

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de posgrado en Ciencias de la vida
con orientación en microbiología**

**Epidemiología molecular y resistencia a antifúngicos de
Candida spp. en pacientes con VIH/SIDA en el estado de Baja
California, México**

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:
Isadora Clark Ordóñez

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Isadora Clark Ordóñez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Directora de tesis

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dra. Rufina Hernández Martínez

Dr. Alexei F. Licea Navarro



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Isadora Clark Ordóñez ©2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Isadora Clark Ordóñez** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Epidemiología molecular y resistencia a antifúngicos de *Candida* spp. en pacientes con VIH/SIDA en el estado de Baja California, México.

Resumen aprobado por:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Directora de tesis

La candidiasis es la infección oportunista más común en pacientes con VIH. El objetivo de este trabajo fue identificar la prevalencia de portadores de *Candida*, la diversidad de especies del género y la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos, en 297 pacientes con VIH/SIDA en el estado de Baja California, México. Las cepas de *Candida* aisladas de enjuagues bucales en pacientes de las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada fueron identificadas por PCR-RFLP. El 56.3% de los pacientes muestreados se encontraron colonizados o infectados con *Candida* spp. En Tijuana se observó un porcentaje significativamente mayor de portadores (75.5%). Se aislaron 181 cepas de las cuales 71.8% pertenecen a la especie *C. albicans* y 28.2% fueron especies *C. no-albicans*. Las especies *C. no-albicans* más comunes fueron *C. tropicalis* (12.2%) seguida de *C. glabrata* (8.3%), *C. parapsilosis* (2.2%), *C. krusei* (1.7%) y *C. guilliermondii* (1.1%). No se identificaron aislamientos de *C. dubliniensis*. En 11 pacientes se encontraron más de dos especies asociadas. Comparado con otras regiones de México y el mundo en Mexicali y Ensenada se observó una menor proporción de portadores de *Candida*, sin embargo en Tijuana, una ciudad fronteriza con muchas peculiaridades, se observó una mayor proporción. En esta población solamente se encontró asociación entre la carga viral y los portadores de *Candida*. Otros factores como el uso de terapia antiretroviral, los títulos de linfocitos T CD4⁺, el tiempo desde el diagnóstico, el consumo de alcohol y de tabaco, y el género no se encontraron asociados con el ser portadores de *Candida*. La mayoría de los aislados de *C. albicans* obtenidos presentaron sensibilidad a todos los antifúngicos probados en un 96.1% mientras que las especies de *C. no-albicans* presentaron una sensibilidad entre el 60.0-94.0%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre *C. albicans* y las especies de *C. no-albicans* para todos los azoles probados ($p < 0.001$), pero no para los antifúngicos polienos ($p = 0.08$). *C. glabrata* y *C. tropicalis* fueron las especies que presentaron menor sensibilidad a los diferentes antifúngicos probados. Fluconazol y miconazol fueron los azoles donde se observó mayor porcentaje de cepas con resistencia. Este trabajo representa el primer estudio de la diversidad de *Candida* en pacientes con VIH/SIDA en el noroeste de México.

Palabras clave: **Epidemiología molecular, candidiasis oral, resistencia a antifúngicos.**

Abstract of the thesis presented by **Isadora Clark Ordóñez** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology

Molecular epidemiology and resistance to antifungal therapy in *Candida* spp. in HIV/AIDS patients in Baja California, México

Abstract approved by:

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Thesis Director

Candidiasis is the most common opportunistic fungal infection in HIV patients. The aim of this study was to identify the prevalence of carriers of *Candida*, to study *Candida* species diversity, and to evaluate *in vitro* the susceptibility to antifungal drugs, in 297 HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. *Candida* strains were identified by molecular methods (PCR-RFLP) from isolates of oral rinses of patients in Tijuana, Mexicali and Ensenada. A total of 56.3% of patients were colonized or infected with *Candida*. In Tijuana there was a significantly higher percentage of carriers (75.5%). From 181 strains isolated, 71.8% were found to be *Candida albicans* and 28.2% were non-*albicans* species. The most common non-*albicans* species isolated were *C. tropicalis* (12.2%) followed by *C. glabrata* (8.3%), *C. parapsilosis* (2.2%), *C. krusei* (1.7%) and *C. guilliermondii* (1.1%). *C. dubliniensis* was not isolated. Only in eleven carriers, two species were found. In Mexicali and Ensenada, there was a lower proportion of *Candida* carriers compared with other regions in Mexico and worldwide, however, in Tijuana, a border town with many peculiarities, a higher carrier rate was found. In this population, only a high viral load was associated with oral *Candida* carriers. Other factors such as the use of antiretroviral therapy, CD4⁺ T-lymphocytes levels, time after diagnosis, alcohol and tobacco consumption and gender were not found associated with *Candida* carriers. Most of *C. albicans* isolates were sensitive to all tested drugs (96.1 %) while the *C. non-albicans* the sensitivity to antifungal drugs was among 60.0-94.0%. There were statistically significant differences between *C. albicans* species and *C. non-albicans* for all the azoles tested ($p < 0.001$), but not for the polyenes ($p = 0.08$) (Table 5). *C. glabrata* and *C. tropicalis* were the species with lower sensitivity rate (Table 6). Fluconazole and miconazole were the azoles tested where we found higher resistance rate. This work is the first study of *Candida* diversity in HIV/AIDS patients in northwestern Mexico.

Keywords: Molecular epidemiology, oral candidiasis, antifungal drug resistance, México.

Dedicatoria

A mi padre.

Agradecimientos

Uno muy especial a mi tutora de tesis y guía de decisiones, la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez, por aceptarme en su grupo de trabajo y por todo su empeño para que esto sea posible.

A la Facultad de Medicina Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por darme la oportunidad de seguir mi preparación académica.

Al Programa de mejoramiento del Profesorado (PROMEPE) por otorgarme la beca que sustentó parte de este posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por promover la realización y permitir la culminación de este trabajo.

A mis sinodales: Las Dras. Rufina Hernández Martínez, Ernestina Castro Longoria, Elva T. Aréchiga Carvajal y el Dr. Alexei F. Licea Navarro, por sus valiosas observaciones para realizar y mejorar este trabajo. Un agradecimiento además por toda su paciencia.

A los Dres. Julia Dolores Estrada Guzmán, Oscar Castillo Soria y Jorge Arturo Alvelais, por abrirme las puertas de sus consultorios para la realización del muestreo necesario en este proyecto.

A la Dra. Elva T. Aréchiga Carvajal por recibirme en su laboratorio para la realización de varios ensayos.

A la Dra. Olga A. Callejas por su ayuda y valiosos consejos dentro de las actividades del laboratorio y al personal del departamento de Microbiología que de alguna manera apoya nuestro transitar como aprendices, muy en especial a la auxiliar Adriana Mejía.

A mis padres Lucia y Alejandro, y a mi hermano Alex, que siempre han comprendido y apoyado mis decisiones, por su gran paciencia con los tiempos comprometidos.

A mis dos tesoros Andrés y Marco, por adaptarse siempre a las condiciones que esto ha implicado.

A todos mis amigos, amigas-hermanas, aquellos que me cuidan como familia, los del caminar paralelo, los que me acompañan desde lejos.

A todos infinitas gracias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglésiii
Dedicatoriaiv
Agradecimientos	v
Lista de figurasviii
Lista de tablas.....	.xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes	4
2. 1 Características generales del género <i>Candida</i>	4
2.1.1 Taxonomía.....	5
2.1.2 Crecimiento y nutrición.....	6
2.1.3 Crecimiento de <i>Candida</i> en la cavidad bucal	6
2.1.4 Morfología.....	7
2.1.5 Ecología y epidemiología.....	8
2.2 Especies de <i>Candida</i> de interés médico	10
2.3 Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia.....	11
2.3.1 Adherencia	122
2.3.2 Secreción de enzimas y toxinas.....	13
2.3.3 Formación de biopelículas	133
2.3.4 Cambios morfogénéticos	144
2.4 Candidiasis oral en pacientes con VIH/SIDA.....	155
2.4.1 Candidiasis pseudomembranosa	17
2.4.2 Candidiasis eritematosa	17
2.4.3 Etiopatogenia	18
2.5 Diagnóstico	19
2.6 Agentes antifúngicos	211
2.6.1 Macrólidos polienos.....	222
2.6.2 Derivados azólicos.....	233
2.6.3 5-fluorocitosina	244
2.6.4 Inhibidores de la síntesis de glucanos.....	25
2.7 Sensibilidad a los antimicóticos.....	26
2.7.1 Métodos de estudio de actividad in vitro a los antifúngicos y evaluación de resistencia	27
Capítulo 3. Planteamiento del problema	28
Capítulo 4. Justificación	30
Capítulo 5. Hipótesis.....	31

Capítulo 6. Objetivos	322
Capítulo 7. Materiales y métodos.....	33
7.1 Tipo de estudio	33
7.2 Población de estudio y muestra de estudio	33
7.3 Variables en estudio	34
7.4 Análisis Estadístico.....	34
7.5 Procesamiento de la muestra de enjuague bucal	35
7.6 Identificación molecular de los aislados microbiológicos	35
7.6.1 Extracción de ADN genómico.....	35
7.6.2 Amplificación de ADN.....	36
7.6.3 Oligonucleótidos	36
7.6.4 Reacciones de PCR	37
7.6.5 Determinación de la especie del género <i>Candida</i> por PCR-RFLP	37
7.7 Determinación de la sensibilidad a antifúngicos con el método de sensidiscos (Neo-sensitabs).	38
7.8 Análisis de la formación de biopelícula	40
Capítulo 8. Resultados	41
8.1 Datos generales	41
8.2 Determinación de la distribución y frecuencia de especies del género <i>Candida</i> en las muestras bucales de pacientes con VIH/SIDA.....	41
8.3 Identificación molecular a través de PCR-RFLP de las cepas aisladas en las muestras de enjuague bucal.	42
8.4 Distribución de las especies del género <i>Candida</i> aisladas, de acuerdo a variables sociodemográficas y clínicas de los pacientes con VIH/SIDA.	45
8.5 Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos	50
8.6 Especies de <i>Candida</i> y sensibilidad a los antifúngicos.....	56
8.7 Ensayos de sensibilidad en biopelículas.....	61
Capítulo 9. Discusiones	64
Capítulo 10. Conclusiones	70
Lista de referencias.....	72

Lista de figuras

Figura	Página	
1	Esquema de la región genómica que codifica el ARN ribosomal. Se muestra en las barras anchas las regiones que codifican al ARN ribosomal 18S, 5.8S y 28S, intercaladas por las barras delgadas que representan las regiones internas espaciadoras transcritas 1 (ITS1) y 2 (ITS2). Con las flechas se representa el sitio donde se alinean los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.....	37
2	Distribución de las especies del género <i>Candida</i> en los aislamientos de pacientes con VIH/SIDA en la totalidad del muestreo.....	42
3	Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los ensayos de PCR-RFLP de aislamientos obtenidos de pacientes con VIH-SIDA. (A) Productos de amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, donde se distinguen bandas de aproximadamente 870 pb que corresponden a la especie <i>C. glabrata</i> , señalada en los recuadros en rojo. (B) Productos de digestión con la enzima MspI. Los recuadros en amarillo muestran el patrón de bandas que representa a la especie <i>C. albicans</i> (una banda de 297 pb y otra de 238 pb), en rojo se observa el patrón de digestión para la especie <i>C. glabrata</i> (una banda de 557 pb y otra de 314 pb) y el recuadro en azul corresponde a la especie <i>C. parapsilosis</i> (una banda de 520 pb).	43
4	Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los ensayos de PCR-RFLP de aislamientos obtenidos de pacientes con VIH-SIDA. (A) Productos de amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. (B) Productos de digestión con la enzima MspI. Los recuadros en rojo muestran el patrón de bandas que representa a la especie <i>C. tropicalis</i> (con una banda de 340 pb y otra de 184 pb) y en amarillo se identifica a la especie <i>C. krusei</i> (con una banda de 261 pb y otra de 249 pb) que se aprecian del mismo tamaño.....	44
5	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de PCR-RFLP. Se muestran los patrones de digestión con la enzima MspI, de los productos de amplificación con los oligonucleótidos ITS 1 e ITS 4. El recuadro en amarillo muestra el patrón de bandas que representa a la especie <i>C. guilliermondii</i> , identificada con tres bandas de tamaños; 371 pb, 155 pb y 72 pb.	44
6	Distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores y no portadores de levaduras del género <i>Candida</i> en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada, con relación a la cantidad en unidades de carga viral.....	48
7	Distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores y no portadores de levaduras del género <i>Candida</i> en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada de acuerdo al hábito de consumir alcohol.	50
8	Distribución del total de las cepas aisladas (181) con relación a la respuesta a los fármacos antifúngicos agrupados por modo de acción (azoles y polienos).....	51

9	Distribución de las cepas aisladas en cada ciudad muestreada (Tijuana, Mexicali y Ensenada), en cuanto a la respuesta a los antifúngicos azoles y polienos probados.....	51
10	Distribución de la respuesta a los antifúngicos azoles y polienos en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH/SIDA.....	52
11	Ensayos de difusión de antifúngicos con discos Neo-Sensitab. Las leyendas en los discos de difusión corresponden a: AMPH= Anfotericina B, ITRAC= Itraconazol, NYSTA= Nistatina, FLUCZ= Fluconazol, MICOZ= Miconazol, KETOC= Ketoconazol y CTRIM= Clotrimazol. La flecha roja indica resistencia, la flecha amarilla respuesta intermedia y la azul sensibilidad. (A) Cepa de <i>C. albicans</i> sensible a todos los antifúngicos. (B) Cepa de <i>C. tropicalis</i> resistente a itraconazol y miconazol, respuesta intermedia a fluconazol y sensible a anfotericina B, nistatina y ketoconazol. (C) Cepa de <i>C. krusei</i> resistente a anfotericina B y nistatina, y sensible a itraconazol, fluconazol, miconazol, ketoconazol y clotrimazol.....	53
12	Distribución del fenotipo de sensibilidad y de resistencia a los antifúngicos azoles y polienos en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH.....	54
13	Distribución del fenotipo de sensibilidad y de resistencia a los antifúngicos probados, agrupados en; Imidazoles (ketoconazol, miconazol y clotrimazol), Triazoles (fluconazol e itraconazol) y Polienos (nistatina y anfotericina B), en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH/SIDA.....	55
14	Porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de resistencia ante uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco antifúngicos simultáneamente, A. Considerando los siete antifúngicos probados (cinco azoles y dos polienos) y B. Considerando sólo los cinco fármacos azoles..	56
15	Porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) ante los dos tipos de antifúngicos probados (azoles y polienos) entre todas las cepas aisladas del género <i>C. albicans</i> y <i>C. no-albicans</i> , en los pacientes con VIH.....	57
16	Porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) ante los dos tipos de antifúngicos probados (azoles y polienos) entre las cepas aisladas del género <i>C. albicans</i> y <i>C. no-albicans</i> , en cada ciudad muestreada.....	58
17	Porcentaje de cepas de <i>C. albicans</i> y <i>C. no-albicans</i> que presentaron fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) ante cada uno de los antifúngicos probados (Miconazol, Clotrimazol, Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Nistatina y Anfotericina B) en el total de las cepas aisladas por ciudad muestreada.....	60
18	Distribución de las respuestas de sensibilidad y resistencia ante los antifúngicos azoles y polienos observados en las diferentes especies del género <i>Candida</i> aisladas en los pacientes con VIH-SIDA.	61
19	Distribución del porcentaje de cepas de <i>C. albicans</i> y <i>C. no-albicans</i> que formaron biopelícula, por ciudad y en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH/SIDA...	62

20

Porcentaje de cepas de las diferentes especies del género *Candida* caracterizadas, que formaron biopelícula en el total de los aislamientos en los pacientes con VIH/SIDA..... 62

21

Porcentaje de cepas de las especies del género *Candida* caracterizadas que formaron biopelícula, sin fluconazol y con fluconazol (8 µg/µl), en el total de los aislamientos en los pacientes con VIH/SIDA..... 63

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Clasificación taxonómica del género <i>Candida</i>	5
2	Formas clínicas de candidiasis, tomado de Hernández, 2012.....	15
3	Factores predisponentes relacionados a candidiasis, Hernández, 2012.....	19
4	Coloración de crecimiento en el medio cromogénico BBL CHROMagar <i>Candida</i> BD Diagnostic Systems.....	20
5	Tamaño del producto de la reacción de amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, en las diferentes especies del género <i>Candida</i> y tamaño de los fragmentos de digestión con la enzima MspI, Tomado de Mirhendi et al., 2006.....	38
6	Valores de referencia del diámetro (mm) de los halos de inhibición de los antifúngicos en los discos de difusión (sensidiscos).....	39
7	Distribución por ciudad y sexo de pacientes con VIH/SIDA con cultivos positivos y negativos para levaduras del género <i>Candida</i>	42
8	Distribución de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada, de acuerdo a las especies del género <i>Candida</i> aisladas de los lavados bucales.....	45
9	Distribución de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada de acuerdo a variables del control de la enfermedad como terapia antirretroviral, carga viral, niveles de linfocitos T CD4 y tiempo desde el diagnóstico de VIH/SIDA.....	46
10	Distribución de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada de acuerdo al hábito de fumar y consumir bebidas alcohólicas.....	49
11	Susceptibilidad a antifúngicos en los aislados de <i>C. albicans</i> y <i>C. no-albicans</i> en los pacientes con VIH/SIDA.....	59

Capítulo 1. Introducción

En años recientes la micología médica se ha enfocado a estudiar el dramático aumento en las tasas de Infecciones fúngicas. Durante las décadas de los 80's y 90's, las micosis sistémicas (ocasionadas por hongos oportunistas) se convirtieron en la séptima causa de muerte entre las enfermedades infecciosas en los Estados Unidos y la mortalidad mundial relacionada a estas infecciones se triplicó (Pinner et al., 1996; Ásmundsdóttir et al., 2002).

Dentro del grupo de hongos patógenos se encuentran especies que generan infecciones oportunistas. Estas micosis se definen como el cambio de una interacción comensal simbiótica a una parasitaria entre un hospedero y un patógeno cuando las condiciones ambientales cambian. Las micosis pueden ser agudas o crónicas y presentarse de forma superficial, subcutánea o sistémica de acuerdo a la duración y localización de la infección. Los hongos causan un amplio espectro de enfermedades, y las más comunes son infecciones menores localizadas en la piel o membranas mucosas. Sin embargo, los hongos oportunistas son capaces de causar infecciones sistémicas y comprometer los órganos internos (Coleman et al., 1998).

Numerosos factores han contribuido al aumento en las infecciones fúngicas, el más importante es la generación de inmunodeficiencia en la población. Las situaciones de deficiencia en el sistema inmune se promueven cuando ocurren alteraciones en las barreras mucosas o cutáneas, defectos en la inmunidad mediada por células, disfunciones metabólicas y extremos de edad. Además, el riesgo para las infecciones por hongos oportunistas aumenta con el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, las quimioterapias citotóxicas y los trasplantes (Diekema, 2002). Actualmente, los hongos oportunistas son considerados una causa de morbilidad y mortalidad y el aumento de las micosis emergentes va en paralelo al incremento en la población de pacientes inmunocomprometidos (Due et al., 2006). Las micosis invasivas ocasionadas por hongos oportunistas más comunes en hospederos inmunocomprometidos son candidiasis, aspergilosis, cryptococosis y zygomycosis (Idemyor, 2003).

Así pues, las micosis invasivas y oportunistas han adquirido especial atención, debido al aumento en su incidencia, su gravedad, la dificultad de tratamiento y a la trascendencia del diagnóstico oportuno (Gadea et al., 2007). Se ha estimado que más del 90% de estas infecciones fúngicas son causadas por especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus* (Basková et al., 2007). Un aspecto alarmante es que las especies del género *Candida* representan la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales por

hongos oportunistas y la frecuencia de este tipo de candidiasis ha aumentado diez veces en las últimas dos décadas en Estados Unidos (Trtkova y Raclavsky, 2006; Gurtner et al., 2007).

Las candidiasis son las infecciones fúngicas causadas por las especies del género *Candida*. Este género agrupa más de 150 especies y sólo algunas son patógenas para el hombre. Producen una amplia variedad de enfermedades, desde infecciones mucocutáneas leves hasta formas diseminadas graves con posible participación de cualquier órgano o sistema.

Se han reportado más de 17 especies del género *Candida* como agentes causales de las candidiasis. Sin embargo, más del 90% de las candidiasis invasivas, se atribuyen sólo a cinco especies; *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Mientras que especies como *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. kefyr*, *C. famata* y *C. rugosa*, representan un grupo de especies aisladas ocasionalmente. *C. albicans* es la especie más estudiada en términos de patogenicidad y es el principal agente causal de las candidiasis superficiales y sistémicas. No obstante, otras especies del género han emergido como patógenos importantes con relación al aumento en la mortalidad y la resistencia a antifúngicos (Kumar et al., 2008).

Las levaduras del género *Candida* son organismos ubicuos en la naturaleza y algunas son parte de la biota natural en los humanos, crecen en la piel y mucosas como el tracto gastrointestinal y genital. La infección se puede producir por tres mecanismos: como consecuencia de transmisión vertical en el neonato, por invasión de cepas colonizantes del tracto gastrointestinal o la piel y por transmisión horizontal principalmente nosocomial a través de comida, objetos inanimados y contacto directo. Las especies patógenas del género *Candida* pueden causar una variedad de infecciones superficiales como son; las orofaríngeas, esofágicas, vulvovaginales y cutáneas; sin embargo, algunas son las responsables de infecciones invasivas profundas y están contempladas como la principal causa de candidemias. Se estima que la incidencia mundial de candidiasis es de 4 a 7 casos/100 000 habitantes/año (Richardson y Rautema, 2009).

La gran cantidad de estudios epidemiológicos durante las últimas dos décadas demuestran que hay una considerable variación temporal y geográfica en la distribución de las especies de *Candida* en los aislados clínicos (Richardson y Rautema, 2009). Se sabe que *C. albicans* es la especie dominante en todos los tipos de candidiasis, pero la frecuencia en ocurrencia varía geográficamente. Así en América Latina representa el 37% de los aislados clínicos, mientras que en Noruega el 70% (Asmundsdóttir et al., 2002).

Las especies del género *Candida* son aisladas con mayor frecuencia de la cavidad oral y detectadas en aproximadamente el 40% al 60% de los individuos sanos. Se sabe que el principal grupo de riesgo son pacientes inmunocomprometidos como son los pacientes en cuidados intensivos, postquirúrgicos, neutropénicos y con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o con el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA). Por otra parte se observa que la frecuencia de colonización aumenta conforme la severidad de la enfermedad y el tiempo de hospitalización (Pfaller y Diekema, 2007).

A pesar de que *C. albicans* es el agente causal más común, la epidemiología ha cambiado considerablemente en las últimas tres décadas. Actualmente se observa un incremento significativo en la prevalencia de infecciones causadas por especies emergentes de *Candida* diferentes de *C. albicans*, a las que ahora se les reconoce su potencial patogénico (Loeffler y Stevens, 2003).

Por lo anterior, se llevó a cabo un estudio para determinar la diversidad de especies del género *Candida*, aisladas de pacientes portadores del VIH o con SIDA, su resistencia *in vitro* a los antifúngicos convencionales y su resistencia al fluconazol durante la formación de biopelículas.

Capítulo 2. Antecedentes

La cavidad bucal está colonizada por levaduras del género *Candida* entre un 40% a un 60% de las personas sanas (Odds y Bernaerts, 1994). Cuando se presentan factores predisponentes estas levaduras pueden causar infecciones bucales agudas o crónicas tales como la candidiasis pseudomembranosa (muguet), atrófica (eritematosa) e hiperplásica (quelitis angular) (Cannon, 1999). La forma pseudomembranosa es la presentación clínica más común en adultos inmunosuprimidos y se caracteriza por la presencia de lesiones papulares multifocales lisas de color blanco o amarillento que al ser frotadas dejan una superficie enrojecida fácilmente reconocible. La forma eritematosa se presenta típicamente en niños, como múltiples focos de eritema macular difuso en el paladar, orofaringe y en zonas dorsales de la lengua (Sánchez et al., 2005). La Candidiasis bucal con frecuencia se complica a Candidiasis esofágica en pacientes inmunocomprometidos (Aguirre, 2002).

La prevalencia de Candidiasis oral varía en diferentes áreas geográficas en función de las características de las diferentes poblaciones encontradas, sin embargo, se ha establecido que los pacientes con VIH/SIDA son especialmente vulnerables a la colonización e infección por diferentes especies oportunistas de hongos y en particular de *Candida*. Se ha reportado un amplio intervalo de portadores de especies de *Candida* en pacientes con VIH/SIDA (11.0%-96.0%) en diferentes regiones del mundo (Samaranayake et al., 1986; Fetter et al., 1993; Shiboski et al., 1996; Campisi et al., 2002; Ohmit et al., 2003; Zhang et al., 2009), mientras que para la población aparentemente sana el intervalo va del 10.0% al 68.0% (Chave 1996, Odds y Bernaerts, 1994).

2. 1 Características generales del género *Candida*

El género *Candida* representa un grupo de levaduras comensales del ser humano, tienen una morfología oval o redondeada de 3 a 7 μm de diámetro, se reproducen asexualmente por blastoconidios y forman pseudomicelios. Asimilan y fermentan carbohidratos (no asimilan inositol), no producen pigmentos carotenoides y carecen de cápsula. Habitan en la piel y las mucosas de los tractos respiratorio, genitourinario y digestivo. Algunas especies son patógenos oportunistas que provocan candidiasis generalmente en individuos inmunocomprometidos. Estos microorganismos crecen rápidamente formando colonias redondas con olor característico (McCullough et al., 1996).

La pared celular es una estructura que da forma a la célula y la protege del estrés ambiental. Está constituida por glucano que representa el principal polisacárido estructural (del 50% al 60 % en peso seco del contenido de la pared), glucoproteínas (del 30% al 50 % del peso seco) y quitina (del 1% al 2 % del peso seco de la pared). Tal superficie juega un papel importante en la adhesión a las superficies de colonización y representa un sitio para la acción de algunos fármacos antifúngicos. Particularmente, la membrana celular de los hongos contiene ergosterol, que participa en la integridad de esta estructura y como regulador de la fluidez (Pontón, 2008).

2.1.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica en el reino fungi está basada principalmente en criterios morfológicos sobre las características de las estructuras de reproducción anamórfica y teleomórfica. Actualmente para identificar las distintas especies se consideran características bioquímicas y fisiológicas, así como algunos estudios moleculares.

Se han descrito más de 150 especies del género *Candida* pero sólo 10 son descritas como patógenos importantes en el ser humano. En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica del género *Candida* descrita por Muller, 2007.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del género *Candida*.

Reino	<i>Eumycota</i>	
Phylum	<i>Ascomycota</i>	
Clase	<i>Hemiascomycota</i>	
Orden	<i>Saccharomycetales</i>	
Familia	<i>Candidaceae</i> <i>Endomycetaceae</i> <i>Metschnikowiaceae</i> <i>Saccharomycetaceae</i>	
Género	ANAMORFO <i>Candida</i>	TELEOMORFO <i>Pichia</i>
Especie (ejemplos)	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. lusitaniae</i>	<i>P. ohmeri</i>

2.1.2 Crecimiento y nutrición

Las levaduras de este género crecen en medios definidos, que básicamente contienen sales, una fuente de carbono (glucosa), una fuente de nitrógeno (hidrolizados proteicos) y fosfato; en algunos casos se puede requerir biotina. Estas levaduras crecen en rangos de temperatura de 20 a 40 °C y en un rango de pH de 2 a 8. La máxima tasa de crecimiento en medios sintéticos está entre 30 y 40 h, pero en medios suplementados con vitaminas y aminoácidos su tasa de crecimiento puede incrementarse hasta 80 h (Calderone, 2002).

La mayoría de las especies del género *Candida* presentan características morfológicas similares al crecer en medio de agar dextrosa Sabouraud en temperaturas entre 28 y 32°C de 24 a 48 h. Las colonias son blancas, cremosas, planas o sobresalientes, lisas o plegadas y tales características pueden variar con respecto a las condiciones del medio. De tal forma que las características morfológicas no son un criterio que oriente hacia la identificación de la especie. Microscópicamente se presentan en dos formas: de levadura y de micelio. La forma levaduriforme es denominada blastoconidio (oval, alargada, cilíndrica y esférica), estos pueden elongarse formando cadenas cortas de levaduras con constricciones, llamadas pseudohifas e incluso formar micelio verdadero (Sullivan et al., 1995).

C. albicans fermenta glucosa, galactosa y maltosa con formación de ácidos y dióxido de carbono. Se han observado diferencias en el patrón de asimilación y fermentación de azúcares en las diferentes especies del género (Luo et al., 2001).

2.1.3 Crecimiento de *Candida* en la cavidad bucal

La cavidad bucal ofrece un ambiente húmedo, con un pH hacia la neutralidad y una temperatura relativamente constante entre 34 y 36°C. La saliva constituye un elemento antifúngico por la labor de barrido mecánico y la secreción de inmunoglobulina A, lisozima, lactoferrina y lactoperoxidasas. Se ha observado que aquellas situaciones que reducen la producción de saliva (xerostomía) promueven la aparición de candidiasis oral. Así mismo, la reducción del pH salival, que normalmente se encuentra entre 5.6 y 7.8, favorece la adhesión del hongo. Las especies del género *Candida* crecen mejor en condiciones aeróbicas y los estudios muestran que en condiciones no patogénicas, la forma dominante

de estos hongos es de levadura, mientras que las pseudohifas e hifas son más comunes cuando se presentan lesiones en la cavidad bucal (Arendorf y Walker, 1980).

De 32 estudios sobre portadores de levaduras en la cavidad bucal de diversas poblaciones se obtuvo que la media de la frecuencia de hallazgo fue de 34.4 % y de este porcentaje, el 17 % correspondió a *C. albicans* como la especie dominante, seguida de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* (Blignaut et al., 2002). Otras levaduras encontradas fueron *C. lusitaniae*, *Trichosporon* spp. y *Saccharomyces* spp. En la saliva de pacientes con candidiasis se han podido aislar aproximadamente 400 UFC/ml en el caso de *C. albicans* (Samaranayake et al., 1986). Utilizando técnicas de impresión, se ha demostrado que particularmente el dorso de la lengua es el reservorio principal de estas levaduras (McCullough, 1996).

2.1.4 Morfología

El género *Candida* está conformado por hongos levaduriformes en su mayoría dimórficos. *C. albicans*, la principal especie patógena del género presenta dimorfismo relacionado con la disponibilidad de nutrientes (Richardson y Warnock, 2003). Sus tres formas biológicas principales son:

- Vegetativa o levadura, de forma oval que mide de 3 a 7µm de diámetro, de reproducción asexual a través de blastoconidios.
- De forma elongada o pseudomicelio, estas son formas filamentosas que sobresalen de las levaduras y miden de 5 a 20 µm. Las pseudohifas son cadenas de células subesféricas en gemación, que no se desprenden y forman una red ramificada parecida a las hifas verdaderas. Las colonias compuestas por pseudohifas tienen un aspecto blando y blanco en contraste con el crecimiento algodonoso del micelio verdadero.
- Clamidoconidias, son unicelulares de formas redondas u ovaladas de 8 a 16 µm de diámetro con pared gruesa refringente, situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados. Son estructuras de reproducción asexual. La célula conidiógena sufre un agrandamiento terminal del primordio, su gran tamaño se debe al almacenamiento de nutrientes de reserva y la pared gruesa es un medio de protección a ambientes desfavorables. La pared está compuesta por dos capas; la interna de polisacáridos β-glucanos y la externa de manoproteínas y quitina que pueden presentar un contenido de lípidos.

Cuando se cultiva *C. albicans* en medios con suero humano y se incuba en un rango de 20 a 37°C por 2 a 8 h, las células de levadura presentan la formación de un tubo germinal, estructura alargada que se observa en cultivos jóvenes. A este fenómeno se le conoce por los estudios de Reynolds-Braude (Kantheti et al., 2012) y es un procedimiento rápido de identificación para la identificación. El sistema API 20 C AUX es un sistema de identificación de las levaduras más comunes encontradas en microbiología clínica y sugiere la identificación de hifas (micelio) o pseudohifas (pseudomicelio) por lo que representa una prueba complementaria a la prueba de detección (Sullivan et al., 1995).

2.1.5 Ecología y epidemiología

C. albicans está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Los tractos digestivo y respiratorio junto con la mucosa genital son los reservorios más importantes en seres humanos y el sitio de origen de las candidiasis endógenas. En estos tejidos, *C. albicans* se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica necesariamente la presencia de infección. Este organismo no sobrevive mucho tiempo en superficies deshidratadas y la supervivencia mejora cuando hay humedad, se le ha aislado de cepillos dentales, cosméticos y ropa. Las especies de este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza, *C. albicans* y *C. glabrata* son encontradas comúnmente en humanos y algunos animales, principalmente primates, animales domésticos incluyendo gatos y perros, varios mamíferos marsupiales y aves. En el ser humano las especies del género *Candida* se encuentran de manera ubicua, las infecciones exógenas son poco frecuentes, mientras que las endógenas son más comunes dado que estas levaduras forman parte de la biota normal (Calderone, 2002).

A principios del siglo XX, sólo *C. albicans* tenía relevancia médica ya que era responsable del 60 al 70 % de las infecciones, mientras que especies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* eran considerados patógenos ocasionales. Entre los años 1980 y 1990 emergieron otras especies consideradas no patógenas como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitaniae* (Nucci y Marr, 2005; Coleman, 1998).

En los Estados Unidos, datos de los hospitales participantes en el *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS), mostraron un aumento en el porcentaje de las infecciones sanguíneas nosocomiales causadas por hongos, del 5.4% en 1980 a 9.9% en 1990. Las levaduras del género *Candida* fueron el cuarto patógeno más común que infectó el torrente circulatorio de los pacientes en estos

hospitales, la especie más frecuente fue *C. albicans* con una prevalencia de entre 28.8 y 79.4%. Las tres especies de *Candida* no-*albicans* más comunes fueron *C. glabrata*, *C. tropicales* y *C. parapsilosis*, con prevalencias de 20 a 25%, 10 a 20% y 10 a 20% respectivamente; mientras que la incidencia de *C. krusei* fue de 4% (Sandven, 2000).

El aislamiento de especies del género *Candida* se ha incrementado notablemente como causante de infecciones nosocomiales y la distribución de las especies ha cambiado con el tiempo. En Estados Unidos, Pfaller y colaboradores entre 1997 y 2003, observaron una tendencia de distribución inespecífica de *C. glabrata* y *C. krusei*, al mismo tiempo detectaron un incremento en *C. tropicalis* de 4.6 a 7.5% y *C. parapsilosis* de 4.2 a 7.3% (Pfaller et al., 2006).

En un estudio sobre la distribución geográfica de *C. albicans*, Falagas y colaboradores (2010) observaron que *C. albicans* fue aislada en el 60 % de los casos de candidemias en el norte y centro de Europa, mientras que en América del Sur y Asia representó sólo el 40 al 42% de los aislados.

Dependiendo de la región geográfica *C. glabrata* puede ocupar el segundo o tercer sitio después de *C. albicans*, como agente causal más común de candidemias como ocurre en Estados Unidos de América y el Reino Unido, donde tiene una frecuencia del 18.8 al 24% y 22.7% respectivamente; mientras que en América Latina, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* sustituyen a *C. glabrata* en tal posición. En América Latina, Colombo y colaboradores (1999) observaron una frecuencia de *C. glabrata* en el 4 al 7% de los casos. Asimismo durante ese período se reportó una disminución de *C. glabrata* del 10.5 al 8.8% en Europa y del 12.1 al 7.2% en Asia, mientras que en los países de América del Sur, sólo representó el 5% de los aislamientos (Silva et al., 2012).

La frecuencia de *C. tropicalis* en Estados Unidos de América y en el norte y centro de Europa representa del 4 al 11% de los casos, mientras que en América del Sur del 21 al 24% y en países de Asia oriental el 22% (Diekema, 2002).

C. parapsilosis muestra una alta incidencia en América del Sur (20.5 al 21.3%), Asia Occidental (30%), Europa Occidental (23%) y Oceanía (20%); a diferencia del norte y centro de Europa (1 al 5%) (Silva et al., 2012). En un estudio sobre candidemia realizado en España en 1997 en 39 hospitales, se determinó una prevalencia de *C. albicans* del 41% y de *C. parapsilosis* del 37% (Trost et al., 2004).

Otras especies menos comunes son *C. krusei*, que representa entre el 1% y el 4% de los aislados y *C. guilliermondii* del 3 al 5% de las candidemias (Bassetti et al., 2005).

2.2 Especies de *Candida* de interés médico

De acuerdo a Garaizar y colaboradores (2006), las principales especies del género *Candida* de interés clínico son:

- *C. albicans*. Comprende el aislamiento más frecuente en las lesiones clínicas en los seres humanos y es el principal agente causal de las micosis oportunistas. Forma parte de la biota comensal de la mucosa bucal, del tracto gastrointestinal y la mucosa vaginal. Está relacionada con todas las manifestaciones micóticas de los tejidos mencionados. Se han identificado dos serotipos de *C. albicans* A y B, este último más frecuente en los pacientes con VIH/SIDA. Además se ha caracterizado una variedad *stellatoidea* de *C. albicans*, agente causal de la vaginitis y endocarditis.
- *C. tropicalis*. Afecta con frecuencia a los pacientes leucémicos y neutropénicos, tiene gran capacidad invasiva y se estima que de un 50% a un 60% de los casos, desarrollan candidiasis diseminada a diferencia de *C. albicans* que lo hacen en un 2 a 15% de los casos (Nucci y Marr, 2005).
- *C. glabrata*. Se ha demostrado que no forma pseudohifas y sus blastoconidios suelen ser pequeños (1µm a 4µm). Es un patógeno emergente muy estudiado por presentar poca sensibilidad al fluconazol. Está relacionada con pacientes inmunosuprimidos por el uso de antibióticos de amplio espectro, uso de catéteres venosos, nutrición parenteral y estancias prolongadas en unidades de cuidados intensivos. Se observan altas tasas de colonización de *C. glabrata* orofaríngea en adultos mayores y en pacientes con cáncer. Por lo anterior, es una especie asociada a una alta tasa de mortalidad y en América Latina representa de un 4 a 7% de las especies relacionadas a candidemias (Maubon et al., 2014).
- *C. parapsilosis*. Es un patógeno exógeno que se encuentra en piel más que en superficies mucosas. Se relaciona con el uso de drogas intravenosas, con el uso de catéteres intravasculares y otros implantes. Se caracteriza por la habilidad de formar biopelículas y está fuertemente asociada a candidiasis sistémicas y nosocomiales, principalmente en infantes y neonatos. La frecuencia de este patógeno ha aumentado considerablemente en América Latina, sin embargo

es una especie asociada a una baja tasa de mortalidad debido al tratamiento generalmente efectivo con antifúngicos azólicos.

- *C. krusei*. Afecta gravemente a pacientes neutropénicos y se le aísla con frecuencia en casos de septicemia y endoftalmitis. Se han reportado casos de poca sensibilidad y resistencia intrínseca a fluconazol (Nucci y Marr, 2005).
- *C. dubliniensis*. Es un patógeno oportunista recientemente descrito, se aísla frecuentemente de la cavidad bucal de pacientes infectados con VIH/SIDA. Esta levadura tiene la capacidad de generar tubo germinal y clamidosporas, situación que dificulta su discriminación de *C. albicans*. Se han obtenido cepas de *C. dubliniensis* resistentes a fluconazol *in vitro* y muestran una elevada expresión del transportador resistente a multidrogas MDR1 (Sullivan et al., 1995; Gutiérrez et al., 2002).
- *C. guilliermondii*. Es considerado un agente causal de endocarditis, principalmente en adictos a drogas intravenosas. Se le asocia a pacientes inmunocomprometidos y que han sufrido procesos quirúrgicos.
- *C. kefyr*. (Antes llamada *C. pseudotropicalis*) causa infecciones oportunistas, principalmente en micosis pulmonares (Hazen, 1995).
- *C. lusitanae*. Este hongo oportunista produce candidiasis en inmunodeprimidos. Ha sido aislado en sangre, esputo, riñón y tracto gastrointestinal. Causa aproximadamente del 2 al 8% de los casos de fungemia en adultos con cáncer y es responsable de infecciones nosocomiales. Su emergencia está asociada con el uso de polienos orales en pacientes susceptibles y se ha observado que desarrolla resistencia a Anfotericina B (Ball et al., 2004).

2.3 Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia

El ser humano en condiciones normales de salud dispone de mecanismos inmunológicos que lo protegen de la infección por *Candida*. La superficie mucosa y la presencia de la microbiota bacteriana normal son barreras naturales contra la colonización. Por otra parte, en los tejidos ocurre la fagocitosis por acción de los macrófagos a través de un complejo enzimático de mieloperoxidasas y en el torrente sanguíneo se encuentran otros importantes elementos defensivos. Es probable que cuando los elementos de defensa mencionados se debilitan, las levaduras saprófitas se convierten en patógenos, ya que habitualmente la candidiasis es de procedencia endógena (Hazen, 1995). Para el establecimiento del proceso patológico normalmente coinciden dos fenómenos: la conversión de la levadura comensal a patógena y la susceptibilidad del hospedero a la infección por *Candida* (Senet, 1997).

El balance entre colonización y candidiasis depende de la capacidad del hongo para modular la expresión de los factores de virulencia en respuesta a los cambios ambientales, combinado con la competencia del sistema inmunológico del hospedero. Sabemos que la virulencia de *C. albicans* se debe a un conjunto de factores relacionados con su capacidad para lesionar los tejidos y evadir los mecanismos de defensa del hospedero. Borecká y colaboradores (2008), describieron diversos mecanismos de virulencia, todos quedan incluidos en las siguientes categorías:

- (1) la expresión de glicoproteínas de adhesión en la superficie (principalmente manoproteínas) reconocidas por el hospedero,
- (2) la secreción de diversas enzimas invasivas como fosfolipasas y proteasas (aspartil proteasas),
- (3) la formación de biopelículas como mecanismo de colonización y resistencia y
- (4) el cambio morfogénico de crecimiento unicelular (levadura) a multicelular y filamentoso (hifas y pseudohifas).

2.3.1 Adherencia

El principal factor que contribuye a la virulencia de algunas especies del género *Candida* es su habilidad para adherirse y persistir en las mucosas epiteliales, situación que precede a la colonización del tejido. Además estas levaduras tienen una afinidad no específica por resinas acrílicas (dentaduras odontológicas) y otros polímeros (catéteres). El mecanismo de adhesión está relacionado con los componentes de la pared celular y se da en dos fases; inicialmente existe una adhesión no específica dada por interacciones electrostáticas (cationes divalentes) y posteriormente por interacción entre receptores específicos y adhesinas (Hamilton et al., 1992).

La adhesión de *Candida* es mejor en formas celulares de blastosporas, pseudohifas y durante la formación del tubo germinativo. En estas fases se observa que aumenta considerablemente la proporción de manoproteínas involucradas en la adhesión (McCullough et al., 1996). Se han descrito dos tipos de adhesinas entre las especies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, la flocular y la fibrilar. Las adhesinas floculares son las responsables de mediar la adhesión a la mucosa epitelial de la cavidad bucal, mientras que las fibrilares generan la adhesión a células endoteliales y componentes de la

matriz extracelular, como fibronectina, laminina y colágeno. Por otra parte, se sabe que la microbiota bacteriana nativa de la boca interfiere con la adherencia y colonización por *Candida* y cuando esta se ve alterada por efecto de una terapia antibiótica, se produce la colonización micótica y aparece la enfermedad. Además, la secreción de inmunoglobulina A también inhibe la adherencia de *Candida* a las células epiteliales (O'Sullivan et al., 2000). Se ha propuesto que el péptido salival con propiedades antimicóticas Hst-5 desempeña un papel importante como protector de la mucosa oral ante la adherencia y colonización por cepas de *C. albicans* (Torres et al., 2008). En pacientes con VIH/SIDA se observan niveles bajos de Hst-5 que correlacionan con la presencia de candidiasis (Repentigny et al., 2004).

2.3.2 Secreción de enzimas y toxinas

En estudios sobre la secreción de toxinas y enzimas hidrolíticas en algunas levaduras del género *Candida*, se observa que las enzimas hidrolizan polímeros produciendo nutrientes que permiten el crecimiento de estas levaduras. Entre estas enzimas se destacan las Saps (Secreted aspartil proteinases) que son endopeptidasas identificadas en *C. albicans*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*. Otras enzimas identificadas son las fosfolipasas, lipasas fosfomonoesterasas, hexosaminidasas, hemolisinas y carboxil-proteinases (capaces de degradar inmunoglobulina A), en diferentes especies del género. Las proteinasas son las más estudiadas y sólo son producidas por algunas de las especies más patogénicas del género: *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Pichova et al., 2001).

2.3.3 Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos unidos a una superficie y embebidos en una matriz exopolimérica que genera protección del ambiente, los fármacos y los mecanismos del sistema inmune. Las biopelículas fúngicas comparten propiedades con las biopelículas bacterianas; en el caso de las biopelículas de *C. albicans* poseen una heterogeneidad estructural y una arquitectura de microcolonias con canales de agua. La formación de estas matrices se ha descrito claramente en *C. albicans*, *C. parapsilosis* (en medios ricos en glucosa y lípidos) y *C. tropicalis* (en superficies de silicón y catéteres de látex) (Borecká et al., 2008).

Los pasos para la formación de una biopelícula cursan por la adhesión, la colonización, la coadhesión, maduración y desinserción. Entre los factores que mejoran la adhesión de las levaduras de *Candida* a las células de la mucosa se citan: la producción del tubo germinal, la secreción de fosfolipasas y proteasas (Saps), la presencia de ciertas manoproteínas en la pared del hongo, el pH y la temperatura (Overman, 2000). Una vez adheridas las células fúngicas secretan una cubierta de glucoproteínas llamadas adhesinas creando una matriz polimérica donde se reproducen las levaduras, este proceso representa la colonización y en términos clínicos la etapa inicial de la infección. La madurez de la biopelícula consiste en una mezcla de levaduras y formas filamentosas embebidas en el material exopolimérico. La coadhesión implica la participación de colonizadores primarios y secundarios o tardíos, donde las especies planctónicas de *Candida* se unen a receptores en la superficie de diferentes microorganismos. Se ha observado que *C. albicans* se une a colonizadores primarios inmovilizados como los estreptococos, *Streptococcus gordonii*, *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. mitis*, entre otras especies (O'Sullivan et al., 2000). La última fase del desarrollo de la biopelícula llamada desinserción, representa el desalojo de microorganismos que en otras áreas pueden reiniciar el ciclo de formación de biopelículas (Overman, 2000).

2.3.4 Cambios morfogenéticos

Uno de los cambios morfogenéticos es el dimorfismo, este consiste en la capacidad que tienen algunas levaduras de cambiar morfológicamente de blastoconidio a pseudohifa e hifa. Estas últimas permiten la penetración a los tejidos y se ha observado que liberan mayor cantidad de fosfolipasas por lo que pueden evadir los mecanismos inmunológicos de defensa del hospedero, como el ataque por fagocitosis (Rueping et al., 2009). Otro cambio morfogenético es el switching fenotípico, el cual habilita a algunas de estas levaduras para cambiar la morfología de la colonia (de colonias lisas a rugosas) y la antigenicidad, como es el cambio en la secreción de enzimas y toxinas (Senet, 1997). Algunas especies del género *Candida* se destacan por la habilidad de cambiar fenotípicamente de levadura a hifa, como es el caso de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Se ha demostrado que las cepas impedidas para desarrollar tales cambios morfogenéticos, tienen baja capacidad de virulencia y menor resistencia a los antifúngicos normalmente utilizados (Kruppa, 2008).

2.4 Candidiasis oral en pacientes con VIH/SIDA

Los seres humanos viven en armonía relativa con una serie de bacterias y hongos que no causan enfermedades a las personas sanas, sin embargo, estos agentes pueden aprovecharse de un sistema inmune debilitado. Las infecciones que ocasionan son llamadas oportunistas, como la candidiasis. Estos microorganismos pueden transformarse en patógenos cuando existen factores que favorecen su crecimiento y colonización, causando afecciones superficiales o profundas (Felix, 1993; Campisi et al., 2001). En la Tabla 2 se presentan las formas clínicas de la candidiasis (Hernández, 2012).

Las candidiasis son las infecciones micóticas orales más frecuentes. Históricamente la afectación oral por *Candida* fue la primera forma clínica descrita. Clásicamente estaba asociada a la infancia y a la ancianidad, actualmente se observa como una manifestación común en pacientes inmunocomprometidos (Hauman et al., 1993; Gugnani, 2003; Hamza et al., 2008). En la mayoría de los pacientes se produce o mantiene a partir de un reservorio endógeno (oral o digestivo) del propio enfermo. En algunos casos la infección se adquiere de otras personas, como ocurre con la candidiasis neonatal de recién nacidos cuyas madres presentan candidiasis vaginal en el momento del parto (Fetter et al., 1993).

Tabla 2. Formas clínicas de candidiasis, tomado de Hernández, 2012.

Localizada	Mucosa	Bucal Esofágica Genital
	Cutánea	Intertrigo Onicomycosis
Diseminada	Candidiasis mucocutánea crónica Granuloma candidiásico	
Sistémica	Tracto urinario Pulmonar Gastrointestinal Endocarditis Meningitis Candidemia	
Alérgica	Eccema Asma Gastritis	

La Candidiasis Orofaringea o Candidiasis Oral (CO) es la complicación bucal con mayor prevalencia en pacientes infectados con el VIH o con SIDA y representa la principal causa de morbilidad y mortalidad. La

presencia de candidiasis en la cavidad oral de estos pacientes es un importante indicador tanto de la enfermedad, como de su progresión (Patton et al., 1999; Ohmit et al., 2003).

Las defensas primarias del huésped para limitar la colonización e invasión de *Candida* son los neutrófilos y los linfocitos T, que en conjunto previenen la candidiasis y la diseminación hematógena. Es decir, en pacientes con conteos de linfocitos T CD4 menores a 200 células/mm³ y/o con una elevada carga viral en plasma hay un alto riesgo de desarrollar candidiasis (Repentigny et al., 2004).

La CO suele presentarse como una manifestación clínica inicial del SIDA y se ha observado que el curso prolongado de la infección con VIH predispone a estos pacientes a episodios recurrentes de CO que puede incrementar en frecuencia y severidad con el progreso de la enfermedad (Schoofs et al., 1998; Ohmit et al., 2003; Zhang et al., 2009).

Históricamente las lesiones generadas por la CO se han clasificado en variantes pseudomembranosas, eritematosas e hiperplásicas. No obstante, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1992 estableció que la clasificación clínica comprende sólo los tipos de candidiasis pseudomembranosa y candidiasis eritematosa. La forma pseudomembranosa es la manifestación clínica más frecuente en los pacientes con VIH/SIDA. La presencia de estas lesiones puede ser dolorosa y promover una reducción en la alimentación, situación que compromete aún más la salud de este grupo de pacientes (Hamza et al., 2008).

La CO puede deberse a diferentes agentes etiológicos, el más frecuente es *C. albicans*. Otras especies involucradas son *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* y *C. inconspicua*. Recientemente, en un estudio sobre las especies de *Candida* relacionadas a CO en pacientes con VIH, se corroboró que *C. albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia (84.5%), seguida por *C. glabrata* (6.8%) y *C. Krusei* (3.4%). Además se ha reportado la presencia de *C. dubliniensis* como agente causal importante de la CO en pacientes infectados con VIH a través de estudios de genotipificación (Gutiérrez et al, 2002).

La implementación de la terapia antiretroviral altamente activa (TARAA) en la práctica clínica para el tratamiento de los pacientes con VIH/SIDA, ha reducido la prevalencia de muchas infecciones oportunistas incluyendo la CO, debido a la reconstitución de diversas funciones inmunes. Se ha observado que un aumento en las cuentas celulares de linfocitos T CD4+ y la disminución de la carga viral en plasma, correlacionan con la disminución de la colonización por *Candida* spp., y con la reducción del

riesgo de infecciones bucales sintomáticas (Gottfredson, 1999). Aunque la incidencia y prevalencia de infecciones oportunistas a nivel mundial se ha reducido gracias al uso de TARAA, la CO sigue siendo la lesión oral más frecuente en pacientes con VIH/SIDA en la mayoría de los países en vías de desarrollo (Repentigny et al., 2004).

2.4.1 Candidiasis seudomembranosa

También conocido como muguet o algodoncillo, es la forma clínica más frecuente y se caracteriza por la presencia de grumos o placas blancoamarillentas de consistencia blanda o gelatinosa, que crecen de manera centrífuga y semiadheridas. Cuando estas placas son raspadas se desprenden fácilmente dejando una zona eritematosa, erosionada o ulcerada, en ocasiones dolorosa. Las lesiones se pueden localizar en cualquier parte de la cavidad bucal pero predominan en la mucosa, paladar orofaríngeo y márgenes laterales de la lengua. En la mayoría de los casos la sintomatología es mínima, pero en los casos graves los pacientes pueden quejarse de dolor, ardor o disfagia, tal es el caso de los pacientes con VIH/SIDA, ya que suelen presentar formas crónicas difíciles de erradicar. En este grupo de pacientes aparece como una infección aguda que puede ser recurrente por meses o años (Zhang et al., 2009). El diagnóstico clínico se realiza por medio de exámenes de microscopia de la seudomembrana blanca, donde se detectan pseudohifas y levaduras que tiñen positivo con el colorante de Gram (Gadea et al., 2007).

2.4.2 Candidiasis eritematosa.

Se presenta clínicamente como un área rojiza de bordes mal definidos en la mucosa oral con la presencia de placas blanquecinas o placas eliminables. Es más frecuente identificarla en el dorso de la lengua en su zona central y en el paladar duro, formando una imagen de doble de espejo. En general son lesiones asintomáticas que producen un ligero picor. Esta forma es común en los pacientes xerostómicos que toman antibióticos de amplio espectro y constituyen la llamada “lengua antibiótica” (Ramírez et al., 2009).

2.4.3 Etiopatogenia

Los factores predisponentes del huésped son de importancia para el desarrollo de la candidiasis. Las levaduras de este género son patógenos oportunistas estrictos, por lo tanto sólo causan enfermedad cuando las defensas del huésped son inadecuadas, como sucede con los pacientes con inmunodeficiencia adquirida o natural (Pfaller y Diekema, 2007).

Los factores predisponentes de la candidiasis se clasifican en dos categorías; factores sistémicos y factores locales. Los factores sistémicos comprenden; periodos extremos de la vida y embarazo, alteraciones hormonales (Diabetes mellitus, hipotiroidismo), trastornos nutricionales (Deficiencias en hierro, folatos y vitamina B12), enfermedades malignas (Cáncer oral, leucemia, agranulocitosis) y defectos en la inmunidad (SIDA, aplasia tímica). Por otra parte los factores locales contemplan; el uso de antibióticos de amplio espectro y corticoides, xerostomía, empleo de drogas, radioterapia, trasplante de órganos, dieta rica en carbohidratos y uso de tabaco fumado. En la Tabla 3 se muestra una clasificación detallada de tales factores (Repentigny et al., 2004).

Con relación a la edad, los lactantes presentan un sistema inmunológico inmaduro, mientras que los ancianos tienen una disminución en la producción de saliva por lo que ambos grupos son susceptibles al desarrollo de infecciones oportunistas (Torres et al., 2008). En el caso de las mujeres en estado de embarazo la predisposición se debe a los cambios hormonales que favorecen el desarrollo de estas infecciones (Shibosky, 1996)

Por otra parte, las alteraciones endócrinas provocan cambios en el metabolismo de los carbohidratos en estos pacientes, situación relacionada con el crecimiento de *Candida*. Se ha reconocido que las dietas ricas en carbohidratos predisponen a la candidiasis oral, ya que las levaduras mejoran su capacidad de adhesión a las células epiteliales. Además, se ha observado que las deficiencias nutricionales tienen correlación con una baja tasa de proliferación celular del sistema inmune. Así, la deficiencia de hierro altera algunos procesos inmunológicos como la producción de anticuerpos y la fagocitosis; el déficit de folato promueve cambios degenerativos en la mucosa oral, y las deficiencias de vitamina A, B1, B2, B12 y C, también alteran el estado inmunológico favoreciendo la aparición de candidiasis oral (Repentigny et al., 2004). Las enfermedades malignas y los defectos de la inmunidad correlacionan con un estado de inmunosupresión, situación que promueve el desarrollo de candidiasis (Odds y Bernaerts, 1994).

La utilización de antibióticos de amplio espectro y corticoides, son factores predisponentes por la destrucción de la flora bucal que altera el equilibrio de la misma. La población drogodependiente y los sujetos que toman sedantes padecen una disminución en la producción de saliva, situación que es una condicionante local para el desarrollo de la candidiasis oral (Wisplinghoff et al., 2004). Acerca del uso de tabaco, se observa que aumenta la queratinización epitelial, reduce la concentración de IgA en la saliva y deprime la función de los leucocitos polimorfonucleares; todas estas situaciones pueden favorecer el crecimiento oral de *Candida*, aunque la relación entre el uso de tabaco fumado y la colonización no está claramente establecida (Aguirre, 2002).

Tabla 3. Factores predisponentes relacionados a candidiasis oral, tomado de Hernández, 2012.

Estados fisiológicos	Inmunodeficiencias y enfermedades debilitantes
Prematurez	Infección con VIH/SIDA
Infancia	Leucemia
Vejez	Linfomas
Embarazo	Sarcomas
	Diabetes
	Obesidad
	Síndrome de Cushing
	Trasplantes
Factores iatrogénicos	Misceláneos
Antibióticos	Drogadicción
Glucocorticoides	Quemaduras y heridas
Citotóxicos	Traumatismo
Inmunosupresores	Cambios de pH
Hormonas sexuales	Prótesis
Cateterismo	
Nutrición parenteral	

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico convencional de las Candidiasis es fundamentalmente clínico, se basa en el reconocimiento de las lesiones provocadas por el agente causal y la confirmación a través de hallazgos radiológicos, de microscopía, análisis en cultivos, ensayos serológicos y exámenes histopatológicos de los tejidos sospechosos. La observación microscópica se realiza en fresco o mediante tinciones que facilitan la identificación de las levaduras y el pseudomicelio. En el laboratorio de micología los aislamientos se identifican al microscopio con la prueba de filamentación en suero de bovino para identificar la formación de tubos germinativos en *C. albicans*. Con la observación morfológica de las blastoconidias,

hifas y pseudohifas al microscopio se distinguen algunas especies del género. Así mismo, con la producción de clamidoconidias en agar y extracto de maíz con Tween-80 (Richardson y Warnock, 2003).

Los cultivos se realizan en placas de agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol o gentamicina (para inhibir el crecimiento bacteriano). Hay medios de cultivo cromogénicos que permiten hacer una identificación presuntiva rápida del aislamiento (18 a 48 h) según el color que presentan las colonias aisladas. Entre estos medios de cultivo se destaca el BBL CHROMagar *Candida* de París, Francia distribuido por BD Diagnostic Systems, este contiene sustratos cromógenos que ponen de manifiesto la actividad enzimática diferencial entre las especies, de tal manera que se pueden discriminar aquellas especies con actividad de hexosaminidasa (*C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*) de aquellas con actividad de fosfatasa alcalina (*C. krusei*). En la Tabla 4 se muestra la coloración de crecimiento identificada en chromagar de algunas especies del género (Odds y Bernaerts, 1994). Otros medios son el agar ALBICANS ID (Bio-Mériux, Francia) y el agar Fluoroplate *Candida* (Merck, RFA), donde *C. albicans* crece en forma de colonias color verde-azulado y lisas en el primero, y las colonias generan una fluorescencia blanca al iluminarlas con luz UV en el segundo de estos medios (Martínez et al., 2008).

Tabla 4. Coloración de crecimiento en el medio cromogénico BBL CHROMagar *Candida* BD Diagnostic Systems.

Agente etiológico	CRHOM agar <i>Candida</i>
<i>C. albicans</i> y/o <i>C. dubliniensis</i>	Verde
<i>C. tropicalis</i>	Azul
<i>C. parapsilosis</i>	Rosa pálido, blanco
<i>C. glabrata</i>	Rosa púrpura, blanco
<i>C. krusei</i> y/o <i>C. guilliermondii</i>	Rosa pálido, púrpura
<i>C. lusitaniae</i>	Rosa púrpura grisáceo

Hay otros métodos bioquímicos de uso comercial para la identificación de las levaduras, como son las pruebas del patrón de fermentación (zimogramas) y asimilación de distintos carbohidratos (auxonogramas). Entre estos se destacan el API ATB ID 32 C (que consta de una galería de 31 carbohidratos), VITEK 2 ID-YST, Microscan y el API 20 C AUX. Existen también medios que permiten identificar los aislamientos mediante reacciones enzimáticas, como el Fongiscreen 4H, el Rapidec Albicans o el Auxocolor, que tienen la ventaja de ser mucho más rápidos que los métodos convencionales (Gadea et al., 2007; Liguori et al., 2007).

Para efecto del aislamiento es muy importante la correcta toma de muestras bucales. Habitualmente se toma con un hisopo o mediante raspado, el hisopo debe ser humedecido con suero fisiológico o agua estéril para que la muestra no se seque. Otros métodos de obtención de muestras bucales son el enjuague bucal, la recolecta de saliva y la impresión mediante contacto del medio de cultivo con la mucosa (Samaranayake et al., 1986; Wahyuningsih et al., 2000; Liguori et al., 2007).

El diagnóstico convencional de las micosis está basado en métodos de identificación que implican tiempo y pueden ser inespecíficos y de baja sensibilidad, con relación a la baja actividad celular y humoral que muestran los pacientes inmunosuprimidos (Ball et al., 2004). Se han descrito varios métodos para diferenciar los aislados de *Candida* por genotipificación para propósitos epidemiológicos. La metodología se basa principalmente en el análisis molecular de la región génica que codifica para el ARNr 25S, región conocida como altamente polimórfica (Liguori et al., 2010).

2.6 Agentes antifúngicos

El esquema de tratamiento de la candidiasis oral está basado en cuatro pilares; realización de un diagnóstico precoz y certero de la infección, corrección de los factores facilitadores (sistémicos y/o locales) o de las enfermedades subyacentes, determinación del tipo de infección candidiásica y el empleo de fármacos antifúngicos apropiados (Zaragoza et al., 2008; Delgado et al., 2009).

En la década de 1950 se registró un gran avance en la terapéutica micológica debido al desarrollo de los polienos como la anfotericina B. Este antifúngico rápidamente se convirtió en el tratamiento de elección para micosis graves, sin embargo, con el tiempo su uso se asoció a efectos adversos severos como nefrotoxicidad. En 1981 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el primer fármaco azólico (ketoconazol) de amplio espectro y con menos efectos secundarios, para el tratamiento de las candidiasis y candidemias. La introducción de los triazoles de primera generación como el fluconazol en 1990 e Itraconazol en 1992 representó una alternativa eficiente para el tratamiento de las micosis, así como los triazoles de segunda generación (voriconazol y posaconazol) que resultaron más potentes contra hongos resistentes a otros antifúngicos (Maertens, 2004).

Por su mecanismo de acción, los fármacos antifúngicos se clasifican en: 1) macrólidos polienos como la anfotericina B y nistatina, que son agentes que alteran la membrana celular; 2) derivados azólicos como

el fluconazol y miconazol, que actúan como inhibidores de la síntesis de ergosterol; 3) equinocandinas como la caspofungina, que inhiben la síntesis de β -glucanos y 4) La fluoropiridina 5- fluocitosina, que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Comparado con la cantidad de antibióticos existe poca diversidad de agentes antifúngicos, por lo que las posibilidades de tratamiento de las micosis son limitadas (Calderone, 2002; Sanglard y Odds, 2002)

Los antifúngicos azólicos (fluconazol en particular) son considerados los fármacos de primera elección para el tratamiento de los pacientes con CO relacionada con el VIH/SIDA (Sullivan, 1997). Se ha encontrado un alto nivel de sensibilidad a fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol y anfotericina B, en infecciones primarias. Aunque tal sensibilidad se ve reducida en los pacientes con CO periódica y/o con terapia antifúngica previa (Pfaller y Diekema, 2007). Es importante el reconocimiento de la especie implicada en el proceso infeccioso para diseñar un tratamiento y manejo específico, ya que algunas levaduras del género *Candida* pueden tener susceptibilidad reducida a determinados antifúngicos. Tal es el caso de *C. krusei* que presenta resistencia intrínseca a fluconazol y *C. glabrata* que con frecuencia muestra resistencia a diferentes azoles. Ambas especies se han encontrado en pacientes inmunosuprimidos (Chave et al., 1996; Barchiesi et al., 2002).

El uso de rutina en los tratamientos profilácticos en pacientes con CO puede generar resistencia y la exposición prolongada a antifúngicos destaca como la principal causa de aparición de cepas resistentes. Se ha observado que los pacientes con una avanzada enfermedad de VIH/SIDA desarrollan resistencia ya sea por tratamientos repetidos o terapias de periodos prolongados (Delgado et al., 2009).

2.6.1 Macrólidos polienos

La Anfotericina B (AmB) tiene alta afinidad de unión al ergosterol de la membrana plasmática, se sabe que altera su estructura modificando también la integridad de la membrana. También forma canales por donde se liberan iones de potasio modificando el gradiente de concentración electroquímico del microorganismo y causa daños oxidativos a las membranas plasmáticas. En altas concentraciones los polienos inhiben a la enzima quitina-sintetasa que participa en la síntesis de la pared celular. Es un compuesto que además inhibe la síntesis de ergosterol y fosfolípidos de las membranas del retículo y mitocondrias. La AmB tiene una relación con el citocromo P 450 fúngico, el cual regula las vías de

biosíntesis de lípidos, así como el cambio morfológico de levadura a pseudohifa. (Loeffler y Stevens, 2003).

La nistatina es otro polieno, con una estructura y mecanismo de acción similar a la AmB. Su uso está restringido a aplicaciones tópicas para infecciones en la piel y administración oral. El efecto secundario de principal cuidado con el uso de estos fármacos es la nefrotoxicidad (Cruciani y Serpelloni, 2008).

La causa de resistencia a los polienos es una alteración importante en la composición lipídica de la membrana plasmática, principalmente una reducción en el contenido de ergosterol, lo que produce una baja afinidad de los polienos a la membrana. Otra causa de resistencia es la alteración en el contenido de β -glucanos 1-3 en la pared celular, estos compuestos aumentan la estabilidad estructural de la pared impidiendo el acceso de grandes moléculas como la AmB. (Sanglard y Odds, 2002).

2.6.2 Derivados azólicos

Se trata de inhibidores de la biosíntesis del ergosterol que interactúan con las enzimas necesarias para transformar el lanosterol en ergosterol. El primer compuesto azólico utilizado sistémicamente fue el clotrimazol y posteriormente el miconazol, que resulto más efectivo contra infecciones sistémicas, sin embargo, su uso intravenoso mostraba pocas diferencias con AmB en lo que a toxicidad se refiere. El Ketoconazol fue el primer azólico de uso bucal que mostró resultados satisfactorios contra la mayoría de las especies del género *Candida* con excepción de *C. glabrata*; además muestra baja hepatotoxicidad y su resistencia ha sido descrita en pacientes con VIH/SIDA con candidiasis mucocutánea, orofaríngea y esofágica (Loeffler y Stevens, 2003).

El Itraconazol tiene un amplio espectro de actividad y es el primer triazol usado en humanos. Es de administración bucal e intravenosa y muestra alta actividad *in vitro* contra las levaduras del género *Candida* (Maertens, 2004). El fluconazol es otro triazol que puede ser administrado bucal e intravenosamente; es usado el tratamiento de la candidiasis orofaríngea y esofágica en los pacientes con VIH/SIDA y en pacientes neutropénicos. Este azol ha mostrado que reduce significativamente la incidencia de candidiasis invasiva en pacientes después de la administración de quimioterapia o un trasplante. Es importante señalar que *C. krusei* es intrínsecamente resistente a este triazol y en diferentes tipos de pacientes se han aislado cepas de *C. glabrata* resistentes también, así como cepas de

C. albicans resistentes en pacientes con VIH (Barchiesi et al., 2002). Otro triazol de amplio espectro es el posaconazol, el cual presente una potente actividad *in-vitro* ante cepas resistentes a fluconazol e itraconazol, se encuentra disponible en suspensión oral y el perfil de toxicidad que genera es menos desfavorable que otros azoles. Se ha utilizado efectivamente en el tratamiento de la candidiasis oral y esofágica en pacientes con VIH (Maertens, 2004).

El Voriconazol está estructuralmente relacionado al fluconazol y muestra un espectro similar al itraconazol, es efectivo contra *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. Se ha recomendado en tratamientos empíricos para sustituir a la AmB en pacientes con neutropenia y fiebre persistente. La eficacia de este fármaco se ha observado principalmente en pacientes con VIH/SIDA que presentan candidiasis orofaríngea (Cruciani y Serpelloni, 2008).

El ergosterol es el esteroide más abundante de la membrana plasmática de los hongos. Los azoles actúan como inhibidores de la enzima lanosterol desmetilasa que participa específicamente en la biosíntesis del ergosterol. El sitio activo de la enzima lanosterol desmetilasa contiene un grupo hemo que porta un átomo de nitrógeno con el cual interactúan los compuestos azólicos, bloqueando el mecanismo de desmetilación del lanosterol. Además se ha observado que pueden interactuar con la enzima 3-cetoesteroide reductasa que participa en la biosíntesis del metilesterol, precursor biosintéticos del ergosterol (Pontón, 2008).

Se han propuesto varios mecanismos de resistencia entre los que destaca la permeabilidad reducida de la membrana celular al antifúngico, posibles alternativas en la vía de biosíntesis del ergosterol, la sobreexpresión de enzimas dependientes del citocromo P450, posibles mutaciones en el gen de la enzima desmetilasa (que disminuyen la afinidad de unión del antifúngico) o la existencia de una bomba de eflujo que elimina el antifúngico que entra a la célula (Sanglard y Odds, 2002).

2.6.3 5-fluorocitosina

Es una pirimidina fluorinada que se usa para el tratamiento de las infecciones fúngicas desde 1960. Su forma de acción está basada en la interferencia del metabolismo de las pirimidinas y la síntesis proteica. La 5-fluorocitosina (5-FC) actúa sobre la enzima citosina permeasa que promueve la transformación del 5-fluoracil en trifosfato fluororidina, molécula que se incorpora al ARN fúngico bloqueando la síntesis de

proteínas. También la 5-FC es convertida en fluorodesoxiuridina-monofosfato que interfiere con la enzima timidilato sintetasa, situación que inhibe la síntesis de ADN. La 5-FC tiene una excelente penetración en los tejidos.

La resistencia primaria al 5-FC no es común, se conocen dos mecanismos principales de resistencia. El primero es una disminución de actividad de la enzima citosina permeasa o desaminasa y el segundo es una disminución de actividad de la enzima uracil fosforribosil transferasa, enzima responsable de la conversión del 5-fluoracil en ácido 5-fluororidílico. Adicionalmente se ha descrito una disminución de la actividad de la enzima pirofosforilasa uridin monofosfato. Sin embargo, en el laboratorio se ha observado que rápidamente pueden surgir mutantes resistentes, por lo que en la práctica se recomienda usar este fármaco junto con otro antifúngico (Cruciani y Serpelloni, 2008).

2.6.4 Inhibidores de la síntesis de glucanos

La pared celular de los hongos está conformada por varias capas estructurales de glucanos, quitina, mananos y manoproteínas. Las equinocandinas son un pequeño grupo de fármacos que bloquean la biosíntesis del β (1-3) D-glucano a través de la inhibición de la enzima β glucano sintetasa, esto genera la disrupción de la pared y la muerte celular. Tres antifúngicos principales componen la clase de las equinocandinas; la caspofungina, micafungina y anidulafungina, todos inhiben la biosíntesis del β (1-3) D-glucano y se ha demostrado que presentan potente actividad *in vitro* contra especies del género *Candida*. Diferentes estudios revelan que esta actividad antifúngica funciona en aislamientos resistentes a los triazoles. Los mecanismos de resistencia a las equinocandinas son limitados y se basan en estudios de laboratorio con mutantes de *S. cerevisiae*. La caspofungina fue la primera utilizada clínicamente y sólo está disponible en formulas intravenosas, es utilizada en primera línea para tratar micosis invasivas incluida la candidiasis orofaríngea y esofágica. La micafungina y anidulafungina tienen un espectro de actividad similar *in-vitro*, farmacocinética y perfil de toxicidad que la caspofungina. El potencial clínico de estos nuevos antifúngicos se estudia ampliamente en la actualidad (Basma et al., 2008).

2.7 Sensibilidad a los antimicóticos

En las últimas décadas se ha registrado un incremento de la incidencia de las infecciones fúngicas como resultado de varios factores que incluyen un aumento en el número de pacientes con inmunosupresión severa. También se observa un incremento en el aislamiento de cepas que muestran resistencia a los fármacos comúnmente utilizados, en especial aislamientos de pacientes que han recibido profilaxis antifúngica, que requieren largos periodos de tratamiento y pacientes en unidades de cuidado intensivo (Sanglard y Odds, 2002).

Se ha publicado un elevado número de casos de infección bucal por *C. albicans* resistentes al fluconazol, el amplio uso de este antifúngico genera conocimiento de aquellos casos donde no se consigue el objetivo terapéutico deseado. La mayoría de las resistencias se asocian con pacientes en estadios finales de la infección por el VIH (con menos de 50 CD4+ por μ l) que padecen candidiasis orofaríngea de repetición y han sido tratadas previa e infructuosamente con diferentes fármacos antifúngicos (Margiotta et al., 1999).

En el caso concreto de *C. albicans* la presencia de resistencias es más baja que en otras especies como *C. krusei* o *C. glabrata*. *C. krusei* es intrínsecamente menos sensible a fluconazol. La caracterización subespecífica de los aislamientos de *C. albicans* de pacientes infectados con el VIH muestra la presencia de biotipos o genotipos diferentes con sensibilidad variable a los azoles en algunos enfermos. La aparición de nuevos episodios de candidiasis orofaríngea sería el resultado de la selección de los biotipos o genotipos con menor sensibilidad al antifúngico. En otros pacientes los nuevos episodios se relacionan con cambios en el fenotipo (probablemente por la presión antifúngica selectiva) en aislamientos con el mismo o diferente genotipo (Luque et al., 2008).

El riesgo de aparición de resistencia a los antifúngicos en pacientes con tratamientos prolongados hace necesario el estudio *in vitro* de la sensibilidad antifúngica. El interés de la evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos se basa principalmente en la necesidad del laboratorio clínico de proporcionar datos fiables que permitan seleccionar el fármaco más adecuado para el tratamiento. Para conseguir este objetivo es necesaria una adecuada valoración cuantitativa que prediga si un aislamiento clínico es resistente *in vitro* a un antifúngico (resistencia microbiológica) y, a su vez, una certera valoración cualitativa (utilidad pronóstica) que sirva para predecir la respuesta clínica cuando se emplea dicho antifúngico en el tratamiento. Además, está la necesidad de explicar los aparentes fallos terapéuticos o los problemas asociados con las resistencias primarias y secundarias en determinadas especies fúngicas a

antifúngicos concretos. Estas pruebas son útiles especialmente en pacientes con defectos inmunitarios o neutropenia, en infecciones recidivantes mucocutáneas y en las micosis diseminadas que no responden al tratamiento inicial.

En el 2005 Sánchez y colaboradores, estudiaron 111 pacientes mexicanos con VIH/SIDA y 201 personas sanas para determinar la presencia de levaduras colonizando la cavidad oral. De los 2 grupos de pacientes se obtuvieron 85 aislamientos de especies de *Candida*, 83.5% eran *C. albicans* y un 27 % de las especies eran *C. no-albicans*. El 10.8% de las levaduras eran resistentes a uno o más antifúngicos azólicos y un 29 % mostraba sensibilidad disminuida.

2.7.1 Métodos de estudio de actividad in vitro a los antifúngicos y evaluación de resistencia

Los métodos de estudio de la sensibilidad a los antifúngicos se dividen en; (1) métodos de difusión del antifúngico que implican una concentración fija en discos de papel, en tabletas o en tiras plásticas y son utilizados en un agar donde se ha inoculado previamente el aislamiento, midiéndose los halos de inhibición del crecimiento, y (2) los métodos de dilución, basados en la utilización de diferentes concentraciones de antifúngico en agar o medio de cultivo líquido. El método de microdilución en caldo (M27-A2) ha sido estandarizado por la NCCLS a través de los años desarrollando estudios colaborativos.

Capítulo 3. Planteamiento del problema

A partir de la década de los 80's ha estado aumentando la población con algún tipo de inmunocompromiso (Pinner, 1996), así mismo se ha observado un aumento en la incidencia de infecciones oportunistas (Coleman et al., 1998). En los pacientes con VIH/SIDA la infección oportunista más frecuente es la candidiasis oral (CO) (Diekema et al., 2002). A mediados de la década de los 90's con la introducción de la TARAA como tratamiento para los pacientes con VIH/SIDA, se observó una disminución general de las infecciones oportunistas en este grupo de pacientes (Gurtner et al., 2007). Sin embargo, no hay datos concluyentes en su relación con la prevalencia e incidencia de la CO.

Aunque la candidiasis es una enfermedad que afecta a la población mundial sin discriminación (Colombo et al., 2006), los factores geográficos juegan un papel muy importante en su aparición y en las especies responsables. En Estados Unidos, las especies de *Candida* varían en cada región geográfica: *C. albicans* en el 30.2% en el Suroeste y 54.5% en el noreste de ese país (Edmond et al., 1999). Los estudios sobre diversidad geográfica permiten detectar patógenos con alta virulencia o con mayor incidencia y prevalencia de estas infecciones. Actualmente, hay un gran interés en las especies de *Candida non-albicans*, debido al aumento y el cambio epidemiológico de las candidiasis.

Se sugiere que *C. albicans* muestra una gran variedad de factores de virulencia como resultado a la adaptación de las condiciones del hospedero y varias especies *non-albicans* son consideradas como patógenos emergentes. Además, las diferentes especies del género *Candida* muestran diferentes grados de sensibilidad a los antifúngicos utilizados en primera línea (azólicos), situación que ha promovido un aumento en los casos de resistencia a los antifúngicos empleados actualmente, ya sea de manera adquirida o intrínseca. La falta de estudios de sensibilidad y resistencia en las especies del género se ve reflejada en el fracaso terapéutico y en el aumento de los casos de resistencia.

Otro aspecto importante, es que pese a los intentos por descubrir nuevos fármacos antifúngicos para resolver el problema de las candidiasis, durante las últimas décadas se ha incrementado el número de fallas terapéuticas en casos de micosis. Esto se atribuye a diferentes causas como la emergencia de especies resistentes, el incremento en las deficiencias inmunológicas, una baja disponibilidad y mal uso de antifúngicos, presencia de alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas y la resistencia antifúngica primaria o secundaria. En México, se han hecho algunos esfuerzos por cuantificar el problema de la resistencia a fármacos antifúngicos en hospitales de atención

general y de especialidades, sin embargo, la magnitud del problema sigue sin conocerse (Manzano-Gayoso *et al.*, 2008).

El diagnóstico convencional de las infecciones fúngicas, está basado en hallazgos radiológicos, análisis en cultivos y exámenes histopatológicos de los tejidos sospechosos, entre otros. Estos métodos implican tiempo y pueden ser inapropiados. En el caso de los ensayos serológicos pueden ser inespecíficos y de baja sensibilidad, con relación a la baja actividad celular y humoral que muestran los pacientes inmunosuprimidos, principal grupo de riesgo ante las candidiasis (Ball *et al.*, 2004). Muchos estudios discuten la posibilidad de utilizar métodos de detección rápidos y no invasivos como lo son aquellos que emplean técnicas moleculares de identificación (Liguori *et al.*, 2010).

Para desarrollar y aplicar la correcta estrategia terapéutica es necesario utilizar metodologías que discriminen con exactitud las cepas involucradas en la infección, situación que demanda un diagnóstico certero y oportuno. Además es necesario establecer los perfiles de sensibilidad que los aislamientos microbiológicos muestran ante los fármacos usados clínicamente.

En México son pocos los laboratorios clínicos que tienen implementadas las pruebas correspondientes para identificar los agentes causales con exactitud y rapidez. Así como para conocer sobre los perfiles de sensibilidad antifúngica de los aislamientos clínicos.

Capítulo 4. Justificación

Se han realizado pocos estudios epidemiológicos con técnicas moleculares enfocados a determinar la frecuencia de portadores sintomáticos y asintomáticos de las diferentes especies del género *Candida*, así como los patrones de sensibilidad antifúngica en grupos vulnerables como son los pacientes inmunosuprimidos con VIH/SIDA, por lo que se desconoce la magnitud del problema para establecer las medidas terapéuticas y preventivas oportunas.

Un diagnóstico certero y oportuno promueve un tratamiento adecuado, sin el cual la mortalidad de las infecciones fúngicas sistémicas aumenta, lo que unido a la derrama económica que este tipo de infecciones genera, las convierten en enfermedades de gran trascendencia en la práctica diaria en el ambiente hospitalario.

Actualmente en México se conoce poco acerca de la distribución de especies del género *Candida* y de los perfiles de sensibilidad antifúngica de los aislamientos. Este estudio representa el primer reporte de prevalencia y distribución de especies del género *Candida*, así como los perfiles de sensibilidad antifúngica de las levaduras bucales en este grupo de pacientes en las principales ciudades del estado de Baja California. Un propósito adicional fue evaluar *in vitro* la capacidad de los aislamientos clínicos para formar biopelículas y su resistencia al antifúngico azólico más utilizado en la práctica clínica.

Capítulo 5. Hipótesis

La distribución y frecuencia de las especies del género *Candida* varía con las características sociodemográficas y clínicas del paciente; así mismo, varía la sensibilidad a los antifúngicos entre las cepas de *C. albicans* y *C. no-albicans*, aisladas de la cavidad oral en este grupo de estudio.

Capítulo 6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Identificar la prevalencia y frecuencia de especies del género *Candida* en muestras bucales de pacientes con VIH/SIDA; así como los patrones de sensibilidad antifúngica *in vitro* de los aislamientos.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar la distribución y frecuencia de especies del género *Candida* en muestras bucales de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada Baja California.
2. Describir la distribución de las especies del género *Candida* aisladas, de acuerdo a variables sociodemográficas y clínicas de los pacientes con VIH/SIDA.
3. Determinar la frecuencia de cepas sensibles y resistentes a siete antifúngicos convencionales en las especies aisladas a través del método de sensidiscos.
4. Analizar la relación entre la sensibilidad a los antifúngicos y las especies identificadas del género *Candida* aisladas en este grupo de pacientes.
5. Determinar la frecuencia de cepas formadoras de biopelícula entre las cepas aisladas.
6. Analizar la relación entre la capacidad de formar biopelícula en las cepas aisladas y la sensibilidad a fluconazol.

Capítulo 7. Materiales y métodos

7.1 Tipo de estudio

De acuerdo con las características y objetivos planteados, este trabajo representa un estudio de tipo descriptivo, transversal, comparativo y prospectivo. Consistió en determinar la distribución de especies del género *Candida*, la prevalencia de resistencia a antifúngicos de las cepas identificadas y su capacidad para formar biopelícula, así como la sensibilidad de esta al antifúngico fluconazol. Lo anterior a partir de muestras de enjuague bucal de pacientes con VIH o SIDA.

7.2 Población de estudio y muestra de estudio

Para determinar el tamaño de muestra se consideró un estudio previo realizado en la ciudad de Ensenada, donde se observó una prevalencia de 48% de portadores de *Candida* spp. Si se considera un índice de confianza de 95% y un error del 5%, el tamaño mínimo de muestra es de 95 pacientes por ciudad.

$$n = \frac{Z^2 pq^2}{E^2} = \frac{(1.96)^2((0.48)(0.52))^2}{0.05^2} = 95$$

n = Tamaño de la muestra

Z = Margen de seguridad (entre 95 y 100 %)

p = Probabilidad pertinente del hecho que se investiga (0.5)

q = Probabilidad no pertinente frente al hecho a investigar (0.5)

E^2 = 5 % margen de error (entre 5 y 10 %)

El presente trabajo fue conducido durante un periodo de cuatro años. Para su realización fue obtenida la aprobación del Comité de Bioética del Hospital Militar de la Cd. De Ensenada B.C. Se incluyeron 297 adultos de ambos sexos, con diagnóstico de ser portadores de VIH o SIDA; 98 de Tijuana, 99 de Mexicali y 100 de Ensenada. El muestreo se realizó en pacientes con VIH/SIDA del programa estatal de Baja California, México de VIH/SIDA que acudieron a la consulta externa del Hospital General en la ciudad de Mexicali y al Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS) en las ciudades de Ensenada y Tijuana, Baja California, México. A todos los pacientes se les invitó a participar libremente y se les pidió su consentimiento informado a través de una carta para participar de manera voluntaria en el presente estudio. Con relación a los procedimientos de toma de muestra e interrogatorio, todos los pacientes invitados accedieron a participar.

7.3 Variables en estudio

Las variables a estudiar fueron con relación al paciente (hospedero) y a los microorganismos aislados en los enjuagues bucales. A los pacientes incluidos se les levantó un cuestionario previamente validado para obtener información sobre las variables: edad, grado de escolaridad, lugar de origen, hábitos de higiene bucal, tabaquismo, alcoholismo, tiempo de diagnóstico de VIH/SIDA, tratamiento antirretroviral, estancias intrahospitalarias, conteo de linfocitos T CD4, carga viral, infecciones previas por *Candida*, tratamiento antifúngico, presencia y tipo de lesiones orales. En el caso de los microorganismos aislados, se identificaron las especies del género *Candida*, la sensibilidad relacionada a cinco fármacos azólicos y dos polienos, y la capacidad de formar biopelículas de las cepas identificadas. Una última variable fue la sensibilidad al fármaco fluconazol en aquellas levaduras aisladas con capacidad de formar biopelícula.

7.4 Análisis Estadístico

Para medir las diferencias entre medias y porcentajes de las variables continuas se utilizó la prueba T de Student. Las diferencias entre las variables categóricas fueron evaluadas con la prueba χ^2 . Se consideró un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$) como estadísticamente significativo.

7.5 Procesamiento de la muestra de enjuague bucal

A todos los pacientes se les tomó una muestra de enjuague bucal con 10 ml de suero fisiológico colectado en vasos para análisis clínico. Después de la colecta las muestras fueron transportadas directamente al laboratorio de microbiología en el CICESE en un período no mayor a 12 h. Los cultivos se realizaron a partir del concentrado obtenido por centrifugación de la muestra de enjuague bucal. Posteriormente se realizaron diluciones para sembrar en cajas de Petri con medio YPG agar (Extracto de levadura 2%, peptona 2%, glucosa 2% y agar 1.5%) y estos inóculos primarios se incubaron a 37°C durante 72 h para la búsqueda de colonias de levaduras. De las cajas con colonias putativas se realizaron aislamientos secundarios en medio YPG agar con cloranfenicol. De las colonias obtenidas en el aislamiento secundario se hicieron reinóculos de colonias individuales (cultivos monoespecíficos) en medio YPG agar para el posterior almacenamiento a -20C (cultivos con glicerol al 30 %). Así mismo, se hicieron cultivos monoespecíficos en YPG líquido y se incubaron a 37°C en agitación continua a 180 rpm por 24 horas, para proceder con la extracción de ADN genómico (protocolo modificado por Hoffman 2001). En aquellas muestras de enjuague bucal donde no se observó crecimiento en el medio de cultivo, se realizó una extracción de ADN genómico de todo el consorcio microbiano de la muestra directa, para descartar la presencia de levaduras a través de técnicas moleculares.

7.6 Identificación molecular de los aislados microbiológicos

7.6.1 Extracción de ADN genómico

Primeramente se precipitó el contenido celular de 1ml de cultivo en fase estacionaria (DO de 0.1₆₆₀λ), centrifugando a 5000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el paquete celular y se resuspendió en 500 μl de agua estéril, se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el paquete celular con 200 μl de buffer de lisis (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM TrisHCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8), un volumen aproximado de 200 μl de microperlas de vidrio y 200 μl de la solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1, se calentó la mezcla a baño maría de 65°C por dos minutos y se mezcló por vórtex durante 3 minutos. A continuación se agregaron 200 μl de buffer TE (1mM Tris-HCL pH 7.4, 10 mM EDTA pH 8), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. La capa superficial se transfirió a otro tubo eppendorf de 1.5 ml y se mezcló por inversión con 1 ml de etanol al 70% (frío), se centrifugó a 14,000 rpm durante 5

minutos y se decantó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla (blanquecina). Para continuar, se secó la pastilla al aire y se resuspendió en 400 µl de buffer TE con 1.5 µl de RNAsa (20mg/ml) y se incubó la reacción a 37°C por 5 min. Finalmente, para precipitar el ADN se agregaron 10 µl de acetato de amonio 4mM y 1ml de etanol al 70 % (frio), se mezcló con cuidado y se dejó reposar a -20°C por 20 min, después se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Por último, la pastilla se dejó secar al aire unos 30 min y se resuspendió en 100 µl de buffer TE. Los tubos con ADN genómico se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados. La obtención de ADN genómico se verificó a través de electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (EtBr) a 0.1µg/ml, que se observaron en un transiluminador (BioRad) con luz UV y el software Quantity One.

7.6.2 Amplificación de ADN

La identificación de las levaduras se realizó a través de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) basado en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de la región ribosomal ITS1 a ITS4 (Internal Transcribed Spacer 1 y 4) (White, 1990)

7.6.3 Oligonucleótidos

Para la reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos universales ITS1 (5' CCAGCGCTT AATTGCG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') diseñado por White y colaboradores (1990), que amplifican la región ITS. Como se observa en la **Figura 1**, la región ITS comprende el ITS1, que codifica el ARN 5.8S y el ITS2. La región ITS contiene zonas conservadas que permiten la identificación de los hongos a nivel de género y además incluye regiones hipervariables que nos permiten diferenciar a nivel de especie, ya sea a través de la secuencia y/o el tamaño del fragmento amplificado.

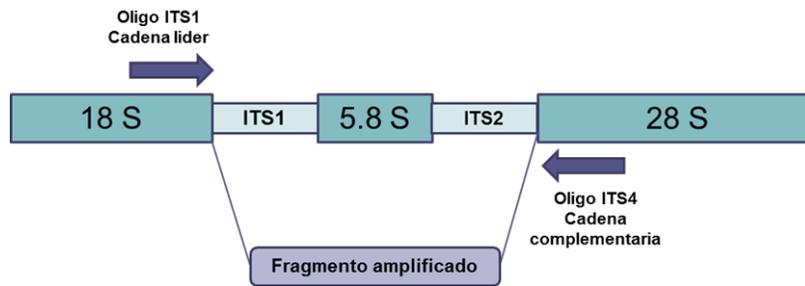


Figura 1. Esquema de la región genómica que codifica el ARN ribosomal. Se muestra en las barras anchas las regiones que codifican al ARN ribosomal 18S, 5.8S y 28S, intercaladas por las barras delgadas que representan las regiones internas espaciadoras transcritas 1 (ITS1) y 2 (ITS2). Con las flechas se representa el sitio donde se alinean los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

7.6.4 Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 50 μl y contenían: 10 μl de buffer colorless 10X (Promega), 5 μl de MgCl_2 (25mM) (Promega), 10 μl de dNTP (1mM), 4 μl de ADN genómico (30 ng/ μl aprox.), 1 U de taq polimerasa GoTaq flexi DNA Polymerase (Promega) y 20 μl de H_2O grado HPLC. Las reacciones de amplificación en el termociclador se realizaron bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización a 94°C por 5', seguido de 35 ciclos de desnaturalización (30'' a 94°C), alineamiento (1' a 55°C) y extensión (1' a 72°C), más un ciclo de extensión final por 10' a 72°C.

Los productos obtenidos de las reacciones de amplificación se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa al 1% con EtBr a 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega) como referencia para corroborar los tamaños de bandas esperados para cada especie, que se muestran en la **Tabla 5**. Los geles se observaron con luz UV en un transiluminador (BioRad) y la captura de imágenes se realizó con ayuda del software Quantity One y una cámara Canon EOS Digital Rebel XT de 12 Megapíxeles.

7.6.5 Determinación de la especie del género *Candida* por PCR-RFLP

Finalmente los productos de amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 se sometieron a una digestión con la enzima endonucleasa MspI, que reconoce y corta el enlace fosfodiéster entre dos citosinas seguidas por dos guaninas en ambos sentidos. Como producto de tal reacción se generó un patrón de bandas (en

aquellas secuencias donde hay sitio de restricción) distinto para cada especie del género *Candida* que se enlista en la Tabla 5 (Mirhendi *et al.*, 2006).

Para la reacción de digestión enzimática se utilizaron 35 µl del producto de PCR, 4 µl de buffer B 10X (Promega), 0.4 µl de BSA 10 µg/µl (Promega) y 1 µl de la enzima de restricción MspI 10 U/ml (Promega). La reacción se incubó a 37°C durante 1.5 h siguiendo las recomendaciones de reacción del fabricante y posteriormente se analizó el patrón de bandas generado a través de una corrida electroforética (80 mV) en gel de agarosa al 1.5% con EtBr a 0.1µg/ml. Los geles se observaron con luz UV en un transiluminador (BioRad) y la captura de imágenes se realizó con ayuda del software Quantity One. Como control se incluyeron las cepas de referencia: SC5314 (*C. albicans*), ATCC 96143 (*C. parapsilosis*), MYA 3904 (*C. tropicalis*) y ATCC 2001 (*C. glabrata*).

Tabla 5. Tamaño del producto de la reacción de amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, en las diferentes especies del género *Candida* y tamaño de los fragmentos de digestión con la enzima MspI, Tomado de Mirhendi *et al.*, 2006.

Especie del género <i>Candida</i>	Tamaño de banda amplificación ITS1-ITS4 (pb)	Fragmentos generados por digestión con MspI (pb)
<i>C. albicans</i>	535	297, 238
<i>C. glabrata</i>	871	557, 314
<i>C. tropicalis</i>	534	340, 184
<i>C. parapsilosis</i>	520	520
<i>C. krusei</i>	510	261, 249
<i>C. guilliermondii</i>	608	371, 155, 82

7.7 Determinación de la sensibilidad a antifúngicos con el método de sensidiscos (Neosensitabs IVD, Rosco Diagnostica).

La técnica con discos de difusión está basada en la guía de usuarios del método M44-A, técnica aprobada por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS por sus siglas en inglés) para medir la sensibilidad de los fármacos antifúngicos en levaduras.

Para las pruebas de sensibilidad a antifúngicos cada aislamiento se cultivó durante una noche en medio YPG líquido a 37°C. A partir del cultivo en fase estacionaria se realizó un inóculo a una DO de 0.1₆₆₀ y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO de 0.5₆₆₀ según la escala de McFarland (fase exponencial, 5 a 7 h aprox.). Una vez que el cultivo se encontró en esta densidad óptica, con un hisopo estéril se cubrió la superficie de una placa Petri con agar Müller- Hinton, suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/ml de azul de metileno. Posteriormente se dejó secar el inóculo por 10 a 30 minutos y se procedió a colocar los sensidiscos Neo-sensitabs con unas pinzas de disección sobre el agar. Los discos de 9 mm utilizados, contenían las siguientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI): Miconazol 10 µg, Clotrimazol 10 µg, Ketoconazol 15 µg, Itraconazol 8 µg, Fluconazol 25 µg, Nistatina 50 µg y Anfotericina B a una concentración de 10 µg. Finalmente, los halos de inhibición se analizaron en un tiempo de 24 a 48 h midiendo la zona visible. Los experimentos se realizaron por triplicado y los criterios de identificación antifúngica fueron los sugeridos por el fabricante (IVD, Rosco Diagnostica).

Para determinar el halo de inhibición de los antifúngicos azólicos se midió el diámetro de la zona de inhibición hasta las colonias que presentaron un tamaño homogéneo en el cultivo, ya que existe una zona de crecimiento de colonias de tamaños variados parcialmente inhibidas que no son consideradas colonias resistentes (guía Neo-sensitabs, por Rosco diagnóstica). En cuanto a la determinación del halo de inhibición de los polienos (Anfotericina B y Nistatina) se midió el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento y si se observaban colonias dentro de esta zona se consideraron cepas resistentes. De acuerdo al NCCLS se han determinado los valores de referencia de las zonas de inhibición de diferentes antifúngicos y se agruparon en tres categorías: sensibles, respuesta intermedia y resistentes, Tabla 6. Se realizaron los ensayos de resistencia a los antifúngicos a las 181 cepas aisladas, por triplicado. Se midieron los halos de inhibición, se promediaron los datos y los resultados se clasificaron de acuerdo a los valores de referencia.

Tabla 6. Valores de referencia del diámetro (mm) de los halos de inhibición de los antifúngicos en los discos de difusión (sensidiscos).

Respuesta	Miconazol	Clotrimazol	Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazol	Nistatina	Anf.B
Sensible	≥20	≥20	≥28	≥23	≥19	≥15	≥15
Intermedia	12 a 19	12 a 19	21 a 27	14 a 22	15 a 18	10 a 14	10 a 14
Resistente	≤11	≤11	≤20	≤13	≤14	≤10	≤10

7.8 Análisis de la formación de biopelícula

Para evaluar la formación de biopelículas se empleó una modificación al método descrito por Ramage 2005. A partir de un cultivo de 24 h de los aislamientos en Agar Dextrosa Sabouraud se realizaron inóculos en tubos con 20 ml de medio líquido YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) que se incubaron a 30°C en agitación orbital (100 rpm) durante 24 h. Posteriormente se hicieron dos diluciones 1:10 partiendo con 100 μ l del cultivo en fase estacionaria en medio líquido (aproximadamente equivalentes a 6×10^8 UFC/ml) resuspendidos en 900 μ l de agua destilada. Después de la segunda dilución se tomaron 50 μ l y 250 μ l de agua destilada, con la finalidad de obtener una concentración celular aproximada a 1×10^6 UFC/ml. El volumen resultante (300 μ l) se lavó dos veces con PBS 10 mM a través de centrifugaciones a 3000 rpm durante un minuto, para finalmente decantar la pastilla y resuspenderla en 300 μ l de RPMI 1640. Para promover el desarrollo de las biopelículas se añadieron 100 μ l de la suspensión celular en los pocillos de placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano (cada aislamiento por triplicado). El mismo procedimiento se realizó para analizar el efecto del fluconazol a una concentración de 8 μ g/ml en el desarrollo de la biopelícula. Las placas control y las placas con fluconazol se incubaron a 37°C por 48 h. Una vez cosechados los cultivos se procedió a evaluar la formación de la biopelícula con el ensayo de reducción de sales de 2,3-bis-2H-tetrazolio-5-carboxanilida y Menadiona (XTT-Menadiona).

Primeramente se preparó una solución de XTT en PBS-Dextrosa (0.5 g/L) filtrada en papel de poro 0.22 μ M que se almacenó a -70°C. Para cada ensayo se descongeló una alícuota de XTT y se le agregó Menadiona 10 mM diluida previamente en acetona. Posteriormente se lavaron las placas tres veces con PBS 10mM para eliminar las células no adheridas y a cada pocillo se le añadió 100 μ l de la solución XTT-Menadiona. Las placas se incubaron en oscuridad a 37°C durante 2 h y posteriormente se retiró el sobrenadante para realizar la lectura de DO en el espectrofotómetro a 490 nm de longitud de onda. Se consideraron cepas formadoras de biopelícula aquellas que presentaron una $DO \geq 0.200$, una vez restada la DO del pocillo de control de esterilidad (sólo con XTT-Menadiona).

Capítulo 8. Resultados

8.1 Datos generales

Se estudiaron 297 adultos de ambos sexos, con diagnóstico de ser portadores de VIH o SIDA, 98 de Tijuana, 99 de Mexicali y 100 de Ensenada, Baja California. De los 297 pacientes muestreados en este trabajo, se obtuvieron 81 aislamientos a partir de los enjuagues bucales colectados en la ciudad de Tijuana, 46 en la ciudad de Mexicali y 54 en la ciudad de Ensenada B.C. El promedio general de edad fue de 39.9 ± 10.3 (media \pm desviación estándar) años, 41.0 ± 9.2 años para Tijuana, 37.8 ± 10.5 años para Mexicali y 40.8 ± 10.9 años para Ensenada. En todas las ciudades cerca del 25% eran mujeres y el resto hombres. Del total de sujetos estudiados, el 57.4 % (170 pacientes) estaban colonizados o infectados por alguna especie de *Candida* u otra levadura.

8.2 Determinación de la distribución y frecuencia de especies del género *Candida* en las muestras bucales de pacientes con VIH/SIDA.

En la Tabla 7 se presenta el número de casos portadores de *Candida* por sexo y con respecto a cada ciudad estudiada. En las ciudades de Mexicali y Ensenada no se observaron diferencias en la proporción de mujeres portadoras de cepas de *Candida* (45.8 % y 47.8 %, respectivamente) y no portadoras (54.2 % y 52.2 %, respectivamente), como tampoco se observaron diferencias en la proporción entre hombres portadores de cepas de *Candida* (45.3 % y 51.9 %, respectivamente) y no portadores (54.7 % y 48.1 %, respectivamente). Sin embargo, en la ciudad de Tijuana se observó mayor proporción de mujeres portadoras de cepas de *Candida* que no portadoras (84 % y 16 %, respectivamente), como también una diferencia entre hombres portadores de cepas de *Candida* (72.6 %) y hombres no portadores (27.4 %). En general, en Tijuana se observó un porcentaje significativamente mayor de portadores de *Candida* con un 75.5% (74 pacientes) ($p=0.00004$), en segundo lugar Ensenada con un 51 % (51 pacientes) y al final Mexicali con un 45.5 % (45 pacientes). Prácticamente la mitad de los pacientes con VIH/SIDA muestreados fueron portadores de levaduras de *Candida*, indistintamente del sexo.

Tabla 7. Distribución por ciudad y sexo de pacientes con VIH/SIDA con cultivos positivos y negativos para levaduras del género *Candida*.

Ciudad	Portadores de <i>Candida</i>												
	Si		No		n	Mujeres				Hombres			
	No.	%	No.	%		Si	No	Si	No	Si	No	%	
Tijuana	74	*75.5	24	24.5	98	21	84.0	4	16.0	53	72.6	20	27.4
Mexicali	45	45.5	54	54.5	99	11	45.8	13	54.2	34	45.3	41	54.7
Ensenada	51	51.0	49	49.0	100	11	47.8	12	52.2	40	51.9	37	48.1
Total	170	57.4	126	42.6	296	43	60.6	28	39.4	127	56.4	98	43.6

*Hubo diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el número de portadores por ciudad.

8.3 Identificación molecular a través de PCR-RFLP de las cepas aisladas en las muestras de enjuague bucal.

En total se obtuvieron 181 cepas de *Candida*, de éstas el 71.8 % (130 cepas) fueron *C. albicans*, y el 28.2 % (51 cepas) fueron especies no-*albicans*. La especie no-*albicans* más frecuente fue *C. tropicalis* que representó el 12.2 % (22 cepas) de los aislados y en segundo lugar *C. glabrata* con 8.8 % (16 cepas), seguida por *C. parapsilosis* con 2.8 % (5 cepas), *C. krusei* con 1.7% (3 cepas) y *C. guilliermondii* con 1.7 % (3 cepas). En el 1.1 % (2 cepas) de los aislados, no se logró identificar el género ni la especie, Figura 2.

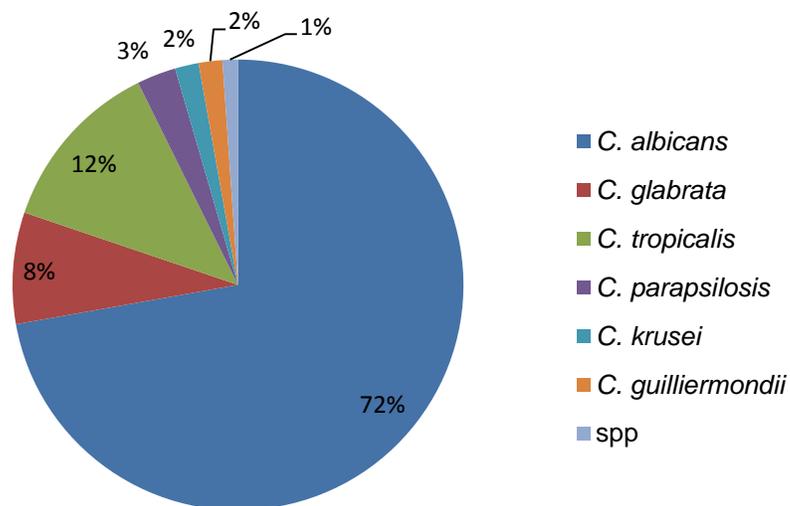


Figura 2. Distribución de las especies del género *Candida* en los aislamientos de pacientes con VIH/SIDA en la totalidad del muestreo.

En la Figura 3(A) se muestra un gel de corrida electroforética con los productos de PCR a partir del ADN genómico de algunos de los aislamientos. En los recuadros rojos se indica el producto de amplificación de la especie *C. glabrata* de 871 pb, mientras que en la Figura 3(B) se muestran los productos de digestión con la enzima *MspI* a partir de los fragmentos previamente amplificados, en éstos se corroboró la presencia de la especie *C. glabrata* (señalada en los recuadros rojos) y se identificó la especie *C. albicans* señalada en los recuadros amarillos. Así mismo se identificó la especie *C. parapsilosis* señalada en el recuadro azul.

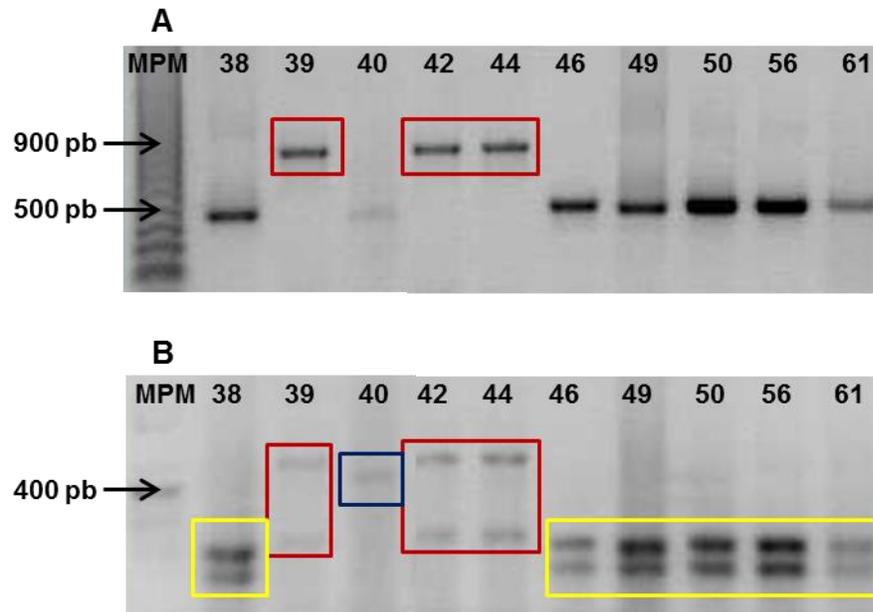


Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de los ensayos de PCR-RFLP de aislamientos obtenidos de pacientes con VIH-SIDA. **(A)** Productos de amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4, donde se distinguen bandas de aproximadamente 870 pb que corresponden a la especie *C. glabrata*, señalada en los recuadros en rojo. **(B)** Productos de digestión con la enzima *MspI*. Los recuadros en amarillo muestran el patrón de bandas que representa a la especie *C. albicans* (una banda de 297 pb y otra de 238 pb), en rojo se observa el patrón de digestión para la especie *C. glabrata* (una banda de 557 pb y otra de 314 pb) y el recuadro en azul corresponde a la especie *C. parapsilosis* (una banda de 520 pb).

En la Figura 4 se muestran otras corridas electroforéticas del ensayo de PCR-RFLP. Particularmente en la Figura 4(A) se presentan los productos de las reacciones de PCR entre los cuales no se observaron diferencias aparentes en el tamaño de las bandas. Sin embargo, en la Figura 4(B) a través del patrón de bandas identificamos las especies *C. tropicalis* (recuadros rojos) y *C. krusei* (recuadros amarillos).

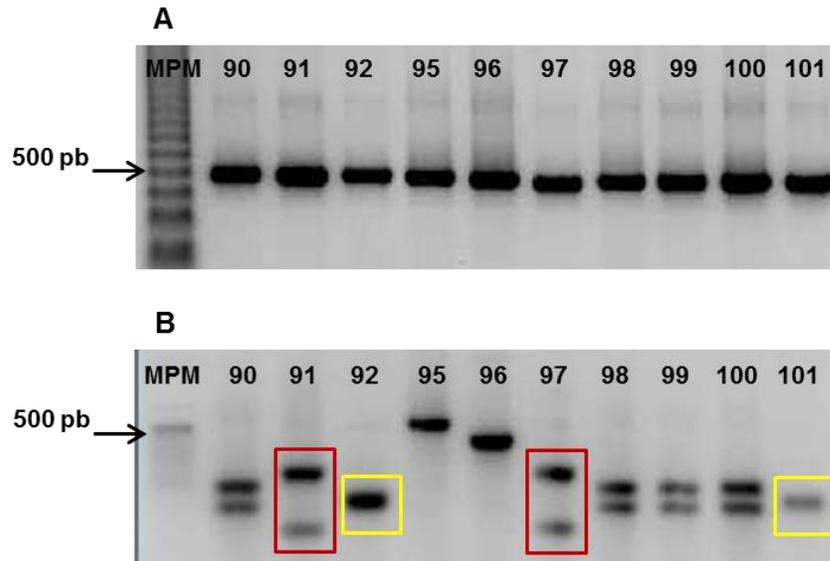


Figura 4. Electroforesis en gels de agarosa al 1% de los ensayos de PCR-RFLP de aislamientos obtenidos de pacientes con VIH-SIDA. (A) Productos de amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. (B) Productos de digestión con la enzima *MspI*. Los recuadros en rojo muestran el patrón de bandas que representa a la especie *C. tropicalis* (con una banda de 340 pb y otra de 184 pb) y en amarillo se identifica a la especie *C. krusei* (con una banda de 261 pb y otra de 249 pb) que se aprecian del mismo tamaño.

Finalmente en la Figura 5 se muestra una de las corridas electroforéticas del ensayo de PCR-RFLP donde se identificó la especie *C. guilliermondii*, representada con tres bandas (recuadro amarillo).

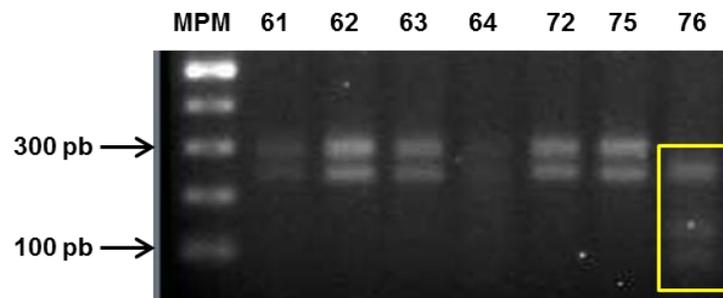


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de PCR-RFLP. Se muestran los patrones de digestión con la enzima *MspI*, de los productos de amplificación con los oligonucleótidos ITS 1 e ITS 4. El recuadro en amarillo muestra el patrón de bandas que representa a la especie *C. guilliermondii*, identificada con una banda de 371 pb, otra de 155 pb y una última de 72 pb.

Por ciudad, se observó que en Ensenada hubo un porcentaje mayor de aislamientos de *C. albicans* con respecto a las otras ciudades ($p=0.004$). Mexicali represento la ciudad con mayor diversidad de especies de *Candida* y fue la única ciudad donde se aislaron seis diferentes especies, mientras que en Tijuana sólo se aislaron cuatro. Sin embargo, Tijuana fue la ciudad en la que se encontró la mayor frecuencia de especies de *C. no-albicans*, principalmente de *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Tabla 8). De los 170 pacientes con cultivos positivos se encontró que el 93.5 % (159 pacientes) eran portadores de una sola cepa de *Candida* y el 6.5 % (11 pacientes) tenían dos cepas cohabitando la cavidad oral. La asociación más frecuente fue *C. albicans* + *C. glabrata* en 5 de los 11 pacientes, es decir, prácticamente la mitad de los pacientes portadores de dos especies. Las asociaciones *C. albicans* + *C. tropicalis* y *C. glabrata* + *C. tropicalis* se presentaron en dos pacientes cada una, mientras que *C. albicans* + *C. parapsilosis* y *C. albicans* + *C. guilliermondii* sólo se observaron en un paciente cada una (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada, de acuerdo a las especies del género *Candida* aisladas de los lavados bucales.

Especies de <i>Candida</i>	Tijuana		Mexicali		Ensenada		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>C. albicans</i>	46	62.2	32	71.1	43	*84.3	121	71.2
<i>C. glabrata</i>	5	6.7	3	6.7	1	1.9	9	5.3
<i>C. tropicalis</i>	15	20.3	2	4.4	1	1.9	18	10.6
<i>C. parapsilosis</i>	-		3	6.7	1	1.9	4	2.3
<i>C. krusei</i>	1	1.3	2	4.4			3	1.8
<i>C. guilliermondii</i>			1	2.2	1	1.9	2	1.2
<i>C. spp</i>			1	2.2	1	1.9	2	1.2
<i>C. albicans</i> + <i>C. glabrata</i>	3	4.0	1	2.2	1	1.9	5	2.9
<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>	2	2.7					2	1.2
<i>C. glabrata</i> + <i>C. tropicalis</i>	2	2.7					2	1.2
<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i>					1	1.9	1	0.6
<i>C. albicans</i> + <i>C. guilliermondii</i>					1	1.9	1	0.6
Total	74	100.0	45	100.0	51	100.0	170	100.0

*Hubo diferencias estadísticamente significativa ($p<0.05$) de los portadores de *C. albicans* en Ensenada.

8.4 Distribución de las especies del género *Candida* aisladas, de acuerdo a variables sociodemográficas y clínicas de los pacientes con VIH/SIDA.

En la Tabla 9 se muestra la frecuencia absoluta y relativa de la distribución de portadores de levaduras del género *Candida* por ciudad de acuerdo a las variables; uso de terapia antirretroviral, carga viral, conteo de linfocitos T CD4 y tiempo desde el diagnóstico. El 80.8% (240 pacientes) se encontraban en estadios diferentes de la enfermedad pero no habían desarrollado SIDA, sólo el 19.2% (57 pacientes) estaban en esta etapa.

Tabla 9. Distribución de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada de acuerdo a variables del control de la enfermedad como terapia antirretroviral, carga viral, niveles de linfocitos T CD4 y tiempo desde el diagnóstico de VIH/SIDA.

Terapia	Ciudad							
	Tijuana		Mexicali		Ensenada		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Antirretroviral								
Con								
Portadores	68	77.3	34	45.9	46	53.5	148	59.7
No portadores	20	22.7	40	54.1	40	46.5	100	40.3
Sin								
Portadores	6	60.0	10	43.5	5	38.5	21	45.7
No portadores	4	40.0	13	56.5	8	61.5	25	54.3
Carga Viral*								
No detectable								
Portadores	28	84.8	23	41.8	35	47.9	86	53.4
No portadores	5	15.2	32	58.2	38	52.1	75	46.6
50-5,000								
Portadores	37	72.5	8	44.4	8	61.5	53	64.6
No portadores	14	27.5	10	55.6	5	38.5	29	35.4
5,000-100,000								
Portadores	8	66.7	3	27.3	3	37.5	14	45.2
No portadores	4	33.3	8	72.7	5	62.5	17	54.8
>100,000								
Portadores	1	50.0	7	87.5	5	100.0	13	86.7
No portadores	1	50.0	1	12.5	0	0.0	2	23.3
Linfocitos T CD4								
>200								
Portadores	7	63.6	12	41.4	11	64.7	30	52.6
No portadores	4	36.4	17	58.6	6	35.3	27	47.4
200-500								
Portadores	38	76.0	18	45.0	24	50.0	80	58.0
No portadores	12	24.0	22	55.0	24	50.0	58	42.0
>500								
Portadores	29	78.4	12	50.0	16	47.1	57	60.0
No portadores	8	21.6	12	50.0	18	52.9	38	40.0
Tiempo del Dx								
<1 año								
Portadores	14	70.0	15	53.6	10	58.8	39	60.0
No portadores	6	30.0	13	46.4	7	41.2	26	40.0
1-5 años								
Portadores	29	80.6	24	49.0	24	49.0	77	57.0
No portadores	7	39.4	26	51.0	25	51.0	58	43.0
>5 años								
Portadores	31	73.8	14	41.2	17	51.5	54	56.8
No portadores	11	26.2	20	58.8	16	48.5	41	43.2

*Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$

En cuanto a la distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras del género *Candida* y su relación con el uso de terapia antiretroviral se encontró que; en la ciudad de Tijuana el 77.3 % de los pacientes bajo terapia antiretroviral fueron portadores de cepas del género *Candida*, mientras que un 60 % que no se encontraban bajo terapia antiretroviral también portaron levaduras; el caso de la ciudad de Mexicali, un 34% de los pacientes con terapia antiretroviral fueron portadores de levaduras y entre los pacientes sin terapia antiretroviral sólo el 10%. Finalmente en la ciudad de Ensenada un 53.5 % de los pacientes con terapia antiretroviral presentaron levaduras de *Candida* y un 38.5 % de los pacientes sin terapia antiretroviral también presentaron levaduras del género. Si consideramos el total de pacientes muestreados observamos que el 59.7% de los pacientes con terapia antiretroviral portaron levaduras y el 45.7 % de los pacientes sin terapia antiretroviral también fueron portadores de levaduras de *Candida*, en el análisis estadístico no se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de pacientes que fueron portadores de levaduras del género *Candida* con relación al uso de terapia antiretroviral, Tabla 9.

Con respecto a la distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras del género *Candida* y el conteo en la carga viral, esta última analizada bajo los criterios de: no detectable, de 50 a 5,000 copias, de 5,000 a 100,00 copias y más de 100,000 copias. Se encontró que en la ciudad de Tijuana el porcentaje de pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras con relación a estos criterios fue de 84.8 %, 72.5 %, 66.7 % y 50 % respectivamente; en la ciudad de Mexicali 41.8 %, 44.4 %, 27.3 % y 87.5 % respectivamente y por último, en la ciudad de Ensenada de 47.9 %, 61.5 %, 37.5 % y 100 % respectivamente. En el total de los pacientes con VIH/SIDA muestreados fueron portadores de levaduras del género *Candida* de manera significativa, aquellos pacientes que presentaron un alto conteo en la carga viral, con más de 100,00 copias, Figura 6.

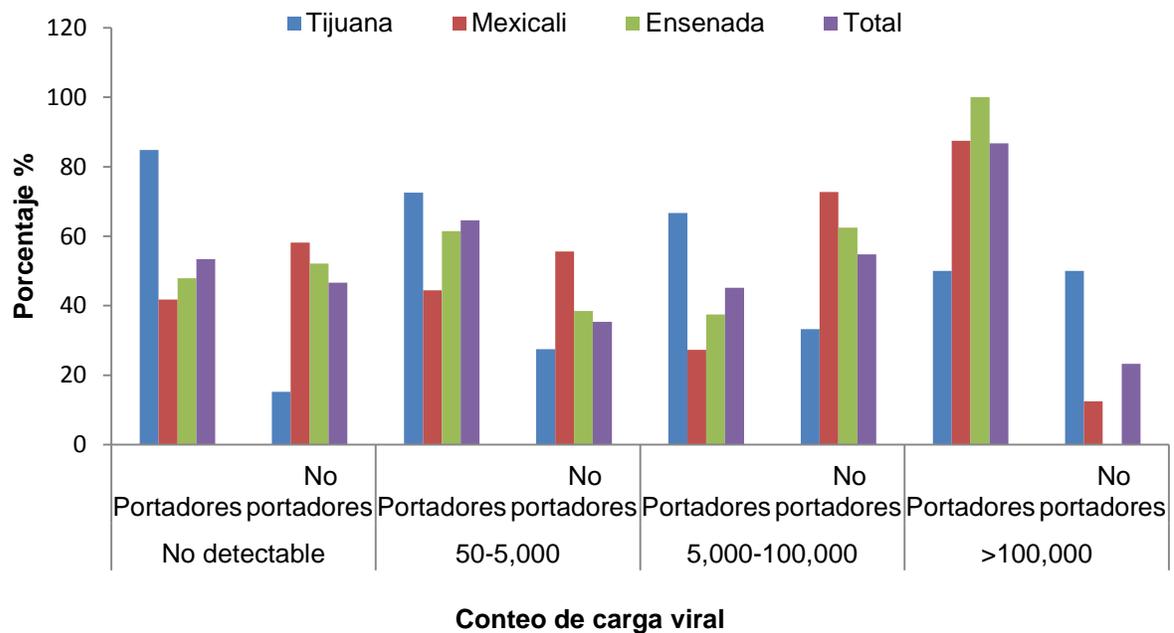


Figura 6. Distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores y no portadores de levaduras del género *Candida* en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada, con relación a la cantidad en unidades de carga viral.

Al analizar la distribución de los pacientes con VIH/SIDA portadores y no portadores de levaduras del género *Candida* en función del conteo de linfocitos TCD4 (cel/mm^3) bajo los criterios de: $<200 \text{ cel}/\text{mm}^3$, de 200 a $500 \text{ cel}/\text{mm}^3$ y $>500 \text{ cel}/\text{mm}^3$, en la ciudad de Tijuana los porcentajes de pacientes con VIH/SIDA portadores de cepas del género *Candida* con relación a los criterios antes mencionados en el conteo de linfocitos TCD4 fueron; de 63.6 %, 76 % y 78.4 % respectivamente, en la ciudad de Mexicali de 41.4 %, 45 % y 50 % respectivamente, y en la ciudad de Ensenada fueron el 64.7 %, 50 % y 47.1 % respectivamente. En el total de los pacientes muestreados en las tres ciudades no se observó una diferencia significativa en la distribución de los pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras bajo los criterios mencionados con relación al conteo de linfocitos TCD4, Tabla 9.

El tiempo de diagnóstico de SIDA tampoco fue una situación que marcara una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la distribución de los pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras del género *Candida*. En el total de pacientes muestreados no se observaron diferencias entre aquellos que tenían menos de un año de diagnóstico de SIDA (60 %) en comparación con aquellos que tenían de uno a cinco años (57 %) o más de cinco años (56.8 %), Tabla 9.

Como se muestra en la Tabla 10, la distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores de cepas del género *Candida* de acuerdo al hábito de fumar no presentó diferencias significativas ($p=0.05$), entre los criterios de no fumador, fumador y ex fumador, es decir, en ninguna de las situaciones se observó mayor proporción de pacientes portadores de levaduras de *Candida*, tampoco se observaron diferencias entre las ciudades muestreadas ni en el total de las muestras. Sólo en la ciudad de Tijuana se observó una diferencia marcada entre el porcentaje de pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras de *Candida* y los no portadores, pero tal situación fue independiente del hábito de fumar.

Tabla 10. Distribución de pacientes con VIH/SIDA en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada de acuerdo al hábito de fumar y consumir bebidas alcohólicas.

Hábito de Fumar	Ciudad							
	Tijuana		Mexicali		Ensenada		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
No fumador								
Portadores	22	75.9	20	60.6	23	52.3	65	61.3
No portadores	7	24.1	13	39.4	21	47.7	41	38.7
Fumador								
Portadores	27	75.0	6	28.6	12	42.9	45	52.9
No portadores	9	25.0	15	71.4	16	57.1	40	47.1
Exfumador								
Portadores	25	75.8	19	42.2	16	59.3	60	57.1
No portadores	8	24.2	26	57.8	11	40.7	45	42.9
Consumo de alcohol								
Si								
Portadores	29	82.9	24	57.1	20	42.6	73	58.9
No portadores	6	17.1	18	42.9	27	57.4	51	41.1
No								
Portadores	45	71.4	21	36.8	30	58.8	96	56.8
No portadores	18	28.6	36	63.2	21	41.2	73	43.2

En el caso de la distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores de cepas del género *Candida* de acuerdo al hábito de consumir alcohol tampoco se observaron diferencias significativas en el total de las muestras aisladas; sin embargo, el análisis por ciudad reveló que en la ciudad de Mexicali si hubo una diferencia significativa ($p=0.05$), entre los pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras que consumían alcohol (57.1 %) comparado con los pacientes que no consumían alcohol (36.8 %), Figura 7.

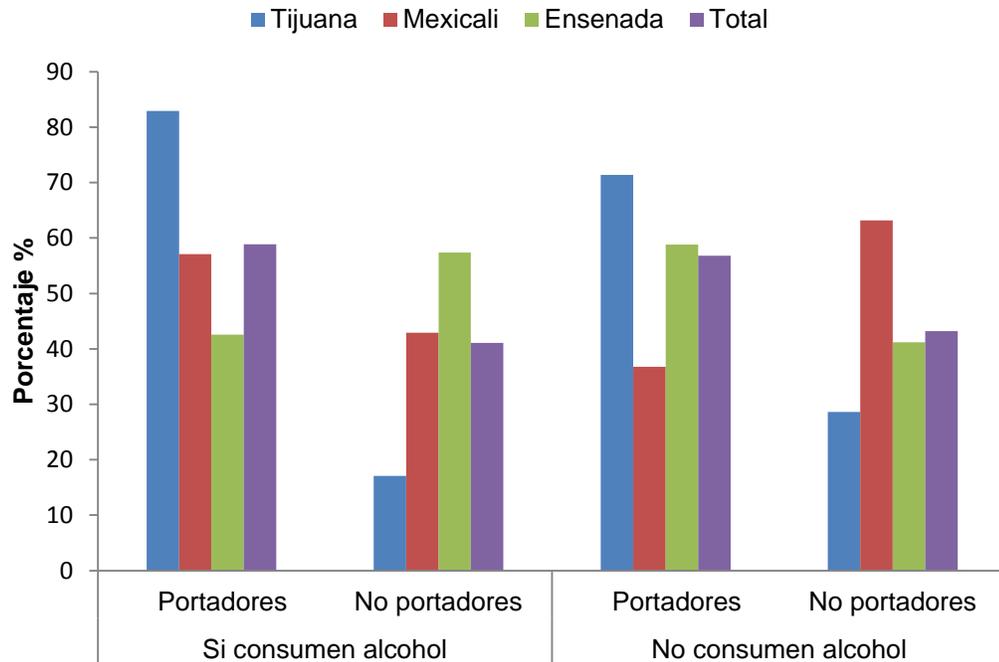


Figura 7. Distribución de pacientes con VIH/SIDA portadores y no portadores de levaduras del género *Candida* en las ciudades de Tijuana, Mexicali y Ensenada de acuerdo al hábito de consumir alcohol.

8.5 Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos

En el total de las cepas aisladas se observó que ante los antifúngicos azólicos (Miconazol, Clotrimazol, Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol) el 87.4 % de las cepas mostraron sensibilidad, un 8.6 % respuesta intermedia y un 3.9 % fenotipo de resistencia. En el caso de la respuesta ante los antifúngicos polienos probados (Nistatina y Anfotericina B) se observó un mayor porcentaje de sensibilidad (97.7 %) y menores porcentajes de respuesta intermedia (0.5%) y fenotipo de resistencia (1.7 %), en comparación con las respuestas a los antifúngicos azólicos, Figura 8.

Las cepas aisladas en las tres ciudades mostraron mayor sensibilidad a los fármacos polienos, como se observa en la Figura 9. En la ciudad de Tijuana, el 96.3 % de las cepas mostraron sensibilidad, en Mexicali un 97.8 % y en Ensenada el 100% de las cepas mostraron este fenotipo. Mientras que la sensibilidad ante los fármacos azólicos fue de 90.7%, 88.6 % y 81.8 % respectivamente. Por otra parte, entre las cepas aisladas en las tres ciudades se presentaron más casos con fenotipo de respuesta intermedia y resistencia ante los fármacos azólicos en comparación con los polienos.

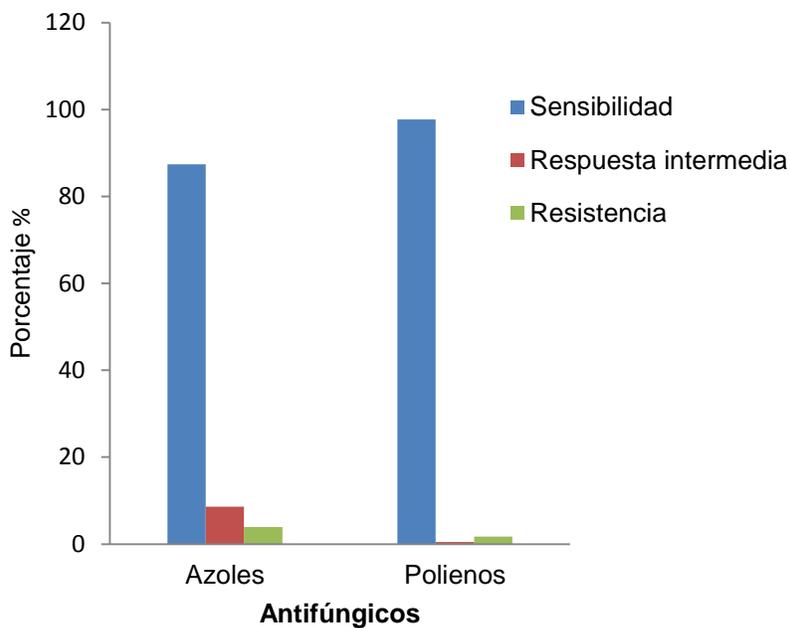


Figura 8. Distribución del total de las cepas aisladas (181) con relación a la respuesta a los fármacos antifúngicos agrupados por modo de acción (azoles y polienos).

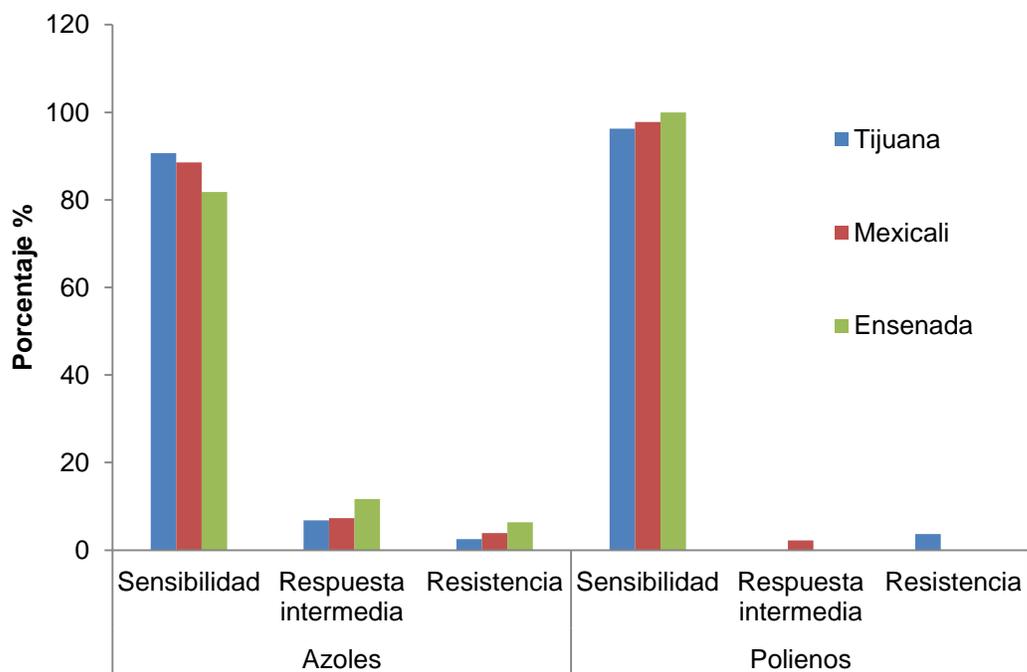


Figura 9. Distribución de las cepas aisladas en cada ciudad muestreada (Tijuana, Mexicali y Ensenada), en cuanto a la respuesta a los antifúngicos azoles y polienos probados.

Con respecto a la respuesta intermedia, en las cepas aisladas de la ciudad de Tijuana se observó un 5.4 %, en Mexicali 3.4 % y en Ensenada 6.2 % de casos con respuesta intermedia ante los azoles, mientras que respuesta intermedia ante los polienos sólo se observó en un 1% de las cepas en la ciudad de Mexicali y ningún caso en las ciudades de Tijuana y Ensenada. En el caso del fenotipo de resistencia ante azoles se presentó en un 1.8 % de los cepas de Mexicali, un 2.5 % en Tijuana y un 3.4 % en Ensenada, mientras que el fenotipo de resistencia ante polienos sólo se observó en la ciudad de Tijuana en un 3.7 % de las cepas, Figura 9.

Los mayores porcentajes de sensibilidad se observaron ante los fármacos nistatina y anfotericina B (polienos) con el mismo porcentaje de respuesta (97.7%), mientras que los mayores índices de respuesta intermedia se observaron en las respuestas ante fluconazol y clotrimazol, 21.8% y 8.9% respectivamente, Figura 10. Por otra parte, los mayores índices de fenotipo de resistencia se observaron ante los fármacos miconazol con un 7.3% e itraconazol con un 5.6% del total de las cepas aisladas. Cabe destacar que la distribución de los fenotipos de respuesta ante los diferentes antifúngicos azólicos fue particular para cada antifúngico, mientras que la distribución de los fenotipos de respuesta entre los dos fármacos polienos probados tuvo el mismo patrón.

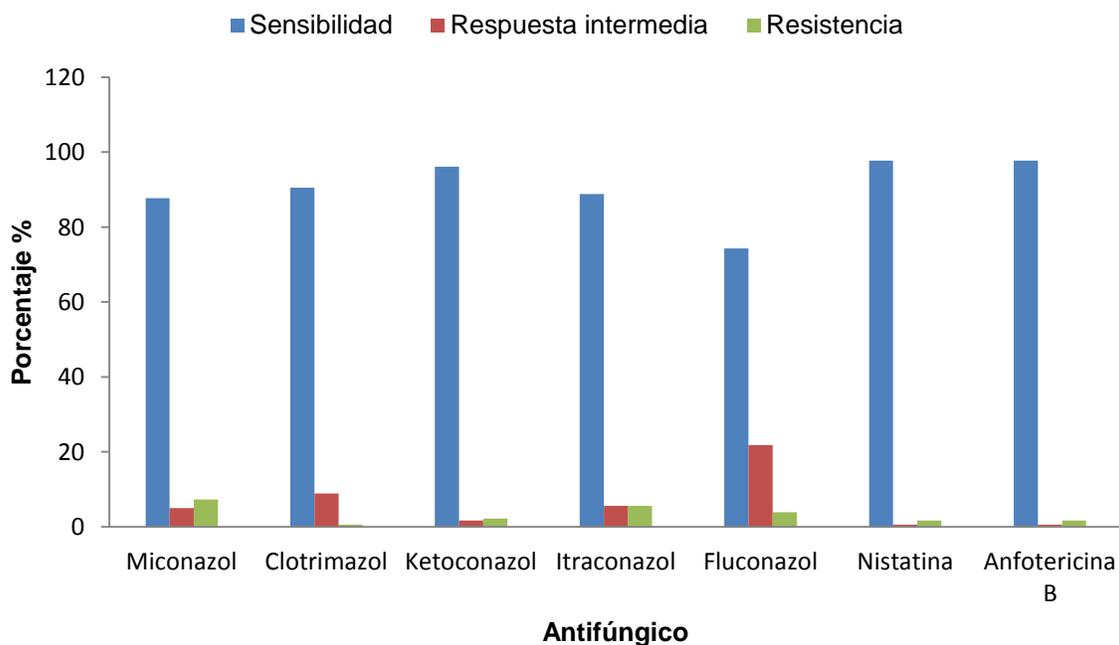


Figura 10. Distribución de la respuesta a los antifúngicos azoles y polienos en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH/SIDA.

En la Figura 11 se muestran los ejemplos de tres ensayos con los discos de difusión, donde podemos distinguir las respuestas de sensibilidad, respuesta intermedia y resistencia, con relación a las medidas en los diámetros de cada halo de inhibición. El ensayo de la cepa en la Figura 11 (A), revela que fue sensible a todos los antifúngicos probados. Con el ejemplo de la Figura 11 (B) podemos distinguir un típico caso de respuesta intermedia, así fue el fenotipo de esta cepa ante fluconazol. Finalmente, la cepa en la Figura 11 (C) presentó resistencia ante los polienos nistatina y anfotericina B.

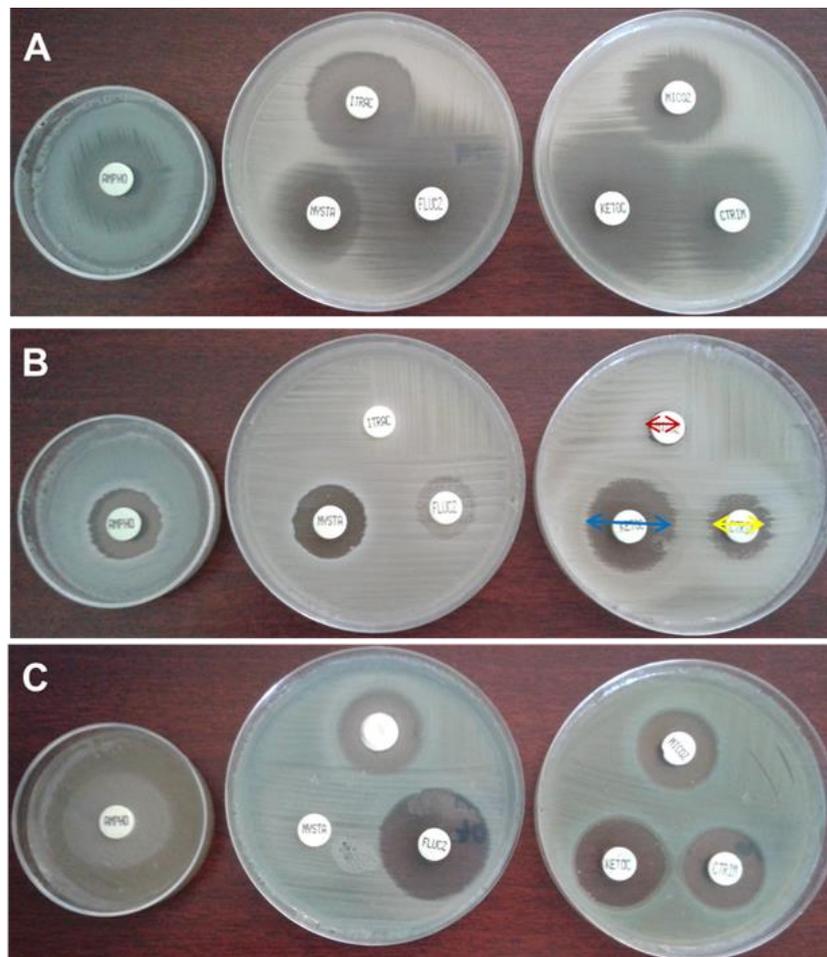


Figura 11. Ensayos de difusión de antifúngicos con discos Neo-Sensitab. Las leyendas en los discos de difusión corresponden a: AMPH= Anfotericina B, ITRAC= Itraconazol, NYSTA= Nistatina, FLUCZ= Fluconazol, MICOZ= Miconazol, KETOC= Ketoconazol y CTRIM= Clotrimazol. La flecha roja indica resistencia, la flecha amarilla respuesta intermedia y la azul sensibilidad. (A) Cepa de *C. albicans* sensible a todos los antifúngicos. (B) Cepa de *C. tropicalis* resistente a itraconazol y miconazol, respuesta intermedia a fluconazol y sensible a anfotericina B, nistatina y ketoconazol. (C) Cepa de *C. krusei* resistente a anfotericina B y nistatina, y sensible a itraconazol, fluconazol, miconazol, ketoconazol y clotrimazol.

Durante este análisis se consideró la respuesta intermedia como resistencia disminuida dado que representa una disminución del efecto del fármaco, ya sea porque la dosis es insuficiente o porque no hay una respuesta completa de sensibilidad. La respuesta intermedia a un fármaco tiene alta probabilidad de representar una falla terapéutica *in vivo*, por ello se contabilizaron los casos de respuesta intermedia (resistencia disminuida) como resistentes (Due et al., 2006). En la Figura 12 se muestra la distribución de los fenotipos de sensibilidad y resistencia ante los diferentes antifúngicos probados en el total de las cepas aisladas. Con este nuevo criterio de clasificación se continuó observando que los mayores índices de sensibilidad se presentaron ante los fármacos polienos (nistatina y anfotericina B) y al ketoconazol, con porcentajes de 97.7% y 96.1%, respectivamente, mientras que los fenotipos de resistencia se observaron principalmente ante fluconazol y miconazol en un 25.7 % y 12.3 % de las cepas aisladas.

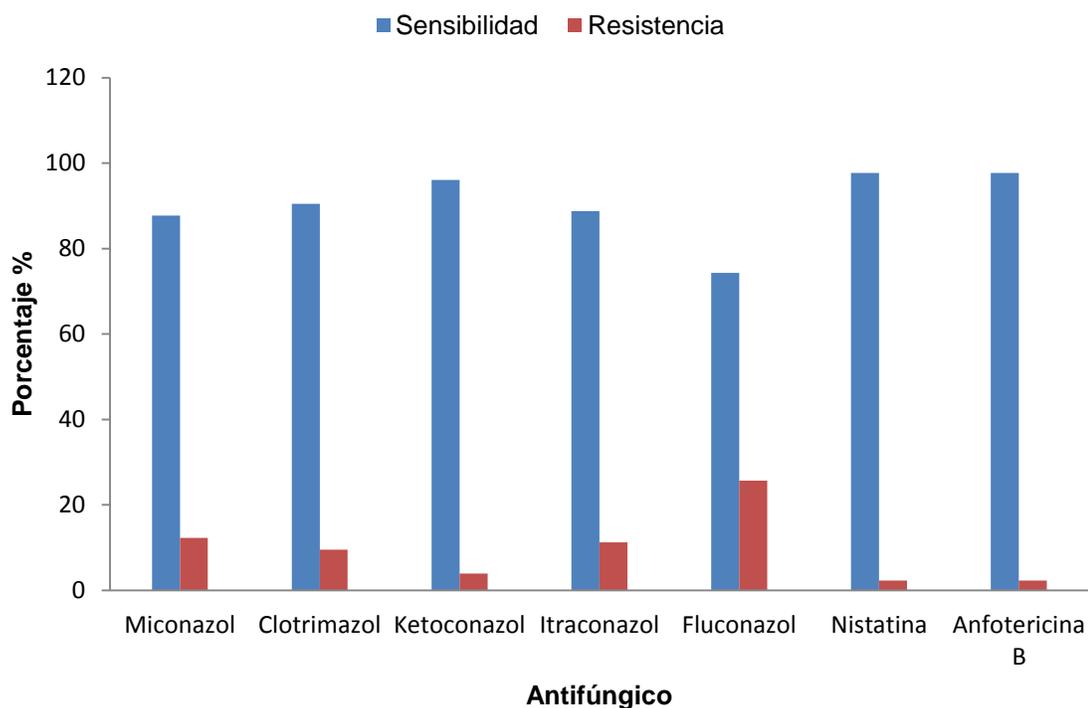


Figura 12. Distribución del fenotipo de sensibilidad y de resistencia a los antifúngicos azoles y polienos en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH.

La Figura 13 muestra la distribución de las respuestas de sensibilidad y resistencia a los fármacos utilizados clasificados en: imidazoles (miconazol, clotrimazol y ketoconazol), triazoles (itraconazol y fluconazol) y polienos (nistatina y anfotericina B). Bajo este criterio de clasificación se observó que entre los fármacos azólicos las cepas aisladas presentaron mayor fenotipo de sensibilidad ante los imidazoles

en un 91.4 % de los casos, mientras que la sensibilidad ante los fármacos triazoles fue de 81.6 %, sin embargo, el mayor fenotipo de sensibilidad se continuó observando ante los fármacos polienos, en un 97.8 % de las cepas aisladas. Así mismo, se observó un mayor porcentaje del fenotipo de resistencia ante los fármacos triazoles, seguido de imidazoles y por último polienos en un 18.4 %, 8.6 % y 2.2 % de las cepas aisladas, respectivamente.

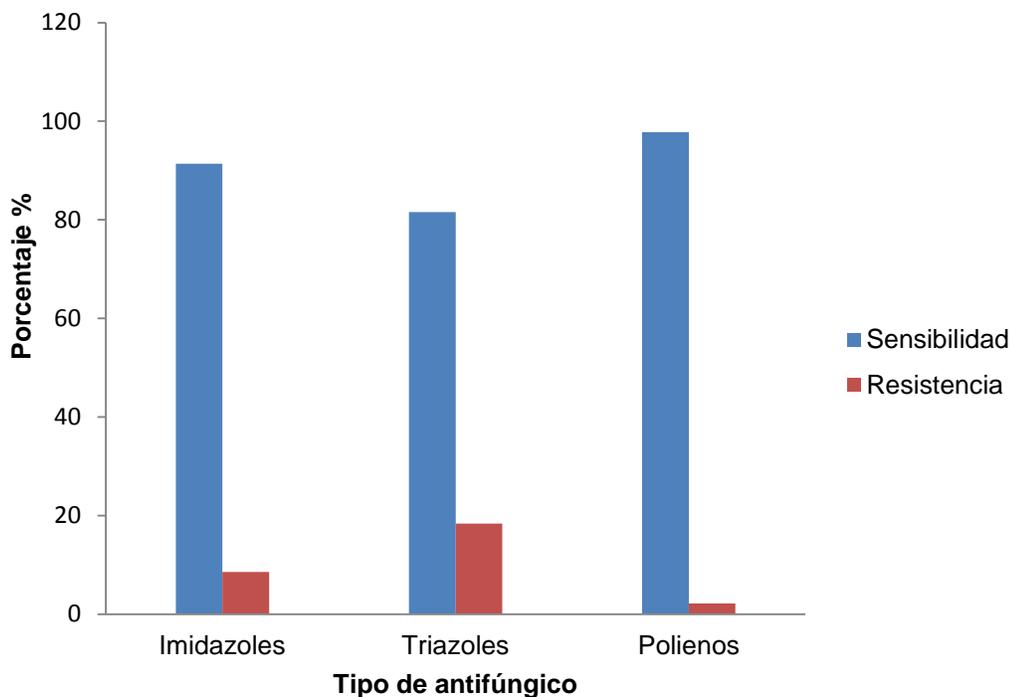


Figura 13. Distribución del fenotipo de sensibilidad y de resistencia a los antifúngicos probados, agrupados en; Imidazoles (ketoconazol, miconazol y clotrimazol), Triazoles (fluconazol e itraconazol) y Polienos (nistatina y anfotericina B), en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH/SIDA.

Por otra parte, se cuantificó el porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de resistencia a uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco antifúngicos sucesivamente, Figura 14. Considerando los 7 antifúngicos probados (cinco tipos de azoles y dos tipos de polienos) se observó que un 18.4 % de las cepas mostró resistencia a un antifúngico, 7.8 % a dos, 3.9 % a tres, 3.4 % a cuatro y 2.2 % a cinco antifúngicos simultáneamente, Figura 14 (A). En la Figura 14 (B) se muestran los porcentajes de resistencia sólo ante los fármacos azoles, se observó que el 19.3 % de las cepas fueron resistentes a un tipo de azol, el 7.2 % a dos, el 3.9 % a tres, el 2.2 % a cuatro y el 2.2 % a los cinco azoles. Es decir, una de cada cinco cepas fue resistente al menos a un fármaco azólico entre los siete azoles más utilizados en la práctica clínica.

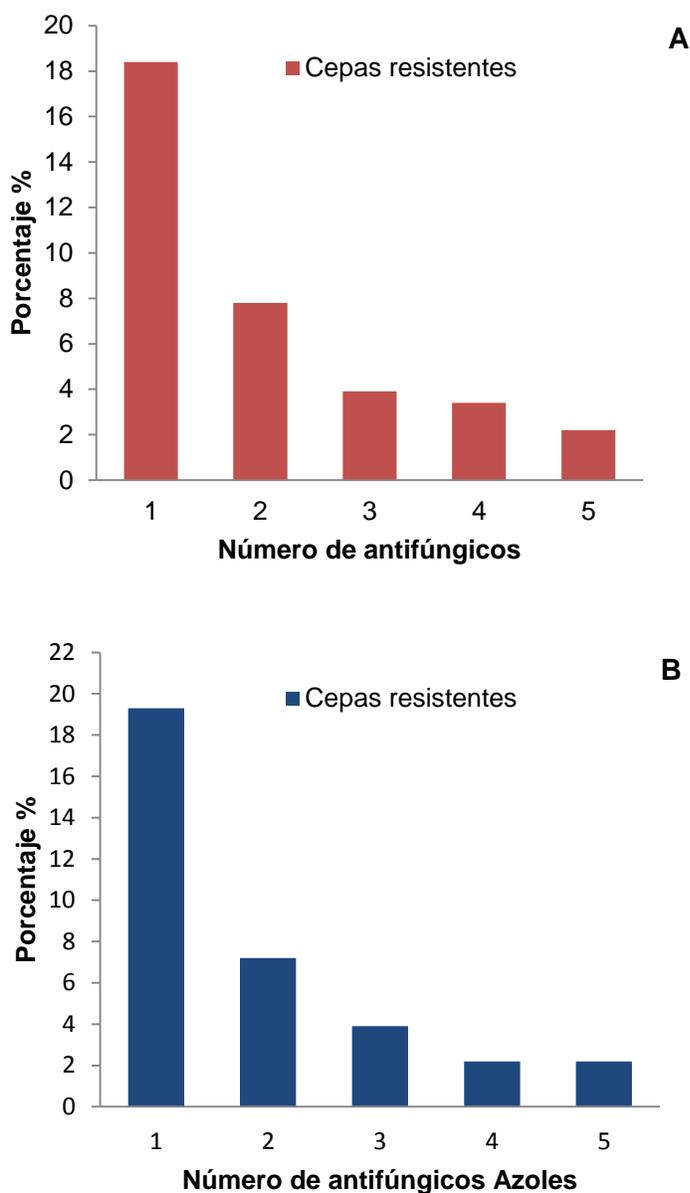


Figura 14. Porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de resistencia ante uno, dos, tres, cuatro y hasta cinco antifúngicos simultáneamente, A. Considerando los siete antifúngicos probados (cinco azoles y dos polienos) y B. Considerando sólo los cinco fármacos azoles.

8.6 Especies de *Candida* y sensibilidad a los antifúngicos

El total de cepas aisladas (181) estuvo representado en un 71.8 % por especies de *C. albicans* y un 28.8 % por especies de *C. no-albicans*. En este grupo de cepas se observó que ante los fármacos azoles el mayor porcentaje en fenotipos de resistencia lo presentaron las cepas de *C. no-albicans* en un 66.6%

comparado con un 22.3 % que presentaron las cepas de *C. albicans*, mientras que ante polienos los fenotipos de resistencia fueron bajos en ambos grupos de cepas, 0.6 % y 0.8 % respectivamente, Figura 15.

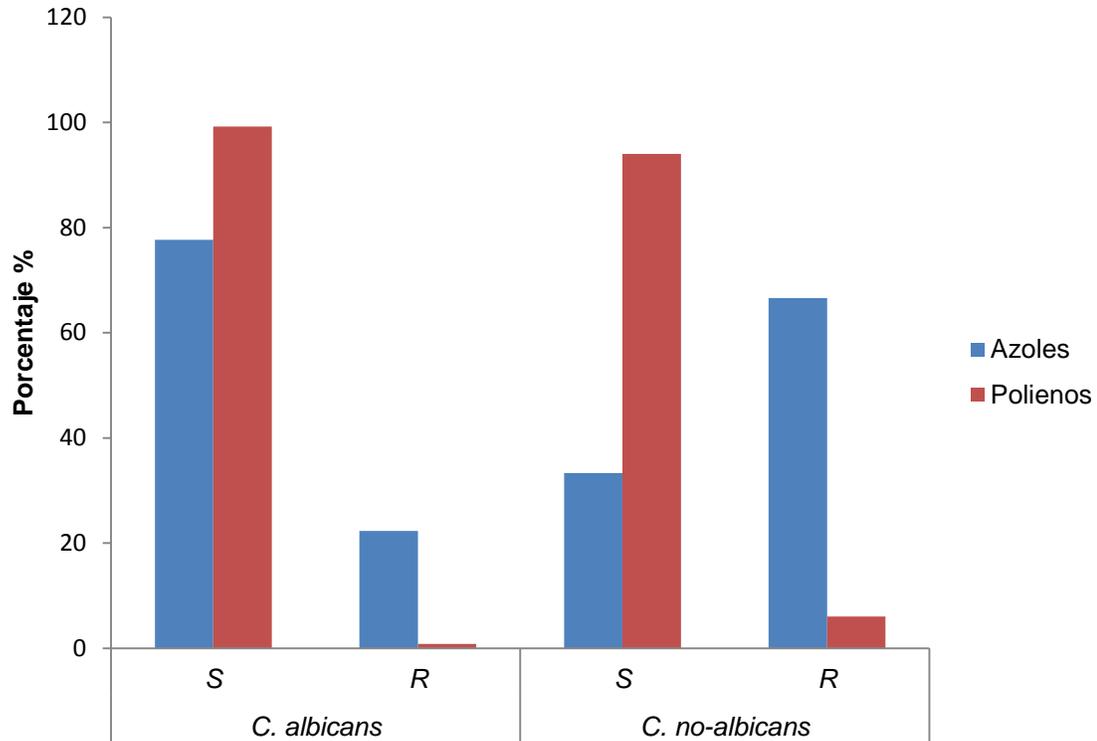


Figura 15. Porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) ante los dos tipos de antifúngicos probados (azoles y polienos) entre todas las cepas aisladas del género *C. albicans* y *C. no-albicans*, en los pacientes con VIH.

El mismo análisis por ciudad, Figura 16, reveló que en la ciudad de Tijuana las cepas de *C. albicans* presentaron un bajo porcentaje de fenotipos de resistencia ante los fármacos azoles (3.9 %) y ningún caso de resistencia ante los polienos (0 %), mientras que el 60% de los aislados *C. no-albicans* mostraron fenotipo de resistencia ante los azoles y un 10 % de resistencia ante los polienos. En la ciudad de Mexicali las cepas de *C. albicans* presentaron mayores porcentajes en los fenotipos de resistencia ante azoles (18.2%) y polienos (3%), en comparación a las cepas de la misma especie aisladas en la ciudad de Tijuana. Mientras que en las cepas *C. no-albicans* aisladas en esta ciudad el 61.5 % mostraron resistencia ante los azoles y no se observó algún caso de resistencia ante los polienos. Finalmente, en los aislados de *C. albicans* de la ciudad de Ensenada se encontró un 45.7 % de cepas resistentes ante los fármacos azoles y ningún caso de resistencia ante los polienos.

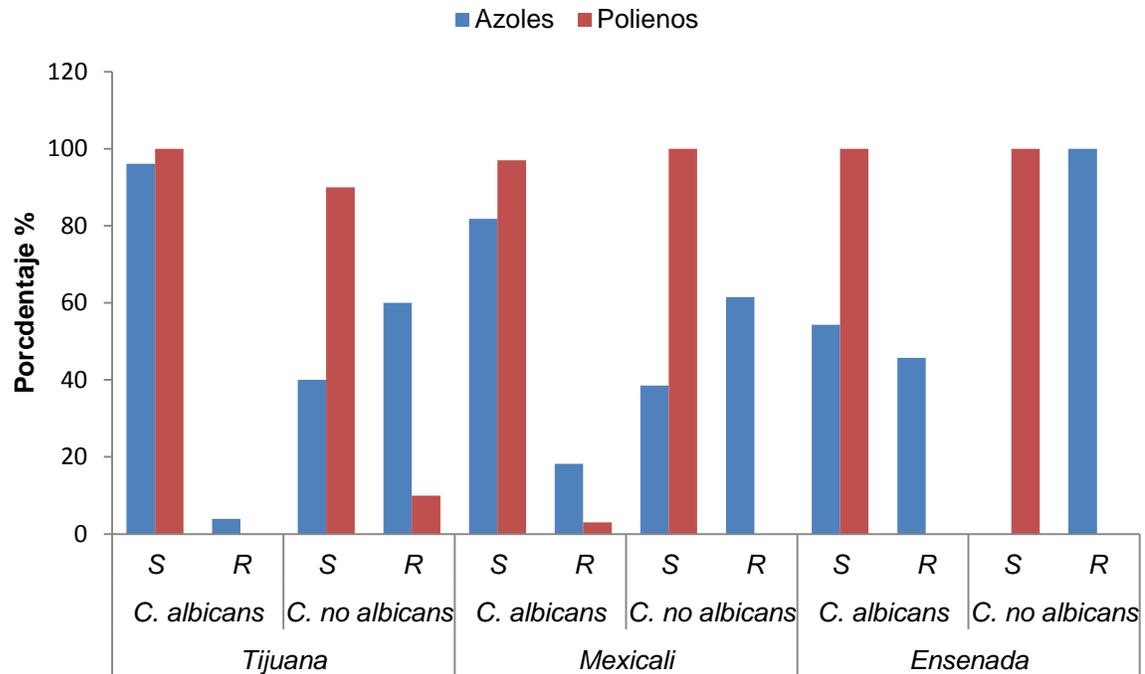


Figura 16. Porcentaje de cepas que presentaron fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) ante los dos tipos de antifúngicos probados (azoles y polienos) entre las cepas aisladas del género *C. albicans* y *C. no-albicans*, en cada ciudad muestreada.

Como se muestra en los datos de la Tabla 11, en la distribución de los fenotipos de sensibilidad y resistencia en cada uno de los fármacos utilizados, entre las cepas aisladas del género *C. albicans* y *C. no-albicans*, ninguna cepa de *C. albicans* presentó fenotipo de resistencia ante el fármaco ketoconazol, sin embargo, el 0.8 % de las cepas presentaron fenotipos de resistencia ante clotrimazol, nistatina y anfotericina B, el 2.3 % ante itraconazol, el 3.8 % ante miconazol y el 22.3 % de las cepas presentaron fenotipo de resistencia ante fluconazol. En el caso de los aislamientos *C. no-albicans* el mayor porcentaje de fenotipos de resistencia fue ante fluconazol en un 40 % de las cepas, seguido de miconazol e itraconazol en un 34 %, clotrimazol en un 32 %, ketoconazol en un 14 % y nistatina y anfotericina B en un 6% de las cepas.

Tabla 11. Susceptibilidad a antifúngicos en los aislados de *C. albicans* y *C. no-albicans* en los pacientes con VIH/SIDA.

Antifúngico	<i>C. albicans</i>			<i>C. no-albicans</i>		
	S	RI	R	S	RI	R
Mic*	125(96.1)	1(0.8)	4(3.1)	33(66.0)	6(12.0)	11(22.0)
Clo*	129(99.2)	1(0.8)	0	34(68.0)	15(30.0)	1(2.0)
Ket*	130(100)	0	0	43(86.0)	3(6.0)	4(8.0)
Itr*	127(97.7)	3(2.3)	0	33(66.0)	7(14.0)	10(20.0)
Flu*	101(77.7)	28(21.5)	1(0.8)	30(60.0)	12(24.0)	8(16.0)
Nys	129(99.2)	1(0.8)	0	47(94.0)	0	3(6.0)
Anp	129(99.2)	1(0.8)	0	47(94.0)	0	3(6.0)

Mic=Miconazol, Clo=Clotrimazol, Ket=Ketoconazol, Itr=Itraconazol, Flu=Fluconazol, Nis=Nistatina, Anf=Anfotericina B, S=Sensible, RI=Respuesta Intermedia, R=Resistente.

*p<0.0

En la ciudad de Tijuana ninguna cepa de *C. albicans* presentó fenotipo de resistencia ante clotrimazol, ketoconazol, itraconazol, nistatina y anfotericina, mientras que ante los fármacos miconazol y fluconazol sólo el 2 % de las cepas mostró fenotipo de resistencia. En el caso de las cepas *C. no-albicans* observamos que ante todos los antifúngicos hubo un porcentaje de cepas con fenotipo de resistencia; 3.3 % resistentes ante ketoconazol, 10 % ante nistatina y anfotericina B, 26.7 % ante miconazol y fluconazol y 33.4 % ante clotrimazol.

En la ciudad de Mexicali los aislados de *C. albicans* no presentaron resistencia a ketoconazol, el 3% de las cepas fueron resistentes ante clotrimazol, itraconazol, nistatina y anfotericina B, el 6.1% ante miconazol y un 13.1% ante fluconazol. Mientras que entre las cepas *C. no-albicans* un 15.4 % fueron resistentes a clotrimazol y ketoconazol, un 30.8 % a miconazol e itraconazol y un 46.2 % a fluconazol.

Finalmente, en la ciudad de Ensenada no se aislaron cepas *C. albicans* resistentes a clotrimazol, ketoconazol, nistatina y anfotericina B, un 4.3 % fueron resistentes a miconazol e itraconazol, y un 45.7 % resistentes ante fluconazol. Mientras que entre las cepas *C. no-albicans* no se observó alguna cepa con fenotipo de resistencia ante los polienos y ante los azoles; un 57.1 % fueron resistentes a clotrimazol, ketoconazol e itraconazol, un 71.4 % a miconazol y un 85.7 % ante fluconazol, Figura 17.

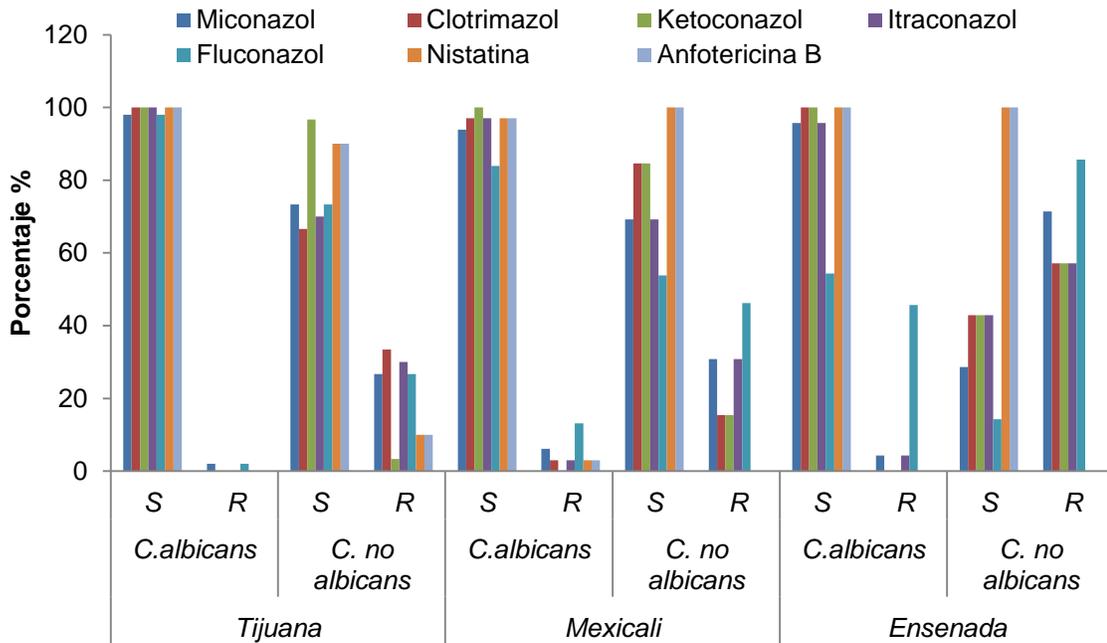


Figura 17. Porcentaje de cepas de *C. albicans* y *C. no-albicans* que presentaron fenotipo de sensibilidad (S) y resistencia (R) ante cada uno de los antifúngicos probados (Miconazol, Clotrimazol, Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Nistatina y Anfotericina B) en el total de las cepas aisladas por ciudad muestreada.

Las distintas especies del género *Candida* presentaron mayor proporción de fenotipos de resistencia ante los fármacos azoles que ante los polienos. Las especies con mayor proporción de fenotipos de resistencia ante los azoles fueron *C. guilliermondii*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, las cuales presentaron 100 %, 81.2 % y 80 % respectivamente. Ante los polienos las especies *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. albicans* presentaron fenotipos de resistencia en un 33.3 %, 13.6 % y 0.8 % respectivamente, mientras que entre los aislamientos de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* no se observó alguna cepa resistente a polienos, Figura 18.

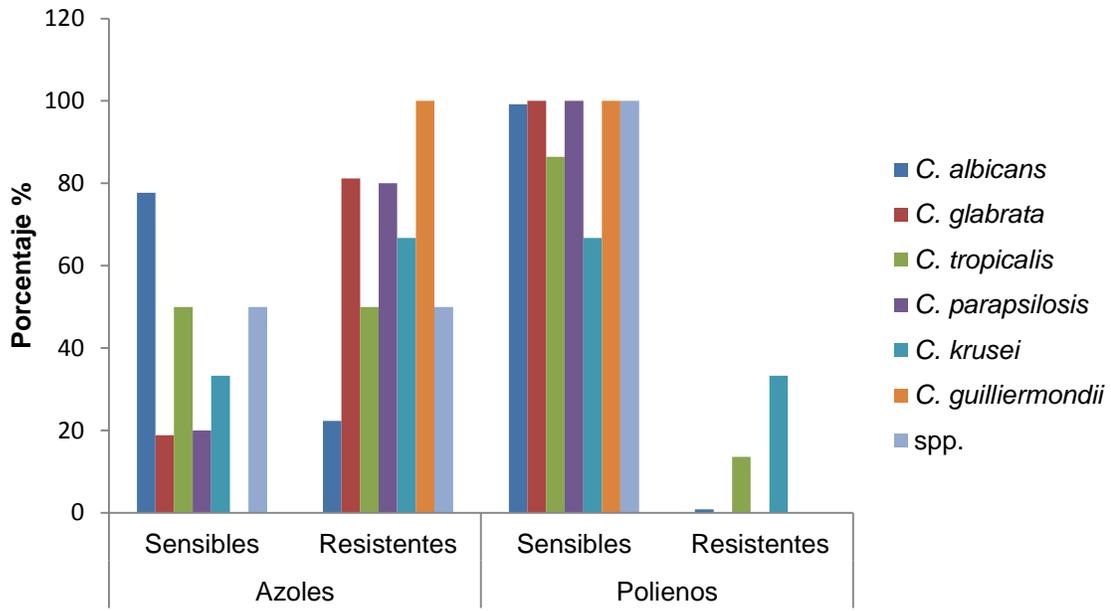


Figura 18. Distribución de las respuestas de sensibilidad y resistencia ante los antifúngicos azoles y polienos observados en las diferentes especies del género *Candida* aisladas en los pacientes con VIH-SIDA.

8.7 Ensayos de sensibilidad en biopelículas

Del total de las 181 cepas del género *Candida* aisladas en los pacientes con VIH/SIDA se observó la formación de biopelícula en el 81.2 % (147 cepas). En el total de las cepas *C. albicans* aisladas en la ciudad de Tijuana el 94.1 % formaron biopelícula, en Mexicali el 93.9 % y en Ensenada el 89.1 %. En el grupo de las cepas de *C. no-albicans* se observó menor cantidad de cepas formadoras de biopelícula, en la ciudad de Tijuana el 63.3 %, posteriormente en Ensenada el 62.5 % y en Mexicali sólo el 23.1 %, Figura 19.

En el caso de la especie *C. albicans* el 92.3 % de las cepas formaron biopelícula, es decir, 120 de las 130 caracterizadas, mientras que entre las cepas *C. no-albicans* las especies que con mayor proporción formaron biopelícula fueron *C. tropicalis*, de la cual se observó que el 95.5 % de los aislamientos formaron biopelícula (21 cepas de 22 aislamientos) y *C. guilliermondii*, de las cuales el 66.7 % formaron biopelícula (2 cepas de 3 aislamientos). En el caso de las especies *C. parapsilosis* y *C. krusei* un 40 % (2 cepas de 5 aislamientos) y un 33.3 % (1 cepa de 3 aislamientos) formaron biopelícula respectivamente. Solamente en los aislados de *C. glabrata* no se observó alguna cepa formadora de biopelícula, Figura 20.

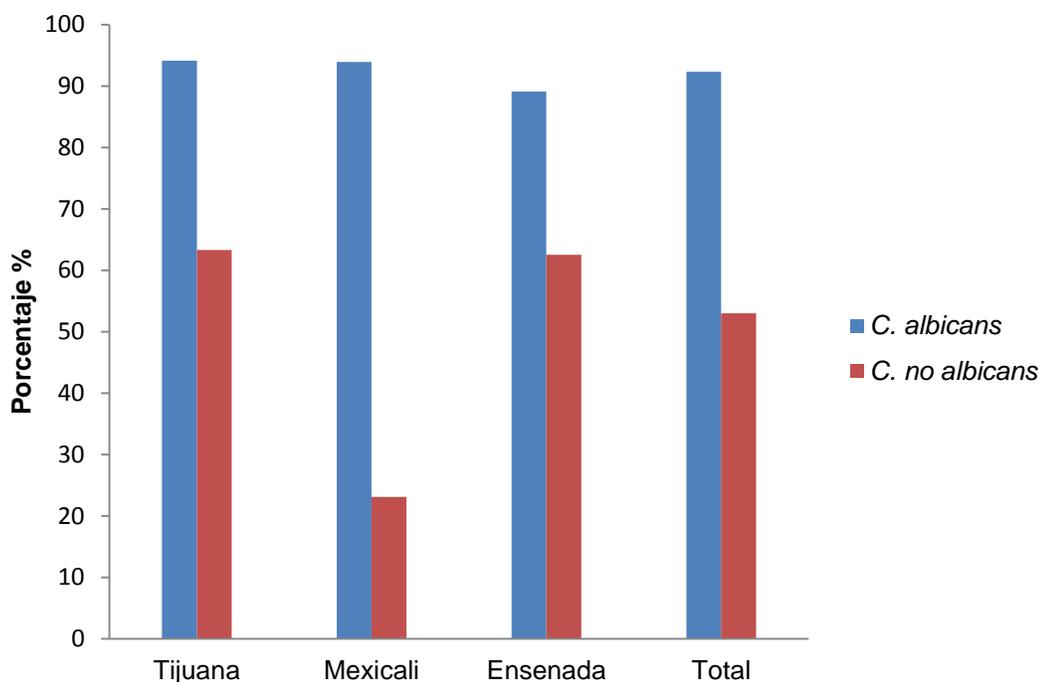


Figura 19. Distribución del porcentaje de cepas de *C. albicans* y *C. no-albicans* que formaron biopelícula, por ciudad y en el total de las cepas aisladas en los pacientes con VIH/SIDA.

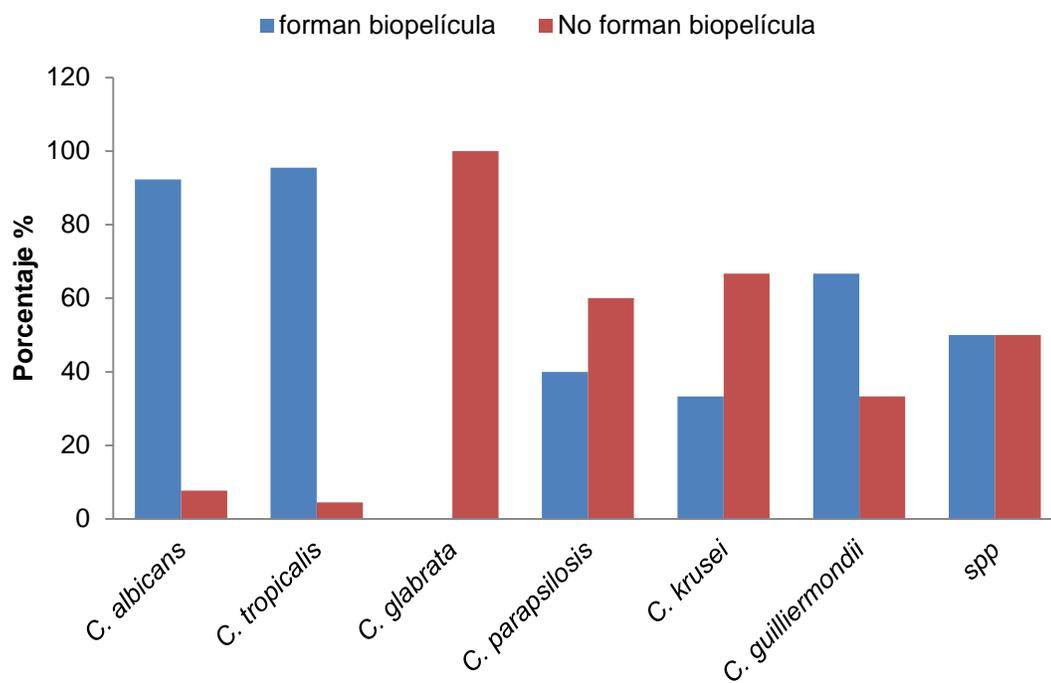


Figura 20. Porcentaje de cepas de las diferentes especies del género *Candida* caracterizadas, que formaron biopelícula en el total de los aislamientos en los pacientes con VIH/SIDA.

El ensayo para inducir la formación de biopelícula también se realizó añadiendo una concentración de 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (menor que la concentración mínima inhibitoria) del antifúngico fluconazol al medio de crecimiento de la biopelícula. En la Figura 21 se muestran los porcentajes de las cepas del género *Candida* en las cuales se observó crecimiento de la biopelícula con la presencia del antifúngico. En este ensayo se observó que un 52.3 % de las cepas de *C. albicans*, un 45.5 % de las cepas de *C. tropicalis* y un 33.3 % de las cepas de *C. guilliermondii* formaron biopelícula con la presencia de fluconazol.

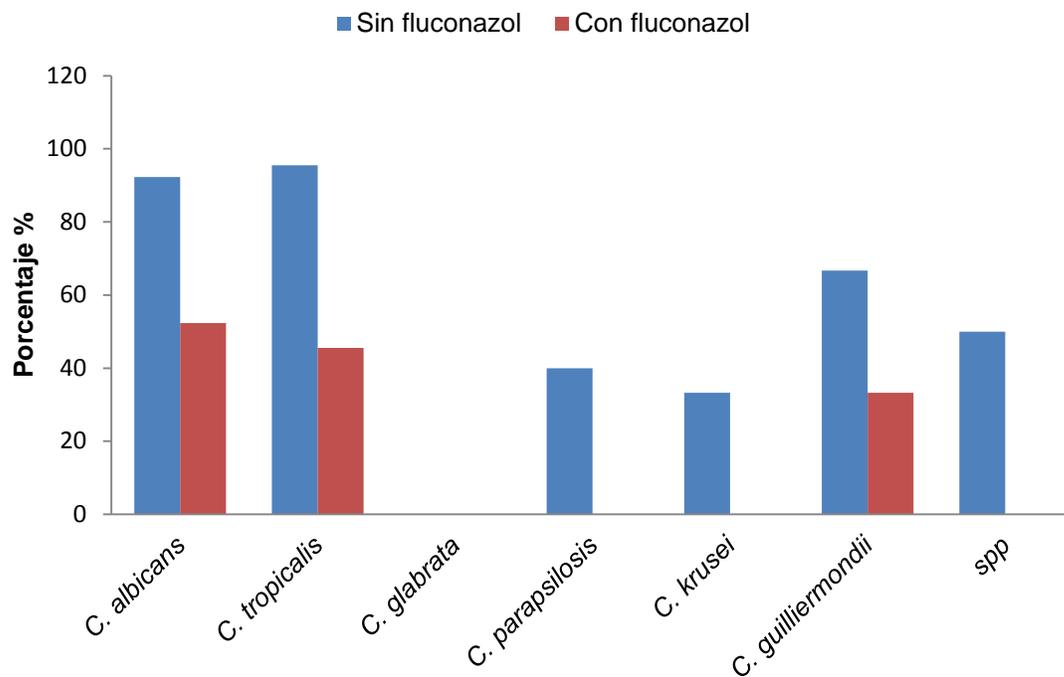


Figura 21. Porcentaje de cepas de las especies del género *Candida* caracterizadas que formaron biopelícula, sin fluconazol y con fluconazol (8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en el total de los aislamientos en los pacientes con VIH/SIDA.

Capítulo 9. Discusión

En el presente estudio se investigó la colonización de la cavidad oral por especies del género *Candida* en pacientes con VIH/SIDA de las tres ciudades más importantes en el estado de Baja California, México. Se observa que el promedio general de edad en este grupo de pacientes es de 39.9 ± 10.3 (media \pm desviación estándar) años, como lo han observado en otros trabajos (Hamza et al., 2008; Gasparin et al., 2009; Gómez y Pedroso, 2009). En el total de los pacientes muestreados se encontró una tasa general de portadores de *Candida* de 57.4%, no obstante, en la ciudad de Tijuana se observó una tasa significativamente mayor (75.5%). La prevalencia de portadores de *Candida* en general y en la ciudad de Ensenada y Mexicali fue mayor que la reportada en un estudio en Brasil donde se observó una prevalencia del 44% en el mismo grupo de pacientes (Delgado et al., 2009). Al contrario de lo que se observa en otros trabajos donde se establecen prevalencias más bajas, como las reportadas para; Hong Kong (58.4%) (Senet, 1997), India (65.3%) (Gugnani et al., 2003), Bélgica (62.3%) (Samaranayake et al., 1986), el Reino Unido (93%) (Felix y Wray, 1993), Suiza (78%) (Chave et al., 1996), Italia (65.9%) (Campisi et al., 2002), Tailandia (66.7%) (Schoofs et al., 1998), Argentina (62.3%) (Luque et al., 2008) y África (84.5%) (Hamza et al., 2008). En el caso de la ciudad de Tijuana, la prevalencia fue mayor excepto en comparación con Suiza, el Reino Unido y África (Felix y Wray, 1993; Chave et al., 1996; Hamza et al., 2008). En otros estudios en México, se ha encontrado un porcentaje de portadores de *Candida* hasta del 66.7% en la Ciudad de México (Repentigny, et al., 2004) que es incluso mayor que en Ensenada y Mexicali pero menor que en Tijuana. Estas diferencias entre las distintas ciudades pueden deberse a las diferencias demográficas de cada una de ellas, Tijuana y Mexicali son dos ciudades fronterizas con EEUU y Ensenada es una ciudad portuaria más alejada de la frontera (100 Km). Tijuana está comprendida por una población muy cosmopolita con alrededor de 5 millones de habitantes (COPLADE, 2014), y se caracteriza por una gran población flotante de migrantes hacia EEUU que vienen de la parte sur de México y Centro América; en cambio Mexicali tiene una población más estable de aproximadamente 1 millón de habitantes y Ensenada alrededor de 0.5 millones de habitantes (COPLADE, 2014).

En este estudio no se observaron diferencias de los portadores de *Candida* por sexo, igual que en otros estudios realizados en México (Repentigny et al., 2004) y Río de Janeiro (Gasparin 2009), no obstante, en otros países como África se ha reportado que las mujeres representan hasta el 75 % de los pacientes con VIH/SIDA portadores de levaduras del género *Candida* (Hamza et al., 2008; Ohmit et al., 2003). Algunos trabajos relacionan esta alta prevalencia en el género femenino con la deficiencia de hierro (Hauman et al., 1993; Sánchez et al., 2005).

En muchos estudios se ha observado que la especie más frecuente encontrada en muestras orales es *C. albicans* (60-80%) en este grupo de pacientes y en pacientes relativamente sanos (Kumar et al., 2008), aunque esto puede variar (Cannon y Chaffin, 1999; Kumar et al., 2008). En las tres ciudades estudiadas esto no fue diferente, se observó un 66.3% de portadores de *C. albicans* en Tijuana, un 72.8% en Mexicali y un 90.3% en Ensenada, aunque este último valor fue mayor a lo reportado por otros autores para México (Repentigny et al., 2004). Las especies de *C. no-albicans* se encontraron entre el 13.7 y 33.7% de los aislamientos. La distribución de las especies caracterizadas fue diferente en cada una de las ciudades estudiadas, por ejemplo en Tijuana *C. tropicalis* fue la más frecuente, pero no en Mexicali donde *C. glabrata* fue la más encontrada y en Ensenada no se observó una especie de *C. no-albicans* predominante. La ciudad donde se observó mayor diversidad de especies fue Mexicali donde se encontraron todas las especies caracterizadas. En el total del muestreo las especies del género *Candida* predominantes fueron *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, como se ha reportado anteriormente ocurre en la cavidad oral en pacientes con candidiasis (Liguori et al., 2008). Tanto en Tijuana como en Mexicali, la ocurrencia de especies *C. no-albicans* fue más alta que en otros reportes (Marguotta 2000; Barchiesi et al., 2002; Hamza et al., 2008), esto es muy importante puesto que la respuesta a antifúngicos convencionales en estas especies puede ser limitada, además se ha observado que las especies de *C. no-albicans* predominan en las muestras de pacientes hospitalizados hasta en un 47% de los aislamientos (Sanabria et al., 2006).

Ninguno de los pacientes estudiados fue portador de *C. dubliniensis*, cepa que se ha aislado de sujetos con VIH/SIDA en otros países (Coleman et al., 1998; Giammanco et al., 2002). La ausencia de *C. dubliniensis* en esta población puede deberse a que esta especie no se ha diseminado en esta región, como sucede en la India donde tampoco se ha identificado (Blignaut, 2002; Kumar et al., 2008), a pesar de que se caracterizó tanto en Europa como Norteamérica hace 20 años (Kirkpatrick et al., 1998; Sandven, 2000). Otra alternativa es que se encuentre en muy baja proporción en esta población. En un estudio en Sudáfrica, que representa la población con mayor cantidad de personas infectadas con VIH en el mundo, observaron que la prevalencia de *C. dubliniensis* está más relacionada a la raza que a los pacientes con VIH/SIDA como se ha sugerido en otros trabajos (Blignaut 2002, Gutiérrez et al., 2002).

La asociación más frecuente fue *C. albicans* + *C. glabrata* en prácticamente la mitad de los pacientes portadores de dos especies (5 de 11 pacientes), de igual forma que lo reportado en África para este grupo de pacientes, aunque en menor porcentaje ya que sólo observaron 2 pacientes de 292 estudiados (Hamza et al., 2008). Otra asociación reportada es *C. albicans* y *C. krusei* en los pacientes con VIH/SIDA (Kumar et al., 2008), además, en este trabajo las otras asociaciones identificadas fueron *C. albicans* + *C.*

tropicalis y *C. glabrata* + *C. tropicalis*, las cuales se presentaron en dos pacientes cada una y con un sólo paciente afectado se encontró *C. albicans* + *C. parapsilosis* y *C. albicans* + *C. guilliermondii*.

En cuanto a las variables estudiadas asociadas con VIH/SIDA como el uso de terapia antirretroviral, carga viral, niveles de linfocitos T CD4 y tiempo desde el diagnóstico, no se observó correlación con la frecuencia de portar levaduras del género *Candida*. Sólo en el grupo de pacientes con más de 100,000 copias virales se observó una alta proporción (86.7 %) de portadores de levaduras del género *Candida*. Este hallazgo es diferente a lo reportado hace tiempo en donde se mostraba que la alta carga viral no se asocia a la presencia de especies de *Candida* en la cavidad oral (Margiotta et al., 1999; O'Sullivan et al., 2000; Barchiesi et al., 2002). Sin embargo, en estudios más recientes se observa que la prevalencia de especies del género *Candida* fue mayor en pacientes con altos títulos de carga viral (Hamza et al., 2008; Moris et al., 2008; Delgado et al., 2009; Gasparin, 2009). De manera particular en un estudio realizado sólo en mujeres con VIH/SIDA observaron mayor colonización por levaduras del género *Candida* y alta prevalencia de candidiasis oral en aquellas mujeres con carga viral de >10,000 copias/mL (Ohmit et al., 2003). En otro tipo de estudios han observado que los niveles altos en la carga viral están relacionados con la supresión de los mecanismos inmunes locales de la mucosa oral, como es la disminución de la secreción salival que se sabe contiene componentes con actividad antifúngica, como son la lisozima, lactoferrina, histatina y lactoperoxidasa, tal situación se ha relacionado con la colonización de levaduras (Gottfredson 1999, Samaranayake et al., 1986). En estudios que se realizaron hace más de diez años sobre la asociación entre terapia antirretroviral y la presencia de *Candida* oral no se encontró ninguna relación y algunos autores proponen que las funciones protectoras de la mucosa bucal son independientes de la cantidad de linfocitos T CD4 (Cannon y Chaffin, 1999; Margiotta et al., 2000, Ohmit et al., 2003). Las terapias antirretrovirales desde entonces han evolucionado y han resultado ser más eficaces. El 83.5% de los pacientes estudiados estaban utilizando algún tipo de terapia antirretroviral y tampoco se observaron diferencias entre los portadores.

Con relación a los niveles de linfocitos T CD4 se encontraron resultados coherentes con los hallazgos de otros estudios donde no se observó una relación entre el conteo de linfocitos y la prevalencia de *Candida* y/o candidiasis oral (Hamilton et al., 1992; Senet, 1997; Gottfredsson et al., 1999; Barchiesi et al., 2002). Sin embargo, hay reportes donde aproximadamente el 80 % de los pacientes con VIH/SIDA y candidiasis oral, tienen un conteo linfocitario menor de 200 cel/mm³ de linfocitos TCD4 (Hamza et al., 2008; Delgado et al., 2009; Ramírez et al., 2009). Por otra parte, un conteo de linfocitos TCD4 menor de 200 cel/mm³ está documentado como factor de riesgo en la prevalencia de infecciones oportunistas (Werneck y Bedin, 2009). Al momento no hay evidencia concluyente de tal asociación.

Acerca del tiempo de evolución desde el diagnóstico de VIH/SIDA tampoco se observó una relación con la presencia de levaduras de *Candida* en la boca, a diferencia de lo reportado en Rio de Janeiro donde se determinó mayor prevalencia en pacientes con mayor tiempo de diagnóstico, así como en pacientes con baja escolaridad (Gasparin et al., 2009).

Con respecto al hábito de fumar, los porcentajes altos de portadores de *Candida* se encontraron entre los exfumadores y fumadores, aunque esto no fue significativo. En otros estudios también se observó la influencia del hábito de fumar en ser portador de *Candida* (Arendorf y Walker, 1980; Campisi et al., 2001; Campisi et al., 2002; Ohmit et al., 2003), pero hasta ahora no se ha presentado evidencia concluyente de esta asociación.

En resumen, aparentemente hay una gran variabilidad no sólo en la frecuencia de portadores de levaduras del género *Candida* y la proporción de las especies identificadas, sino también en relación a las diferentes variables que pueden estar asociadas (el género, el estado inmunológico, la carga viral, el uso de terapia antiretroviral, los niveles de linfocitos T CD4+, los hábitos de tabaquismo y consumo de alcohol). Estas diferencias pueden deberse a otros factores intrínsecamente relacionados a las poblaciones de diferentes regiones geográficas. Es por esto la importancia de estudiar el problema de las infecciones provocadas por las levaduras del género *Candida* en diferentes grupos de riesgo en varias regiones. Otro factor que puede contribuir a la variabilidad de los resultados es el método utilizado tanto para el muestreo como para la identificación de las cepas. En este estudio utilizamos enjuagues bucales para la obtención de los aislados y PCR-RFLP para la identificación de las cepas, ambos métodos considerados confiables y significativos para determinar la frecuencia de portadores y candidiasis oral (Samaranayake et al., 1986; Campisi et al., 2002; Mirhendi et al., 2006).

Por otra parte, en general las especies de *Candida* son sensibles tanto a los fármacos antifúngicos azoles como a los polienos, en este trabajo observamos que ante los fármacos azoles el 3.9 % del total de las cepas aisladas presentó fenotipo de resistencia y un 8.6 % fenotipo de sensibilidad dependiente de la dosis, mientras que para los fármacos polienos se observaron menores porcentajes de ambos fenotipos (1.7 y 0.5 % respectivamente). La resistencia a antifúngicos se ha observado principalmente en el tratamiento de la candidiasis oral con fármacos azoles en pacientes con VIH/SIDA (Barchiesi et al., 1998; Sánchez et al., 2005). El fluconazol es el antifúngico más utilizado para tratar la candidiasis oral en pacientes con VIH/SIDA en México (NOM 2003) y el incremento en resistencia a este triazol es actualmente un reto difícil. En el presente estudio observamos que los fenotipos de resistencia y sensibilidad dependiente de la dosis varía entre los fármacos agrupados de acuerdo a su naturaleza

bioquímica, de manera que la prevalencia de fenotipos de resistencia y sensibilidad dependiente de la dosis es mayor ante los triazoles probados (fluconazol e itraconazol), mientras que los fármacos más efectivos para limitar el crecimiento de las levaduras fueron el imidazol ketoconazol y los polienos estudiados (anfotericina B y nistatina) similar a lo reportado en otros estudios en México (Sánchez et al., 2005). Si bien el patrón de respuesta ante los antifúngicos azoles se muestra con una distribución particular para cada tipo de fármaco, en el caso de los polienos no se observan diferencias en los patrones de respuesta. Es posible que haya más diversidad en los mecanismos de resistencia ante los azoles en comparación con los mecanismos de resistencia ante polienos. En el total de cepas aisladas no se observó alguna resistente a todos los antifúngicos probados, no obstante, una de cada cinco cepas es resistente a alguno de los fármacos probados y una de cada cincuenta es resistente a cinco fármacos simultáneamente.

Asimismo, está descrito que la sensibilidad varía significativamente entre *C. albicans* y las especies de *C. no-albicans*. Algunas especies de *C. no-albicans* tienen resistencia inherente o secundaria a los azoles (10 – 75%) (Krcmaery 2002); mientras que la resistencia a polienos es menor (5-20 %) (Hamilton, 1974; Dick et al., 1980). En los pacientes con VIH/SIDA portadores de *Candida* oral, la prevalencia de cepas de *C. albicans* con resistencia a fluconazol se estimó en un 22% de los pacientes de Norte América (Martins et al., 1997; Martins et al., 1998; Sanglard y Odds, 2002). Otros estudios muestran altas tasas de sensibilidad a fluconazol (93 a 97%) y sensibilidad dependiente de la dosis (3 a 7 %) (Barchiesi et al., 1998; Sánchez et al., 2005). Por el contrario, ante fluconazol en el presente trabajo encontramos una resistencia de 0.8-3.1 % en los aislados de *C. albicans* y una sensibilidad dependiente de la dosis entre un 0.8-21.5 %; mientras que en los aislados de *C. no-albicans* observamos una frecuencia de fenotipos de resistencia en un 8.0-22.0 % de las cepas aisladas y una sensibilidad dependiente de la dosis de 6.0-30 %. La mayoría de las cepas resistentes son *C. glabrata* y *C. tropicalis* en las tres entidades muestreadas, esto coincide con lo reportado en otros trabajos (Pfaller et al., 2006; Guitard et al., 2013; Maubon et al., 2014). Al parecer los aislados de *Candida* pueden desarrollar resistencia *in vitro* durante los episodios repetidos de candidiasis oral tratada con fluconazol (Maenza et al., 1997). Sin embargo, algunas cepas de *Candida* resistentes a fluconazol son sensibles a otros azoles, probablemente porque hay varios mecanismos de resistencia a este grupo de fármacos (Sanglard y Odds, 2002). En este estudio, la prevalencia de fenotipos de resistencia a polienos en las cepas aisladas de *Candida* fue particularmente baja, sólo un 0.8% de las cepas aisladas de *C. albicans* presentaron sensibilidad dependiente de la dosis a nistatina o anfotericina B, y en el caso de los aislados de *C. no-albicans* el 6.0 % presentaron resistencia a ambos polienos, estos hallazgos son similares a lo reportado para otras poblaciones donde se observa

resistencia de 0.4-4 % en los aislados clínicos (Dick 1980, Hamilton, 1974). La anfotericina B es usada como monoterapia en casos severos de candidiasis oral y candidemia y a pesar de esto, la resistencia a este fármaco es poco común. Su efecto fungicida puede limitar la selección de mutantes resistentes, no obstante, algunas cepas de *C. no-albicans* muestran una ligera disminución en la sensibilidad a anfotericina B y nistatina, como se observa en este trabajo (Guinea et al., 2010; Silva et al., 2012). Sólo una cepa de *C. albicans* y tres de *C. tropicalis* en la ciudad de Tijuana presentaron resistencia a los polienos. Otros estudios en pacientes con fungemia, han descrito resistencia a polienos en las especies *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*. En esta población, la resistencia a los polienos está asociada a pacientes con salud severamente comprometida (inmunocomprometidos, con leucemia, anemia aplásica o con trasplante de médula ósea), infectados con *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Krcmery y Barnesz, 2002; Dick et al., 1980). Los estudios con respecto a los mecanismos de resistencia a polienos sugieren que está principalmente asociada con el bloqueo en la vía de síntesis de los esteroides, provocando una acumulación de intermediarios que presentan menor afinidad a los polienos que el ergosterol (Borecká et al., 2008), sin embargo, el mecanismo de resistencia en nuestros aislados falta por estudiarse.

En cuanto a la capacidad de formar biopelícula en las cepas aisladas, observamos que el 92.3 % de las cepas de *C. albicans* aisladas formaron biopelícula en condiciones normales de crecimiento, mientras que entre las cepas de *C. no-albicans* sólo el 53 %. En el grupo de especies *C. no-albicans*, la cepa más frecuente fue *C. tropicalis*. Prácticamente la mitad de las cepas de *C. albicans* que formaron biopelícula en condiciones normales de crecimiento, también lo hicieron en presencia de fluconazol, de igual manera que en las cepas de *C. tropicalis* (45.5%).

En conclusión, este trabajo representa el primer estudio de la diversidad de *Candida* en pacientes con VIH/SIDA en el noroeste de México. Las diferencias en frecuencia de las especies de *Candida* en las tres ciudades refleja el impacto de la localización geográfica. Se requieren estudios más profundos para aclarar los mecanismos de resistencia a los fármacos antifúngicos de los aislamientos clínicos.

Capítulo 10. Conclusiones

Se encontró una tasa general de portadores de *Candida* de 57.4%, sin embargo, en la ciudad de Tijuana se observó una tasa significativamente mayor (75.5%).

En las tres ciudades estudiadas *C. albicans* es la especie de mayor prevalencia, con un 66.3% en Tijuana, un 72.8% en Mexicali y un 90.3% en Ensenada.

La distribución de las especies de *C. no-albicans* caracterizadas fue diferente en cada una de las ciudades estudiadas, en Tijuana *C. tropicalis* fue la más frecuente, *C. glabrata* en Mexicali y en Ensenada no se observó una especie de *C. no-albicans* predominante.

En cuanto a las variables estudiadas asociadas con VIH/SIDA; como la distribución por sexo, el uso de terapia antiretroviral, carga viral, niveles de linfocitos T CD4, tiempo desde el diagnóstico, y la relación con los hábitos de tabaquismo y consumo de alcohol, no se observó correlación con la frecuencia de portar levaduras del género *Candida*.

Sólo en el grupo de pacientes con más de 100,000 copias virales se observó una alta proporción (86.7 %) de portadores de levaduras del género *Candida*.

Se observaron mayores proporciones de fenotipos de resistencia ante los fármacos azoles (12.5 %) que ante los polienos (2.2 %).

Los fármacos más efectivos para limitar el crecimiento de las levaduras fueron el imidazol ketoconazol y los polienos estudiados; anfotericina B y nistatina.

Una de cada cinco cepas es resistente a alguno de los fármacos probados y una de cada cincuenta es resistente a cinco fármacos simultáneamente.

Los aislados de *C. no-albicans* presentan mayor frecuencia de fenotipos de resistencia y respuesta intermedia que los aislados de *C. albicans*.

El 92.3 % de las cepas de *C. albicans* aisladas formaron biopelícula en condiciones normales de crecimiento, mientras que entre las cepas de *C. no-albicans* sólo el 53 %.

La mitad de las cepas de *Candida* que formaron biopelícula en condiciones normales de crecimiento, también lo hicieron en presencia de fluconazol.

Lista de referencias

- Aguirre, U.J. 2002. Candidiasis orales. Revista Iberoamericana de Micología, 19(1), 17-21.
- Arendorf, T.M., Walker, D.M. 1980. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Archives of Oral Biology, 25(1), 1-10.
- Asmundsdóttir, L.R., Erlendsdóttir, H., Gottfredsson, M. 2002. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. Journal of Clinical Microbiology, 40(9), 3489-3492.
- Ball, L.M., Bes, M.A., Theelen, B., Boekhout, T., Egeler, R.M., Kuijper, E.J. 2004. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida species* colonization in children undergoing allogenic stem transplantation. Journal of Clinical Microbiology, 42(4), 1673-1679.
- Barchiesi, F., Maracci, M., Radi, B., Arzeni, D.E., Baldassarri, I. 2002. Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50(1), 999-1002.
- Barchiesi, F., Arzeni, D., Del Prete, M.S., Sinicco, A., Falconi Di Francesco, L., Pasticci, M.B., Lamura, L., Nuzzo, M.M., Burzacchini, F., Coppola, S., Chiodo, F., Scalise, G. 1998. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41(1), 541-548.
- Basková, L., Landlinger, C., Preuner, S., Lion, T. 2007. The Pan-AC assay: a single reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species. Journal of Medical Microbiology, 56(1), 1167-1173.
- Basma, R., Barada, G., Ojaimi, N., Khalaf, R.A. 2008. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in lebanese hospital isolates. Mycosis, 52(1), 141-148.
- Bassetti, M., Righi, E., Costa, A., Fasce, R., Molinari, M.P., Rosso, R., Pallavicini, F.B., Viscoli, C. 2005. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. BioMed Central Infectious Diseases, 6(21). doi: 10.1186/1471-2334-6-21.
- Bignaut, E. 2007. Oral candidiasis and oral yeast carriage among institutionalised South African pediatric HIV/AIDS patient. Mycopathologia, 163(2), 67-73.
- Borecká, M.S., Moran, G.P., Sullivan, D.J., Kucharíkova, S., Chorvát, D., Bujdáková, M. 2008. The expression of genes involved in the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms exposed to fluconazole. Mycoses, 52(2), 118-128.

- Calderone, R.A. 2002. *Candida* and Candidosis. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Campisi, G., Pizzo, G., Mancuso, S., Margiotta, V. 2001. Gender differences in HIV-related oral lesions: an Italian study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*, 91(5), 546-551.
- Campisi, G., Pizzo, G., Mancuso, S., Margiotta, V. 2002. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus infected subjects. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*, 93(3), 281–286.
- Cannon, R.D., Chaffin, W.L. 1999. Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 10(3), 359-383.
- Chave, J.P., Durussel, C., Glauser, M.P., Bille, J. 1996. Asymptomatic oral yeast carriage in HIV-infected patients: frequency and fluconazole susceptibility profile. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), 249–252.
- Coleman, D., Rinaldi, M.G., Haynes, K.A., Rex, J.H., Summerbell, R.C., Anaissie, E.J., Li, A., Sullivan, D.J. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology*, 36(1), 156-165.
- Colombo, L., Nucci, M., Salomao, R., Branchini, M., Richtman, R., Derossi, A. 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazil tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34(4), 281-286.
- COPLADE. 2014. Apuntes de Población de Baja California. Población de Baja California y sus municipios, (1), 2-7.
- Cruciani, M., Serpelloni, G. 2008. Management of *Candida* infections in the adult intensive care unit. *Informa healthcare*, 9(2), 175-191.
- Delgado, A.C.D., De Jesus, P.R., Aoki, F.H., Resende, M.R., Trabasso, P., Colombo, A.L., Oliveira, M.S.M., Mikami, Y., Moretti, M.L. 2009. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clinical Microbiology Infections*, 15(4), 364-371.
- Dick, J.D., Merz, W.G., Saral, R. 1980. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(1), 158-163.
- Diekema, D.J., Messer, S.A., Brueggemann, A.B., Coffman, S.L., Doern, G.V., Herwaldt, L.A., Pfaller, M.A. 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1298-1302.

- Due, A.K., Johansen, H.K., Gotzsche, P.C. 2006. Fungal infection-related mortality versus total mortality as an outcome in trials of antifungal agents. *Biomedical Research Methodology*, 6:40. doi: 10.1186/1471-2288-6-40.
- Edmond, M. B., Wallace, D. K., McClish, M. A., Pfaller, R., Wenzel, R.P. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 29(2), 239-244.
- Falagas, M.E., Roussos, N., Vardakasm, K.Z. 2010. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from patients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), 954-966.
- Felix, D.H., Wray, D. 1993. The prevalence of oral candidiasis in HIV-infected individuals and dental attenders in Edinburgh. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 22(9), 418–20.
- Fetter, A., Partisani, M., Koeing, H., Kremer, M., Lang, J.M. 1993. Asymptomatic *Candida albicans* carriage in HIV-infection: frequency and predisposing factors. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 23(), 57–59.
- Gadea, I., Cuenca, E.M., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J., Rodríguez, T.J.L. 2007. Procedimientos microbiológicos para el diagnóstico de las micosis y pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(5), 336-340.
- Garaizar, J., Brena, S., Bikandi, J., Rementeria, A., Pontón, J. 2006. Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the patogénesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 6(7), 987-998.
- Gasparin, A.B., Ferreira, F.V., Danesi, C.C., Mendoza-Sssi, R.A., Silveira, J., Martínez, B.A.M., Zhang, L., Juraci, A.C. 2009. Prevalence of oral lesions in persons with HIV and associated factors in a southern Brazilian city. *Cad. Saúde Pública*, 25(6),1307-1315.
- Giammanco, G.M., Pizzo, G., Pecorella, S., Distefano, S., Pecoraro, V., Milici, M.E. 2002. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiology Immunology*, 17(2), 89-94.
- Gómez, R.C., Pedroso, P.E. 2009. Study on the clinical and epidemiological characteristics of patients with human immunodeficiency virus at the walk-in service of the teaching hospital of the Federal University of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), 114-118.
- Gottfredsson, M., Cox, G.M., Indridanos, O.S., De Almeida, G.M.D., Heald, A.E., Perfect, J.R. 1999. Association of plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA and oropharyngeal *Candida* colonization. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(2), 534-537.

- Gugnani, H.C., Becker, K., Fegeler, W., Basu, S., Chattopadhyaya, D., Baveja, U., Satyanarayana, S., Kalghatgi, T., Murlidhar, A. 2003. Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. *Mycoses*, 46(8), 281–288.
- Guinea, J., Recio, S., Escribano, P. 2010. Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of Etest performed directly on blood samples from patients with fungemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2205–2012.
- Guitard, J., Angoulvant, A., LetscherBru, V. 2013. Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature. *Medical Mycology*, 51(8), 795-799.
- Gurtner, S., Selitsch, B., Rotter, M.L., Hirschl, A.M., Willinger, B. 2007. Development of Novel Real-Time PCR Assays for detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 906-914.
- Gutiérrez, J., Morales, P., Gonzáles, M.A., Quindós, G. 2002. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *Journal of Basic Microbiology*, 42(3),207-227.
- Hamza, O.J.M., Matee, M.I.N., Moshi, M.J., Simon, E.N.M., Mugusi, F., Mikx, F.H.M., Helderma, W.H.P., Rijs, A.J.M. van der Ven, A., Verweij, P.E. 2008. Species distribution and in Vitro antifungal susceptibility of oral yeasts isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BioMed Central Microbiology*, 8(6), 135-143.
- Hamilton, J.M.T. 1974. Non-emergence of polyene-resistant yeasts: an hypothesis. *Microbios*, 10(1), 91-95.
- Hamilton, J.N., Thompson, S.H., Scheidt, M.J., McQuade, M.J., Van Dyke, T., Plowman, K., 1992. Correlation of subclinical candidal colonization of the dorsal tongue surface with the Walter Reed staging scheme for patients infected with HIV-1. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology*, 73(1), 47-51.
- Hauman, C.H.J., Thompson, I.O.C., Theunissen, F., Wolfaardt, P. 1993. Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV-seropositive persons. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology*, 76(5), 570-572.
- Hazen, K.C. 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 462-478.
- Hernández, G.M.S. 2012. Infección por especies de *Candida no-albicans* y su resistencia a diversos antifúngicos. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 22 pp.

- Idemyor, V. 2003. Emerging opportunistic fungal infections: Where are we heading?. *Journal of the National Medical Association*, 95(12), 1211-1215.
- Kantheti, L.P., Reddy, B., Ravikumar, S., Anuradha, Ch., Chandrasekhar, P., Rajeswari, M.R. 2012. Isolation, identification, and carriage of candidal species in PHLAs and their correlation with immunological status in cases with and without HAART. *Journal of Oral Maxillofacial Pathology*, 16(1), 38-44.
- Kirkpatrick, W.R., Revankar, S.G., Mcatee, R.K. 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in America by primary CHROMagar Candida screening and susceptibility testing of isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(36), 3007-3012.
- Krcmery, V., Barnesz, A.J. 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, 50(4), 243-260.
- Kumar, G.C.P., Menon, T., Rajasekaran, S., Sekar, B., Prabu, D. 2008. Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. *Mycosis*, 52(1), 44-48.
- Kruppa Michael. 2008. Quorum Sensing and *Candida albicans*. *Mycosis*, 52(1), 1-10.
- Liguori, G.A., Lucariello, G., Colella, A., De Luca y Marinell, P. 2007. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *Journal of Clinical Pathology*, 60(9), 1035-1039.
- Liguori, G., Di Onofrio, V., Lucariello, A., Gallé, F., Signoriello, G., Colella, G., D'Amora, M., Rossano, F. 2008. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Molecular oral microbiology*, 24(1), 76-78.
- Liguori, G., F. Gallé, A. Lucariello, V. Di Onofrio, L. Albano, G. Mazzarella, M.D., Amora, F. 2010. Comparison between multiplex PCR and phenotypic systems for *Candida* spp. Identification. *New Microbiologica*, 33(1), 63-67.
- Loeffler, J., Stevens, D.A. 2003. Antifungal drug resistance. *Clinical Infection Diseases*, 36(1), 531-541.
- Luo, G., Samaranayake, L., Yau, J. 2001. *Candida* species exhibit differential in-vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2971-2974.
- Luque, A.G., Biasoli, M.S., Tosello, M.E., Binolfi, A., Lupo, S., Magaro, H.M. 2008 Oral yeast carriage in HIV-infected and non-infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses*, 52(1), 53-59.
- Maenza, J.R., Merz, W.G., Romagnoli, M.J., Keruly, J.C., Moore, R.D., Gallant, J.E. 1997. Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clinical Infection Diseases*, 24(1), 28-34.

- Maertens, J. 2004. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infections*, 10(1), 1-10.
- Margiotta, V., Campisi, G., Mancuso, S., Accurso, V., Abbadessa, V. 1999. HIV infection: oral lesions, CD4+cell count and viral load in an Italian study population. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 28(4)173-177.
- Margiotta, V., Campisi, G., Mancuso, S. 2000. Plasma HIV-1 RNA and route of transmission in oral candidiasis and oral hairy leukoplakia. *Oral Diseases*, 6(3), 194-195.
- Martins, M.D., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. 1997. Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clinical Infection Diseases*, 25(1), 843-846.
- Martins, M.D., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. 1998. Declining rates of oropharyngeal candidiasis and carriage of *Candida albicans* associated with trends toward reduced rates of carriage of fluconazole resistant *C. albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clinical Infection Diseases*, 27(1), 1291-1294.
- Martínez, E.J., Eslava, G.M., Gaitán, C.R., López, C.F., Gómez, P.Z., Cabuto, L.J., Arenas, R. 2008. Candidiasis cutánea: utilidad del CHROMagar *Candida* en la identificación de especies. *Dermatología Revista Mexicana*, 52(3),121-126.
- Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., Cornet, M. 2014. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. *Intensive Care Medicine*, 40(9), 1241-1255.
- McCullough, M.J., Ross, B.C., Reade, P.C., *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Bucal Maxillofacial Surgery*, 25(2), 136-144.
- Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., Yamaguchi, H. 2006. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Japan Journal of Medical Mycology*, 47(3). 225-229.
- Moris, D.V., Melhelm, S.C., Martins, M.A., Mendes, R.P. 2008. Oral *Candida* spp Colonization in human immunodeficiency virus infected individuals. *Journal Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 14(2), 224-257.
- Muller, G.M. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1-5.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual. 2003.

- Nucci, M., Marr, K. 2005. Emerging Fungal diseases. *Emerging Infectious Disease Journal*, 41(4), 521-526.
- Odds, F.C., Bernaerts, R. 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for preservative identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1923-1929.
- Ohmit, S.E., Sobel, J.D., Schuman, P., Duerr, A., Mayer, K., Rompalo, A., Klein, R.S. 2003. Longitudinal study of mucosal *Candida* species colonization and Candidiasis among Human Immunodeficiency Virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(1), 118-127.
- O'Sullivan, J.M., Jenkinson, H.F., Cannon, R.D. 2000. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology*, 146(1), 41-48.
- Overman, P.R. 2000. Biofilm: A new view of plaque. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 3(1), 18-29.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 8(25), 78-82.
- Patton, L.L., McKaig, R.G., Eron, J.J., Jr, Lawrence, H.P., Strauss, R.P. 1999. Oral hairy leukoplakia and oral candidiasis as predictors of HIV viral load. *AIDS*, 13(15), 2174-2176.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Colombo, A.L. 2006. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3578-3582. doi:10.1128/JCM.00863-06
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J. 2007. Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133-163.
- Pinner, R.W., Teutsch, S.M., Simonsen, L. 1996. Trends in infectious disease mortality in the United States. *JAMA*. 281(1), 61-66.
- Pichova, I., Pavlickova, L., Dostal, J., Dolejsi, E., Hruskova, O., Weber, J. 2001. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *European Journal of Biochemistry*, 268(9), 2669-2677.
- Ramírez, A.M., Espinosa, E., González, R.D., Anaya, S.G., Ormsby, C.E., Reyes, T. 2009. Identification of oral candidosis, hairy leukoplakia and recurrent oral ulcers as distinct cases of immune reconstitution inflammatory syndrome. *International Journal of STD & AIDS*, 20(4), 259-261.

- Repentigny, L., Lewandowski, D., Jolicoeur, P. 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in Human Immunodeficiency Virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 729-759.
- Richardson, M.D., Warnock, D.W. 2003. *Fungal infection: Diagnosis and management*. (3rd ed.) Oxford Blackwell Publishing. United Kingdom.
- Richardson, M. and Rautema, R. 2009. How the host fights against *Candida* infections. *Frontiers in Bioscience*, 1(14), 245-253.
- Rueping, M.J., Vehreschild, J.J., Cornely, O.A. 2009. Invasiva candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(6), 735-748.
- Samaranayake, L.P., MacFarlane, T.W., Lamey, P.J., Ferguson, M.M. 1986. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *Journal of Oral Pathology*, 15(7), 386-388.
- Sanabria, R., Samudio, M.I., Fariña, N., Laspina, F., Ortellado, C., Arbizu, L., Laconich, R. 2006. Identificación de especies de *Candida* aisladas de pacientes ambulatorios, hospitalizados, e inmunocomprometidos en Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 4(2), 33-40.
- Sánchez, V.L., Ortiz, L.N., Villar, M., Moragues, M.D., Aguirre, J.M., Cashat, C.M., Lopez, R.J., Gaitán, C.L., Quindós, G. 2005. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(2), 83-92.
- Sanglard, D., Odds, F.C. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(2), 73-85.
- Sandven, P. 2000. Epidemiology of Candidemia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(1), 73-81
- Schoofs, A., Odds, F.C., Colebunders, R., Ieven, M., Goosens, H. 1998. Cross-sectional study of oral *Candida* carriage in a human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive population: predisposing factors, epidemiology and antifungal susceptibility. *Mycoses*, 41(5), 203-211.
- Senet, J.M. 1997. Risk Factors and physiopathology of candidiasis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14(1), 6-13.
- Shiboski, C.H., Hilton, J.F., Neuhaus, J.M., Canchola, A., Greenspan, D. 1996 Human immunodeficiency virus-related oral manifestations and gender, a longitudinal analysis. *Archives of Internal Medicine*, 156(19), 2249-2254.

- Silva, S., Negri, M., Henriques, M. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305
- Sullivan, D.J., Westernberg, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E., Coleman, D.C. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. *Microbiology*, 41(7), 1507–1521.
- Torres, S.R., Garzino D.A., Meiller, T.F., Meeks, V., Jabra, R.M. 2008. Salivary histatin-5 and oral fungal colonization in HIV+ individuals. *Mycoses*. 52(1), 11-15.
- Trost, A., Graf, B., Eucker, J., Sezer, O., Possinger, K., Gobel, U.B., Adam, T. 2004. Identification of Clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 201-211.
- Trtkova, J., Raclavsky, V. 2006. Molecular Genetic Approaches to identification and Typing of Pathogenic *Candida* Yeasts. *Biomedical Papers Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 150(1), 51-61.
- Wahyuningsih, R., Freisleben, H.J., Sonntag, H.G., Schnitzler, P. 2000. Simple and Rapid Detection of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3016-3021.
- Werneck, S.A., Bedin, P.L. 2009. Role of upper endoscopy in diagnosing opportunistic infections in human immunodeficiency virus-infected patients. *World Journal of Gastroenterology*, 15(9), 1050-1056.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallen, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 309-317.
- Zaragoza, R., Pemán, J., Salavert, M., Viudes, A., Solé, A., Jarque, I., Monte, E., Romá, E., Cantón, E. 2008. Multidisciplinary approach to the treatment of invasive fungal infections in adult patients. Prophylaxis, empirical, preemptive or targeted therapy, which is the best in the different hosts?. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(6), 1261-1280.
- Zhang, X., Reichart, P.A., Song, Y. 2009. Oral manifestations of HIV/AIDS in China: a review. *Oral Maxillofacial Surgery*, 13(2), 63–68.