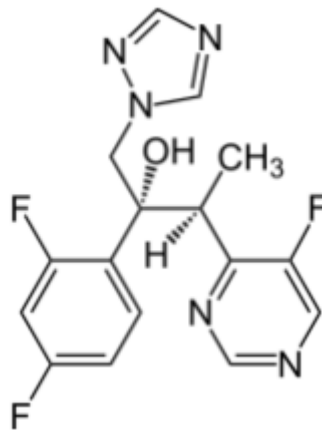


Figura 4. Estructura química del voriconazol. (3).

Caspofungina. Es un compuesto lipopeptídico cíclico semisintético con una cadena lateral N-acil (equinocandina), sintetizado a partir de un producto de fermentación de *Glarea lozoyensis* (ver figura 5). Inhibe la acción del 1,3-β-D-glucano, componente esencial en la pared celular de muchas levaduras y hongos filamentosos. (8).

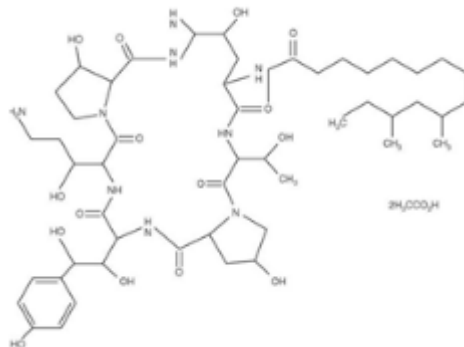


Figura 5. Estructura química de la caspofungina. (23).

Micafungina. Pertenece al grupo de las equinocandinas. Inhibe la acción del 1,3- β -D-glucano, componente esencial en la pared celular de muchas levaduras y hongos filamentosos y es activa frente a *Candida* spp y especies del género *Aspergillus*; además posee una mayor seguridad en candidosis invasora con resultados similares al fluconazol y anfotericina B (ver figura 6). (8).

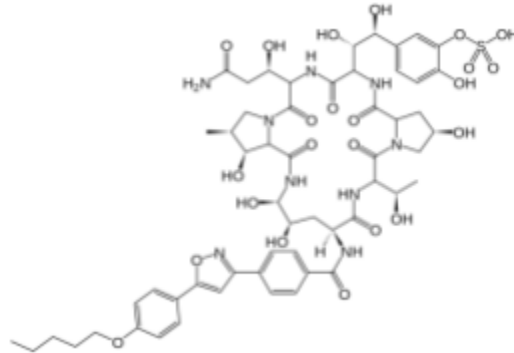


Figura 6. Estructura química de la micafungina. (23).

Es importante considerar que la terapia antifúngica está subordinada al estado clínico del paciente, así como también al conocimiento preciso de la especie levaduriforme y el perfil de sensibilidad que presenten dichos patógenos a los antifúngicos de elección. Asimismo, la complejidad en el patrón de sensibilidad fenotípicamente expresado, debe evaluarse con fundamento en la capacidad de desarrollo de mecanismos de patogenicidad del agente etiológico.

Mecanismos de resistencia a los antifúngicos

La falta de éxito de la terapia antifúngica puede ser debida a la **resistencia que se observa *in vitro*** (resistencia que puede ser intrínseca a la cepa, o adquirida durante el tratamiento) o a una **resistencia clínica**; esta última se asocia con

numerosos factores relacionados con el **hospedero**, el **agente antifúngico** o la **cepa responsable de la infección**. (19).

Asimismo, la resistencia a fluconazol por parte de *C. krusei* podría deberse a la sobreexpresión del gen *ERG11*, causando interferencia sobre la acción de la 14 α -dimetilasa, alteraciones en otras enzimas de la biosíntesis del ergosterol y la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco. (51).

En términos generales, los mecanismos identificados hasta ahora, por los que una célula inicialmente sensible se hace refractaria a agentes citotóxicos son:

1.- Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior.

2.- Cambios en la interacción fármaco diana: aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones.

3.- Modificaciones de las enzimas de las vías metabólicas.

4.- Alteraciones en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del fármaco. (42).

Marco de referencia

Un estudio realizado por Quindós y colaboradores (53), determinó que las infecciones producidas por las diversas especies del género *Candida* son cada vez más importantes en el medio hospitalario; dichas infecciones se establecen mediante la colonización persistente de órganos diana que funcionan como focos infecciosos de diseminación hematógena. En áreas de alto riesgo como las unidades de hematología, la tasa de candidemia se sitúa alrededor de 6 episodios por 1000 ingresos. (53). En el estudio multicéntrico de European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) en 1999, la mortalidad global y relacionada a candidemia fue de 39% y 24% respectivamente. A su vez, el factor más determinante en la historia reciente de candidosis invasiva ha sido la utilización sistemática de la profilaxis antifúngica con fluconazol en pacientes oncohematológicos, observándose la disminución de *Candida tropicalis* y *Candida albicans* como agentes etiológicos, en contraparte con el incremento relativo de *Candida krusei* y *Candida glabrata*.

Quindós y colaboradores (53) también observaron que candidosis invasiva representa la cuarta causa de infección nosocomial. *Candida albicans* es la especie predominante, pero en los últimos años se ha producido un cambio epidemiológico en la etiología de las candidosis invasoras. El 90% de estas infecciones son causadas por *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. (53).

En estudios realizados por Lora Téllez y colaboradores, se observó que la incidencia cada vez más frecuente de *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* está asociada a infecciones generalizadas a partir de urosepsis relacionada o no al uso de dispositivos artificiales, mostrando además la capacidad de desarrollar biopelícula en 60% y hasta 100% de las cepas clínicas aisladas; lo cual representa una interferencia en la eficacia de la terapia antifúngica. (34, 36, 37, 38, 39).

En otro estudio realizado por Stewart y colaboradores en 2004 observaron que los mecanismos de resistencia que se despliegan en las biopelículas constituyen una defensa de amplio espectro que es efectiva contra muchos tipos de antimicrobianos. Las células de la biopelícula dispersadas son susceptibles, y muestra que la resistencia de la biopelícula refleja un estado físico o fenotípico reversible. (57).

Planteamiento del problema

La creciente morbilidad de candidosis, ya sea en la variedad clínica localizada o sistémica en pacientes inmunocomprometidos, ha forzado el uso de antifúngicos en esquemas terapéuticos prolongados y de amplio espectro; comprometiendo la condición clínica del hospedero en un binomio de acción a expensas de los factores de patogenicidad del agente etiológico y los efectos toxicológicos ocasionados por la acción de los antifúngicos de elección terapéutica.

¿Cuál será la frecuencia de hongos levaduriformes formadores de biopelícula y cuál será la implicación probable de este factor de virulencia en la evolución clínica de los pacientes?

Justificación

La relevancia clínica del estudio de los mecanismos de patogenicidad en el género *Candida*, tales como la formación de biopelícula, reside en la implicación directa sobre la acción fungicida eficaz de los antifúngicos de primera elección, ya que la eficacia de un antifúngico no sólo depende del espectro de acción, sino también del acceso hacia los sitios diana durante la fase logarítmica de crecimiento, careciendo de acceso y reconocimiento en la interacción molecular sobre las estructuras micóticas localizadas al abrigo de la biopelícula. Asimismo, bajo este concepto, es factible la práctica de la prescripción médica mediante un método razonado y correcto sobre el uso adecuado de los antimicrobianos.

Objetivos

General:

Estudiar y correlacionar la formación de biopelícula con el perfil de sensibilidad para antifúngicos en especies del género *Candida* de importancia médica.

Particulares:

- 1.- Determinar la incidencia y datos epidemiológicos de candidosis en la población de estudio.
- 2.- Evaluar la capacidad de desarrollo de biopelícula *in vitro*, de los aislamientos clínicos levaduriformes sobre superficie artificial.
- 3.- Obtener el perfil de respuesta a los antifúngicos flucitosina, anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina y micafungina para los aislamientos levaduriformes en estudio, mediante técnica *in vitro* en método semi-automatizado.

Diseño de investigación

Se realizó una investigación observacional de diseño transversal debido a que la recolección de datos se realizó en un solo periodo de tiempo.

Criterios de inclusión

Cepas de hongos levaduriformes pertenecientes al género *Candida*, aislados de pacientes pediátricos con diagnóstico establecido de candidosis en diversidad clínica.

Criterios de exclusión

Cepas de hongos levaduriformes que no pertenecen a los géneros *Candida*, aislados de pacientes pediátricos con diagnóstico establecido de micosis invasiva en diversidad clínica.

Universo de estudio

Cepas levaduriformes aisladas de pacientes pediátricos del Hospital para el Niño Poblano.

Tamaño de muestra

Cepas levaduriformes aisladas de pacientes pediátricos con diagnóstico establecido de micosis invasiva obtenidas durante el periodo septiembre 2014 a enero 2015.

Ubicación espacio-temporal

Laboratorio Clínico del Hospital para el Niño Poblano; septiembre 2014-enero 2015.

Lugar de muestreo

Laboratorio Clínico del Hospital para el Niño Poblano. Puebla, México.

Metodología

1.- Se realizó resiembra a los aislamientos clínicos levaduriformes ya conocidos e identificados en género y especie en agar dextrosa Sabouraud al 4%, provenientes de los pacientes inmunocomprometidos con diagnóstico clínico de micosis invasiva.

2.- Se incubó en condiciones de atmósfera ambiente, temperatura de 37 °C y período de tiempo de 24-48 horas.

3.- Para la prueba de formación de biopelícula se depositó una asada del crecimiento obtenido en tubos de ensaye, de vidrio, boca ancha, cierre hermético, con 4 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI).

4.- Se incubó en condiciones de atmósfera ambiente, temperatura de 37 °C y período de tiempo de 24-72 horas.

5.- Se realizaron observaciones comparativas en las paredes del tubo de ensaye con diferentes fuentes de luz y revelado con safranina.

6.- Del crecimiento levaduriforme obtenido, también se realizó una suspensión en solución fisiológica 0.45% con concentración en unidades de transmitancia de 1.800-2.200, equivalente a 1.5-2.0 en la escala de turbidez Mc Farland.

7.- Con esta suspensión levaduriforme, se realizaron pruebas de sensibilidad a los antifúngicos flucitosina, anfotericina B, fluconazol, voriconazol, caspofungina y micafungina, por método cualitativo y concentración mínima inhibitoria en microplaca en sistema automatizado Vitek 2-Biomérieux TM.

8.- Se realizaron observaciones y recopilación de datos.

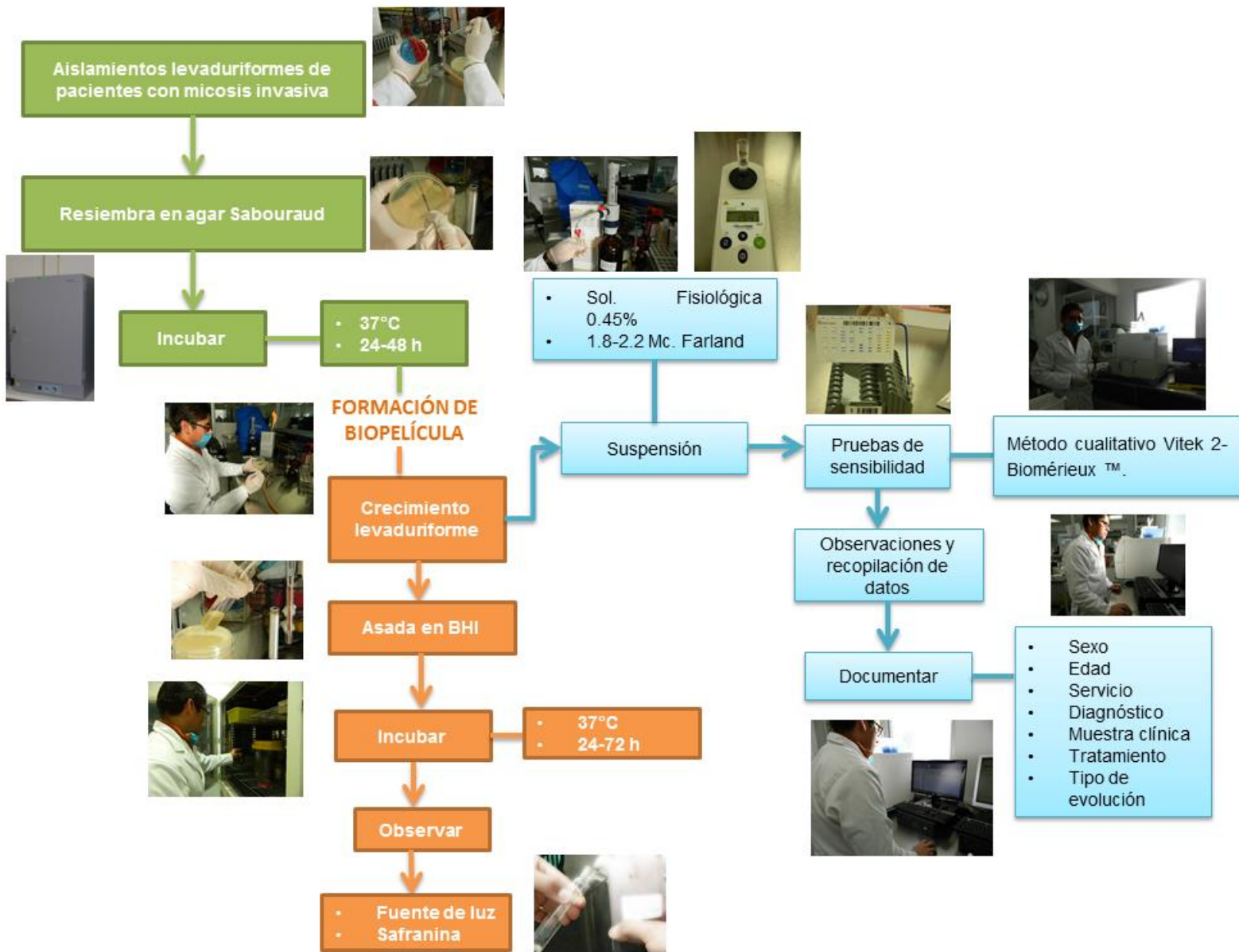
9.- Se documentaron mediante archivo clínico, los casos clínicos relacionados con las cepas levaduriformes estudiadas para realizar correlación de datos obtenidos.

10.- Para la documentación de casos clínicos relacionados, se registró: sexo, edad, servicio, diagnóstico, muestra clínica de origen de la cepa, tratamiento antifúngico administrado, tipo de evolución clínica del paciente. **Metodología:** (25, 28, 29).

Material

- *Bata blanca de algodón
- *Guantes de látex
- *Cubreboca
- *Mechero Bunsen
- *Contenedores para RPBI
- *Aislamientos clínicos levaduriformes identificados en género y especie
- *Asa bacteriológica
- *Safranina
- *Fuente de luz
- *Tubos con caldo BHI (4 mL)
- *Tubos de ensaye de vidrio, boca ancha, cierre hermético.
- *Casetes de prueba para levaduras de sistema VITEK
- *Placas de agar dextrosa Sabouraud al 4%
- *Solución fisiológica 0.45%
- *Sistema Vitek 2-Biomérieux TM.
- *Incubadora a 37 °C

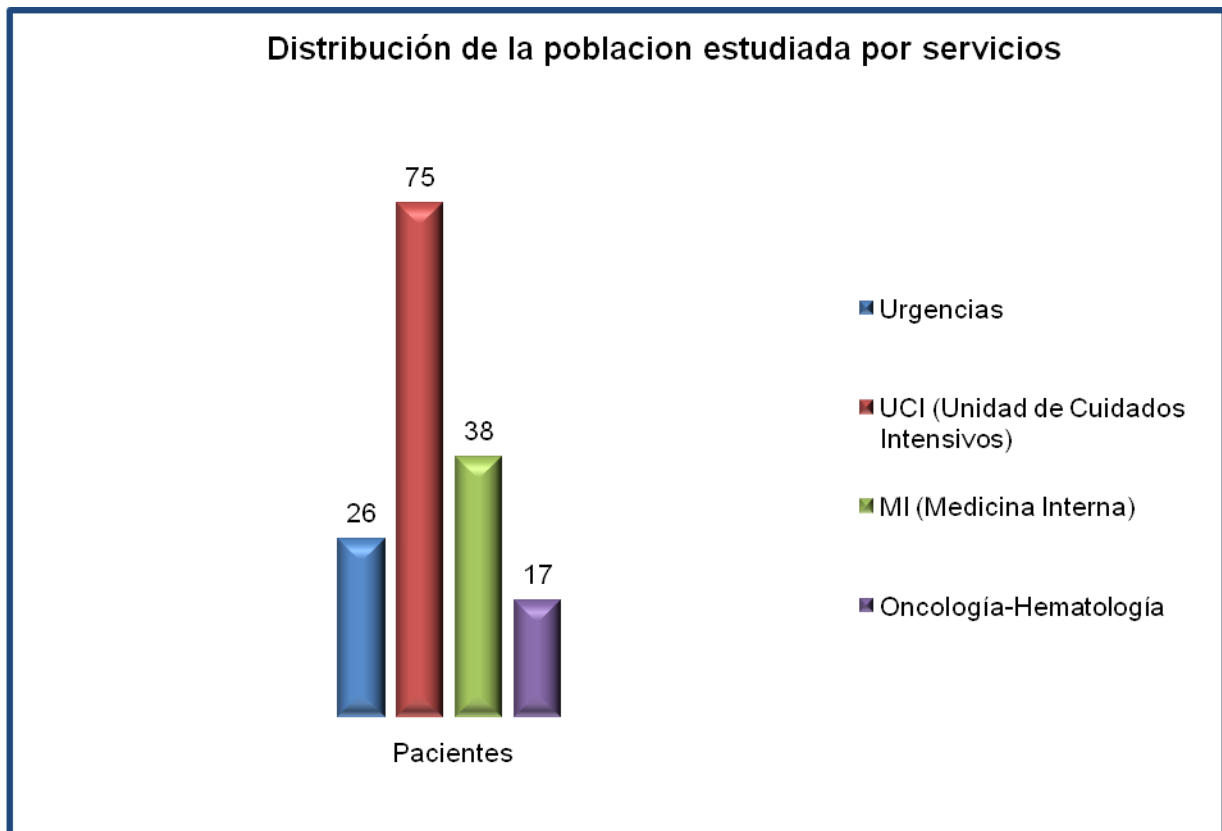
DIAGRAMA DE TRABAJO



Resultados

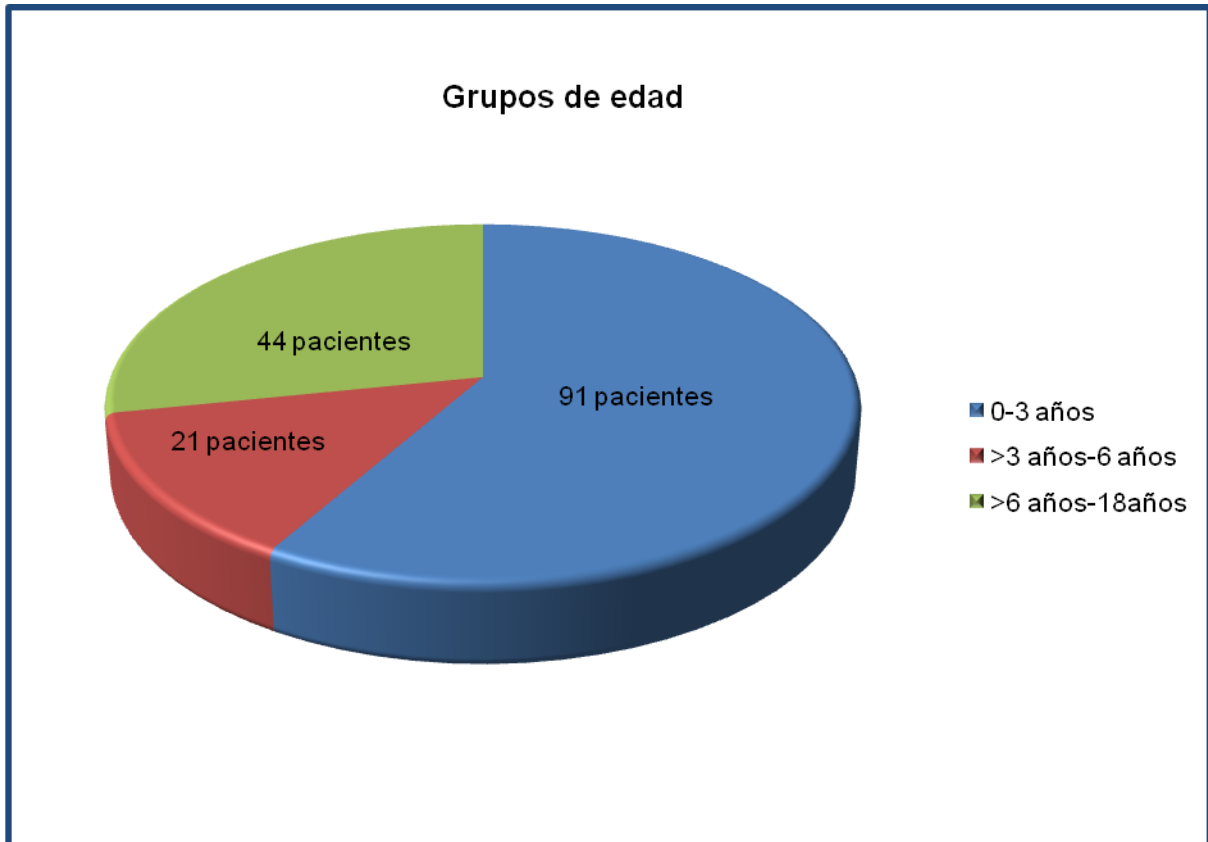
Se estudió una población total de 156 pacientes pediátricos con diagnóstico establecido de candidosis en diversidad clínica del Hospital para el Niño Poblano, en el periodo de septiembre 2014-enero 2015.

Gráfica 1.- Distribución de la población estudiada por servicios



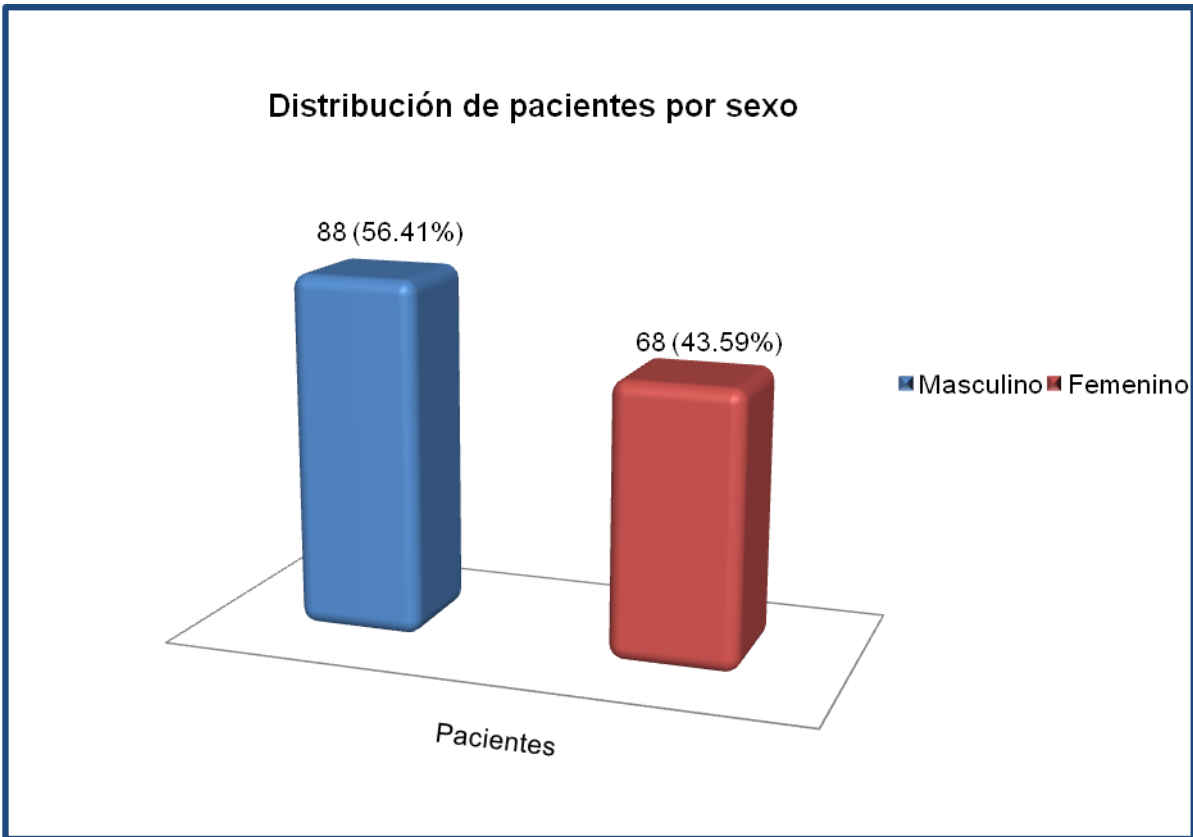
En este gráfico se observa que la Unidad de Cuidados Intensivos obtuvo la mayor frecuencia de pacientes con micosis invasiva, debido al uso de dispositivos artificiales de apoyo clínico, así como la condición de inmunosupresión de los pacientes.

Gráfica 2.- Grupos de edad



En el gráfico anterior se observan las edades promedio de los pacientes estudiados, mostrando una alta tendencia hacia pacientes pediátricos de 0 a 3 años de edad; esto se debe a que la microflora y la inmunidad local de los pacientes que limitan su crecimiento están insuficientemente desarrollados.

Gráfica 3.- Distribución de pacientes por sexo



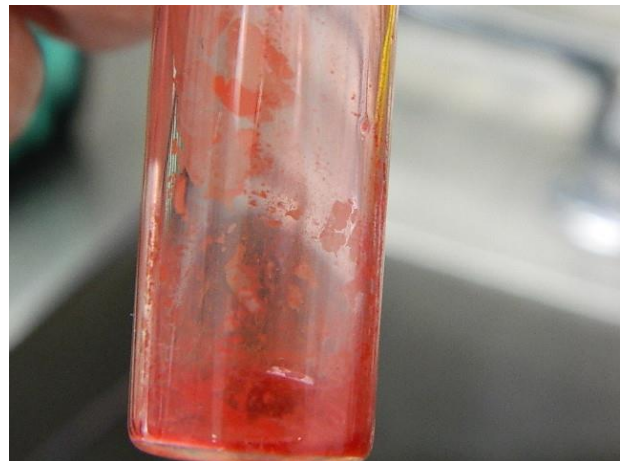
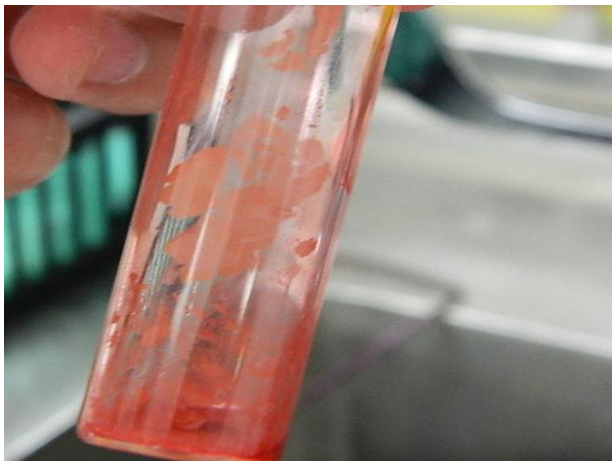
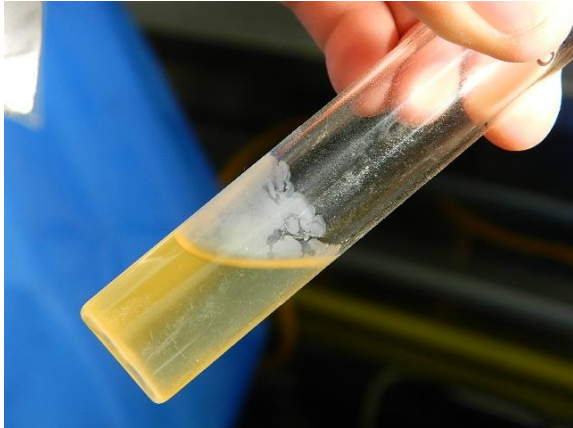
En este gráfico se muestra el total de pacientes pediátricos estudiados, así como la distribución por sexo de los mismos en relación a los casos de micosis invasiva, lo cual demuestra la susceptibilidad del sexo masculino hacia este tipo de infecciones.

Tabla 1.- Distribución de aislamientos por agente etiológico identificado y formación de biopelícula.

Hongo levaduriforme	Formación de biopelícula	No formación de biopelícula	Total
<i>Candida albicans</i>	44	45	89
<i>Candida tropicalis</i>	28	1	29
<i>Candida parapsilosis</i>	12	6	18
<i>Candida lusitanae</i>	3	6	9
<i>Candida glabrata</i>	1	5	6
<i>Candida krusei</i>	3	0	3
<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	2
TOTAL	59%	41%	156

En esta tabla se puede observar la frecuencia y agentes etiológicos identificados en los pacientes, así como la capacidad de formación de biopelícula; se observa que el género *Candida* prevalece como el principal agente etiológico de micosis invasiva, siendo *Candida albicans* la especie de mayor frecuencia; cabe destacar que *Candida tropicalis* formó biopelícula en casi 100% de los aislamientos obtenidos, lo que demuestra la gran capacidad de esta especie para formar biopelícula, en contraste con *Candida glabrata* cuya capacidad de formación de biopelícula no supera el 20%. Por otra parte *Trichosporon asahii*, aunque en baja frecuencia, se incluyó dentro del grupo de estudio como patógeno emergente, destacando la capacidad de desarrollar biopelícula en la mitad del número de aislamientos obtenidos.

Observación de formación de biopelícula con fuente de luz y revelado con safranina.



Observación de biopelícula al microscopio.

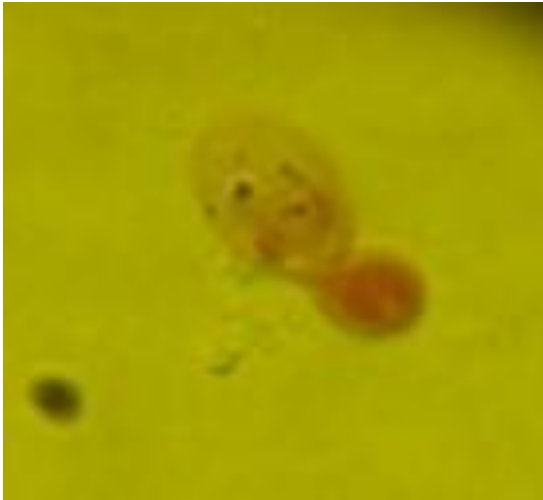


Tabla 2.- Respuesta a los antifúngicos *in vitro* observada en los hongos levaduriformes estudiados.

Hongo levaduriforme	Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Flucitosina	Caspofungina	Micafungina
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Candida lusitanae</i>	S	S	R	S	S	S
<i>Candida glabrata</i>	S	S	S	S	S	S
<i>Candida krusei</i>	R	S	S	S	S	S

En esta tabla se puede apreciar el perfil de sensibilidad a antifúngicos *in vitro* realizados a cada especie, mostrando la mayoría sensibilidad a los antifúngicos de elección, excepto para las especies *Candida krusei* y *Candida lusitanae*, de las cuales, dicho resultado fue atribuible a la resistencia innata a fluconazol por parte de *Candida krusei* y a anfotericina B por parte de *Candida lusitanae*.

<i>Trichosporon asahii</i>	Sin resultado	Sin resultado	Sin resultado	Sin resultado	Sin resultado	Sin resultado
----------------------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------

Aunque *Trichosporon asahii* no está incluido en el grupo de estudio de este trabajo, se consideró pertinente resaltar esta información obtenida a razón de la capacidad para desarrollar biopelícula observada en dicho organismo levaduriforme de importancia médica.

Tabla 3.- Respuesta a los antifúngicos *in vivo*

Número total de aislamientos	Hongo levaduriforme	Tratamiento de primera elección: Fluconazol		Tratamiento de segunda elección: anfotericina B	Tratamiento de tercera elección: Voriconazol/caspofungina
		Evolución clínica satisfactoria	Evolución clínica no satisfactoria		
89 aislamientos	<i>Candida albicans</i>	69 de 89 pacientes.	20 pacientes.	20 pacientes.	No necesario.
29 aislamientos	<i>Candida tropicalis</i>	0 pacientes	29 pacientes	5 de 29 pacientes.	20 pacientes con Voriconazol. 4 pacientes con Caspofungina.
18 aislamientos	<i>Candida parapsilosis</i>	5 de 18 pacientes.	13 de 18 pacientes.	8 de 13 pacientes.	5 pacientes con Voriconazol.
9 aislamientos	<i>Candida lusitanae</i>	8 de 9 pacientes.	1 paciente.	1 paciente.	1 paciente con Voriconazol
6 aislamientos	<i>Candida glabrata</i>	4 de 6 pacientes.	2 pacientes.	2 de 6 pacientes.	No necesario.
3 aislamientos	<i>Candida krusei</i>	0 pacientes	3 pacientes	3 de 3 pacientes.	No necesario.

La tabla anterior muestra la respuesta a los antifúngicos *in vivo*. Es importante señalar que todos los pacientes recibieron tratamiento antifúngico de inicio con fluconazol. En los aislamientos de *Candida albicans*, se observa que fue necesario aplicar tratamiento de segunda elección (anfotericina B) a 20 pacientes, ya que no tuvieron una evolución clínica satisfactoria con el primer tratamiento, logrando con anfotericina B mejoría en el paciente.

29 pacientes fueron diagnosticados con micosis invasiva causada por *Candida tropicalis*; los 29 pacientes fueron tratados inicialmente con fluconazol, sin embargo, ninguno tuvo una evolución clínica satisfactoria a este tratamiento, por lo cual fue necesario complementar el esquema terapéutico con anfotericina B. En esta nueva terapia antifúngica, sólo 5 de 29 pacientes presentaron mejoría; sin embargo, 24 tuvieron que ser tratados con un tratamiento nuevo, el cual consistía en la aplicación de voriconazol a 20 de los pacientes y caspofungina a 4 pacientes, mostrando una evolución clínica satisfactoria con este tratamiento.

Para el caso de *Candida parapsilosis*, se observó que 13 de 18 pacientes no evolucionaron satisfactoriamente con fluconazol, por lo cual se complementó el tratamiento con anfotericina B; sin embargo, de esos 13 pacientes, solo 8 respondieron satisfactoriamente, por lo que a los 5 restantes fue necesario cambiar el esquema terapéutico con voriconazol, obteniendo finalmente una respuesta favorable.

Candida lusitaniae mostró una marcada sensibilidad hacia fluconazol; sin embargo, el paciente que no respondió favorablemente, tuvo que ser tratado con voriconazol debido a la resistencia que tuvo al complementar el tratamiento con anfotericina B.

Candida glabrata mostró una marcada sensibilidad a fluconazol. Solo en 2 de 6 casos fue necesario complementar el esquema con anfotericina B, obteniendo una evolución clínica satisfactoria en éstos pacientes.

Candida krusei, mostró resistencia innata en un 100% al tratamiento de primera elección, por lo cual se complementó el tratamiento con anfotericina B, donde finalmente lograron una evolución clínica satisfactoria.

En el caso de *Trichosporon asahii*, se observa resistencia en un 100% a fluconazol; por otra parte, también se observa resistencia de este hongo levaduriforme a anfotericina B en un 50%, por lo cual fue necesario utilizar caspofungina como tratamiento de tercera elección. Sin embargo, la evolución clínica del paciente no fue satisfactoria.

2 aislamientos	<i>Trichosporon asahii</i>	0 pacientes	2 pacientes	1 de 2 pacientes	1 paciente con Caspofungina.
-------------------	--------------------------------	-------------	-------------	------------------	---------------------------------

La elaboración de esta tabla se fundamentó en los conceptos o definiciones siguientes:

Se considera **evolución satisfactoria** si después de 10 días de tratamiento con el antifúngico de primera elección el paciente ya no presenta datos sépticos: fiebre, alteraciones en la frecuencia cardíaca y estado general y sin aislamiento del agente etiológico en los cultivos de control.

Se considera **evolución clínica no satisfactoria** cuando después de 10 días de tratamiento antifúngico de primera elección, persisten en el paciente datos de estado séptico y se obtienen aislamientos repetidos del agente etiológico en los cultivos de control, por lo cual es necesario complementar el esquema de tratamiento con la adición de otro antifúngico, o bien, cambiar el esquema antifúngico.

Tabla 4.- Distribución de las cepas aisladas asociadas a patologías

Hongo levaduriforme	Neumonía	Fibrosis quística	Cardiopatías (Tetralogía de Fallot)	Urosepsis	Total
<i>Candida albicans</i>	44	13	6	26	89
<i>Candida tropicalis</i>	21	1	2	5	29
<i>Candida parapsilosis</i>	13	1	1	3	18
<i>Candida lusitanae</i>	7	0	0	2	9
<i>Candida glabrata</i>	3	0	1	2	6
<i>Candida krusei</i>	3	0	0	0	3
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0	0	1	2
TOTAL	92	15	10	39	156

En esta tabla se puede observar que candidosis mostró una marcada tendencia hacia la asociación con patologías desarrolladas en el sistema respiratorio como sitio diana, representada dicha asociación con neumonía, fibrosis quística e incluso cardiopatías congénitas (tetralogía de Fallot), ya que involucra la afectación directa en vías respiratorias debido a la comunicación anómala de venas pulmonares y comunicación interventricular. Se observa que *Candida albicans* es el agente más frecuente asociado a neumonía y urosepsis, debido a que las patologías de base que presentaron los pacientes (leucemia linfocítica con neutropenia profunda, traumatismo craneoencefálico o politraumatismo) son un factor de riesgo para que se produzcan estas infecciones.

Tabla 5.- Relación entre cepas con formación de biopelícula y patologías identificadas en el pacientes.

		Patologías respiratorias			Tracto urinario	Total
Hongo levaduriforme	Biopelícula (+)	Neumonía	Fibrosis quística	Cardiopatías (Tetralogía de Fallot)	Urosepsis	
<i>Candida albicans</i>	44 casos de 89 cepas aisladas. (49.43%)	18 de 44 casos con biopelícula. (40.90%)	12 de 13 casos con biopelícula. (92.30%)	4 de 6 casos con biopelícula. (66.66%)	10 de 26 casos con biopelícula. (38.46%)	44 casos con biopelícula.
<i>Candida tropicalis</i>	28 casos de 29 cepas aisladas. (96.55%)	21 de 21 casos con biopelícula. (100%)	1 de 1 caso con biopelícula. (100%)	2 de 2 casos con biopelícula. (100%)	4 de 5 casos con biopelícula. (80%)	28 casos con biopelícula.
<i>Candida parapsilosis</i>	12 casos de 18 cepas aisladas. (66.66%)	7 de 13 casos con biopelícula. (53.84%)	1 de 1 caso con biopelícula. (100%)	1 de 1 caso con biopelícula. (100%)	3 de 3 casos con biopelícula. (100%)	12 casos con biopelícula.
<i>Candida lusitaniae</i>	3 casos de 9 cepas aisladas. (33.33%)	3 de 7 casos con biopelícula. (42.85%)	Sin casos registrados.	Sin casos registrados.	Sin casos registrados.	3 casos con biopelícula.
<i>Candida glabrata</i>	1 caso de 6 cepas aisladas. (16.66%)	Sin casos registrados.	Sin casos registrados.	1 de 1 caso con biopelícula. (100%)	Sin casos registrados.	1 caso con biopelícula.
<i>Candida krusei</i>	3 casos de 3 cepas aisladas. (100%)	3 de 3 casos con biopelícula. (100%)	Sin casos registrados.	Sin casos registrados.	Sin casos registrados.	3 casos con biopelícula.
<i>Trichosporon asahii</i>	1 caso de 2 cepas aisladas. (50%)	Neumonía asociada a cardiopatía	Sin casos registrados.	1 de 1 caso con biopelícula. (100%)	Sin casos registrados.	1 caso con biopelícula.

La tabla anterior muestra el porcentaje de cepas formadoras de biopelícula relacionadas con las patologías diagnosticadas en los pacientes; se puede observar que en las infecciones respiratorias especies como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* son formadoras de biopelícula desde 60% hasta 100%. Por otra parte, el uso de dispositivos artificiales (sondas, catéteres, cánulas orotraqueales) es considerado un factor de riesgo para desarrollar una

micosis invasiva; y a su vez, favorece el ambiente propicio para el desarrollo de biopelícula por parte de las etiologías ya mencionadas.

Discusión

En este trabajo se estudió una población total de 156 pacientes pediátricos con diagnóstico establecido de candidosis en diversidad clínica del Laboratorio del Hospital para el Niño Poblano durante el periodo septiembre 2014-enero 2015, donde se obtuvo una incidencia de micosis invasivas por hongos levaduriformes del género *Candida* de 98.7% y 1.3% para *Trichosporon asahii*.

En este estudio se encontró una tendencia hacia el sexo masculino en la mayoría de los casos. Esto puede deberse a que existen criterios acerca de que el varón es más susceptible a las infecciones, principalmente desde el nacimiento hasta los 15 años de vida, debido a que en las mujeres influye el cromosoma X, el cual está encargado de dar mayor apoyo inmunológico y algunos factores asociados con la síntesis de inmunoglobulinas, que le confieren una mayor protección, lo cual coincide con lo reportado por Mengana y colaboradores. (44). Por otra parte, hubo un predominio en pacientes con una edad promedio de 0 a 3 años, esto se debe a que los pacientes son más susceptibles a enfermedades por su condición inmunológica en edades extremas, por ejemplo los lactantes menores y pacientes geriátricos.

Candida albicans fue el principal agente etiológico de micosis invasiva en este estudio, lo cual concuerda con lo reportado por Lora Téllez (34, 36, 37, 38, 39), Quindós y colaboradores (53). La mayoría de las cepas aisladas desarrollaron biopelícula en la mayoría de los casos, lo cual puede deberse a que la biopelícula es un mecanismo de supervivencia por parte del hongo levaduriforme, principalmente cuando colonizan dispositivos artificiales de apoyo clínico como sondas y catéteres, e incluso favorece la adherencia celular (53). La mayoría de las cepas aisladas, a excepción de *Candida lusitanae*, *Candida glabrata* y *Trichosporon asahii*, desarrollaron biopelícula en más del 60% de los casos registrados y en el caso de *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, 96% y 100%,

respectivamente, lo que concuerda con lo reportado por Lora Téllez (34, 36, 37, 38, 39).

A pesar de que *Candida krusei* se aisló solo en 3 casos, su desarrollo de biopelícula en un 100% es relevante por su marcada resistencia a antifúngicos de primera elección, en contraste con *Candida albicans* que, a pesar de tener la mayor frecuencia de casos, puede o no responder a tratamientos antifúngicos de primera elección como los azoles. La formación de biopelícula depende de la capacidad de adherencia del microorganismo a las superficies.

El tiempo de análisis para los ensayos *in vitro* del perfil de sensibilidad a antifúngicos fue de 14 a 18 horas, debido a que el sistema Vitek solo puede evaluar la sensibilidad del hongo en la fase logarítmica de crecimiento, razón por la cual en el análisis no se incluye la probabilidad de desarrollo de otras estructuras micóticas, como hifas.

La mayoría de las cepas levaduriformes mostraron sensibilidad a todos los antifúngicos seleccionados. *Candida lusitaniae* presentó resistencia innata a Anfotericina B, debido a que el sistema Vitek posee información acerca de la resistencia de esta especie; lo anteriormente descrito también aplica para el caso de *Candida krusei*.

La resistencia a fluconazol por parte de *C. krusei* podría deberse a la sobreexpresión del gen *ERG11*, causando interferencia sobre la acción de la 14 α -dimetilasa, alteraciones en otras enzimas de la biosíntesis del ergosterol y la disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco. (51).

Se observó que el sistema Vitek no pudo evaluar la sensibilidad a antifúngicos para *Trichosporon asahii*; es probable que esto se deba a que el hongo desarrolla diversas estructuras en su morfología durante la fase logarítmica de crecimiento, como levaduras, blastoconidios (levaduras en gemación), artroconidios y micelio artrosporado, para los cuales los antifúngicos no encuentran sitio diana de ataque. (34, 36, 37, 38, 39).

La respuesta a los antifúngicos *in vivo* demostró que la formación de biopelícula se relaciona directamente con la acción eficaz del antifúngico seleccionado, ya que el tratamiento de primera elección (fluconazol) no fue suficiente para la evolución satisfactoria del paciente. Esto se debe a que la biopelícula representa una estrategia de supervivencia, pues proporciona una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana (antifúngicos); tal es el caso específico de *Candida tropicalis*, que en 28 de 29 cepas aisladas desarrollaron biopelícula, con lo cual se demostró la alta capacidad de esta especie para formar biopelícula.

Se reitera que el resultado de *Candida tropicalis*, el cual presentó resistencia a fluconazol de acuerdo a la referencia del fracaso en el tratamiento *in vivo*; y a pesar de que las pruebas de sensibilidad *in vitro* mostraron actividad antifúngica del fluconazol sobre dicho microorganismo, puede inferirse como una posible causa que la biopelícula es responsable de la resistencia al antimicrobiano, impidiendo el acceso al sitio diana de ataque.

Anfotericina B mostró un resultado más eficaz, ya que la formulación lipídica de este antifúngico es activo contra biopelículas a diferencia del fluconazol, de acuerdo a lo descrito por Pemán y colaboradores (51). Sin embargo, se requirió tratamiento con equinocandinas (caspofungina) y triazoles (voriconazol) en 31 pacientes.

Es importante señalar que para indicar un tratamiento adicional, o en su caso el cambio total del tratamiento, es necesario evaluar la evolución del paciente, el cual se basará en la ausencia de fiebre, ausencia de sintomatología y el no aislamiento del microorganismo en los cultivos de control posterior a los primeros 10 días de tratamiento, lo cual coincide con lo reportado por Lora Téllez. (34, 36, 37, 38, 39).

Neumonía y urosepsis fueron las patologías que más se asociaron con candidosis invasiva. En el caso de neumonía, se observa relación con al menos 60% de los pacientes cuya patología de base fue leucemia linfocítica con neutropenia

profunda. El resto presentaba traumatismo craneoencefálico o politraumatismo. Debido a esto, la mayoría de los pacientes ingresaron a la unidad de cuidados intensivos, ya que necesitaban de un dispositivo artificial como cánulas orotraqueales como ejercicio de respiración asistida.

Estos dispositivos se colonizaron por el grado de inmunocompromiso de los pacientes, los cuales al no tener un mecanismo de defensa, son susceptibles a desarrollar enfermedades micóticas a partir de la misma flora normal del paciente, además de tener una estancia muy prolongada en dicha unidad. Lo anterior demuestra que las infecciones por hongos levaduriformes son en su mayoría de origen endógeno, lo cual concuerda con reportes encontrados en la literatura médica mundial. (1-64).

La unidad de cuidados intensivos fue el área con más casos de micosis oportunistas, lo cual concuerda con lo reportado con Chandra. (10).

Urosepsis fue la segunda patología asociada con candidosis, siendo *Candida albicans* la especie predominante. Sin embargo, se observa una incidencia importante con *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* principalmente, lo cual concuerda con lo descrito por Lora Téllez (34, 36, 37, 38, 39).

Conclusiones

Se estudió y correlacionó la formación de biopelícula con el perfil de sensibilidad para antifúngicos en especies del género *Candida* de importancia médica; observándose una correlación del 59% para la formación de biopelícula en las cepas estudiadas; de las cuales el 73% mostró resistencia al tratamiento *in vivo* de primera elección.

Se determinó una incidencia de 98.7% de candidosis, con datos epidemiológicos de sexo y edad; con predominio sobre el sexo masculino y grupo de edad lactantes, en la población de estudio.

Se evaluó satisfactoriamente la capacidad de desarrollo de biopelícula mediante técnica *in vitro*, de los aislamientos clínicos levaduriformes sobre superficie artificial.

Se obtuvo convenientemente el perfil de respuesta a los antifúngicos flucitosina, Anfotericina B, fluconazol, Voriconazol, Caspofungina y Micafungina para los aislamientos levaduriformes estudiados, mediante técnica *in vitro* en método semi-automatizado.

Comentarios finales (Conclusiones)

Se obtuvo una incidencia de 98.7% de candidosis invasiva, demostrando que el género *Candida* es el principal agente etiológico responsable de micosis invasivas por hongos levaduriformes.

Se obtuvo una frecuencia de 42.94% en especies de *Candida no albicans* y *Trichosporon asahii* en los aislamientos obtenidos; con lo cual se enfatiza la importancia clínica como patógenos emergentes de los hongos levaduriformes ya mencionados.

Como características epidemiológicas observadas, dentro de la población pediátrica de estudio, los lactantes fue el grupo de edad más afectado por micosis invasivas de etiología levaduriforme, con tendencia hacia el sexo masculino en dicho grupo.

La utilización de dispositivos artificiales de apoyo clínico durante un largo periodo de tiempo en la Unidad de Cuidados Intensivos propicia a que exista una colonización por parte de hongos oportunistas.

El uso inadecuado de antifúngicos, específicamente como tratamiento profiláctico para pacientes neutropénicos, es un factor predisponente para el desarrollo de resistencia antifúngica por parte de los hongos levaduriformes.

En este estudio, se observó asociación entre el desarrollo de biopelícula de las cepas levaduriformes aisladas y la resistencia antifúngica desarrollada *in vivo* de acuerdo a la evolución clínica del paciente; lo cual repercutió en una acción ineficaz de los antifúngicos de primera elección, obligando a utilizar combinación de antifúngicos o cambiar por completo un tratamiento.

Es necesario tener un monitoreo constante entre el perfil de sensibilidad a antifúngicos y la aplicación del tratamiento al paciente, ya que las condiciones entre uno y otro nunca son las mismas; por otra parte, el perfil de sensibilidad a antifúngicos se realiza en fase logarítmica de crecimiento, fase en la cual el hongo no produce la biopelícula.

Es importante señalar que, la información derivada del estudio de capacidad de formación de biopelícula de cepas levaduriformes implicadas en una patología, es de gran utilidad clínica para el médico tratante; al complementar el reporte final escrito concerniente al estudio de la identificación etiológica y perfil de sensibilidad *in vitro* a antifúngicos.

Glosario

Abiótico: Medio que por sus características no puede albergar ninguna forma de vida.

Anoxemia: Disminución de oxígeno en la sangre. También se le conoce como anoxia.

Antígeno: Cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor de células T.

Candidosis invasiva: Infección por levaduras del género *Candida* en sangre y su posterior diseminación en otros órganos profundos.

Candidosis localizada: Infección por levaduras del género *Candida* que afecta a un único órgano, siendo los más frecuentes: pulmones, riñones, sistema nervioso, ojos, endocardio.

Cánula: Tubo de calibre, forma y materia variables abierto por ambos extremos, que se introduce en una abertura natural o accidental del cuerpo, generalmente con un trocar en su interior en el acto de la introducción.

Catalizador: Sustancia que hace más rápida la velocidad de una reacción química sin participar en ella.

Catéter: Instrumento de consistencia blanda o rígida, destinado a practicar el cateterismo.

Célula diana: Célula que tiene un receptor específico que reacciona con una hormona, antígeno, anticuerpo, antibiótico, célula T sensibilizada u otra sustancia específica.

Depleción: Disminución de la cantidad de sangre del organismo.

Disgregación: Separación de las partículas que constituyen una sustancia cuando esta se disuelve en un líquido.

Endoftalmitis: Tipo de inflamación que afecta a todas las estructuras del ojo, principalmente a la cavidad vítrea.

Enzima: Molécula de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas.

Estomatitis: Inflamación de la boca a nivel de su mucosa.

Ergosterol: Componente de la membrana celular del hongo cuya función es ser precursor de vitaminas, lípidos, hormonas y sales biliares.

Escisión: Ablación de una porción poco voluminosa de un tejido o de un órgano.

Farnesol: Líquido incoloro que se extrae a partir de aceites de plantas tales como citronella, neroli, ciclamen y tuberosa.

Fenotipo: Cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento.

Genotipo: Información genética que posee un organismo en particular en forma de ADN.

Hematógeno: Que toma origen en la sangre.

Inanición: Fenómeno por el cual un ser privado de alimentación continúa viviendo a expensas de sus reservas celulares hasta que la desasimilación le ha hecho perder un 40% de su peso.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado. La incidencia muestra la probabilidad de que una persona en esa población resulte afectada por la enfermedad.

Inmunocompromiso: Estado en el cual el paciente tiene defectos en sus mecanismos de defensa naturales, lo cual resulta en un mayor riesgo de infección.

Inmunosupresión: Inhibición de uno o más componentes del sistema inmunitario adaptativo o innato.

Levadura: Hongo microscópico celular de la familia de las exoásceas.

Lisis: Proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida del material intracelular.

Micosis: Toda enfermedad ocasionada por un hongo parásito, que se desarrolla sobre o en un organismo humano o animal.

Morbilidad: Proporción de personas que se enferman en un sitio y tiempo determinados.

Mortalidad: Relación entre el número de defunciones de una aglomeración determinada en un tiempo dado y el número de individuos que la componen.

Patógeno: Organismo que produce enfermedad.

Polímero: Macromolécula formada por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros.

Polisacárido: Polímero compuesto por una extensa sucesión de monosacáridos, unidos entre sí a través de enlaces glucosídicos.

Profilaxis: Estudio de las condiciones y de las precauciones propias para evitar las enfermedades.

Resistencia clínica: Crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, aunque en éste existan concentraciones terapéuticas del fármaco en cuestión. La resistencia clínica está relacionada con distintos factores dependientes del fármaco, del paciente o de ambos.

Resistencia intrínseca o innata: Es aquélla que presentan todas las cepas de una misma especie de un hongo y no tiene relación con la exposición al antifúngico.

Resistencia primaria: Es la que ocurre en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico cuando aparecen de forma espontánea cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.

Resistencia secundaria o adquirida: Es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.

Saprófito: Que vive a expensas de la materia corrompida.

Sésiles: Órganos u organismos insertados directamente a un sustrato por su base.

Sonda: Instrumento de metal, caucho ebonita, etc., que sirve para la exploración de un conducto o cavidad, o para la evacuación del contenido de un órgano.

Urosepsis: Fiebre séptica consecutiva a una infección procedente de los órganos urinarios o de sus inmediaciones.

Anexos

Medidas de bioseguridad en el laboratorio

Se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos, clasificados por grupos de riesgo (1, 2, 3, 4).

Grupo de riesgo 1 (Riesgo individual y poblacional escaso o nulo).	Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o en animales.
Grupo de riesgo 2 (Riesgo individual moderado; riesgo poblacional bajo).	Agentes patógenos que pueden causar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, población, ganado o el medio ambiente. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
Grupo de riesgo 3 (Riesgo individual elevado; riesgo poblacional bajo).	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
Grupo de riesgo 4 (Riesgo individual y poblacional elevado).	Agentes patógenos que suelen causar enfermedades graves en los humanos o animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Tabla 5.- Clasificación de los grupos de riesgo según la Organización Mundial de la Salud. (47).

Niveles de bioseguridad en el laboratorio

Los laboratorios se clasifican de la siguiente manera de acuerdo a su nivel de bioseguridad. Los niveles de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y nivel de procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo.

Grupo de riesgo.	Nivel de bioseguridad.	Tipo de laboratorio.	Prácticas de laboratorio.	Equipo de seguridad.
1	Básico nivel 1	Enseñanza básica. Investigación.	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.
2	Básico nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación.	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico.	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles.
3	Contención nivel 3	Diagnóstico especial. Investigación.	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire.	CSB, además de otros medios de contención primaria para todas las actividades.
4	Contención máxima nivel	Unidades de patógenos	Prácticas de nivel 3 más	CSB de clase 3 o trajes

	4	peligrosos.	cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos.	presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado.
--	---	-------------	--	--

TMA: Técnicas microbiológicas apropiadas. **CSB:** Cámara de seguridad biológica.

Tabla 6.- Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, prácticas y equipo. (47).

Técnica del lavado de manos

El siguiente diagrama ilustra las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud para el lavado de manos.



Figura 7.- Técnica de lavado de manos. (48).

Los 5 momentos para la higiene de las manos

El siguiente diagrama muestra los momentos más importantes en los que hay que lavarse las manos cuando se interactúa con el paciente, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.



Figura 8.- Los 5 momentos para la higiene de manos. (40).

Espectro de actividad de un antibiótico

Un antibiótico es una sustancia química producida por un microorganismo que desarrolla una actividad antimicrobiana. Su origen puede ser:

Natural o biológico: Se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.

Semisintético: Se obtiene a partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural; se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables.

Un agente antimicrobiano debe cumplir tres condiciones como mínimo: poseer actividad antimicrobiana, desarrollar dicha actividad a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped. (49).

Según su acción, los antibióticos pueden diferenciarse en:

Antibióticos bactericidas: Es aquél que es capaz de producir la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso.

Antibióticos bacteriostáticos: Es aquél que logra solamente la inhibición del crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de tal manera que cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. Puede alcanzar un efecto bactericida si se alcanza la concentración adecuada, pero esta concentración no puede alcanzarse en un individuo sin presentar efectos secundarios o debido a la cantidad de antibiótico que debería administrarse. (54).

El espectro de actividad microbiana de un antibiótico representa la distribución de las especies microbianas encontradas en la patología infecciosa humana en tres grupos en función de su sensibilidad/resistencia a este antibiótico. Esta sensibilidad/resistencia se evalúa por la medida de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un número importante de cepas que pertenecen a una misma

especie. De esta manera, se define una especie microbiana como sensible, intermedia (moderadamente sensible) o resistente hacia determinado antimicrobiano respectivamente. Se considera además la resistencia natural (fenotipo salvaje) de una especie frente a un antibiótico, así como la esperada de una o eventuales resistencias adquiridas en el transcurso del tiempo.

Una especie compuesta mayoritariamente de cepas naturalmente sensibles a un antibiótico se define como sensible. Se define como sensibilidad intermedia cuando el antimicrobiano no es más que moderadamente activo sobre la mayoría de las cepas (en estos casos debe incrementarse la dosis para obtener el efecto deseado). En ocasiones, en estas dos categorías se puede constatar la adquisición de mecanismos de resistencia por una fracción de la población. La especie se vuelve inconstantemente sensible o moderadamente sensible. Esta eventualidad obliga a documentar por medio del antibiograma el estado de toda cepa aislada en clínica, puesto que el resultado no es predecible. Es importante, para cada especie y antimicrobiano, conocer la prevalencia de las resistencias adquiridas. Es, por naturaleza, muy variable de un país a otro, de una región o de una ciudad a otra, de un hospital o de un servicio a otro. Estas frecuencias evolucionan igualmente con el tiempo, por lo tanto, surge la necesidad de seguirlas y reevaluarlas permanentemente. Una especie compuesta de cepas naturalmente resistentes a un antibiótico es categorizada como especie resistente. Lo anteriormente descrito se aplica para el caso de una gran mayoría de cepas de una especie dada que sea objeto de una resistencia adquirida.

Por lo tanto, medir la sensibilidad a un antimicrobiano de una cepa microbiana aislada de un paciente para definir el estado sensible, intermedio o resistente, es un problema puntual.

Definir el estado de una especie o de un género microbiano es un problema epidemiológico, sujeto a variación y necesita ser actualizado regularmente. (20).

Antibiograma

El antibiograma es el estudio *in vitro* del comportamiento de los antimicrobianos frente a los diferentes microorganismos responsables de una infección. Cuando se realiza un antibiograma, se trata de reproducir experimentalmente lo que pudiera ocurrir en el huésped, sin que podamos asegurar que su comportamiento en el paciente será el mismo que el observado en la prueba. Afortunadamente, en la mayoría de los casos existe una buena correlación entre la prueba *in vitro* y la efectividad del o los antimicrobianos empleados; sin embargo, no nos debe extrañar que en algunos casos la respuesta de un antimicrobiano *in vitro* no corresponda con la efectividad terapéutica. (55).

La comprensión y buena lectura del antibiograma cobra vital importancia en una perspectiva de responsabilidad pública. Por consiguiente, cuando un microorganismo es aislado en el laboratorio, su caracterización con frecuencia incluye pruebas para detectar la resistencia a antimicrobianos, delimitando así la definición de antibiograma como “la realización de procedimientos *in vitro* para detectar la resistencia a antimicrobianos mediante las pruebas de perfil de sensibilidad disponibles”.

El laboratorio de microbiología clínica es responsable de maximizar el impacto positivo que la información referida a las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos pueda tener sobre el uso de estos agentes para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. De tal forma que, para mantener la calidad en un contexto con recursos decrecientes y resistencia a antimicrobianos en aumento, las estrategias para realizar pruebas de sensibilidad deben planearse con cuidado. Estas estrategias deben tener como metas la aplicabilidad, la precisión y la comunicación.

Aplicabilidad. La decisión de realizar una prueba de sensibilidad debe conceptualizarse bajo criterios tales como: la importancia clínica del aislamiento microbiano, la previsibilidad de la sensibilidad del aislamiento microbiano a los agentes antimicrobianos utilizados con mayor frecuencia contra él, a menudo

denominados fármacos de elección y la disponibilidad de métodos estandarizados confiables para probar el aislamiento.

Precisión. Las estrategias para realizar pruebas de sensibilidad centradas en la producción de resultados exactos deben apoyarse en el uso de metodologías exactas y la revisión de los resultados obtenidos. Por consiguiente, se necesita la selección de los métodos de prueba (ya sea difusión de disco en placa, microdilución en caldo de origen comercial-automatizado) y la consideración cuidadosa de cómo se combinan con mayor eficacia los diferentes métodos para detectar patrones de resistencia importantes y saber cuándo se necesitan pruebas auxiliares o suplementarias, para asegurar de esta forma la obtención de datos exactos y confiables. Por lo tanto, la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos involucra el rastreo de los perfiles de sensibilidad producidos por los microorganismos patógenos que se encuentran dentro de una institución determinada, en una localización geográfica específica. Los datos obtenidos proporcionan información valiosa para monitorear las tendencias de resistencia que aparecen en la flora microbiana local; y es útil también para establecer las pautas del tratamiento empírico, para identificar casos de posible uso inadecuado o excesivo de antimicrobianos. A su vez, la convalidación de resultados por medio de revisión y resolución de los mismos, no sólo aumenta la confiabilidad de los informes del laboratorio para el tratamiento del paciente, sino que también refuerza la credibilidad de los datos de sensibilidad antimicrobiana utilizados para la vigilancia de resistencia y los perfiles de antibiogramas.

Comunicación. A medida que los perfiles de resistencia y sus mecanismos subyacentes se tornan más variados y complejos, el personal del laboratorio clínico debe asegurarse de que la importancia de los datos de sensibilidad sean comunicados con claridad y precisión, de forma que optimice la atención del paciente y el uso de los antimicrobianos.

El antibiograma se debe comprender como la unión de múltiples conceptos que se integran en una sugerencia acerca de la actividad de un antimicrobiano sobre un determinado patógeno presente en un determinado sitio anatómico. Para una

adecuada interpretación es necesario poseer ciertos conocimientos, tanto sobre los mecanismos de resistencia microbiana involucrados, el comportamiento biológico de los agentes antimicrobianos, así como las nociones de farmacocinética y farmacodinamia de los antibióticos.

Incorporados los conceptos antes señalados, no sólo se debe leer el antibiograma, sino que debe analizarse minuciosamente, con lo que se realiza una lectura interpretativa.

Las condiciones para realizar las pruebas de sensibilidad se han estandarizado en forma estricta para cumplir con tres propósitos importantes:

- 1.- Optimizar las condiciones de desarrollo microbiano, para que la inhibición del desarrollo pueda atribuirse al agente antimicrobiano al cual el microorganismo se está exponiendo, y no a limitaciones de nutrientes, temperatura o atmósfera.
- 2.- Optimizar las condiciones para mantener la integridad y actividad del antimicrobiano, de manera que la falta de inhibición del desarrollo microbiano pueda atribuirse a un mecanismo de resistencia asociado al microorganismo y no a la inactivación del fármaco por factores del medio.
- 3.- Mantener la reproducibilidad y la coherencia de los resultados, de manera que el mismo microorganismo produzca el mismo perfil de resistencia, con independencia del laboratorio de microbiología que realiza las pruebas.

Las condiciones estándar para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos se han establecido de acuerdo con numerosas investigaciones de laboratorio. Las pautas y recomendaciones para su uso están publicadas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS); actualmente CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute); y son las siguientes:

- a) El tamaño del inóculo microbiano siempre en fase logarítmica de crecimiento.
- b) El medio de desarrollo. En este también debe considerarse: pH, concentración de cationes, suplementos de sangre y suero, contenido de timidina.

- c) La atmósfera de incubación.
- d) La temperatura de incubación.
- e) El tiempo de incubación.
- f) Las concentraciones de antimicrobianos probadas.

Aunque la estandarización de las condiciones *in vitro* es esencial, el uso de condiciones estándares impone algunas limitaciones a considerar. La más notable es que las condiciones del ensayo de laboratorio, de ninguna manera imitan el medio *in vivo* en el sitio de la infección, en el que el agente antimicrobiano y los microorganismos interactúan realmente. Además, se debe considerar la influencia de otros factores en la respuesta terapéutica, tales como: la difusión del antimicrobiano en los tejidos y células del hospedero; la unión del antimicrobiano a proteínas del suero hospedero; las interacciones e interferencias farmacológicas; la calidad inmunológica del paciente; la virulencia y patogenicidad del agente etiológico.

A pesar de estas limitaciones, se sabe que la resistencia a antimicrobianos afecta en forma sustancial la morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados, y que el reconocimiento oportuno y exacto de la existencia de microorganismos resistentes es una ayuda significativa para el manejo terapéutico óptimo de los pacientes. (21, 27, 33, 35).

Pruebas de sensibilidad a los antimicóticos

El aumento creciente de infecciones fúngicas y la aparición de resistencia a los antimicóticos, han hecho necesario el desarrollo de métodos estandarizados para la determinación de la susceptibilidad antifúngica. En la actualidad, la emergencia de resistencia antimicótica se debe, principalmente, al reciente aumento de especies con resistencia natural y a la selección de cepas resistentes durante la terapia antimicótica. Sin embargo, con el uso crónico de tratamientos antifúngicos, principalmente en pacientes inmunosuprimidos, se ha generado menor susceptibilidad y se ha establecido cierta resistencia a los azoles, por parte de algunos aislamientos. Así también, el uso de azoles en medicina, agricultura y salud animal, ha producido una selección y diseminación de microorganismos resistentes. Para enfrentar este reto es necesario entender los mecanismos de resistencia antifúngica, además de realizar el aislamiento microbiológico de los microorganismos patógenos, junto con pruebas de sensibilidad antifúngica. (64).

Las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos están destinadas a proporcionar información que ayudará al médico a seleccionar el agente antimicótico adecuado, útil para tratar una infección específica. Lamentablemente, las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos no progresaron del mismo modo que las de sensibilidad a los agentes antibacterianos. Sin embargo, todas las variables fueron estandarizadas y se están realizando intentos para desarrollar pautas de interpretación para los diferentes agentes antimicóticos. NCCLS aceptó de forma preliminar el documento M27-A que son normas actuales para las pruebas de sensibilidad para los antimicóticos contra *Candida*.

Actualmente existen métodos comerciales que presentan una buena correlación con los métodos de referencia de NCCLS, como son:

- 1.- *Sensitivitre YeastOne*: Método colorimétrico basado en la microdilución, con un indicador de crecimiento de óxido-reducción (azul Alamar), tiene la ventaja de facilitar la lectura por un cambio de color de azul a rojo púrpura.

2.- *E-test*: Método cuantitativo de difusión en agar basado en gradientes de concentración de un antifúngico, impregnado en una tira de plástico que difunde en el medio.

3.- *Sistema Vitek 2*: El sistema Vitek 2 (BioMérieux) es un sistema automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15 horas. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un *software* de análisis y un sistema experto avanzado. Permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *Candida dubliniensis* y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación. (13). La realización de pruebas de sensibilidad a antifúngicos no está recomendada en forma rutinaria, solo se aconseja en casos de mala respuesta clínica, en episodios recurrentes y en aquéllos pacientes en los que la infección fúngica ocurra en el contexto de un tratamiento profiláctico prolongado. (63).

Debe hacerse hincapié en que la metodología y la interpretación de las pruebas de sensibilidad para los antimicóticos aún se encuentran en evolución, pero pueden ser de valor en las siguientes circunstancias:

1.- Cuando dentro de una institución se determinan los antibiogramas para los aislamientos.

2.- Para optimizar el manejo de pacientes con candidosis orofaríngea refractaria al tratamiento.

3.- Para optimizar el manejo de pacientes con candidosis invasora cuando se cuestiona el empleo de azoles en infecciones causadas por otras especies de *Candida no albicans*.

Los problemas que complican las pautas de interpretación incluyen:

a) Condición inmunológica del paciente.

b) Tipo de infección y capacidad de penetración y dirección del fármaco hacia los sitios diana de acción germicida.

c) Dosis del fármaco y su farmacocinética.

d) Método utilizado para determinar la prueba de sensibilidad y el nivel sérico del fármaco administrado.

e) Mecanismos de patogenicidad desarrollados por el agente etiológico.

La experiencia anecdótica proporciona la mejor experiencia con la quimioterapia con antimicóticos. Por ejemplo, se sabe que los pacientes con infección por *Candida krusei* no responden al tratamiento con fluconazol; y los pacientes con infección por *Candida lusitanae* no responden al tratamiento con anfotericina B.

A pesar de los problemas asociados con las pruebas de sensibilidad a los antimicóticos, se considera en la práctica médica que dichas pruebas son importantes para la selección de un agente antimicótico adecuado y como método para detectar el desarrollo de resistencia de ciertos microorganismos durante la quimioterapia.

Bibliografía

- 1.- Adam B., Baillie G., Douglas J. 2002. **Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis***. Journal of Medical Microbiology. Vol. 51. University of Glasgow, U.K. pp. 344-349.
- 2.- Arenas Guzmán R. 2011. **Micología Médica Ilustrada**. 4° edición. Ed. Mc. Graw Hill. México. pp. 221, 223, 225.
- 3.- Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear (ALASBIMN). 2013. **Estudio comparativo de complejos tricarbonílicos de fluconazol y voriconazol en infecciones fúngicas**.
- 4.- Bandenhorts L., Botha P., Rensburg J. and cols. 1991. **The incidence of hospital fungal infections-yeast**. South African Medical Journal. Vol. 79. pp. 302-303.
- 5.- Beyenal H., Lewandowski Z. 2002. **Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities**. Biotechnology Progress. Vol. 18. pp. 55-61.
- 6.- Calderone R., Cihlar R. 2002. **Secretory proteins in fungal virulence**. 1° edición. Ed. Marcel Bekker INC. New York, USA. Basel- Switzerland. pp 51-72.
- 7.- Castrillón Rivera L., Palma Ramos A., Padilla Desgarenes M. 2013. **Biopelículas fúngicas**. Dermatología Revista Mexicana. Vol. 57. pp. 350-361.
- 8.- Catalán M., Montejo J. 2006. **Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética**. Revista iberoamericana de micología. Vol.23.pp 39-49.
- 9.- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K. and cols. 2001. **Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance**. Journal of bacteriology. Vol. 183. pp. 5385-5394.
- 10.- Chandra J., Ghannoum M. 2004. **Fungal biofilms**; en Ghannoum M., O´Toole G. 2004. **Microbial biofilms**. 1° edición. ASM Press (American Society for Microbiology). Washington D.C., USA. pp 30-40.
- 11.- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum. 2012. **Anfotericina**. España.
- 12.- Costerton J., Cheng G., Geesey T. and cols. 1987. **Bacterial disease in nature and disease**. Revista Microbiology. Vol. 44. pp. 435-464.

- 13.- Cuenca Estrella M., Gadea Gironés I., Martín Mazuelos E. and cols. 2006. **“Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de sensibilidad a antifúngicos”**. Procedimientos en Microbiología Clínica. pp. 1-69.
- 14.- Dabout E. 1999. **Diccionario de medicina**. 1° edición. Ed. Época S.A. de C.V. México.
- 15.- Davey M., Caiazza N., O’Toole G. 2003. **Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1**. Journal of bacteriology. Vol. 185. pp. 1027-1036.
- 16.- De Beer D., Stoodley P., Roe F. and cols. 1994. **Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport**. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 43. pp. 1131-1138.
- 17.- Donlan R.M. 2009. **Biofilms: microbial life on surfaces**. Emerging Infectious Disease. Vol. 8. pp 881-890.
- 18.- Emmons C., Binford W., Chapman H. and cols. 1963. **Medical Mycology**. 1° edición. Ed. Lea & Febiger. USA. pp 131-141.
- 19.- Espinel-Ingroff A. 2008. **Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi**. Revista iberoamericana de micología Vol. 25. pp. 101-106.
- 20.- European Study Group On Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS) de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. 2007. **Normativa para la vigilancia epidemiológica**. España.
- 21.- Forbes B., Sahm D. 2004. **“Diagnóstico Microbiológico”**. 11° edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Capítulos 1, 2, 3, 5, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 53, 56, 57, 60.
- 22.- Gilbert P., Allison D.G., McBain A.J. 2002. **Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance?** Journal of applied Microbiology Symposium Supplement. Vol. 92. pp. 98-110.
- 23.- Gregori Valdés S. 2005. **Estructura y actividad de los antifúngicos**. Revista cubana de farmacología. Vol. 39.
- 24.- Hawser S., Douglas L. 1995. **Resistance of *Candida albicans* biofilms to Antifungal Agents *In Vitro***. Antimicrobial agents and Chemoterapy. Vol. 39. pp. 2128-2131.

- 25.- Hee Shin J., Jung Kee S. and cols. 2002. "**Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources**". Journal of clinical Microbiology. Vol. 40. pp. 1244-1248.
- 26.- InfoSIDA. 2015. **Base de datos de medicamentos**. USA.
- 27.- Jehl, F., Chomarar M. 2004. "**Del antibiograma a la prescripción**". Éditions Biomérieux. Paris. Francia.
- 28.- Kirckpatrick W.R., López Ribot J.L. and cols. 2000. "**Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions**". Journal of clinical Microbiology. Vol. 38. pp. 902-904.
- 29.- Koneman E. and cols. 2008. **Koneman: diagnóstico microbiológico**. 6° edición. Ed. Médica Panamericana. USA. pp. 39, 902, 1164-1172.
- 30.- Lewis K. 2001. **Riddle of biofilm resistance**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 45. pp. 999-1007.
- 31.- Liu H., Fang H. 2002. **Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges**. Journal of bacteriology. Vol. 95. pp. 249-256.
- 32.- López Martínez R., Méndez Tovar L., Manzano Gayosso P. and cols. 2009. **Principios de micología médica. Clínica, diagnóstico y prevención**. 1° edición. Ed. Méndez editores. México. pp. 131-139, 221-226.
- 33.- Lora Téllez V., Méndez Ramírez A. 2001. "**Utilización del agar CHROM-*Candida* como apoyo en la identificación directa de especies de levaduras del género *Candida* de importancia médica**". Tesis Profesional para Licenciado en Químico Farmacobiólogo. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Microbiología. BUAP. Puebla, México.
- 34.- Lora Téllez V., Ramírez Cueto M.A., Torres Montiel R. 2006. "**Evaluación de la Actividad lipolítica y Formación de biopelícula en levaduras oportunistas aisladas en población pediátrica**". IX Congreso Nacional De Micología; octubre Ensenada, Baja California. México.
- 35.- Lora Téllez V., Ulloa Rodríguez K. 2010. "**Determinación del perfil de sensibilidad antibacteriana en cepas aisladas de pacientes pediátricos con infección de vías urinarias en el Hospital para el Niño Poblano**". Tesis Profesional para Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Escuela de Ciencias. Departamento de Química y Biología. Universidad de las Américas-Puebla UDLAP. Puebla, México

36.- Lora Téllez V., Pérez Ricardez M.L., Aquino Prieto, L.D. Agosto 2011. **“Etiopatogenia De *Candida spp.* de origen clínico en población pediátrica intrahospitalaria.”** VI Congreso Nacional De Micología Médica. AMMM. Oaxaca. México.

37.-Lora Téllez V., Pérez Ricardez M.L. and Aquino Prieto, L.D. June 2012. **“*In Vitro* biofilm production, haemolytic activity and antifungals sensitivity by clinical isolates of *Candida spp.*”**. 18th Congress of the International Society For Human And Animal Mycology ISHAM. Berlin, Germany.

38.- Lora Téllez V., M.L. Pérez Ricardez., L.D. Aquino Prieto. Septiembre 2012. **“Etiopatogenia De *Candida spp.* asociada a Candiduria en población pediátrica Intrahospitalaria”**. XI Congreso Nacional De Micología. Asociación Española De Micología. AEM. Cádiz, España.

39.- Lora Téllez V., M.L. Pérez Ricardez., G. López-Hernández. Junio 2014. **“Hialohifomicosis En Hospederos Pediátricos Inmunosuprimidos”**. 100 Congreso Español De Pediatría. II Congreso Extraordinario Latinoamericano De Pediatría. Asociación Española De Pediatría. AEP. Madrid, España.

40.- Luengo, M. 2013. **Higiene de manos, un objetivo estratégico en la Unidad de Cuidados Intensivos.** España.

41.- Martino Borafull R., Sierra Gil J. 2003. **Infecciones fúngicas en hematología y oncología.** Ed. ARS Médica. 1^o edición. Barcelona, España. pp. 39-52.

42.- Mellado E., Cuenca-Estrella M., Rodríguez Tuleda J. 2002. **Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos;** en “Puesta al día en métodos microbiológicos para el diagnóstico clínico”. Capítulo 7. pp. 50-56.

- 43.- Melo L. 2005. **Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity.** Water Science & Technology. Vol. 52. pp. 77-84.
- 44.- Mengana López E., Galano Stivens, E., Menéndez Rodríguez. 2011. **Principales características clínicoepidemiológicas de una población infantil con neumonía bacteriana grave.** Hospital Infantil Norte Docente “Dr. Juan de la Cruz Martínez Maceira”. Santiago de Cuba.
- 45.- Merino Guzmán G., Cedillo Ramírez L., Silva Andrade F. and cols. 2011. **Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica.** Revista Mexicana de micología. Vol. 33. pp. 1-8.
- 46.- Myszka K., Czaczyk K. 2012. **Mechanisms Determining Bacterial Biofilm Resistance to Antimicrobial Factors.** Antimicrobial agents. pp. 213-237.
- 47.- Organización Mundial de la Salud. 2005. **Manual de bioseguridad en el laboratorio.** 3° edición. Biblioteca de la OMS. pp. 1-4.
- 48.-Organización Mundial de la Salud, Hospital Tan Tock Seng. 2012. **Cómo lavarse las manos.** Singapur.
- 49.- Paredes F., Roca J. 2004. **“Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana”.** Ámbito farmacéutico; Farmacología. Vol. 23. pp. 116-124.
- 50.- Parsek M., Greenberk E. 2005. **Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms.** Trends in microbiology. Vol. 13. pp. 27-33.

- 51.- Pemán J., Cantón E., Valentín A. 2008. **Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida***. Revista iberoamericana de micología. Vol. 25. pp. 124-128.
- 52.- Purevorj-Gage L., Stoodley P. 2004. **Biofilm structure, behavior, and hidrodinamics**; en Ghannoum M., O'Toole G. 2004. **Microbial biofilms**. 1° edición. ASM Press (American Society for Microbiology). Washington D.C., USA. pp. 160-169.
- 53.- Quindós G., Eraso E. 2008. **Actividad antifúngica in vitro de la anidulafungina**. Revista iberoamericana de micología. Vol. 25. pp 83-91.
- 54.- Quintana A. 2010. **“Antibióticos: Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos”**. Departamento de Microbiología. pp. 1-17.
- 55.- Sánchez J., Feris J. 1998. **“Antibiogramas: utilidad y limitaciones”**. Archivos Dominicanos de Pediatría. Vol. 34. pp. 83-87.
- 56.- Stewart P. 2003. **Difussion in biofilms**. Journal of bacteriology. Vol.185. pp. 1485-1491.
- 57.- Stewart P., Mukherjee P., Ghannoum M. 2004. **Biofilm antimicrobial resistance**; en Ghannoum M., O'Toole G. 2004. **Microbial biofilms**. 1° edición. ASM Press (American Society for Microbiology). Washington D.C., USA. pp 250-265.
- 58.- Stoodley P., Doods I., Boyle J. and cols. 1999. **Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure**. Journal of Applied Microbiology. Vol. 85. pp. 19-28.
- 59.- Tay Zavala J., Velasco Castrejón O. 2009. **Introducción a la micología médica**. 2° edición. Ed. Méndez editores. México. pp 325.

60.- Tolker-Nielsen, T., Molin, S. 2000. **Spatial organization of microbial biofilm communities**. The molecular Microbial Ecology Group. Vol. 40. pp. 75-84.

61.- Velázquez L. 1976. **Farmacología y su proyección a la clínica**. 13° edición. Ed. Oteo. pp. 966.

62.- Velázquez, M. 1991. **Diccionario Velázquez**. Tomo 2. Ed. Prontice-Hall hispanoamericana S.A. México.

63.- Vilata Corell J. 2005. **“Micosis cutáneas”**. 1° edición. Ed. Médica Panamericana. pp. 119.

64.- Zapata González F., Cardona Castro N. 2012. **“Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos”**. Revista CES Medicina. Vol. 26. pp. 71-83.