

Identificación y susceptibilidad a antifúngicos de levaduras aisladas de lesiones orales en personas con VIH.

Lic. Aileen Leal Flores. MSc.

Lic. Tecnología de la Salud. Perfil Microbiología. Master en Bacteriología-Micología.

Profesor Instructor.

Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río

Comunicación: aileenlf@princesa.pri.sld.cu

PREMIO PROVINCIAL CONCURSO “MEJOR TESIS EN SALUD” CATEGORÍA TESIS DE MAESTRÍA

Introducción

El aumento de la incidencia y la gravedad de las micosis están relacionados con la aparición de enfermedades debilitantes, como el sida, reportándose con frecuencia la candidiasis oral. En Cuba no se disponen de estudios recientes que permitan conocer los principales agentes etiológicos causantes de lesiones orales en personas VIH-positivas y casos sida, así como los patrones de susceptibilidad a los antifúngicos disponibles, por lo que se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal, durante los meses de septiembre de 2011 a febrero de 2012, en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, con el objetivo de aportar datos que contribuyan al tratamiento de pacientes con cuadros a repetición y episodios refractarios. Se identificaron las especies de levaduras productoras de lesiones orales, a través de métodos convencionales y moleculares, y se obtuvieron los patrones de susceptibilidad *in vitro* a 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol. Se colectaron 62 muestras, lográndose 50 aislamientos pertenecientes a tres géneros, siendo el más representativo *Candida* con un 96%. Las especies identificadas fueron *C. albicans* (84%), *C. kefyr* (6%), *C. tropicalis* y *C. glabrata* (2%). EL método molecular de la PCR múltiple tuvo una sensibilidad del 97,7% y una especificidad del 100%. Para *C. albicans* dos aislados mostraron sensibilidad dosis dependiente a fluconazol y uno resistencia a 5-fluorocitosina. Se obtuvo susceptibilidad *in vitro* de todos los aislamientos, a itraconazol y voriconazol, siendo los primeros reportes en el país. El examen directo tiene gran valor para

descartar fallos en el diagnóstico presuntivo de candidiasis oral. Se demostró la efectividad de la terapéutica antifúngica y la utilidad de la PCR múltiple.

DeCS: MICOSIS/microbiología; MUCOSA BUCAL; VIH.

Introducción

En las últimas décadas las infecciones fúngicas son consideradas un problema creciente y de preocupación mundial. El aumento de la incidencia y la gravedad de las micosis están relacionados con la aparición de enfermedades debilitantes, como el sida, entre otras (1). Se ha producido un aumento de casi todas las formas de presentación de la candidiasis, aunque hay tres que destacan por su magnitud e importancia (2):

- La sistémica o diseminada es sin duda la forma más grave debido a sus elevadas tasas de morbilidad, que pueden llegar hasta el 71% en enfermos inmunodeficientes, *Candida* es el tercer o cuarto patógeno aislado del torrente sanguíneo y explica el 5 al 15% de las infecciones nosocomiales (3).
- La candidiasis vulvovaginal afecta al 75% de las mujeres con al menos un episodio durante su vida, y hasta el 5% de los casos se vuelve crónica (4).
- La candidiasis oral, infección oportunista que indica la progresión a sida y ha sido definida como la “enfermedad del paciente enfermo”. Comprende las manifestaciones clínicas ocasionadas por levaduras del género *Candida*, en especial, *C. albicans*, aunque se han descrito otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y más recientemente *C. dubliniensis* (1).

En los pacientes inmunocomprometidos su implicación patológica está vinculada al deterioro de la inmunidad celular, convirtiéndola en un importante patógeno en personas que viven con VIH, y que poseen recuentos bajos de linfocitos T CD4+. En estos pacientes son frecuentes las recidivas así como los episodios refractarios a los tratamientos, lo que obliga a la administración de ciclos terapéuticos repetidos y en ocasiones a quimioprofilaxis prolongadas con antifúngicos. Circunstancias estas que han provocado la aparición del fenómeno de resistencia a algunos antifúngicos, suponiendo un reto al tratamiento de esta infección oportunista (1, 5).

Material y método:

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal, durante los meses de septiembre de 2011 a febrero de 2012, en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK). Teniendo como criterios de inclusión: pacientes de cualquier sexo, VIH-positivos o casos sida, que en el momento de la recogida de la muestra, presentaban sospecha clínica de candidiasis oral y que desearon participar en el estudio, firmando el consentimiento informado. Se utilizaron como controles para la identificación y la susceptibilidad a los antifúngicos ensayados las cepas provenientes de la Micoteca del Laboratorio Nacional de Referencia de Micología del IPK. *Candida albicans* LMIPK 0213, *Candida tropicalis* LMIPK 0286, *Candida glabrata* LMIPK 0287, *Candida guilliermondii* LMIPK 0104, *Candida krusei* LMIPK 0283, *Candida parapsilosis* LMIPK 0290, *Cryptococcus neoformans* LMIPK 0181. A los efectos de este estudio se utilizó como criterio de diagnóstico micológico, los expuestos por Higashide *et. al.* (1988) y Pomarico *et. al.* (2009), se consideraron como casos confirmados de candidiasis oral, aquellos que presentaron cultivos positivos con más de 10 colonias (4, 6).

Técnicas y procedimientos:

La muestra fue tomada por hisopado de las lesiones e inoculadas en los medios necesarios para el examen directo (1 mL de solución salina estéril) y en el medio de cultivo óptimo para este microorganismo. El examen directo se efectuó con una gota del sedimento de la centrifugación y una de blanco de calcoflúor y fue observado en microscopio de fluorescencia (2). Se obtuvieron los cultivos puros en cuantía suficiente para la realización de la identificación convencional, con métodos comerciales y moleculares. La identificación de las especies se realizó siguiendo el flujograma general de identificación establecido en el Laboratorio Nacional de Referencia de Micología del IPK (4).

Pruebas morfológicas:

Del cultivo previamente purificado se procedió al montaje de las pruebas de formación de tubos germinativos (Según la técnica descrita por McGinnis) y al estudio de filamentación en agar harina de maíz + Tween 80. (según técnica de Dalmau) (7).

Pruebas fisiológicas:

Fueron realizadas a todas aquellas cepas que no formaron tubo germinativo, ni clamidosporas, con el método comercial API 20C AUX (bioMérieux). Se procedió según lo estipulado en la ficha técnica referida por el fabricante (8).

Identificación molecular con PCR múltiple.

Se realizó utilizando una PCR múltiple a partir de los cultivos purificados, previa estandarización del método en nuestras condiciones. Para la extracción del ADN se siguió la metodología descrita por Leotta, *et. al.*, (2005), (9). Las muestras de ADN obtenidas se conservaron a -80°C hasta su utilización. La reacción de la PCR múltiple se realizó según la metodología descrita por Estrada Barraza, *et. al.*, (2011) (3).

Determinación de la susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos.

Se utilizó el ATB FUNGUS 3 (bioMérieux), se procedió según lo estipulado en la ficha técnica referida por el fabricante (10). El lote a utilizar fue validado en nuestras condiciones, siguiendo las recomendaciones de los expertos y los documentos normativos de la realización de los estudios de susceptibilidad *in vitro*, con las cepas de referencia *C. krusei* LMIPK 0283 y *C. parapsilosis* LMIPK 0290 para las que se obtuvieron los valores de CMI, de los antifúngicos ensayados, según lo establecido (11).

La información que se obtuvo se llevó a una base datos mediante la aplicación Microsoft Excel 2007 y fue procesada con el programa estadístico SPSS versión 16.

El protocolo de investigación fue previamente aprobado por el comité científico y de ética del IPK. Durante el proceso de toma de muestra fueron previamente informados los sujetos, para que de forma voluntaria se incluyeran en el estudio, firmando el consentimiento informado.

Los resultados obtenidos de esta investigación fueron informados a los médicos de asistencia y serán, publicados, previa revisión y autorización del Comité Científico y de ética del IPK, siempre bajo la supervisión del tutor y revisores del maestrante.

Resultados:

Se colectaron 62 muestras, obteniendo crecimiento en 48 (77,4%), de ellos 11 (17,7%) fueron negativos en el examen directo y con cultivo positivo. El

examen directo fue positivo en 44 (70,9%) de las muestras estudiadas y en siete (11,3%) no coincidieron los resultados obtenidos por este método con los del cultivo. En 7 muestras coincidió tanto el examen directo como el cultivo de forma negativa. Al validar el examen directo con el cultivo, el primero tuvo una sensibilidad del 77,08%.

Identificación convencional

Del total de aislamientos, se obtuvieron 42 *C. albicans*, (84%); tres *C. kefyr*, (6%); y una *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Candida* sp., respectivamente, además se identificó un aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae*, y otro de *Geotrichum penicillatum*, para un 2% respectivamente.

Identificación por PCR

El análisis del peso molecular de las bandas obtenidas en el gel de agarosa y su comparación según los patrones esperados, para cada especie, permitió la identificación de 42 *C. albicans* y una *C. glabrata*. A pesar de la existencia de iniciadores para *C. tropicalis* la PCR no la pudo identificar. Este resultado fue confirmado al repetir los estudios de identificación tanto por el método convencional como por el molecular. No fueron identificadas: *C. kefyr*, *G. penicillatum* y *S. cerevisiae*, para los cuales no existían iniciadores en la mezcla. Para la PCR, se obtuvieron valores de sensibilidad de 97, 73% y de especificidad del 100%.

Estudios de susceptibilidad

Frente a la 5-fluorocitosina (5FC), de los 42 aislamientos identificados como *C. albicans*, 41 resultaron sensibles y solo uno (2,3%) resultó resistente. Los aislados de *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida* sp., *G. penicillatum*, resultaron sensibles a dicho antifúngico, no siendo así con el *S. cerevisiae*, que mostró una susceptibilidad intermedia. El 100% de los aislamientos resultaron sensibles a la anfotericina B (AMB), a una concentración $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$. Frente a los triazoles, se inhibieron entre los rangos $\leq 0,125 - 0,5 \mu\text{g/mL}$ de las CMI del itraconazol (ITR) y entre $\leq 0,06 - 0,25 \mu\text{g/mL}$ del voriconazol (VRC). Para el fluconazol (FCA) los rangos de sus CMI que inhibieron la totalidad de los aislamientos variaron entre $\leq 1 - 32 \mu\text{g/mL}$. Los aislamientos de las especies de *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida* sp., *G. penicillatum* y *S. cerevisiae* resultaron sensibles, a los triazoles. *C. albicans* tuvo un comportamiento

ligeramente diferente frente al FCA, ya que 40 de sus aislamientos resultaron sensibles, pero dos de ellos resultaron sensible dosis dependiente (S-DD).

Discusión de los resultados

El diagnóstico de cualquiera de las formas clínicas de candidiasis oral es fundamentalmente clínico, y se basa en el reconocimiento de lesiones sugerentes. Sin embargo, no está exento de errores e incluso su efectividad puede variar con las formas clínicas. Es por eso que se recomienda, siempre que sea posible, su confirmación mediante la observación microscópica de *Candida* en las muestras orales y por su aislamiento en cultivo (12). Debido a que las especies de *Candida* pueden estar colonizando la mucosa de la cavidad oral hasta en un 50% de los individuos sanos, la positividad del cultivo, en ausencia de clínica compatible, no implica necesariamente que estemos en presencia de una candidiasis oral. La elevada sensibilidad de este método diagnóstico pudiera ser causa de resultados falsos positivos y es por eso que ha sido necesario establecer criterios que correlacionen con la infección (4, 13). Del total de casos confirmados 48 (77,4%), por criterio micológico, (4, 6), el 17,7% fueron negativos en el examen directo. La presencia de un cultivo positivo con examen directo negativo, demuestra uno de los principales inconvenientes del examen microscópico directo que es su baja sensibilidad, ya que el mismo requiere de un número significativo de elementos fúngicos para que puedan ser observados; por lo que un examen microscópico negativo no excluye nunca la infección. Sin embargo, siempre que se pueda es recomendable la realización del mismo, especialmente en aquellos casos en los que el paciente está recibiendo terapia antifúngica y en la muestra puede haber microorganismos no viables sólo detectados por microscopía y suficientemente característicos como para diagnosticar la etiología de una infección candidiásica (13). La presencia de elementos fúngicos no viables pudiera ser una explicación en los casos que se obtuvo un examen directo positivo con cultivo negativo. Otro elemento a considerar, es la irregular distribución de las levaduras en la cavidad oral que puede provocar falsos negativos del cultivo, al muestrear por hisopado, sin descartar la existencia de elementos tisulares u otros artefactos que pudieran confundir al observador, elemento que afecta la especificidad del examen directo (14). La observación

de hifas y pseudohifas entre las levaduras en el examen directo se asocia a infección por *Candida*. Sin embargo, su presencia no es patognomónica y es la invasión tisular por parte de las hifas, observada en preparaciones histológicas, el indicador más confiable de infección; si bien pocas veces está indicada la biopsia de estas lesiones con fines diagnósticos (4). Los resultados negativos por ambos métodos fueron interpretados como portadores de lesiones que no se correspondían con formas clínicas de candidiasis oral. Estos resultados, cuando la muestra es adecuada, tienen gran valor para descartar la candidiasis como etiología de las lesiones orales y sugieren un error en el diagnóstico clínico presuntivo (15).

Son escasos los trabajos publicados que validan la utilidad del examen directo y el cultivo para el diagnóstico de la candidiasis oral. Terai y Simahara (2009), en Japón, comentan esta dificultad. Al estudiar 40 pacientes con candidiasis oral reportan una positividad del 75% para el cultivo y del 57,5% para el examen directo. El porcentaje de positividad por ambos métodos fue de un 55% y en el 22,5% de los pacientes tanto el cultivo como el examen directo resultaron negativos (15).

Los resultados de esta investigación muestran que hasta en un 11% de los casos puede existir fallo en el diagnóstico clínico, y que el examen directo de conjunto con el cultivo pudiera contribuir a confirmar o descartar la etiología micótica de las lesiones. Esto evitaría por una parte, la administración innecesaria de fármacos costosos no exentos de efectos adversos y con riesgo de interacción con otras drogas pero sobre todo evitaría pérdida de tiempo en establecer un diagnóstico certero y adoptar las conductas terapéuticas específicas ante lesiones que en algunos casos son malignas (5).

Identificación convencional

El elevado predominio de *C. albicans* está reportado en la literatura, con cifras que pueden alcanzar hasta 96%.(16, 17), debido a que tiene atributos de virulencia que le permite la colonización del hospedero. Esta relación se ve afectada por su variabilidad antigénica, el cambio fenotípico y la transición dimórfica. Además de otros factores de virulencia que pueden potenciar su acción patogénica como su morfología celular, la actividad enzimática

extracelular y los factores de adhesión que favorecen la formación de biopelículas (1).

Son pocos los trabajos previos sobre aspectos microbiológicos de la candidiasis oral en pacientes con VIH, desarrollados en nuestro país. El más reciente fue el realizado por Martínez *et. al.* , (1997), con el objetivo de identificar las especies de *Candida* en pacientes con VIH. El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Micología del IPK, pero con una diferencia de 15 años. Estudiaron 25 muestras clínicas de las que aislaron 31 levaduras pertenecientes al género *Candida*, obteniendo un 54,1% de *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* y *C. glabrata* (8,1%), *C. kefyr*, (5,4%), y otras en porcentajes variables como *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. utilis* (16). Aunque la metodología utilizada en ambos trabajos no fue la misma es de destacar un marcado incremento (aproximadamente 30%) en la incidencia de *C. albicans*, como agente etiológico de los episodios de candidiasis oral en este grupo de estudio. La ausencia de estudios de vigilancia sistemáticos, concernientes a la etiología de la candidiasis oral en pacientes seropositivos y casos sida, durante tantos años en la institución, impide arribar a conclusiones precisas de cómo ocurren estas variaciones epidemiológicas y sus posibles causas y alertan sobre la necesidad de establecer una adecuada metodología para su ejecución. Se pudo corroborar además, la aparición de otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. kefyr*. Semejantes resultados reportó en Venezuela, Dolande *et. al.*, (2008) obtuvieron un 46,7% de *C. albicans*, mientras que el resto de especies del género representaron el 53,3% de los aislamientos, entre *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. kefyr* en cifras variables. Los resultados de ese estudio demuestran un incremento notable de las especies *no-albican* (17). Kliemann *et. al.*, en Brasil, (2008), identificaron las principales especies de *Candida* productoras de esofagitis, obteniendo que *C. albicans* fue la responsable de la mayoría de las infecciones con un 96,2%, seguida de *C. tropicalis* (2,5%), *C. lusitaniae* y *C. glabrata* (0,6%). Fueron excluidos del estudio 5 pacientes, uno de ellos por presentar *Saccharomyces cerevisiae*, hallazgo reportado en nuestro trabajo aunque en cifras muy bajas (18). Por otra parte en Francia, Enache, (2007) recopiló los resultados de 25 laboratorios de micología, coincide en ser *C. albicans* la más frecuente en

muestras orales con un 80,7%, seguida por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. kefyr*, en porcentajes variables; especies reportadas en nuestro estudio con cifras variables (19). En Tanzania, Hamza et. al., (2008) reportan una frecuencia de aislamiento predominantemente de *C. albicans* 84,5%, seguida de *C. glabrata* y *C. krusei* en porcentajes variables (20). Reportes de varios investigadores coinciden en hallazgos de otros géneros diferentes a *Candida* en la cavidad oral, aunque en porcentajes muy bajos, lo que corrobora que otro grupo de levaduras pueden ser los agentes causales de esta patología, no solo en personas VIH-positivas (3, 21).

Identificación por PCR

La PCR múltiple en evaluación fue la descrita por Estrada Barraza et. al., en México, (2011), quienes realizaron un estudio comparativo entre esta metodología y varios métodos de identificación convencional. La asimilación de carbohidratos por el método comercial ID 32C AUX, fue utilizada, en ese estudio, como prueba de oro. Los valores de sensibilidad y especificidad, de la PCR, fueron obtenidos según las especies, reflejando para *C. albicans* 100% de especificidad y 97, 8% de sensibilidad, ya que la PCR no identificó una de las *C. albicans* previamente identificadas por el método convencional. Para *C. tropicalis* se obtuvo un 100% de sensibilidad y un 95,3% de especificidad, ya que la PCR identificó tres aislamientos más que el método convencional y para *C. glabrata* se obtuvo un 100% tanto de sensibilidad como de especificidad. Entre los hallazgos micológicos, por métodos convencionales aislaron, además *C. kefyr*, *Geotrichum capitatum* y *Saccharomyces cerevisiae*, (1,3%), los que no fueron identificados por la PCR ya que no existían los juegos de iniciadores (3). Existe gran correlación al comparar nuestros resultados con lo reportado por estos autores, pues el mismo demostró ser altamente sensible y específico para *C. albicans* y *C. glabrata*; en la identificación de *C. tropicalis* obtuvimos un falso negativo, mientras que ellos reportan tres falsos positivos que atribuyen a que los iniciadores utilizados pueden flanquear en regiones similares intergénicas de otras especies (3). Sin embargo Luo y Mitchell utilizando estos mismos cebadores obtienen 100% de sensibilidad y especificidad al estudiar 35 aislamientos de *C. tropicalis* (22). Por su parte, Martins et. al., Portugal, (2010), identifican ocho especies pero utilizan dos PCR múltiples: una (grupo A) para

C. albicans, *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* y otra (grupo B) para *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* y *C. kefyr* además de una PCR simple para *C. tropicalis*. En todos los casos, los pares de cebadores son específicos para amplificar regiones del gen de la topoisomerasa II y en cuatro de las especies (*C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* y *C. krusei*) coinciden con los utilizados en nuestro estudio. La identificación por PCR mostró ser muy sensible y específica, identificando la totalidad de los aislamientos y detectando errores en la identificación presuntiva con el CHROMagarCandida. Solo tres aislamientos no pudieron ser identificados por la PCR al no disponer de los cebadores específicos para esas especies (14). El sistema de PCR múltiple evaluado en nuestro estudio tiene como ventaja que solo realiza una reacción de PCR lo cual lo hace más económico y rápido, sin embargo, tiene la desventaja de que no identifica *C. parapsilosis* que es una especie reportada frecuentemente como patógena.

En estudios publicados se ha evidenciado el uso de métodos moleculares para la identificación de especies de *Candida*, y otros patógenos, procedentes tanto de muestras clínicas como de aislamientos previamente identificados por métodos convencionales, confirmando que el PCR constituye una herramienta muy útil, con elevada sensibilidad y especificidad, tanto para la identificación de especie como para la determinación de la enfermedad, contribuyendo a la rapidez del diagnóstico, la implementación de un tratamiento personalizado así como la vigilancia epidemiológica de las especies, aunque no suele utilizarse aún, como rutina en el laboratorio, debido al elevado costo del equipamiento y la necesidad de personal muy bien entrenado, por lo que su utilización dependerá de la disponibilidad y el objetivo de cada laboratorio (3, 14, 22).

Estudios de susceptibilidad

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos tienen como objetivo fundamental, brindar información que contribuya a seleccionar las drogas más útiles y eficaces para el tratamiento de determinada afección micótica. Los mismos, deben estar integrados a los programas de control epidemiológico, y así, en función de los datos recopilados con estudios sistemáticos, favorecer la propuesta de esquemas terapéuticos. Para cumplir esos objetivos, es imprescindible que los resultados de los estudios de susceptibilidad *in vitro*

tengan una adecuada correspondencia con los resultados obtenidos *in vivo* (23). Se dispone de dos metodologías, el documento M27-A3 (CLSI) y el Dis 7.1 (EUCAST) validados y aceptados internacionalmente como los métodos de referencia (Regla de oro) para los estudios de susceptibilidad *in vitro* de levaduras, que muestran la mejor correspondencia entre sus resultados y los obtenidos de su aplicación en la práctica médica. Sin embargo, su complejidad, laboriosidad y alto costo hacen de ellos métodos poco prácticos para su uso rutinario en los laboratorios de Microbiología en instituciones asistenciales. Es por eso que, el desarrollo de métodos comerciales de sencilla y rápida ejecución, que correlacionan bien con los métodos de referencia, es de gran utilidad y tienen gran aceptación en los laboratorios diagnósticos (23).

Se realizó el estudio de susceptibilidad a los 50 aislamientos obtenidos. Solo se realizó el análisis de los resultados obtenidos para *C. albicans*, por ser la única especie con un número de aislamientos representativo (n=42). El 2,3% de resistencia encontrado en este estudio, es ligeramente inferior al reportado por Fernández *et al.*, (2000), en el IPK, estudiaron 50 aislamientos de *C. albicans* según el micrométodo estandarizado por el CLSI y encontraron un 8% de cepas resistentes (24). A su vez discrepan considerablemente de lo obtenido por Halley *et al.*, (1997) Cuba, quienes utilizando el sistema ATB Fungus reportaron 39,1% de cepas resistentes, 8,7% de cepas con sensibilidad intermedia y 52,2% de cepas sensibles (25). Generalmente se acepta que la resistencia intrínseca a la 5-fluorocitosina es relativamente frecuente en *C. albicans* pudiendo alcanzar hasta un 10% de los aislamientos y que hasta el 30% de esa especie puede desarrollar resistencia secundaria durante el tratamiento con esa droga (26). Para *G. penicillatum* y *S. cerevisiae* el análisis se realizó utilizando los criterios de sensibilidad y resistencia que se proponen por el CLSI para las especies de *Candida* pues no se disponen de puntos de corte establecidos para interpretar el comportamiento de la susceptibilidad de esas especies frente a los antifúngicos (11). El 100% de los aislamientos resultaron sensibles a la AMB, a una concentración $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$. Algunos estudios han confirmado la efectividad *in vitro* de la AMB como el realizado por Fernández *et al.*, (2007), en Cuba, quienes estudiaron la susceptibilidad de diferentes especies del género *Candida*, y reportaron valores de CMI₉₀ para

este polieno de 0,25 µg/mL, similares a los de este trabajo (0,5 µg/mL), y un aislamiento de *C. krusei* como resistente (CMI ≥ 2 µg/mL) (27). Resultados similares obtuvieron Nweze y Ogdonnaya, en el 2011 en Nigeria utilizando el método de microdilución M27-A3 del CLSI al estudiar 120 aislamientos obtenidos de hemocultivos (28). Los estudiosos en la temática afirman que son escasas las especies con resistencia intrínseca a este antifúngico, y solo excepcionalmente se desarrolla resistencia secundaria (29).

Al analizar la susceptibilidad a los triazoles, se destaca que la totalidad de los aislamientos, se inhibieron entre los rangos $\leq 0,125$ - 0,5 µg/mL de las CMI del itraconazol y entre $\leq 0,06$ - 0,25 µg/mL del voriconazol. Para el fluconazol los rangos de sus CMI que inhibieron la totalidad de los aislamientos variaron entre ≤ 1 - 32 µg/mL. Los aislamientos pertenecientes a las especies de *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Candida sp.*, *G. penicillatum* y *S. cerevisiae* resultaron sensibles, a los triazoles. *C. albicans* tuvo un comportamiento ligeramente diferente para el FCA, ya que 40 de sus aislamientos resultaron sensibles, pero dos de ellos resultaron sensible dosis dependiente (S-DD). Para *G. penicillatum* y *S. cerevisiae* el análisis se realizó utilizando los criterios de sensibilidad y resistencia que se proponen por el CLSI para las especies de *Candida* pues no se disponen de puntos de corte establecidos para interpretar el comportamiento de la susceptibilidad de esas especies frente a los antifúngicos (11). Nuestros resultados concuerdan con Fernández *et. al.*, (2007), en Cuba, quienes utilizaron el micrométodo de dilución, según protocolo M27-A2 del CLSI, encontraron que el 95,4% de los aislamientos de *C. albicans* resultaron sensibles al FCA, 4 resultaron S-DD para un 3% y 2 resultaron resistente (1,5%) (27). Se obtuvieron valores de sensibilidad y resistencia similares a los reportados por Dolande *et. al.*, en Caracas, Venezuela, (2008) quienes reportaron que para *C. albicans* solo el 1,1% fue resistente y el 6,3% S-DD frente al fluconazol, el 0,97% resistente y el 1,5% S-DD frente a Itraconazol y 100% fueron sensibles al voriconazol (17).

En Cuba el tratamiento de la candidiasis oral en los pacientes seropositivos al VIH y casos sida sigue las recomendaciones de las guías de tratamiento internacionales (30, 31). En nuestro estudio se confirmaron los hallazgos de estudios previos, para el fluconazol y la anfotericina B, en cuanto a que la

resistencia y susceptibilidad dependiente de la dosis de los aislamientos es muy baja. Según la bibliografía consultada, estos resultados son los primeros reportes, en el país, de susceptibilidad *in vitro* de aislamientos orales de *Candida*, frente al ITR y el VRC, la primera es otra de las drogas recomendadas como segunda línea en el tratamiento y la segunda no ha sido incluida aun en los esquemas de tratamiento recomendados para esta afección.

Conclusiones

El examen directo es un método confiable para descartar fallos en el diagnóstico clínico presuntivo de candidiasis oral y de gran utilidad cuando los pacientes no responden al tratamiento empírico y no hay posibilidades de realizar un cultivo simultáneo. El marcado incremento de *C. albicans* como principal agente etiológico de la candidiasis oral, al comparar los resultados con los de trabajos previos, confirma la necesidad de realizar estudios sistemáticos que permitan detectar estas variaciones epidemiológicas. Los elevados valores de sensibilidad y especificidad de la PCR, evaluada en nuestras condiciones, la ratifican como un procedimiento confiable y de gran utilidad cuando es imprescindible una rápida identificación de las principales especies de *Candida*. Los bajos porcentajes de resistencia, en particular de *C. albicans*, confirman la utilidad del fluconazol, itraconazol y la anfotericina B como medicamentos de elección para el tratamiento de la candidiasis oral en el IPK.

Recomendaciones

Realizar examen directo y cultivo en los pacientes con diagnóstico presuntivo de candidiasis, que no responden a los tratamientos empíricos, para descartar posibles errores en el diagnóstico clínico. Establecer una vigilancia, mediante estudios similares, que permita detectar variaciones epidemiológicas en la etiología y susceptibilidad a los antifúngicos de los aislamientos obtenidos de episodios de candidiasis oral en personas con VIH, en el IPK. Validar la utilidad de la PCR Múltiple para la identificación de especies de *Candida* a partir de muestras clínicas. Realizar estudios de susceptibilidad *in vitro* de estos aislamientos frente a los antifúngicos utilizados en el tratamiento tópico, en particular nistatina y clotrimazol.

Referencias Bibliográficas

1. Lobaina Rodríguez T, Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Zayas Ruíz Y, Rodríguez Rodríguez A. Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado Rev Cubana Med Trop. 2010;62(1):48-57.
2. Gómez J, García Vázquez E, Hernández A, Espinosa C, Ruiz J. Candidemias nosocomiales: nuevos retos de un problema emergente Servicios MI-Infecciosas y Microbiología. 2010;23(4):158-68.
3. Estrada Barraza D, Dávalos Martínez A, Flores Padilla L, Mendoza De Elias R, Sánchez Vargasa LO. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar *Candida* y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. Rev Iberoam Micol. 2011;28(1):36-42.
4. Aguilar Díaz Y. Etiología, susceptibilidad in vitro y factores predisponentes asociados a la candidiasis vulvovaginal [maestría]. La Habana, Cuba; 2012.
5. Fidel Jr PL. *Candida*-Host Interactions in HIV Disease: Implications for Oropharyngeal Candidiasis. Adv Dent Res. 2011;23(1):45-9.
6. Pomarico L, Ferraz D, Soares RM, Pomarico I, Barbosa GF, Socransky S. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV-infected children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108:203-10.
7. McGinnis MR. Laboratory Handbook of medical Mycology. Academy Press INC. New York; 1980.
8. Manual de técnica y procedimiento de api 20 C AUX (2007).
9. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, et al. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Revista Argentina de Microbiología. 2005;37:1-10.
10. Manual de técnica y procedimiento de ATB TM Fungus 3. 2008
11. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard 3rd. M27-A3 ed.: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne; 2008.

12. Giannini PJ, K. S. Diagnosis and Management of Oral Candidiasis *Otolaryngol Clin N Am*. 2011;44:231-40.
13. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García Rodríguez J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(1).
14. Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Goncalves V, Seabra A, et al. Oral Candida carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(3):119-24.
15. Terai H, Shimahara M. Usefulness of culture test and direct examination for the diagnosis of oral atrophic candidiasis. *International Journal of Dermatology*. 2009;48:371-3.
16. Martinez Machin G, Perurena Lancha M, Nuñez Carvajal J, Fernandez Andreu CM, Bandera Tirado F. Aislamiento, identificación y tipificación de levaduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. *Rev Cubana Med Trop*. 1997;49(3):174-80.
17. Dolande Franco ME, Reviákina V, Panizo MM, Macero C, Moreno X, Calvo A, et al. Distribución y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de Candida en seis centros de salud del área metropolitana de Caracas, Venezuela (años 2003-2005). *Rev Iberoam Micol*. 2008;25:17-21.
18. Kliemann DA, Comarú Pasqualotto A, Falavigna M, Giaretta T, Carlos Severo LC. Candida esophagitis: species distribution and risk factors for infection. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2008 septiembre/octubre;50(5).
19. Enache Angoulvant A. Reglas de interpretación de las infecciones por Candida *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2007 octubre-diciembre:587-93.
20. Hamza O, Matee M, Moshi M, Simon E, Ferdinand Mugusi F, Mikx F, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC Microbiology*. 2008;8:135.

21. Alfonso C, López M, Arechavala A, Perrone MC, Guelfand L, Bianchi M. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de BrillianceCandidaAgar. *Rev Iberoam Micol.* 2010 marzo;27(2):90-3.
22. Luo G, Mitchell TC. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2860-5.
23. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter.* 2010;23(4):169-76.
24. Fernández CM, Lemus D, Martínez G. Sensibilidad de aislamientos clínicos de *Candida albicans* frente a la 5-fluorocitosina. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52:191-6.
25. Halley MC, Hart M, Martínez ML, Valdivia I, Fernández C, Espinosa F. Estudio de la sensibilidad in vitro de hongos levaduriformes frente a diversos antifúngicos. *Rev Esp Quimioter.* 1997;10:328-33.
26. Espinel Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:101-6.
27. Fernández Andreu CM, Martínez Machín G, Illnait Zaragozí MT, Perurena Lancha MR, Águila Sánchez A, Brito Galloso M. Sensibilidad in vitro de cepas de *Candida* frente a fluconazol y anfotericina B. *Rev Cubana Med Trop.* 2007;59(2).
28. Nweze EI, Ogdonnaya UL. Oral *Candida* isolates among HIV-infected subjects in Nigeria. *J Microbiol Immunol Infect.* 2011;44:172-7.
29. González GM, Elizond M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2902-5.
30. Ortega González LM, Pérez Avila LP. Pautas para el manejo de la infección por VIH/sida. Instituto de Medicina Tropical " Pedro Kourí". La Habana; 2007.
31. Ruhnke M, Rickerts V, Cornely OA, Buchheidt D, Glöckner A, Heinz W, et al. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint

recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* 2011;54:279-310.