

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA

**FACTORES DETERMINANTES DE LA COLONIZACIÓN E
INFECCIÓN POR ESPECIES DE *CANDIDA* RESISTENTES
AL FLUCONAZOL EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR
EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**



TESIS DOCTORAL

**PRESENTADA POR:
MARÍA DEL MAR MASIÁ CANUTO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JAIME MERINO SÁNCHEZ
DR. D. FÉLIX GUTIÉRREZ RODERO**

ALICANTE-1998

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

1. Nociones sobre la estructura y morfología de los hongos

2. Principales grupos de micosis humanas

3. Aspectos generales de las infecciones por *Candida*

3.1 Candidiasis orofaríngea

3.1.1 Factores predisponentes para la infección orofaríngea por *Candida*

3.1.2 Variantes clínicas de la candidiasis orofaríngea en enfermos con infección por el VIH

3.1.3 Patogénesis de la candidiasis orofaríngea

4. Epidemiología de las infecciones fúngicas

4.1 Epidemiología de la candidiasis orofaríngea en los enfermos con infección por el VIH

5. Tratamiento de la candidiasis orofaríngea en los enfermos con infección por el VIH

6. Resistencia a los antifúngicos

6.1 Candidiasis resistente al fluconazol en los enfermos inmunodeprimidos

6.2 Candidiasis resistente al fluconazol en los enfermos con infección por el VIH

II. FUNDAMENTO

III. OBJETIVOS

IV. PACIENTES Y MÉTODOS

1. Población estudiada

2. Diseño

3. Ambito

4. Procedimiento

4.1 Recogida de datos

4.2 Variables

4.2.1 Variables predictoras de los factores determinantes de la colonización e infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol.

4.2.2 Variable respuesta

4.3 Estimación de la prevalencia de colonización e infección orofaríngea por las diferentes especies de *Candida* y sus patrones de sensibilidad a los antifúngicos

4.4 Procedimientos de laboratorio

5. Definiciones

6. Análisis estadístico

V. RESULTADOS

1. Características de los pacientes

1.1 Características generales de los pacientes

1.2 Tratamiento antifúngico

1.3 Colonización e infección por *Candida* sp.

2. Estudios microbiológicos

2.1 Recuento de colonias

2.2 Distribución de los aislamientos

2.3 Sensibilidad al fluconazol

3. Factores asociados con la colonización e infección por levaduras diferentes de *Candida albicans*

4. Factores asociados con la colonización e infección por especies de *Candida* resistentes al fluconazol

4.1 Características clínicas de los enfermos

4.2 Consumo de fármacos

4.3 Exposición a antifúngicos

5. Factores determinantes de la colonización e infección por levaduras resistentes

VI. DISCUSION

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA



I. INTRODUCCIÓN

- 1. Nociones sobre la estructura y morfología de los hongos.**

- 2. Principales grupos de micosis humanas.**

- 3. Aspectos generales de las infecciones por *Candida***
 - 3.1 Candidiasis orofaríngea
 - 3.2 Factores predisponentes para la infección orofaríngea por *Candida*
 - 3.1.1 Variantes clínicas de la candidiasis orofaríngea en enfermos con infección por el VIH.
 - 3.1.2 Patogénesis de la candidiasis orofaríngea.

- 4. Epidemiología de las infecciones fúngicas**
 - 4.1 Epidemiología de la candidiasis orofaríngea en los enfermos con infección por el VIH.

- 5. Tratamiento de la candidiasis orofaríngea en los enfermos con infección por el VIH.**

- 6. Resistencia a los antifúngicos.**
 - 6.1 Candidiasis resistente al fluconazol en los enfermos inmunodeprimidos
 - 6.2 Candidiasis resistente al fluconazol en los enfermos con infección por el VIH.

1. NOCIONES SOBRE LA ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos de estructura eucariótica que dependen de fuentes externas de carbono orgánico para producir sus elementos estructurales. Pueden vivir sobre materia muerta o como parásitos de otros organismos. Se cultivan con relativa facilidad en medios de cultivo artificiales y, en comparación con las bacterias, tienen en general requerimientos nutritivos muy simples.

Por su complejidad estructural las células fúngicas son semejantes a las células animales y vegetales (Dixon DM *et al.*, 1991). Ultraestructuralmente poseen un verdadero núcleo con varios cromosomas rodeados por una membrana nuclear. El citoplasma está rodeado por una membrana celular que, a diferencia de las células procariotas, contiene esteroides. La pared celular se compone de polisacáridos cristalinos (celulosa, quitina) y amorfos (mananos, glucanos), con frecuencia asociados a proteínas que actúan como sustancias de cemento y constituyen los grupos inmunodeterminantes de la pared fúngica. Los polisacáridos cristalinos insolubles constituyen el esqueleto parietal y son responsables de la rigidez y morfología de la pared. La presencia de quitina es suficientemente constante para ser considerada un componente característico de la pared fúngica, mientras que la celulosa sólo está presente en algunos grupos de hongos inferiores.

Los hongos son muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico (Dixon DM *et al.*, 1991). Algunos crecen como células aisladas (levaduras) y otros como filamentos multinucleares (hongos filamentosos o moho). Algunos hongos patógenos para el hombre son dimórficos, es decir, pueden crecer como levaduras (generalmente forma parasitaria) o como mohos (forma vegetativa).

Las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen por gemación o fisión. Poseen morfología esférica o elíptica y miden de 3 a 10 micras de longitud. Durante la gemación, el núcleo de la célula madre se divide y un núcleo hijo pasa a la nueva célula. La unidad estructural de los hongos filamentosos son las hifas. Estas poseen un diámetro de 3-12 micras y pueden tener varios centímetros de longitud. Las hifas crecen por elongación de su extremo distal (polo apical) y de las porciones viejas de la misma emergen ramificaciones laterales. Un conjunto de hifas entrelazadas e interconexionadas constituyen el micelio, el cual se hace macroscópicamente visible como una colonia fúngica.

2. PRINCIPALES GRUPOS DE MICOSIS HUMANAS

Los hongos son microorganismos muy ubicuos; se encuentran diseminados en el suelo, aire, agua y seres vivos, sobre todo en los vegetales. Sin embargo, sólo unas 175 especies, de las más de 500.000 clasificadas hasta la fecha, son capaces de producir enfermedades en el hombre (Ausina V, 1988). Además de sobrevivir y crecer a la temperatura del cuerpo humano, los hongos que producen enfermedad en el hombre deben vencer los mecanismos de defensa del huésped y esto se da en muy pocas ocasiones.

Desde un punto de vista práctico, los hongos que actúan como agentes etiológicos de las micosis pueden incluirse dentro de dos grupos (Meddof G *et al.*, 1980): a) hongos llamados primariamente patógenos como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* o *Blastomyces dermatitidis*, y b) hongos oportunistas o secundariamente patógenos, como *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Mucoraceae* o *Cryptococcus neoformans*. Los primeros han sido reconocidos desde hace muchos años como causa de infección en la población general, mientras que los hongos oportunistas son los que afectan a los pacientes con los mecanismos de defensa alterados por diversas causas. Además, *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* y *Cryptococcus* muestran una distribución universal

(especies □cosmopolitas□), en contraste con muchos de los hongos primariamente patógenos como *Histoplasma*, *Coccidioides* y *Blastomyces* que se hallan confinados a ciertas áreas geográficas (□regionales□), por lo que sólo provocan infecciones en dichas zonas.

Las infecciones fúngicas también pueden clasificarse según el territorio donde asienta la enfermedad. De manera muy esquemática se dividen en superficiales y profundas, según que afecten a la piel y/o anexos, o bien que la infección se produzca más allá del epitelio (Dixon DM *et al.*, 1991, Ausina V,1988). Sin embargo, teniendo en cuenta que existen muchos procesos intermedios o de difícil catalogación, también se han dividido, de acuerdo con la zona afectada y la reacción que la infección puede ocasionar en el huésped, en los siguientes grupos (Torres-Rodríguez JM *et al.*, 1979): a) superficiales (capa córnea de la piel o cabellos sin reacción inflamatoria acompañante), b) cutáneas (zona queratinizada de la piel y anexos con reacción de los tejidos afectados); c) subcutáneas (tejido subcutáneo y/o submucoso con participación linfática), y d) sistémicas (órganos, aparatos o sistemas, en ocasiones de forma extensa, múltiple y diseminada).

3. ASPECTOS GENERALES DE LAS INFECCIONES POR *CANDIDA*

La levadura *Candida* sp. representa la causa más frecuente de infección fúngica en los pacientes inmunocomprometidos (DeGregorio *et al.*, 1982). Existen más de 100 especies diferentes, pero sólo unas pocas se consideran patógenos importantes para el hombre. *Candida albicans* es la especie más virulenta, y constituye el agente principal en las infecciones micóticas humanas. Otras especies como *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae* y *C. guilliermondi* pueden también ser responsables de procesos infecciosos en enfermos inmunocomprometidos (Meunier F, 1988). *C. tropicalis* se considera la más invasiva entre estas últimas y parece tener una especial predilección por los enfermos neutropénicos, sobre todo los afectados de leucemia aguda (Wingard JR *et al.*, 1979). *C. parapsilosis* se aísla casi siempre en los que reciben nutrición parenteral y provoca infecciones invasivas con menos frecuencia (Herrero JA *et al.*, 1992). En general, *Candida albicans* y *C. tropicalis* son las especies que más se asocian con

candidiasis invasiva post-funguemia. Por el contrario, la funguemia por otras especies de levaduras se asocia con escasa frecuencia con enfermedad invasiva (Hawkins C *et al.*, 1984).

La identificación de *C. albicans* puede hacerse de una forma relativamente simple y rápida mediante el test de filamentación de Reynolds-Braude (Reynolds *et al.*, 1956): se incuba el microorganismo con suero, y en aproximadamente 90 minutos se observa la formación de un corto micelio característico. La identificación del resto de las especies exige la práctica de diversas pruebas bioquímicas, especialmente el estudio de su capacidad de asimilación de diversas fuentes de hidratos de carbono (auxonograma).

Los dos tipos de infección que produce *Candida* en los enfermos inmunocomprometidos son la superficial o mucocutánea y la sistémica (Hawkins C *et al.*, 1984). La primera es la más común, y se limita a la superficie de la piel, orofaringe, tracto gastrointestinal y tracto respiratorio superior e inferior (Luna MA *et al.*, 1993). La candidiasis sistémica o invasiva puede afectar a cualquier órgano, entre ellos el corazón, riñones, hígado, bazo, pulmón y cerebro. Los enfermos suelen tener en su mayoría alguno de los siguientes factores de riesgo (Maksymiuk *et al.*, 1984, Luna MA *et al.*, 1993): a) neoplasias hematológicas, b) neoplasias sólidas u otras enfermedades que requieran de tratamiento inmunosupresor, como los trasplantes de órganos, c) infección por el VIH, y d) intervenciones quirúrgicas recientes (postoperatorio).

3.1 CANDIDASIS OROFARÍNGEA

Candida es un microorganismo comensal del tracto gastrointestinal. La orofaringe es la localización que con mayor frecuencia está colonizada por especies de *Candida*, fundamentalmente la superficie dorsal de la lengua, seguida del paladar y la mucosa bucal (Stone HH *et al.*, 1976). La frecuencia media de colonización por *Candida* en la población sana es de un 50% aproximadamente (Arendorf TM *et al.*, 1980). *C. albicans* es la especie que se aísla con más frecuencia (Odds FC *et al.*, 1988) aunque también se han descrito otras especies,

como *Torulopsis glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, etc (Wilkinson C *et al.*, 1991). La progresión de colonización, es decir, el aislamiento de levaduras sin que se observen lesiones orofaríngeas, a infección, está determinada por factores endógenos que alteran las defensas del huésped y factores exógenos que producen una interrupción de la barrera mucosa oral.

3.1.1 FACTORES PREDISPONENTES PARA LA INFECCIÓN OROFARÍNGEA POR CANDIDA

A) Factores endógenos

1- Edad. Se han descrito dos etapas de mayor incidencia de candidiasis oral. Una de ellas es el período neonatal, probablemente debido a la inmadurez del sistema inmune y al escaso desarrollo de la microflora oral durante esta etapa. El segundo pico de incidencia se produce en adultos de edad avanzada, aunque se duda de que por sí misma la edad constituya un factor predisponente, y se ha sugerido que la mayor frecuencia de enfermedades y tratamientos que se asocian con la senectud serían realmente los factores desencadenantes (Odds FC *et al.*, 1988).

2. Diabetes. Los pacientes diabéticos están colonizados por *Candida* con más frecuencia que el resto de la población (Tapper-Jones *et al.*, 1981), lo que se atribuye a la elevada concentración de glucosa en la saliva (Samaranayake LP *et al.*, JOP 1986). Se ha descrito asimismo una mayor prevalencia de colonización en fumadores diabéticos, y en los portadores de prótesis dentales (Tapper-Jones *et al.*, 1981).

3. Neoplasias. Fundamentalmente las de estirpe hematológica, sobre todo las leucemias, son las que más comúnmente se asocian a colonización e infección por *Candida* sp. En los enfermos con leucemia se han descrito alteraciones en la fagocitosis y en la

capacidad fungicida (Lehrer RI *et al.*, 1971), lo que unido a la neutropenia asociada a la enfermedad y a su tratamiento, aumentan el riesgo de adquirir infecciones por *Candida*.

4. Factores esofágicos locales. Las alteraciones en la motilidad esofágica y los procesos que produzcan obstrucción mecánica o funcional son factores predisponentes para adquirir las infecciones por *Candida*. El estasis local facilita el sobrecrecimiento de este microorganismo. Se ha descrito una mayor incidencia de estas infecciones en pacientes con esclerodermia, acalasia y funduplicatura gástrica (Hendel L *et al.*, 1988, Gefter *et al.*, 1981).

B) Factores exógenos

1. Antibióticos. Es conocido que el cada vez mayor uso de antibióticos de amplio espectro ha contribuido al aumento en la incidencia de infección y colonización por *Candida* (Seelig *et al.*, 1966). Aunque no se conoce a fondo el mecanismo por el que esto sucede, se supone que la eliminación de bacterias que compiten por los nutrientes facilita el sobrecrecimiento de *Candida*. Varios estudios sugieren que además del tratamiento prolongado, los ciclos cortos de diversos antibióticos pueden desencadenar también candidiasis oral (Gundry *et al.*, 1980).

2. Esteroides. Poco tiempo después de que se introdujeran los esteroides inhalados para el tratamiento del asma se describieron algunos casos de infección orofaríngea en enfermos tratados con dexametasona por esta vía. En un estudio posterior Vogt *et al.* confirmaron la relación entre el uso de estos fármacos y las infecciones orofaríngeas por *Candida*. En los enfermos tratados con esteroides inhalados la incidencia de candidiasis oral se aproxima al 10% (Dennis H *et al.*, 1964, Voght FC, 1979).

3. Inmunosupresores. El uso de agentes inmunosupresores en el tratamiento de las neoplasias y los trasplantes de órganos ha producido un incremento en la frecuencia de colonización e infección por *Candida* (Clift R., 1984). La neutropenia subsecuente a la aplicación de estos tratamientos disminuye la fagocitosis por los neutrófilos, que es uno de los principales mecanismos de defensa contra las infecciones por esta levadura. Asimismo se han descrito alteraciones en el número y la función de los monocitos, que junto con la neutropenia, son los factores más importantes implicados en la génesis de la candidiasis oral y esofágica en estos enfermos.

4. Radioterapia. La irradiación de tumores en la cabeza y el cuello también favorece el crecimiento de *Candida* sp. En un estudio prospectivo con 109 pacientes, la proporción de cultivos positivos para *Candida* sp. aumentó del 22% antes de la irradiación, al 49% al final del período de tratamiento (Silverman S *et al.*, 1984). La xerostomía inducida por la irradiación se ha propuesto como el mecanismo básico para el crecimiento de *Candida*.

5. Antagonistas de la histamina. La elevación del pH gástrico facilita el crecimiento de *Candida* a este nivel, y por lo tanto promueve la colonización por estas especies. En un estudio en 51 pacientes con esclerodermia se recuperó *Candida* sp. tras el cepillado de la mucosa en el 44% de los no tratados con fármacos antiseoretos, frente al 89% de los que habían sido tratados con estos fármacos. Los autores concluyeron que los inhibidores de la acidez gástrica favorecen el sobrecrecimiento de *Candida*, al que predispone también la alteración de la motilidad esofágica (Hendel L *et al.*, 1988).

3.1.2 VARIANTES CLÍNICAS DE CANDIDIASIS OROFARÍNGEA EN ENFERMOS CON INFECCIÓN POR EL VIH.

Existen 4 formas diferentes de presentación de la candidiasis oral en los pacientes con infección por el VIH: eritematosa, pseudomembranosa, hiperplásica y queilitis angular (Samaranayake *et al.*, 1989). Las variedades más frecuentes son la eritematosa y la pseudomembranosa. Es característico que la infección sea multifocal, lo que es infrecuente en otros enfermos. Una razón para ello podría ser la inmadurez de los mecanismos de defensa y la depresión de los linfocitos T *helper* inducida por el virus.

1- *Candidiasis pseudomembranosa*. Se presenta en forma de exudados semiadherentes, de color amarillo claro, cremosos, en forma de gotas o como membranas confluentes, que se desprenden con el raspado de la mucosa, dejando una superficie eritematosa y levemente sangrante. El curso es habitualmente agudo, pero en los pacientes con infección por el VIH las lesiones pueden persistir durante meses si no se tratan. Aunque se pueden localizar en cualquier área de la boca, la mayoría de las veces se sitúan en la lengua y el paladar. En un estudio con 106 pacientes, la localización más frecuente fue el dorso y la cara lateral de la lengua en el 48% y el 42% de los casos respectivamente, seguido del paladar duro en el 20%, el blando en el 19%, y la mucosa bucal en el 15% (Greenspan D *et al.*, 1989)

2. *Candidiasis eritematosa o atrófica*. Antes de la aparición del sida, esta variedad se presentaba con poca frecuencia, generalmente después del uso de antibióticos de amplio espectro o de esteroides. En los pacientes con infección por el VIH se cree que esta forma precede a la pseudomembranosa, a diferencia de lo que ocurre en otros enfermos, aunque no hay estudios prospectivos que confirmen esta teoría. Se caracteriza por la presencia de unas placas difusas, depapiladas, enrojecidas y que no se desprenden. Se localiza en el paladar, mucosa bucal y labial, y en la lengua.

3. *Candidiasis hiperplásica*. Es la forma más infrecuente en los pacientes con infección por el VIH. Las lesiones son placas de color amarillo claro que no se desprenden, y que se han relacionado con el tabaquismo. En los enfermos con infección por el VIH se localizan

bilateralmente en la mucosa bucal, y raramente en el área retrocomisural, que es la presentación clásica en otros pacientes. Esta forma debe diferenciarse de la leocoplaquia vellosa, a la que se asemeja macroscópicamente.

4. *Queilitis angular*. Se manifiesta como fisuras o grietas maceradas y eritematosas, con o sin ulceración acompañante, que se localizan en las comisuras de la boca, y habitualmente acompañan a la candidiasis en el interior de la cavidad oral. Pueden causar sensación de quemazón o de dolor. Esta variedad de infección es poco frecuente y se ha calculado que se presenta en 1 de cada 8 enfermos con infección por el VIH.

Aunque la candidiasis oral puede ser asintomática, algunas de las formas descritas, como la pseudomembranosa y la hiperplásica, se acompañan frecuentemente de dolor y sensación urente que dificulta la alimentación y contribuye al empeoramiento del estado nutricional de los pacientes, ya comprometido en ocasiones por la enfermedad. Un síntoma frecuente es la alteración del gusto (disgeusia), una sensación desagradable que a menudo agrava la anorexia de estos enfermos. La afectación de la faringe puede ser asintomática o manifestarse como odinofagia que en ocasiones llega a ser intensa e impide la ingesta oral. Con mucha frecuencia la candidiasis oral coexiste con candidiasis esofágica, por lo se considera un marcador predictivo de ésta, como se describe más adelante.

3.1.3 PATOGÉNESIS DE LA CANDIDIASIS OROFARÍNGEA.

El paso previo a la colonización es la adhesión a la superficie de la mucosa oral. Se ha descrito una mayor capacidad de adherencia de las levaduras germinadas que de las no germinadas (Kimura LG *et al.*, 1980). *C. albicans* tiene una mayor capacidad de adherencia *in vitro* que el resto de las especies (King RD *et al.*, 1980).

Una vez que se ha producido la adhesión y la colonización por *Candida* de la mucosa orofaríngea, puede o no desarrollarse infección, que es lo que constituye la candidiasis oral. La transformación de *Candida* sp. de comensal en patógeno para el ser humano depende de varios factores, de los cuáles el más importante es el estado inmunitario del huésped (Samaranayake LP *et al.*, 1989).

Por microscopía electrónica se ha conseguido observar la existencia de levaduras parcialmente englobadas por invaginaciones de la membrana de las células epiteliales orales (Calderone RA *et al.*, 1984), aunque el mecanismo preciso por el que se produce esta penetración en las células epiteliales no es bien conocido. En los huéspedes con un número suficiente de neutrófilos, habitualmente se desarrolla una respuesta inflamatoria aguda y se adquiere una infección superficial y localizada. Por el contrario, en los enfermos neutropénicos la respuesta inflamatoria puede estar ausente, y existe una mayor vulnerabilidad para la infección diseminada.

En los pacientes con infección por el VIH no se ha documentado la existencia de alteraciones en la función de los neutrófilos. La elevada prevalencia de infección y colonización por especies de *Candida* en esta población y en otros enfermos con cocientes linfocitos T *helper*/supresores disminuidos, ha llevado a especular sobre un posible papel de la inmunidad celular en la patogénesis de estas infecciones, aunque los datos disponibles son muy escasos. Por otra parte, el sida se ha asociado a varias anomalías funcionales de los monocitos, que incluyen entre otras una quimiotaxis y fagocitosis defectuosas (Smith PD *et al.*, 1984, Roy S *et al.*, 1988). Puesto que se sabe que los monocitos tienen actividad antifúngica (Marodi L *et al.*, 1991), se piensa que esta alteración, unida a los defectos en los linfocitos T, contribuye a la predisposición a la candidiasis oroesofágica de estos enfermos. Sin embargo, hasta el momento existen pocos estudios que hayan analizado en profundidad la patogénesis y las interacciones entre las células y las levaduras a nivel de la superficie de la mucosa de la boca y el esófago.

4. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS

En los últimos años varios factores han realzado la importancia de las infecciones por hongos y la terapia antifúngica. Además del aumento en la tendencia de las infecciones fúngicas adquiridas a nivel comunitario, la incidencia de micosis nosocomiales, sobre todo las producidas por *Candida* sp. y *Aspergillus* sp. ha aumentado de forma considerable, hasta el punto de que en muchos hospitales constituyen una causa importante de mortalidad y morbilidad. Los enfermos con un mayor riesgo de adquirirlas son los que tienen neoplasias sólidas o hematológicas, inmunodeficiencias, traumatismos o quemaduras extensas, enfermedades gastrointestinales, diabetes y sobre todo los receptores de trasplantes de médula ósea (Pfaller M *et al.*, 1992, Wenzel R, 1995).

En un estudio internacional realizado en Europa, Japón y Canadá se analizó la frecuencia de infecciones por hongos en pacientes con cáncer. Aunque hubo una gran variabilidad entre los diferentes países, la frecuencia media de infección fúngica invasiva en estos enfermos fue del 8,7%. La frecuencia más alta se encontró en los receptores de trasplantes, en los que llegó a ser del 25% (Bodey G *et al.*, 1992).

En algunas unidades de trasplante, la neumonía nosocomial por *Aspergillus* sp. es una de las más frecuentes, y se acompaña de una mortalidad del 85% aproximadamente (Pannuti CS *et al.*, 1991). Además de *Candida* sp. y *Aspergillus* sp, ciertas especies de hongos que hasta hace muy poco tiempo eran considerados contaminantes o meros colonizadores cuando se aislaban en humanos, están surgiendo en los últimos años de forma cada vez más frecuente como patógenos oportunistas significativos. Esto fundamentalmente sucede en enfermos con cáncer y trasplante de médula ósea, en los que producen infecciones invasivas muy graves y con una elevada mortalidad, que en algunos casos se acerca al 100%. Estas especies se han denominado "hongos emergentes", e

incluyen hongos filamentosos, pertenecientes al grupo de las feohifomicosis y las hialohifomicosis, y ciertas levaduras como especies de *Candida no-albicans*, *Trichosporon beigeli*, *Malassezia furfur* o *Rhodotorula* spp. (Anaisse EJ *et al.*, 1989).

Sin embargo, de todas las infecciones fúngicas, las producidas por *Candida* sp. son las que han experimentado un crecimiento más importante. En un estudio multicéntrico realizado por el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de los Estados Unidos, que analizó las causas de bacteriemia nosocomial en la década de los 80 (Banerjee SN *et al.*, 1991), se puso de manifiesto que *Candida* sp. era uno de los patógenos que más había aumentado con respecto a años previos, tan sólo superado por los estafilococos coagulasa negativos, tanto en pacientes inmunocompetentes con enfermedades graves como en pacientes inmunodeprimidos. Según se deduce de éste y otros trabajos, la incidencia de candidemia nosocomial se ha multiplicado entre 5 y 10 veces en los últimos 10 años (Beck-Sague CM *et al.*, 1993, Banerjee SN *et al.*, 1991), y en la actualidad *Candida* sp. constituye entre la cuarta y la quinta causa de bacteriemia en los pacientes hospitalizados (Jarvis WR 1995, Edwards 1991); ello supone aproximadamente un 10-15% de todos los aislamientos en los hemocultivos, fundamentalmente en los hospitales de tercer nivel (Pfaller MA *et al.*, 1992), Whey SB *et al.*, 1988). De forma global, las infecciones por el género *Candida* representaron el 72% de todas las infecciones fúngicas nosocomiales en un estudio multicéntrico realizado en EE.UU. y constituyeron la séptima causa más frecuente de infección nosocomial (Jarvis WR 1995).

El aumento de la frecuencia de infecciones por *Candida* no sólo se ha acompañado de un importante incremento de la morbilidad y de las estancias hospitalarias, sino también de un aumento de la mortalidad (Whey SB *et al.*, 1988 y 1989). En un estudio histórico de casos y controles realizado por Whey *et al.* la mortalidad atribuible a la candidemia se estimó en un 38%, y en un estudio posterior esta frecuencia llegó a ser del 57% (Frasser VJ *et al.*, 1992) lo que contradice la teoría previa sobre la existencia de candidemia benigna. De hecho, en este último

trabajo, la mortalidad en los pacientes no tratados fue del 63%, siendo marcadores del pronóstico la gravedad de la enfermedad subyacente y la duración de la candidemia (Frasser VJ *et al.*, 1992).

Numerosos factores han contribuido al incremento de las infecciones por *Candida*, incluyendo una mejor detección *pre* y *post mortem*, la mejoría de la supervivencia en pacientes con cáncer, y en general en los inmunodeprimidos, el desarrollo de programas de trasplantes de órganos sólidos y de médula ósea, el uso de regímenes de quimioterapia más intensivos, y la utilización de estrategias terapéuticas más complejas y medidas de soporte vital (cirugía torácica y abdominal, empleo de antibioterapia de amplio espectro, catéteres y dispositivos endovasculares, intubación orotraqueal, administración parenteral de sustancias lipídicas, etc.) (Frasser VJ *et al.*, 1992, Saral R, 1991).

En un estudio de casos y controles en el que se analizaban las causas de candidemia nosocomial, el análisis multivariable demostró que el tratamiento previo con múltiples antibióticos, la cateterización con un catéter de Hickman, el aislamiento de especies de *Candida* en otras localizaciones y la hemodiálisis eran factores de riesgo independientes para el aislamiento de *Candida* en los hemocultivos (Wenzel RP, 1995). La intensidad de la colonización por *Candida* fue también un factor independiente predictor de infecciones invasivas por esta levadura en un estudio en pacientes graves ingresados en unidades de cuidados intensivos quirúrgicas y neonatales (Pittet D *et al.*, 1994). La alta mortalidad de las infecciones por *Candida* observada en este último trabajo, motivó que se emprendiera un estudio prospectivo para evaluar el beneficio del tratamiento antifúngico precoz en los pacientes con mayor riesgo de adquirir infecciones por este microorganismo.

Sin embargo, de todos los factores señalados anteriormente, ninguno ha tenido tanto impacto sobre la incidencia de micosis oportunistas como la epidemia de sida. El dramático incremento en la prevalencia mundial de sida en los últimos 10 años se ha acompañado de un aumento también espectacular en la frecuencia de las infecciones producidas por *Candida*, particularmente las que afectan a la mucosa orofaríngea (Diamond R, 1991).

4.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA CANDIDIASIS OROFARÍNGEA EN LOS ENFERMOS CON INFECCIÓN POR EL VIH.

Es bien conocida la estrecha relación entre la candidiasis oral y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Desde que se reconoció por primera vez éste en 1981, se constató que la candidiasis orofaríngea era una de las infecciones oportunistas más frecuentes en estos enfermos (Gottlieb MS *et al.*, 1981, Mildvan D *et al.*, 1982, Phelan JA *et al.*, 1987). De hecho, su existencia en un individuo con algún factor de riesgo se ha considerado un signo indicador de infección por el VIH (Syrjanen S *et al.*, 1988) y un marcador de progresión a sida (Klein *et al.*, 1984).

Aunque la frecuencia de candidiasis oral en los pacientes con infección por el VIH varía de unas series a otras, lo que posiblemente sea debido a las características de los enfermos estudiados y a los criterios utilizados para su definición, se ha descrito que puede llegar a ser de hasta el 90% a lo largo de su evolución (Coleman D *et al.*, 1989, Phelan JA *et al.*, 1987). Como ya se ha comentado, esta infección produce una morbilidad significativa, ya que la disfagia y la odinofagia pueden conducir a una escasa ingesta oral, pérdida de peso e inanición.

La candidiasis oral se considera un signo precoz de inmunosupresión. La frecuencia de aislamiento de *Candida* y los signos clínicos de candidiasis oral aumentan a medida que avanza la infección por el VIH. En un estudio que incluyó a 63 pacientes con infección por el VIH en diferentes estadios, se aislaron especies de *Candida* de la cavidad oral del 57.5% de los enfermos en fases precoces (estadio 1 de la clasificación del Centers for Disease Control -CDC- de 1987), frente al 87.5% de los pacientes en fases avanzadas (estadio 3 del CDC) (Korting HC *et al.*, 1989).

Además, la candidiasis oral constituye por sí misma un marcador de progresión de la infección por el VIH, independientemente del recuento de linfocitos CD4 . Klein RS *et al.*, 1984 en un trabajo publicado en 1983 en el que se evaluaron durante 12 meses a 42 enfermos con sida, observaron que el 56% de los 22 enfermos con candidiasis oral presentó una infección oportunista severa, mientras que los 20 pacientes sin candidiasis no desarrollaron ninguna enfermedad, incluso aunque el cociente T4/T8 fuera muy bajo (Klein RS *et al.*, 1984).

La candidiasis oral se asocia con frecuencia con candidiasis esofágica, que es otra de las infecciones oportunistas más comunes en los enfermos con infección por el VIH. Se piensa que la candidiasis esofágica se produciría por una extensión local a partir de las lesiones de la boca. La esofagitis or *Candida* sp. constituye la forma de presentación de sida en el 13% de los enfermos, y al menos el 25% de ellos la desarrollan en algún momento durante su evolución. Se manifiesta fundamentalmente por disfagia, pero puede también causar hemorragia gastrointestinal y, raramente, perforación seguida de mediastinitis e infección diseminada por *Candida*.

En varios estudios prospectivos se ha demostrado que la mayoría de los pacientes con candidiasis oral presentan también lesiones esofágicas. El valor predictivo positivo de la candidiasis oral como marcador de esofagitis por *Candida* en los enfermos con disfagia se aproxima al 90% (Tativian A *et al.*,1986, Wilcox CM *et al.*, 1995). De ahí la recomendación actual de tratar empíricamente con azoles a los pacientes con síntomas esofágicos y candidiasis oral, reservando las técnicas diagnósticas adicionales, como la endoscopia, para los que no responden al tratamiento antifúngico.

5. TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS OROFARÍNGEA EN LOS ENFERMOS CON INFECCIÓN POR EL VIH

Paralelamente al aumento en la incidencia de micosis humanas observada en los últimos años, se ha producido un incremento en el uso de los antifúngicos clásicos, como la anfotericina B (Gutiérrez F *et al.*, 1995, Perfect JR *et al.*, 1991, Gross MH *et al.*, 1987, Walsh TJ *et al.*, 1990, Laguna F *et al.*, 1994, Chavanet P *et al.*, 1994). Además, se han desarrollado nuevos fármacos para el tratamiento de micosis sistémicas, cuyas ventajas frente a los anteriores, fundamentalmente en cuanto a toxicidad y comodidad de administración, han tenido implicaciones importantes en el manejo de estas enfermedades. Esto ha sido particularmente relevante con el grupo de los azoles durante la década de los 80 y de los 90.

El tratamiento precoz de la candidiasis oral es preceptivo, no sólo por la sintomatología causada por las lesiones, sino porque éstas suponen un reservorio de microorganismos para la diseminación local de la infección (Lancet (letter)1989: 1491-2). Estas infecciones responden inicialmente a agentes tópicos, entre los que se han empleado polienos, como la nistatina o la anfotericina B, e imidazoles como el clotrimazol. Sin embargo, en los pacientes con infección por el VIH, la respuesta a estos agentes es habitualmente transitoria y las recaídas son muy frecuentes. Estos fracasos del tratamiento se deben a la inmunodeficiencia subyacente y a la baja adherencia al tratamiento, debido en parte a la necesidad de administración frecuente, a las molestias gastrointestinales que produce y a su mal sabor.

Todo ello motivó el que se sustituyesen los fármacos tópicos por antifúngicos sistémicos como tratamiento inicial de elección, y entre ellos, los más utilizados han sido los azólicos. En un primer momento se empleó el ketoconazol, que es un derivado del grupo de los imidazoles, cuya eficacia ya se había demostrado en el tratamiento de la candidiasis mucocutánea crónica y en las infecciones por *Candida* en otros enfermos inmunocomprometidos. El ketoconazol oral se administra a dosis de 200 a 400 mg diarios, y se suele recomendar tomar el fármaco con alimentos, ya que el ácido gástrico es esencial para su disolución y absorción. El ketoconazol se asocia con un número elevado de efectos adversos, como náusea, exantema, prurito y hepatitis. La frecuente

alteración en los parámetros de función hepática obliga a monitorizar los niveles de transaminasas con regularidad en los pacientes tratados con este fármaco.

En los años siguientes se desarrolló el grupo de los bis-triazoles, representado por el itraconazol, y fundamentalmente por el fluconazol, cuyas ventajas desde el punto de vista farmacocinético y en cuanto a eficacia *in vivo* le convirtieron en el antifúngico de elección para el tratamiento de la candidiasis oral en los enfermos con infección por el VIH y en el fármaco azólico de referencia. Además, dada la frecuencia de la candidiasis oral en los pacientes con sida, es también uno de los medicamentos más utilizado en estos pacientes.

El fluconazol es un bis-triazol soluble en agua cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la enzima demetilasa, que está implicada en la síntesis de ergosterol. La sustitución del anillo triazólico por el imidazólico supuso un aumento en la polaridad y una reducción en la unión a proteínas con respecto a otros azólicos, como el ketoconazol. La absorción oral es rápida y casi completa en las 2 horas siguientes a su administración, muy superior a la absorción del ketoconazol. Apenas se metaboliza en el organismo y su eliminación se efectúa predominantemente por el riñón. Su vida media es de aproximadamente 30 horas, por lo que se administra en una sola dosis diaria. Las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo son del 80% de las que se alcanzan en suero, lo que posibilita su utilización en el tratamiento de las meningitis fúngicas. En general es bien tolerado, y cuando se administra a las dosis habituales, no suprime la síntesis de hormonas esteroideogénicas. Aunque se han descrito de forma infrecuente reacciones cutáneas importantes y hepatitis durante el tratamiento con fluconazol, no se ha confirmado su relación con el fármaco.

En la mayoría de los estudios comparativos el fluconazol ha demostrado ser más eficaz que los antifúngicos tópicos, como la nistatina o el clotrimazol (CID, 1992), y también más eficaz que otros antifúngicos sistémicos, como el ketoconazol (Laine L *et al.*,1992) en el tratamiento de la candidiasis oral y esofágica. En un trabajo en el que se estudiaron 129 pacientes con sida y

esofagitis por *Candida* evaluados por endoscopia, se constató desaparición de las lesiones en el 91% de los pacientes tratados con fluconazol frente al 52% de los tratados con ketoconazol. Además de las ventajas farmacocinéticas del fluconazol sobre el ketoconazol, la menor eficacia del ketoconazol se debe a la hiposecreción ácida gástrica que se produce en los enfermos con enfermedad avanzada, lo que dificulta aún más su absorción. El fluconazol tienen además mayor actividad *in vivo* frente a *Candida* (Laine L *et al.*, 1992).

Independientemente del fármaco empleado para el tratamiento, la naturaleza de microorganismo comensal de *Candida* y el estado de inmunodeficiencia subyacente del huésped, condicionan una tendencia a la recidiva de las infecciones orales (Laine L, 1994, Hay RJ, 1990). En muchos casos es necesario administrar un tratamiento supresor a largo plazo (profilaxis secundaria) para reducir la morbi-mortalidad y el gasto económico que suponen las infecciones recidivantes por *Candida* sp. en los pacientes con infección por el VIH. Las ventajas del fluconazol frente al resto de los azólicos le convirtieron también en el tratamiento de elección en la profilaxis secundaria de la candidiasis oroesofágica. Como era esperable, varios trabajos demostraron su eficacia en la profilaxis secundaria y también en profilaxis primaria (en pacientes que no habían presentado antes candidiasis oroesofágica), tanto en pautas de uso diario como semanal, sin apenas efectos adversos acompañantes (Stevens DA *et al.*, 1991, Just Nubling G *et al.*, 1991, Powderly WG *et al.*, 1995, Schuman P *et al.*, 1997).

A pesar de su eficacia en la prevención, se desaconsejó el uso rutinario de fluconazol por su elevado coste, la baja probabilidad de enfermedad invasiva, la posible interacción con otros fármacos y la posibilidad de que facilitara la aparición de especies resistentes, que ya se apuntaba en algunos de los estudios (Powderly WG *et al.*, 1995, Schuman P *et al.*, 1997). Se recomendó por ello restringir su empleo en profilaxis y reservarlo para los enfermos con un mayor riesgo de adquirir candidiasis oroesofágica, como aquéllos con CD4 por debajo de $50/\text{mm}^3$ o con antecedentes de candidiasis oral previa (Powderly WG *et al.*, 1995, Schuman P *et al.*, 1997).

Además de ser eficaz en el tratamiento y en la profilaxis de la candidiasis mucosa en los pacientes con infección por el VIH, el fluconazol ha demostrado su eficacia en la profilaxis secundaria de la meningitis criptocócica. En un estudio publicado en 1992, el tratamiento con fluconazol en pauta oral diaria de 200 mg fue superior a la anfotericina B semanal para prevenir la recidiva de la meningitis criptocócica en enfermos con sida (Powderly WG *et al.*, 1992). Todo ello ha favorecido su uso generalizado tanto en el tratamiento y profilaxis secundaria de la candidiasis oral y esofágica, como en la profilaxis secundaria de la meningitis criptocócica.

6. RESISTENCIA A LOS ANTIFÚNGICOS

Hasta la introducción en la clínica de los antifúngicos azólicos en la década de los 80 y los 90, apenas se había planteado la necesidad de realizar estudios de sensibilidad, ya que el único fármaco disponible para tratar las infecciones por hongos había sido durante muchos años la anfotericina B. La mayoría estaban producidas por *C. albicans*, que era habitualmente sensible a casi todos los antifúngicos. Sin embargo, esta situación cambió a finales de la década de los 80. Por entonces se describieron los primeros casos de fracaso del tratamiento antimicótico, que hasta entonces sólo se habían producido en situaciones muy restringidas y predecibles, como en las endocarditis, y se detectaron cada vez con mayor frecuencia especies con resistencia intrínseca a los antifúngicos, es decir, independiente de la exposición previa al fármaco, como *C. krusei* y *C. glabrata* (Denning DW *et al.*, 1997).

Los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos no se han desarrollado hasta hace relativamente poco tiempo. Uno de los principales inconvenientes ha sido la ausencia de estandarización de los métodos empleados, lo que ha dificultado la reproductibilidad y la posibilidad de comparación entre los diferentes resultados obtenidos. Esto motivó que no existiese acuerdo en los criterios para definir sensibilidad y resistencia.

En 1992, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) estableció por primera vez las normas para la estandarización en los métodos para valorar la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos, que se revisaron en 1995 (Rex JH *et al.*, 1995). Consistía en un método de macrodilución en caldo que utilizaba un medio tamponado con pH de 7.0 (RPMI 1640 conteniendo tiamina, vitamina B12 y varios aminoácidos). El tamaño del inóculo se estableció en $0.5-2.5 \times 10^3$ células por mililitro: para su preparación se recomienda tomar 5 colonias de 1mm de diámetro, aproximadamente, de cultivos incubados durante 24-48 horas. Estas colonias deben suspenderse en 5 mL de suero salino estéril. La suspensión resultante debe agitarse bien, y ajustarse la densidad con un espectrofotómetro hasta igualar a la producida por el tubo 0.5 de la escala de McFarland, a una longitud de onda de 530 nm. Esto proporciona una solución de 1.5×10^6 células por mL. Posteriormente se diluye al 1:100 y luego al 1:20 con caldo RPMI 1640 para alcanzar el inóculo final de $0.5-2.5 \times 10^3$ células por mL. Se emplean diluciones seriadas de los antifúngicos a ensayar partiendo de soluciones stock concentradas y siguiendo esquemas de dilución previamente establecidos.

Aunque la temperatura óptima determinada por el NCCLS para la incubación de las especies de *Candida* fue de 35°C, la mayoría de los laboratorios disponen de incubadoras o habitaciones a temperatura ambiental de 37°C, por lo que es ésta la temperatura que habitualmente se emplea en la mayoría de los casos. Es probable que no existan diferencias relevantes en los resultados con cualquiera de las temperaturas. El período de incubación recomendado son 48 horas, ya que un período inferior puede llevar a una infraestimación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en una pequeña proporción de los aislamientos. La definición de los "puntos de corte" utilizada por el NCCLS es la concentración a la que se consigue una inhibición del 80% del crecimiento, determinado por lectura visual. Recientemente, basándose en la evolución *in vivo* de los pacientes, se han propuesto los siguientes "puntos de corte" para la definición de resistencia: a) cepas sensibles, aquéllas con una $CMI \leq 8$ mcg/mL, b) cepas sensibles dependiendo de la dosis, cuando la CMI está entre 16 y 32 mcg/mL y c) cepas resistentes si la $CMI \geq 64$ (Rex JH *et al.*, 1997).

El término resistencia hace referencia a la demostración de una relativa falta de sensibilidad al fármaco antifúngico, estudiado *in vitro*, comparado con otros aislamientos de la misma especie o el mismo género. La "resistencia clínica" equivale al fracaso de un ciclo apropiado de tratamiento para una indicación determinada. En el caso de la candidiasis oroesofágica se considera que existe resistencia al fluconazol cuando no hay respuesta con 100 mg diarios de fluconazol después de 7-10 días de tratamiento, basándose en la evolución *in vivo* de los pacientes (Rex JH *et al.*, 1997). Además de la resistencia *in vitro* al fármaco, puede haber otros motivos para el fracaso del tratamiento, como una biodisponibilidad disminuida, un metabolismo del fármaco acelerado, factores locales que perpetúan la infección, o una función inmune de base muy alterada. No obstante, cuando hablamos de resistencia clínica, aceptamos que la mayoría de las veces se asocia con resistencia *in vitro* al fármaco (Denning DW *et al.*, 1997, Dronda F *et al.*, 1994).

6.1 CANDIDIASIS RESISTENTE AL FLUCONAZOL EN LOS ENFERMOS INMUNODEPRIMIDOS

El aumento progresivo en las infecciones invasivas por *Candida* y su elevada mortalidad hizo preceptiva la adopción de medidas para prevenirlas, lo que en muchos casos implicaba la aplicación de tratamientos profilácticos en los pacientes con un riesgo más elevado. El hecho de que en varios trabajos la intensidad de la colonización o la existencia de candidiasis localizada se asociase también a un mayor riesgo de infecciones diseminadas, es otro factor que indujo a tratar estas infecciones en estadios precoces (Pittet D *et al.*, 1994, Frasser VJ *et al.*, 1992, Saral R, 1991).

Aunque las consecuencias del aumento en el consumo de antifúngicos es probable que todavía no se conozcan completamente, una de las que cabría esperar es que se produjeran modificaciones en la ecología de las especies fúngicas, por la selección de microorganismos resistentes. En concreto, el uso extenso de fluconazol en pacientes inmunocomprometidos se ha

relacionado con la aparición de especies de *Candida* resistentes a este fármaco. Este fenómeno no sólo se ha detectado en pacientes con infección por el VIH, sino en otros grupos de pacientes inmunodeprimidos, incluso de forma aislada en pacientes inmunocompetentes (Hennequin C *et al.*, 1994). En dos estudios multicéntricos en pacientes trasplantados de médula ósea o leucemia aguda que recibieron profilaxis con fluconazol, se observó un aumento en la prevalencia de colonización por *C. krusei* y una disminución en la colonización por *C. albicans*, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Goodman JL *et al.*, 1992, Winston DJ *et al.*, 1993).

La introducción del fluconazol en el Centro de Oncología John Hopkins para la profilaxis antifúngica postrasplante de médula ósea se asoció a un aumento de la colonización e infección diseminada por *C. krusei*, una especie de *Candida* que es intrínsecamente resistente al fluconazol (Wingard JR *et al.*, 1991). Los autores concluyeron que la supresión de las cepas más virulentas de *Candida*, como *C. albicans*, contribuyó a la emergencia de otras especies menos virulentas, pero que no eran sensibles al fluconazol, como *C. krusei*.

Este fenómeno se ha constatado en muchos otros hospitales de todo el mundo. En un trabajo reciente se demostró también un aumento en la frecuencia de los aislamientos de especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* de forma paralela al aumento en el consumo intrahospitalario de antifúngicos, hecho que no sucedió en los pacientes externos (Gutiérrez F *et al.*, JHI 1995). El estudio prospectivo multicéntrico más extenso hasta la actualidad, de más de 4 años de duración, cuyo objetivo era analizar los cambios en la epidemiología de los aislamientos de *Candida* en los hemocultivos en los años 90 y que incluyó 446 candidemias, demostró un aumento muy importante en las fungemias producidas por levaduras diferentes de *Candida albicans* (LDCA) que incluso llegaron a sobrepasar a las producidas por *C. albicans* (Nguyen MH *et al.*, 1996). Además se observó que el tratamiento simultáneo con fluconazol se asoció con el aislamiento preferente de LDCA (sobre todo *C. krusei* y *C. parapsilosis*), y con la presencia de CMI elevadas para el fluconazol (>8 mcg/mL). El análisis univariable demostró

que los factores asociados al aislamiento de especies con una CMI > 8 mcg/mL fueron además la neutropenia y el tratamiento previo con esteroides o antibióticos (Nguyen MH *et al.*, 1996). En un trabajo de carácter retrospectivo efectuado en el Hospital General Universitario de Elche, en el que se evaluaron las candidemias durante un período de 4 años (1993-1996), se encontró que el 55% estuvieron causadas por especies LDCA (Llavero J *et al.*, 1997).

6.2 CANDIDIASIS RESISTENTE AL FLUCONAZOL EN LOS ENFERMOS CON INFECCIÓN POR EL VIH

En los pacientes con infección por el VIH también se ha puesto de manifiesto el fenómeno de la resistencia a los azoles. Como ya se ha mencionado, la elevada frecuencia de infecciones oroesofágicas por *Candida* y la idoneidad del fluconazol para su tratamiento, hizo que se convirtiera en un fármaco ampliamente utilizado y en el antifúngico azólico de referencia. Además, debido a su buena tolerancia y escasa toxicidad, y en vista de su eficacia clínica, a finales de la década de los 80 muchos centros adoptaron la medida de efectuar profilaxis secundaria mediante tratamiento continuo con dosis bajas del fármaco (Denning DW *et al.*, 1997).

A principios de la década de los 90 empezaron a detectarse los primeros fracasos terapéuticos con fluconazol (Denning DW *et al.*, 1997). Durante la Conferencia Internacional de Sida celebrada en Vancouver en 1990 se comunicó por primera vez el fracaso del fluconazol en el tratamiento de un episodio de candidiasis orofaríngea en un paciente con sida en profilaxis secundaria prolongada (Fulton *et al.*, 1990). En los meses siguientes se describieron nuevos casos en enfermos que previamente habían respondido en Manchester, Edimburgo y Londres (Fox R *et al.*, 1991, Willcocks R *et al.*, 1995, Kitchen VS *et al.*, 1991).

El primer estudio en el que se relacionó el fracaso clínico con resistencia *in vitro* al fluconazol se publicó en 1993 en EE.UU. (Boken D *et al.*, 1993). Desde entonces se han descrito múltiples

casos de resistencia tanto clínica como *in vitro* al fluconazol asociada a la infección por el VIH (Boken D *et al.*, 1993, Rhunke M *et al.*, 1994, Johnson EM *et al.*, 1995, Law D *et al.*, 1994).

Existen muy pocos datos acerca de la prevalencia de resistencia al fluconazol en las especies aisladas de los enfermos con infección por el VIH, ya que la mayoría de los trabajos disponibles incluyen grupos seleccionados de pacientes, generalmente aquéllos con una mayor inmunodepresión. Uno de los grupos más estudiados han sido los enfermos con candidiasis oral, en los que la frecuencia de resistencia al fluconazol oscila según las series desde un 23% (Laguna F *et al.*, 1996) hasta un 32% (Revankar SG *et al.*, 1996). En una publicación reciente en que se evaluaron 64 pacientes con infección por el VIH con una cifra mediana de linfocitos CD4 de 20 cel/mm³ (Maenza JR *et al.*, 1996), la proporción hallada de especies resistentes fue del 41%. A pesar de que muchos de los pacientes con infección por el VIH desarrollarán eventualmente candidiasis oral a lo largo de su evolución, existe un amplio grupo de enfermos en estadios precoces que están colonizados por *Candida* sp., pero que no han tenido todavía infecciones orales, y que no está representado en estos trabajos.

La frecuencia de resistencia al fluconazol está también determinada por los puntos de corte en las CMI de fluconazol utilizadas para definirla. Puesto que hasta muy recientemente no se habían establecido de forma consensuada unas CMI para clasificar a las cepas, cada autor escogía la que a su criterio era la más adecuada. Esto supuso una gran variabilidad en cuanto a la definición de resistencia y ha dificultado las comparaciones. La mayoría de las veces, además, los puntos de corte eran inferiores a los propuestos actualmente, por lo que la prevalencia estaría sobrestimada en la mayoría de los trabajos. Por todo esto, resulta difícil extrapolar los resultados de la mayoría de los estudios publicados hasta la actualidad a toda la población de enfermos con infección por el VIH.





II. FUNDAMENTO

Los factores que determinan la aparición de especies de *Candida* resistentes al fluconazol en los pacientes con infección por el VIH no son bien conocidos. Dado que fue después del uso generalizado de fluconazol cuando comenzaron a describirse los primeros casos de resistencia al tratamiento, se propuso una relación entre la exposición al fármaco y la aparición de especies resistentes (Rhunke M *et al.*, 1994, Johnson EM *et al.*,1995, Chavanet P *et al.*,1994, Laguna F *et al.*,1997, Maenza JR *et al.*,1996, Revankar SG *et al.*,1996). Para confirmar que el fracaso clínico se acompañaba de resistencia *in vitro*, algunos estudios analizaron de forma prospectiva los patrones de sensibilidad de las levaduras procedentes de enfermos tratados y no tratados con fluconazol (Rhunke M *et al.*, 1994, Johnson EM *et al.*,1995).

Johnson *et al.* investigaron el efecto de diferentes pautas de tratamiento con fluconazol sobre la aparición de especies resistentes, para lo que compararon las CMI de los aislamientos de *Candida* sp. de enfermos que habían recibido el fármaco de forma prolongada, durante cortos períodos de tiempo o que no habían sido tratados. Se comprobó que la sensibilidad al fluconazol era menor en los enfermos expuestos que en los no expuestos al antifúngico, y que globalmente seguía disminuyendo a medida que aumentaba la exposición. Sin embargo, las especies resistentes también se aislaron en los pacientes muy inmunodeprimidos, por lo que los autores abogaban por la importancia del sistema inmune para que se produjera la emergencia de cepas de *Candida* resistentes.

En otro estudio prospectivo en el que se evaluó la sensibilidad al fluconazol de *Candida* sp. en los pacientes con candidiasis oral recurrente tratados con fluconazol, se demostraron incrementos progresivos en las CMI a medida que se administraban nuevos ciclos de tratamiento (Rhunke M *et al.*,1994). En este trabajo los autores también destacaban la severidad de la inmunodepresión de los enfermos, que incluso en muchas ocasiones tenían infecciones bacterianas o neoplasias concomitantes, y por tanto estaban en tratamiento simultáneo con antibióticos o citostáticos.

En los últimos años se han realizado algunos estudios sobre la sensibilidad de los aislamientos orales de *Candida* en enfermos con infección por el VIH en diferentes hospitales (Sangeorzan JA *et al.*, 1994, Maenza JR *et al.*,1997, Laguna F *et al.*,1997, Revankar SG *et al.*,1996). En todos ellos, las especies de *Candida* resistentes se aislaban fundamentalmente en los pacientes que habían sido expuestos previamente al fluconazol. Los autores concluían por lo tanto que el consumo de fluconazol era un factor de riesgo para adquirir estas especies (Sangeorzan JA *et al.*,1994, Maenza JR *et al.*,1997, Laguna F *et al.*,1996, Revankar SG *et al.*,1996). Sin embargo, existen algunos inconvenientes en el diseño de estos estudios que limitan sus conclusiones.

En primer lugar, el objetivo principal de la mayoría de estos estudios no era la investigación de los factores de riesgo para la adquisición de especies resistentes. En varios de estos estudios los datos se obtuvieron de las historias clínicas (Laguna F *et al.*,1997, Maenza JR *et al.*,1996, Revankar SG *et al.*,1996, Chavanet P *et al.*,1994), lo que conlleva con frecuencia una importante pérdida de la información, sobre todo en este caso, en el que se evalúan fármacos consumidos y pautas de tratamiento en enfermos ambulatorios. Además, puede existir un sesgo de entrevistador si el investigador conoce previamente en qué pacientes se aíslan las especies que son resistentes cuando se recogen los datos, lo que en varios de estos estudios no queda debidamente aclarado (Maenza JR *et al.*,1996, Revankar SG *et al.*,1996).

Otro de los inconvenientes de que la investigación de los factores que determinan la resistencia a los antifúngicos no constituyera un objetivo fundamental de los trabajos es que no se tuvieran en cuenta *a priori* todas las posibles variables implicadas. Así, las variables que se estudian en la mayoría son fundamentalmente el recuento de linfocitos CD4 y el consumo de fluconazol o las características del consumo (Revankar SG *et al.*, 1996, Chavanet P *et al.*, 1994, Laguna F *et al.*, 1997). Sin embargo existen más elementos que son comunes a los enfermos con infección por el VIH o en general a los enfermos inmunodeprimidos, y cuyo papel en la ecología fúngica no ha sido suficientemente evaluado.

Otro de los inconvenientes es que el número de enfermos estudiados en la mayoría de los trabajos era reducido (Revankar SG *et al.*,1996, Sangeorzan JA *et al.*,1994, Jonhson EM *et al.*,1995, Maenza JR *et al.*,1996), y en general se incluyeron enfermos con candidiasis oral o un recuento muy bajo de linfocitos CD4 (Maenza JR *et al.*,1996, Laguna F *et al.*,1996, Revankar SG *et al.*,1996), por lo que las conclusiones pueden no ser extrapolables a toda la población de pacientes con infección por el VIH.

Además del diseño, existen también algunos problemas en relación con los estudios microbiológicos. En algunos de estos trabajos, el método utilizado para determinar la sensibilidad no era el estándar (Chavanet P *et al.*,1994). En segundo lugar, puesto que hasta hace apenas pocos meses aún no se habían unificado los criterios de resistencia *in vitro* para las especies de *Candida*, existía una gran variabilidad en las definiciones de las cepas resistentes. En general los puntos de corte empleados han sido más bajos que los propuestos actualmente, lo que supone haber incluido pacientes que no tenían auténtica resistencia clínica. Todo esto dificulta la comparación de los resultados entre los diferentes estudios.

Existen algunos datos clínicos en los pacientes que despiertan dudas sobre el papel del fluconazol como único inductor de resistencia en los pacientes con sida. En el estudio de Boerlin *et al.* que ya se ha mencionado, algunas de las cepas expuestas al fluconazol no aumentaron sus CMIs, e incluso en algún caso disminuyeron (Boerlin P *et al.*, 1996). Revankar *et al.* comprobaron también que no se desarrollaban resistencias en todos los pacientes tratados con fluconazol, sobre todo en los menos inmunodeprimidos (Revankar SG *et al.*,1996). Además, se han encontrado especies resistentes de *C. albicans* y LDCA en pacientes con infección por el VIH que no habían sido previamente tratados con fluconazol (Laguna F *et al.* 1997, Martins *et al.*, 1997 Revankar SG *et al.*,1996).

En enfermos inmunodeprimidos sin infección por el VIH también se ha cuestionado el papel del fluconazol en la emergencia de especies de *Candida* resistentes (White TC, 1997). Existen estudios prospectivos y controlados con placebo en los que no se ha demostrado que el

fluconazol favorezca la aparición de especies resistentes (Winston DJ *et al.*, 1993, Goodman JL *et al.*, 1992). Por otra parte, la incidencia en los enfermos con cáncer de candidemia por *C. krusei*, una especie de *Candida* intrínsecamente resistente al fluconazol, no ha variado en los últimos 20 años (Abi Said D *et al.*, 1997 *et al.*, Wingard JR *et al.*, 1991), a pesar de la introducción de fluconazol en la última década.

Es posible que otros factores, como el empleo de quimioterapia más intensiva en los enfermos con cáncer, con el consiguiente aumento en la toxicidad a nivel medular y de mucosas que conlleva, permita que especies menos virulentas (como sucede con muchas de las resistentes al fluconazol) colonicen y produzcan invasión a diferentes niveles. En un estudio multicéntrico prospectivo, las levaduras diferentes de *Candida albicans* fueron una causa relativamente frecuente de funguemia en enfermos no neutropénicos no expuestos al fluconazol (Rex JH *et al.*, 1994). En algunos estudios en pacientes oncológicos, se encontró candidemia por *C. krusei* no asociada al consumo de fluconazol (Iwen PC *et al.*, 1995).

Además del consumo de fluconazol, varios autores han señalado la importancia del grado de inmunodepresión en el desarrollo de resistencia. De hecho, en la mayor parte de los trabajos ya comentados, las especies resistentes se aislaban preferentemente en los sujetos más inmunodeprimidos (Rhunke M *et al.*, 1994, Johson EM *et al.*, 1995, Laguna F *et al.*, 1996, Maenza JR *et al.*, 1996, Sangeorzan JA *et al.*, 1994, Revankar SG *et al.*, 1996, Chavanet P *et al.*, 1994, Imbert Bennard C *et al.*, 1994), y muchos sostenían por tanto que la inmunodepresión severa era el otro factor determinante en la aparición de estas especies (Johson EM *et al.*, 1995, Maenza JR *et al.*, 1996, Revankar SG *et al.*, 1996). En estudios que incluían enfermos con un intervalo más amplio de linfocitos CD4, prácticamente no se aislaron especies resistentes en los que tenían las cifras más elevadas (Chavanet P *et al.*, 1994) y hubo una tendencia a un desarrollo inferior de resistencias en los seguimientos prospectivos cuando se trató a estos enfermos con fluconazol (Revankar SG *et al.*, 1996).

En la práctica, la exposición al fluconazol y la inmunodepresión avanzada a menudo están estrechamente unidos, por lo que resulta difícil determinar cuál es realmente el responsable de la emergencia de especies resistentes. La información disponible hasta ahora es escasa, ya que apenas se han diseñado trabajos en los que éste haya sido el objetivo fundamental. Maenza *et al.*, en un artículo publicado en 1996 realizaron un estudio de casos y controles para identificar los factores de riesgo asociados con la candidiasis oroesofágica resistente al fluconazol en enfermos con infección por el VIH. Para ello se aparearon 25 sujetos con candidiasis oral que no respondieron al tratamiento con fluconazol y tenían resistencia comprobada *in vitro*, con 50 controles con candidiasis que sí respondieron. La conclusión fue que tanto el tratamiento previo con azoles como la inmunodepresión avanzada eran factores de riesgo para adquirir especies resistentes (Maenza JR *et al.*, 1996).

No obstante, dos estudios encontraron que el nivel de linfocitos CD4 no era un factor independiente de riesgo para el desarrollo de resistencia al fluconazol en el análisis multivariable, y lo que realmente reflejaba era la duración de la infección por el VIH necesaria para que existiera una adecuada exposición acumulada al fármaco, más que una relación causal (Maenza JR *et al.*, 1997, Chavanet P *et al.*, 1994). Sin embargo, si realmente los linfocitos CD4 no influyeran en la aparición de especies resistentes y sólo fuera el fluconazol el factor determinante, no se entendería por qué enfermos expuestos al fármaco con mayores cifras de CD4 no la desarrollan (Chavanet P *et al.*, 1994, Revankar SG *et al.*, 1996).

El fluconazol es un fármaco muy eficaz y con pocos efectos adversos. Es el tratamiento de elección de las infecciones orofaríngeas y esofágicas por *Candida* sp. en los enfermos con infección por el VIH y en otros inmunodeprimidos, y en la prevención de las recidivas de la criptococosis y de la esofagitis por *Candida*. Es también considerado un fármaco de primera línea para el tratamiento de la candidemia en pacientes no neutropénicos (Rex JH *et al.*, 1994), y es también muy eficaz en la candidiasis crónica diseminada, la endoftalmitis candidiásica y muchas otras infecciones superficiales y profundas producidas por *Candida* sp. Es preciso pues determinar si la utilización del fluconazol realmente induce resistencia y si hay además otros

factores que independientemente de la exposición al fármaco determinen la aparición de especies resistentes. Se necesita, además, conocer la frecuencia de cepas de *Candida* sp. resistentes al fluconazol en nuestro medio y tratar de identificar las características de los enfermos con estas cepas.



III. OBJETIVOS



PRINCIPAL:

11 Analizar los factores determinantes de la colonización e infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol en pacientes con infección por el VIH.

SECUNDARIOS:

21 Conocer la prevalencia de la colonización e infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol en pacientes con infección por el VIH.

31 Conocer la epidemiología de la colonización e infección por levaduras diferentes de *Candida albicans* en pacientes con infección por el VIH.

41 Conocer la prevalencia de infección y colonización por levaduras en la orofaringe de los enfermos con infección por el VIH de nuestro medio, y su relación con el estadio inmunitario de base y con el consumo previo de antifúngicos.

51 Conocer los factores de riesgo relacionados con la adquisición de levaduras diferentes de *Candida albicans*.

61 Conocer el papel patógeno de las levaduras diferentes de *Candida albicans* en la candidiasis orofaríngea de los enfermos con infección VIH.

71 Determinar si existe alguna relación entre el recuento de colonias obtenido en el cultivo y el estadio inmunitario evaluado por la cifra de linfocitos CD4.





IV. PACIENTES Y MÉTODOS.

1. Población estudiada

2. Diseño

3. Ambito

4. Procedimiento

4.1 Recogida de datos

4.2 Variables

4.2.1 Variables predictoras de los factores determinantes de la colonización e infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol.

4.2.2 Variable respuesta

4.5 Estimación de la prevalencia de colonización e infección orofaríngea por las diferentes especies de *Candida* y sus patrones de sensibilidad a los antifúngicos

4.4 Procedimientos de laboratorio

5. Definiciones

6. Análisis estadístico

1. POBLACIÓN ESTUDIADA

El estudio se realizó en los pacientes con infección por el VIH atendidos en el Hospital General Universitario de Elche y en el Hospital de Area de la Marina Baixa de Alicante entre julio de 1996 y enero de 1997.

2. DISEÑO

1₁ Para conocer los factores determinantes de la colonización e infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol se diseñó un estudio de casos y controles con casos prevalentes. Se consideraron casos todos los pacientes con colonización o infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol en el momento de la evaluación y controles todos los pacientes con colonización o infección orofaríngea por especies de *Candida* sensibles al fluconazol.

2₁ Para estimar la prevalencia de la colonización e infección orofaríngea por *Candida albicans* y por levaduras diferentes de *Candida albicans* en pacientes con infección por el VIH y determinar sus patrones de sensibilidad a los antifúngicos, se realizó un estudio transversal.

3. AMBITO

El Hospital General Universitario de Elche es un Hospital de Area con Servicios de Referencia, con 409 camas para una población de 250.000 habitantes. En este centro se controla periódicamente a un número aproximado de 200 pacientes con infección por el VIH. En la actualidad se ha creado una Unidad de Enfermedades Infecciosas dotada con un Hospital de Día con 6 camas, donde son seguidos los enfermos con infección por el VIH. Esta Unidad no estaba disponible cuando se realizó el estudio.

El Hospital de la Marina Baixa es un Hospital de Area de 300 camas para una población de 125.000 habitantes. Dispone desde hace 7 años de una Unidad Específica de Seguimiento para pacientes con infección por el VIH dotada con un Hospital de Día con 5 camas. En la actualidad son seguidos periódicamente en dicha Unidad cerca de 200 pacientes.

4. PROCEDIMIENTO

4.1 Recogida de datos.

Todos los enfermos con infección por el VIH que acudieron a Consultas Externas o al Hospital de Día, o que ingresaron en el Hospital durante el período de reclutamiento, que duró 2 meses en cada centro (julio-agosto 1996, Hospital de Area Marina Baixa; diciembre 1996-enero 1997, Hospital General Universitario de Elche), y voluntariamente decidieron participar en el estudio, fueron evaluados siguiendo un cuestionario estructurado.

A todos los pacientes se les efectuó una anamnesis y un examen físico. Asimismo se les extrajo en la misma visita una muestra de sangre para la determinación de las variables relacionadas con el estadio inmunológico. En todos los casos se realizó un examen de la cavidad oral y se recogió una muestra de la mucosa orofaríngea mediante frotación con una

torunda siguiendo un protocolo previamente establecido: frotación de las lesiones durante 30 segundos, y en los que no tenían lesiones, frotación secuencial de la lengua, ambas mejillas y ambas amígdalas.

En el momento de la valoración de los pacientes los resultados de los estudios microbiológicos no estaban disponibles, por lo que los investigadores no conocían quiénes eran casos y quiénes controles, lo que minimizó el sesgo de información en la recogida de datos anamnésticos. Para minimizar el sesgo de recuerdo en relación con los tratamientos antifúngicos consumidos previamente, se preguntó a todos los pacientes por los nombres genéricos y comerciales de los fármacos antifúngicos y antivirales, mostrándoles las cajas de los preparados comerciales disponibles para ayudarles a recordar.



4.2 Variables.

La hoja de recogida de datos incluía los siguientes grupos de variables:

4.2.1 Variables predictoras de los factores determinantes de la colonización e infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes al fluconazol:

a) Variables sociodemográficas: edad, sexo, grupo de riesgo, centro.

b) Variables relacionadas con la infección por el VIH: tiempo desde el diagnóstico de la infección (expresado en meses), categoría del CDC (1992), infecciones oportunistas previas o actuales, tumores o demencia. Se elaboró para ello un listado de las infecciones oportunistas más frecuentes, y se asignó un número a cada una de ellas, que se registraba en la hoja de recogida de datos, en la que se disponía de 8 apartados para las infecciones previas, y de 6 para las infecciones actuales. Sólo se registraron como infecciones oportunistas las infecciones documentadas por estudios microbiológicos o con un diagnóstico clínico-radiológico o histológico de alta probabilidad.

c) Variables relacionadas con el estadio inmunológico: linfocitos CD4, linfocitos CD8, cociente CD4/CD8, leucocitos totales, granulocitos, monocitos, IgG, IgA, IgM.

d) Variables relacionadas con el tratamiento antibiótico y antirretroviral en las 4 semanas previas a la entrevista, y con el tratamiento antirretroviral anterior, especificando el tiempo en meses que se tomó. Se codificaron por separado cada uno de los inhibidores de la transcriptasa inversa disponibles hasta ese momento (zidovudina, didanosina, zalcitabina) y las combinaciones. Se asignó un apartado a otros , en el que se incluyeron los nuevos inhibidores de la transcriptasa inversa

(estavudina y lamivudina) y los inhibidores de la proteasa, a medida que estuvieron disponibles.

e) Variables relacionadas con el consumo de fármacos para profilaxis primaria o secundaria de enfermedades oportunistas, o para el tratamiento de éstas. Para ello se elaboró una lista de los antibióticos y antivirales más frecuentes, y se asignó un número a cada uno de ellos. Esta lista incluyó, además, otros fármacos, como esteroides, inhibidores de la secreción ácida gástrica, sucralfato, acetato de megesterol, ácido acetilsalicílico, insulina, antidiabéticos orales y □ otros antibióticos □ que no se hubieran incluido en el listado. Se crearon 5 apartados específicos para el tratamiento profiláctico de infecciones oportunistas, y 8 apartados independientes para el tratamiento de las enfermedades activas o el tratamiento empírico de las enfermedades sospechadas pero no confirmadas en el momento de la evaluación. Se creó asimismo un apartado extra, de carácter binario (sí/no), para evaluar el consumo de antibióticos no relacionado con las infecciones oportunistas.

f) Antecedentes de candidiasis oral o esofágica previas, o de candidiasis recidivante.

g) Variables relacionadas con el tratamiento antifúngico previo: tratamiento continuo o intermitente con azoles y/o polienos en el año previo, fármaco/s antifúngico/s empleados/s, duración total del tratamiento antifúngico, tiempo transcurrido desde el último ciclo de tratamiento, número de ciclos y de días de tratamiento que el enfermo recordara haber tomado en los 3 últimos meses e indicación (profilaxis, tratamiento, profilaxis y tratamiento).

- Para calcular la duración del tratamiento antifúngico, se definieron los siguientes intervalos:

0= no tratamiento, 1= más de 1 año, 2= 1 año-6 meses, 3= 6 meses-1 mes, 4= menos de 1 mes.

- Para calcular el tiempo transcurrido desde el último ciclo de tratamiento, se definieron los siguientes intervalos:

0= no tratamiento, 1= menos de 7 días, 2= entre 7 y 30 días, 3= entre 30 y 90 días, 4= 90 días, 1 año, 5= más de 1 año, 6= continuo.

- Para calcular el número de ciclos de tratamiento en los 3 últimos meses, se definieron los siguientes intervalos:

0= ninguno, 1= continuo, 2= 1-3, 3= 4-6, 4= más de 6.

- Para calcular el número de días de tratamiento en los 3 últimos meses, se definieron los siguientes intervalos:

0= ninguno, 1= 1-7, 2= 8-21, 3= 22-35, 4= más de 35.

h) Variables relacionadas con los estudios micológicos: recuento de colonias en cultivo por placa.

Una vez extraída la información se recodificaron algunas de las variables para simplificar los análisis estadísticos de los datos:

1. En relación con el tratamiento antibacteriano:

1=tratamiento con tuberculostáticos, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol, claritromicina, azitromicina, pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina. 0=no tratamiento con estos fármacos.

2. En relación con el tratamiento antifúngico:

a) 1= tratamiento con fluconazol, 0= no tratamiento con fluconazol.

b) 0= no tratamiento, 1= tratamiento con cualquier antifúngico, pero nunca con fluconazol, 2= tratamiento con fluconazol más de 3 meses antes, 3= tratamiento con fluconazol en los 3 últimos meses, 4= desconocido.

c) 0= no tratamiento con antifúngicos, 1= tratamiento durante más de un mes, 2= tratamiento durante menos de 1 mes.

3. En relación con las infecciones oportunistas:

a) 0=no infecciones oportunistas, 1=neumonía por *Pneumocystis carinii*, 2=tuberculosis, 3=otras infecciones oportunistas.

b) 0=no infecciones, 1= cualquier infección oportunista, 2=desconocido.

4.2.2 Variable respuesta:

Presencia de colonización o infección orofaríngea por especies de *Candida* resistentes a los azoles: enumeración de las especies aisladas en el cultivo orofaríngeo, sensibilidad al fluconazol de cada una de estas especies.

4.3 Estimación de la prevalencia de colonización e infección orofaríngea por las diferentes especies de *Candida* y sus patrones de sensibilidad a los antifúngicos

-Se describió la proporción de pacientes con colonización e infección orofaríngea por las diferentes especies de *Candida* y sus patrones de sensibilidad a los antifúngicos

4.4 Procedimientos de laboratorio.

Las muestras obtenidas se sembraron de forma inmediata sobre placas de Agar dextrosa Sabouraud^R con cloramfenicol, y fueron incubadas a 30 grados. La siembra se hizo sobre

toda la superficie de la placa para permitir un recuento de las colonias, haciéndose una valoración semicuantitativa: incontables ($>10^3$ colonias); > 100 (entre 10^2 y 10^3); y número de colonias hallado (<100)

Para la identificación de las especies se empleó el test de filamentación y el sistema API 20 C AUX^R (BioMerieux, Craponne Francia). Se estudiaron por separado todas las colonias que presentaban diferente morfología. En caso de morfotipo único, se seleccionaron al azar 3-5 colonias para su estudio.

Para la determinación de la sensibilidad al fluconazol se utilizó el método de microdilución siguiendo las recomendaciones del NCCLS (NCCLS, 1995). Las diluciones del antifúngico se realizaron con el medio RPMI 1640 tamponado con MOPS 0.165 M y pH=7.0, partiendo de la preparación intravenosa (Diflucán^R) a concentración 2000 mcg/ml. Se preparó una solución stock de 640 mcg/ml, que se dispuso en alícuotas de 4 ml y se mantuvo congelada a -70° C hasta su uso. Para el ensayo se hicieron diluciones seriadas siguiendo un esquema preestablecido, de manera que las concentraciones finales en los pocillos fueran de 64 mcg/ml a 0.125 mcg/ml, dispensándose 100 μ l del fármaco con una pipeta multicanal, depositándose en el pocillo 1 la concentración más alta y en el 10 la más baja, y reservándose los pocillos 11 y 12 de cada fila para los controles de crecimiento y esterilidad.

Se empleó un inóculo estandarizado por espectrofotometría partiendo de una suspensión ajustada a 0.5 de Mc Farland ($1 \times 10^6 - 5 \times 10^6 \mu$ /c/ml). Se diluyó al 1:10 en RPMI 1640 y se añadieron 10 μ l a cada uno de los pocillos, excepto en la fila 12 (control de esterilidad). Se utilizaron placas microtiter de 96 pocillos y fondo plano. Las placas preparadas se mantuvieron selladas a -70° C hasta su uso, salvo aquéllas que se utilizaron en las siguientes 24-48 horas de su preparación, que se conservaron refrigeradas a 4-6°C.

Las microplacas se incubaron a 35°C y se leyeron a las 24 y 48 horas, después de una breve agitación de las mismas. El crecimiento en cada pocillo fue comparado con el pocillo control

(sin antifúngico) y se usó una numeración para la lectura de la siguiente manera: 0, sin turbidez; 1, ligeramente turbio; 2, clara disminución en la turbidez (aproximadamente del 50%); 3, ligera reducción en la turbidez; 4, sin reducción en la turbidez. Se consideraron concentración mínima inhibitoria (CMI) las menores concentraciones que resultaron en una ligera turbidez (puntuación 1).

Se siguieron las recomendaciones del NCCLS sobre los límites en la CMI para el fluconazol para la definición de sensibilidad, sensibilidad dependiendo de la dosis y resistencia (Rex 1997). Estos puntos de corte se basan en extrapolaciones de candidiasis orofaríngea producida por *C. albicans*. La correlación *in vivo-in vitro* para otras especies de *Candida* aún no está bien definida.

5. DEFINICIONES.

Colonización orofaríngea: aislamiento de *Candida* sp. de alguna muestra de la orofaringe, sin lesiones orofaríngeas en el examen físico.

Infección orofaríngea: aislamiento de *Candida* sp. de alguna muestra de la orofaringe con lesiones típicas de candidiasis en el examen físico (placas blanquecinas que al desprenderse dejan una superficie eritematosa).

Sensibilidad al fluconazol: Se siguieron las recomendaciones recientes del NCCLS sobre los puntos de corte en las CMI al fluconazol, y se clasificaron las especies/cepas de la siguiente forma (Rex 1997):

Sensible: $CMI \leq 8 \text{ mcg/mL}$

Sensible dependiendo de la dosis: $CMI = 16-32 \text{ mcg/mL}$

Resistente: $CMI > 64 \text{ mcg/mL}$

6. ANALISIS ESTADÍSTICO.

Los datos fueron introducidos en el programa DBASE que permite la creación de una base de datos. Para la comparación de medias de los valores numéricos obtenidos en cada variable continua se empleó la *t* de Student. En los casos en los que fue necesario -por heterogeneidad de las variables o por no normalidad- se empleó el test de Mann-Witney para la comparación entre medias. Para la comparación de proporciones se empleó Ji al cuadrado.

La magnitud y precisión de las asociaciones investigadas se determinaron mediante la *odds ratio* (OR) y sus intervalos de confianza al 95%. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas Epi-Info Versión 6 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EE.UU.) y SPSS (versión 6.0.1, Chicago, Illinois, EE.UU.)

Para controlar la existencia de factores de confusión se efectuó un modelo multivariable de regresión logística no condicional. En primer lugar se realizó un análisis por el procedimiento stepwise para explorar las variables que mejor predicen la presencia de resistencia al fluconazol desde el punto de vista estadístico. Con estas variables y aquellas que la literatura y en general el conocimiento previo han relacionado con la resistencia, se construyó un modelo paso a paso hasta llegar al que mejor ajuste mostró.

El análisis multivariable se efectuó con el programa estadístico EGRET.



V-RESULTADOS

1. Características de los pacientes

- 1.1 Características generales de los pacientes
- 1.2 Tratamiento antifúngico
- 1.3 Colonización e infección por *Candida* sp.

2. Estudios microbiológicos

- 2.1 Recuento de colonias
- 2.2 Distribución de los aislamientos
- 2.3 Sensibilidad al fluconazol

3. Factores asociados con la colonización e infección por levaduras diferentes de *Candida albicans*

4. Factores asociados con la colonización e infección por especies de *Candida* resistentes al fluconazol

- 4.1 Características clínicas de los enfermos
- 4.2 Consumo de fármacos
- 4.3 Exposición a antifúngicos

5. Factores determinantes de la colonización e infección por levaduras resistentes

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

1.1 Características generales de los pacientes

Durante el período de tiempo que duró el estudio se evaluaron 179 pacientes, de los que 174 se incluyeron en el análisis de los datos. En el momento de la recogida de la muestra, 28 pacientes (16%) tenían candidiasis oral y en 21 pacientes (12%) el cultivo fue negativo (**fig. 1**).

Las características demográficas y clínicas de los sujetos del estudio se resumen en la tabla 1 y en las **fig. 2** y **fig. 3**. Como muestra la tabla, el factor de riesgo más frecuente para la adquisición de la infección por el VIH fue el uso de drogas por vía parenteral, seguido por la práctica homosexual. Un 35% de los enfermos fueron incluidos en la categoría A del Centers for Disease Control (CDC), es decir, estaban asintomáticos. El 10% de los enfermos tenía una cifra de linfocitos CD4 mayor de 500 c/s/mm³, el 52% inferior a 200 c/s/mm³ y un 28% <50 c/s/mm³.







Tabla1. Características demográficas y clínicas de los pacientes.

Variable	Total pac. (n=174) (%)	Infectados (n=28) (%)	Colonizados (n=125) (%)	Cultivo (-) (n=21) (%)	P
Sexo,					
Varones	142 (82)	23 (82)	103 (82)	16 (76)	NS
Mujeres	32 (18)	5 (18)	22 (18)	5 (24)	
Edad					
Mediana	34	33	34	33	NS
Rango	23-67	24-67	24-61	23-55	
Grupo de riesgo					
UDVP	90 (52)	19 (68)	62 (50)	9 (43)	NS
Homosexual	37 (21)	4 (14)	29 (23)	4 (19)	
Heterosexual	31 (18)	4 (14)	23 (18)	4 (19)	
Transfusión	5 (3)	0	3 (2)	1 (5)	
Otro	11 (6)	1 (4)	7 (6)	3 (14)	
Tiempo evolución de la infección VIH (meses)					
Mediana	51	51	51	48	NS
Rango	0-198	0-198	1-120	1-132	
Nº CD4 (cel/mm ³)					
Mediana	178	28	210	275	<0.001*
Rango	2-840	2-840	3-734	12-752	
Categoría del CDC [^]					
A	61 (35)	0	52 (42)	9 (43)	0.0003
B	37 (21)	7 (25)	26 (21)	4 (19)	
C	75 (43)	21 (75)	46 (37)	8 (38)	
Desconocida	1 (0,5)	0	1 (0,8)	0	

* Diferencia significativa entre el grupo de pacientes colonizados e infectados

Pac.= pacientes

UDVP= usuarios de drogas por vía parenteral

CDC= Centers for Disease Control

[^] Categoría A=asintomático o infección primaria. B=muguet, leucoplasia vellosa oral, displasia o CIS cervical uterina, angiomatosis bacilar, Herpes Zoster recurrente o multimetamérico. C=infección oportunista que define sida

NS= no significativo



El 24% de los pacientes tenía alguna infección oportunista en el momento de la evaluación (tabla 2). La más frecuente fue la tuberculosis, seguida por el sarcoma de Kaposi. Entre las infecciones oportunistas anteriores, también la tuberculosis fue la más frecuente, y a continuación la neumonía por *Pneumocystis carinii*. Un 84% de los pacientes estaba siendo tratado con antirretrovirales, de los que el más consumido fue la zidovudina. Entre las combinaciones, la más frecuente fue la de zidovudina y zalcitabina (tabla 2). En los pacientes tratados con la combinación de zidovudina y didanosina había una proporción menor de infección orofaríngea por *Candida* sp. ($P=0.05$). Sólo 14 enfermos estaban siendo tratados con inhibidores de la proteasa, 10 de ellos con saquinavir.



Tabla 2. Infecciones oportunistas y tratamiento antirretroviral de los pacientes.

Variable	Total pac. (n=174) (%)	Infectados (n=28) (%)	Colonizados (n=125) (%)	Cultivo (-) (n=21) (%)	P
Infección oportunista previa	81 (47)	23 (82)	49 (39)	9 (43)	<0.0001*
Tuberculosis					
Neumonía por PC	30 (17)	9 (32)	17 (14)	4 (19)	
Neumonía bacteriana	20 (12)	5 (18)	12 (11)	3 (14)	
	14 (8)	7 (25)	6 (5)	1 (5)	
Infección oportunista actual	42 (24)	11 (39)	28 (22)	3 (14)	0.2
Tuberculosis					
Sarcoma de Kaposi	11 (6)	3 (11)	8 (6)	0	
Neumonía por PC	8 (5)	2 (7)	5 (4)	1 (5)	
	5 (3)	3 (11)	2 (2)	0	
Tratamiento antirretroviral**					
AZT***	139 (84)	18 (64)	103 (82)	18 (86)	0.07
DDI***	122 (70)	11 (39)	95 (76)	16 (76)	0.0005*
DDC***	47 (27)	6 (21)	34 (27)	7 (33)	NS
AZT+DDC	74 (43)	7 (25)	58 (46)	9 (43)	0.03*
AZT+DDI	57 (33)	6 (21)	43 (34)	8 (38)	0.4
AZT+estavudina	37 (21)	1 (4)	30 (24)	6 (29)	0.05
DDI+estavudina	2 (1)	1 (4)	1 (1)	0	NP
AZT+DDC+saquinavir	1 (0.6)	1 (4)	0	0	NP
AZT+DDI+saquinavir	9 (5)	0	9 (7)	0	NP
AZT+DDC+ritonavir	1 (0.6)	1 (4)	0	0	NP
AZT+DDI+ritonavir	3 (2)	1 (4)	2 (2)	0	NP
	1 (0.6)	0	1 (1)	0	NP

Pac.= pacientes

PC= *Pneumocystis carinii*

AZT= zidovudina, DDI= didanosina, DDC= zalcitabina.

NS= no significativo

NP= no procede

* Diferencia significativa entre el grupo de pacientes colonizados e infectados

** Incluye tratamiento en las 4 semanas previas a la evaluación

*** Incluye todos los enfermos en los que se empleó el fármaco sólo o en combinación

1.2 Tratamiento antifúngico

El 54% de los pacientes había sido tratado con algún antifúngico (**fig. 3**). El más frecuentemente empleado fue el fluconazol, y a continuación la nistatina (tabla 3, **fig. 4**). El 24% de los pacientes había recibido más de 30 dosis del antifúngico. La mayoría de los tratamientos se habían efectuado en pautas intermitentes para erradicar los episodios de infección orofaríngea, y en un 15% de los casos se había empleado un régimen continuo de profilaxis secundaria (**fig. 5** y **fig. 6**).



Tabla 3. Características del tratamiento antifúngico recibido por los pacientes.

Variable	Total pacientes (n=174) (%)	Infectados (n=28) (%)	Colonizados (n=125) (%)	Cultivo negativo (n=21) (%)	P
Tratamiento antifúngico					
Cualquier azólico	90 (54)	24 (86)	57 (46)	9 (43)	<0.001
Fluconazol	78 (45)	23 (83)	48 (39)	7 (33)	<0.001
Ketoconazol	72 (41)	23 (83)	42 (33)	7 (33)	<0.001
Itraconazol	18 (10)	7 (25)	11 (9)	0	0.009
Nistatina	6 (3)	3 (11)	3 (2)	0	0.06
Anfotericina	45 (26)	9 (32)	29 (23)	7 (33)	0.4
	7 (4)	3 (11)	4 (3)	0	0.009
Exposición a los antifúngicos					
> 1 año	6 (4)	3 (11)	3 (2)	0	0.26
1 año-6 meses	14 (8)	6 (21)	6 (4)	2 (10)	
6 meses-1 mes	21 (12)	4 (14)	17 (14)	0	
< 1 mes	47 (27)	11 (39)	29 (23)	7 (33)	
Indicación					
Profilaxis	15 (15)	7 (25)	7 (6)	1 (5)	0.08
Infección	75 (43)	19 (68)	49 (39)	7 (33)	
Profilaxis+Infección	2 (7)	1 (4)	0	0	







El recuento de linfocitos CD4 en los enfermos tratados y no tratados se expone en la **fig. 7**.

1.3 Colonización e infección por *Candida* sp.

La cifra de linfocitos CD4 fue significativamente más baja en los pacientes infectados (mediana de 28 cls/mm^3) que en los colonizados (mediana de 210 cls/mm^3) ($P < 0.0001$) (tabla 1). El 75% de los pacientes infectados estaban incluidos en la categoría C del CDC, frente a sólo un 37% de los pacientes colonizados ($P = 0.0003$). Una proporción mayor de los enfermos infectados había tenido infecciones oportunistas previas ($P < 0.0001$), aunque no hubo diferencias en la infecciones oportunistas activas en el momento de la evaluación (tabla 2). La tuberculosis fue en ambos casos la infección oportunista más frecuente en los enfermos colonizados y en los infectados.

La infección orofaríngea por especies de *Candida* se asoció también de forma significativa con una cifra inferior de leucocitos totales y de monocitos (tabla 4), con un menor consumo de AZT, DDC, y AZT+DDC (tabla 3) y con un mayor consumo de antibióticos, de tuberculostáticos y de fármacos para la

profilaxis frente a *Pneumocystis carinii* (tabla 5).



Tabla 4. Algunos de los parámetros hematológicos en los pacientes colonizados e infectados.

Variable	Colonizados N=125	Infectados N=28	P
Leucocitos			
Mediana	4565	3935	0.04
Rango	700-37300	999-8800	
Neutrófilos			
Mediana	2350	2500	NS
Rango	300-33000	570-8000	
Monocitos			
Mediana	490	300	0.007
Rango	50-2600	70-700	
IgG			
Mediana	1920	1771	NS
Rango	935-6950	786-6381	
IgA			
Mediana	333	264	NS
Rango	75-1000	147-1060	
IgM			
Mediana	173	130	NS
Rango	37-1689	37-430	

Tabla 5. Algunos de los fármacos recibidos por los pacientes colonizados e infectados.

Variable	Colonizados N=125 (%)	Infectados N=28 (%)	P
Antibióticos*	22 (18)	10 (36)	0.03
Tuberculostáticos [^]	11 (8)	7 (25)	0.02
Profilaxis NPC			
TMP-SMZ	57 (45)	16 (57)	
Pentamidina	17 (14)	6 (21)	0.03
No profilaxis	51 (41)	6 (21)	

*Incluye tratamiento en las 2 semanas previas a la evaluación. Excluye el tratamiento de alguna infección oportunista, salvo neumonía.

[^]Isoniacida y rifampicina, con o sin pirazinamida o etambutol.

NPC= neumonía por *Pneumocystis carinii*

TMP-SMZ: trimetoprim sulfametoxazol



Cuando se comparó el grupo de pacientes colonizados con los que tenían el cultivo negativo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la cifra de linfocitos CD4, leucocitos totales, neutrófilos, monocitos ni inmunoglobulinas entre ambos grupos (tabla 6).



Tabla 6. Algunos parámetros hematológicos en los enfermos colonizados y en los que tenían el cultivo negativo .

Variable	Colonizados	Cultivo negativo	P
Nº CD4 (cel/mm ³)			
Mediana	210	275	0.2
Rango	3-734	12-752	
Leucocitos			
Mediana	4600	5765	0.1
Rango	700-37300	2000-11800	
Neutrófilos			
Mediana	2350	3035	0.1
Rango	300-33000	600-8600	
Monocitos			
Mediana	490	530	0.8
Rango	50-2600	100-1800	
IgG			
Mediana	1920	1690	0.3
Rango	935-6950	1240-2719	
IgA			
Mediana	333	249	0.3
Rango	75-1000	75-559	
IgM			
Mediana	173	177	0.7
Rango	37-1689	77-665	

En los enfermos con infección orofaríngea, el consumo de antifúngicos, y en concreto de fluconazol, fue significativamente superior al de los enfermos colonizados ($P < 0.001$ en ambos casos). También fue significativamente superior el consumo global de fármacos azólicos en los pacientes infectados que en los pacientes colonizados ($P < 0.001$) (tabla 3). Un 32% de los enfermos con candidiasis había estado expuestos más de 6 meses al fluconazol frente al 10% de los enfermos colonizados ($P = 0.17$). En los pacientes con infección orofaríngea se utilizaron los antifúngicos en pauta continua para profilaxis secundaria en el 25% de los casos, frente a un 6% en los pacientes

colonizados y un 5% en los pacientes con cultivo negativo ($P=0.08$).

2. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS

2.1 Recuento de colonias.

En un 45% de los enfermos el número de colonias por placa fue inferior a 100 y en el 20% superior a 1000 (tabla 7). Los pacientes con candidiasis orofaríngea tuvieron un recuento mayor de colonias que los pacientes colonizados ($P<0.001$). Los enfermos con un mayor número de colonias tuvieron con más frecuencia antecedentes de candidiasis oral ($P=0<0.001$), candidiasis esofágica ($P=0.02$), o candidiasis recidivante ($P=0.0004$). También tuvieron más infecciones oportunistas en el momento de la evaluación ($P<0.001$) y la cifra mediana de linfocitos CD4 fue más baja que en los enfermos en los que el recuento de colonias fue menor ($P=0.004$) (tabla 8).

Cuando se excluyeron los enfermos infectados, persistió una cifra más baja de linfocitos CD4 en los pacientes con el mayor número de colonias en el cultivo ($P=0.002$), así como una mayor frecuencia de infecciones orales recidivantes por *Candida* ($P=0.006$) y de infecciones oportunistas anteriores o presentes en el momento de la evaluación ($P<0.001$) (tabla 9).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de especies resistentes en relación con el recuento de colonias por placa, independientemente de que se incluyeran o no los enfermos con candidiasis oral en el análisis.

Tabla 7. Relación entre el recuento de colonias por placa de los enfermos y la candidiasis oral.

Recuento de colonias/placa	<100 N=78	100-1000 N=40	>1000 N=35	P
Enfermos colonizados	72 (58)	33 (26)	20 (16)	<0.001
Enfermos infectados	6 (21)	7 (25)	15 (54)	
Candidiasis oral previa				<0.001
Sí	30 (38)	27 (68)	27 (77)	
No	46 (59)	13 (32)	8 (23)	
Desconocido	2 (3)	0	0	
Candidiasis esofágica previa				0.02
Sí	6 (8)	3 (8)	9 (26)	
No	61 (78)	33 (82)	19 (54)	
Desconocido	19 (14)	4 (10)	7 (20)	
Candidiasis oral recidivante				<0.001
Sí	18 (23)	16 (40)	23 (66)	
No	58 (74)	24 (60)	11 (31)	
Desconocido	2 (3)	0	1 (3)	



Tabla 8. Relación entre el recuento de colonias por placa de los enfermos y la existencia de infecciones oportunistas, algunas variables hematológicas y CMI de las especies.

Recuento de colonias/placa	<100 N=78	100-1000 N=40	>1000 N=35	P
Infección oportunista previa				<0.001
Sí	31 (40)	14 (35)	27 (77)	
No	47 (60)	26 (65)	8 (23)	

Infección oportunista actual				
Sí	10 (13)	9 (22)	14 (40)	0.35
No	64 (82)	30 (75)	20 (57)	
Desconocido	4 (5)	1 (3)	1 (3)	
Nº CD4(cfs/mm³)				
Mediana	186	243	49	0.004
Rango	4-840	5-700	2-63	
Leucocitos (x10⁶/L)				
Mediana	4735	4565	3935	0.2
Rango	700-11800	1400-8800	1140-37300	
Neutrófilos (x10⁶/L)				
Mediana	2400	2160	2500	0.4
Rango	300-8800	570-8000	700-33000	
Monocitos (x10⁶/L)				
Mediana	500	450	400	0.1
Rango	50-2600	110-2360	90-1400	
CMI fluconazol (mcg/mL)				
>=64	9 (12)	3 (8)	7 (21)	0.2
<64	68 (88)	37 (82)	27 (79)	



Tabla 9. Características de los enfermos en relación con el recuento de colonias por placa, excluyendo a los infectados.

Recuento de colonias/placa	Cultivo (-) N=21	<100 N=72	100-1000 N=33	>1000 N=20	P
N1 CD4 (cls/mm ³)					
Mediana	275	195	266	116	
Rango	12-752	4-734	5-700	3-630	
Candidiasis oral previa					
Sí	8 (38)	26 (36)	20 (61)	12 (60)	0.1
No	13 (62)	45 (63)	13 (39)	8 (40)	
Desconocido	0	1 (1)	0	0	
Candidiasis esofágica previa					
Sí	1 (5)	5 (7)	0	4 (20)	0.17
No	17 (81)	59 (82)	30 (91)	13 (65)	
Desconocido	3 (14)	8 (11)	3 (9)	3 (15)	
Candidiasis recidivante					
Sí	2 (9)	15 (21)	10 (30)	12 (60)	0.006
No	18 (86)	56 (78)	23 (70)	8 (40)	
Desconocido	1 (5)	1 (1)	0	0	
Infección oportunistas previa					
Sí	9 (43)	27 (37)	9 (27)	13 (65)	<0.001
No	12 (57)	45 (63)	24 (73)	7 (35)	
Infección oportunistas actual					
Sí	2 (9)	8 (11)	6 (18)	9 (45)	<0.001
No	18 (86)	60 (83)	26 (79)	11 (55)	
Desconocido	1 (5)	4 (6)	1 (3)	0	
Leucocitos					
Mediana	5765	4735	4565	3935	0.1
Rango	2000-11800	700-11800	1400-8800	11400-37300	
Neutrófilos					
Mediana	3035	2400	2160	2500	0.2
Rango	600-8600	300-8800	570-8000	700-33000	
Monocitos					
Mediana	530	500	450	400	0.2
Rango	100-1800	50-260	110-2360	90-1400	
CMI fluconazol					
≥64	0	7 (10)	1 (3)	2 (11)	0.3
<64	21	64 (90)	32 (97)	17 (89)	

2.2 Distribución de los aislamientos.

En un 88% de los pacientes (n=153) crecieron una o varias especies de levaduras en el cultivo del frotis oral (tabla 10). Se aislaron un total de 168 cepas. En 121 enfermos (79%) creció *Candida albicans* en cultivo puro; en 2 de ellos se identificaron 2 cepas diferentes de *C. albicans*. Se aislaron levaduras diferentes de *C.*

albicans (LDCA) en 32 pacientes (21%), en 19 de ellos en cultivo puro. La especie de LDCA más frecuente fue *C glabrata* (n=15), que supuso un 45% de las LDCA, seguida de *C. inconspicua* en un 18% de los casos y *C. tropicalis* en el 13% (**fig. 8**, tabla 10). En total, en 13 enfermos (8%) se identificaron dos levaduras diferentes en el cultivo, en 11 de ellos (7%) se trataba de un cultivo mixto de *C. albicans* y una LDCA, y en los dos restantes se identificaron dos especies distintas de LDCA.



Tabla 10. Distribución de las levaduras aisladas en los pacientes colonizados e infectados.

Microorganismo	Total N (%)	Pacientes colonizados N (%)	Pacientes infectados N (%)
<i>C. albicans</i>	121(70)	100 (81)	21 (75)
Levaduras diferentes de <i>Candida albicans</i> :	32 (18)	25 (19)	7 (25)
<i>C. glabrata</i>	12 (6)	8 (6)	4 (14)
<i>C. inconspicua</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>C. tropicalis</i>	1 (0.5)	0	1 (4)
<i>C. famata</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>Geotrichum penicillatum</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>Cryptococcus albidus</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 (1)	2 (2)	0
<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	3 (2)	3 (2)	0
<i>C. albicans</i> y <i>C. inconspicua</i>	3 (2)	3 (2)	0
<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	2 (2)	1 (0.8)	1 (4)
<i>C. albicans</i> y <i>C. sphaerica</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>C. albicans</i> y <i>C. krusei</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i>	1 (0.5)	0	1 (4)
<i>C. inconspicua</i> y <i>C. glabrata</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0
<i>C. inconspicua</i> y <i>S. cerevisiae</i>	1 (0.5)	1 (0.8)	0

2.3 Sensibilidad al fluconazol

La sensibilidad al fluconazol se expone en la **fig. 9** y en la tabla 11. Un 11% de las especies de *Candida* (n=19) fueron resistentes al fluconazol (CMI mayor o igual a 64 mcg/mL), y un 6% se clasificaron como □sensibles dependiendo de la dosis□ de fluconazol (CMI entre 16 y 32 mcg/mL). Globalmente hubo un 17% de pacientes en quienes se aisló al menos una especie de *Candida* con sensibilidad disminuida al fluconazol según la nueva clasificación del NCCLS (CMI>8 mcg/mL) y un 12% con alguna especie resistente.



Tabla 11. Sensibilidad al fluconazol de las levaduras aisladas en pacientes colonizados y en pacientes infectados (*Candida albicans* frente a LDCA)

CMI fluconazol (mcg/mL)	CANDIDA ALBICANS			LDCA		
	Colonizados (%) (n=100)	Infectados (%) (n=21)	Total (%) (n=121)	Colonizados (%) (n=25)	Infectados (%) (n=7)	Total (%) (n=32)
<=8	95 (95)	16 (76)	111 (92)	9 (36)	2 (29)	11 (35)
16-32	0	1 (5)	1 (0,8)	9 (36)	0	9 (28)
>=64	5 (5)	4 (19)^	9 (7)	5 (20)*	5 (71)^**	10 (31)***
Desconoc.	0	0	0	2 (8)	0	2 (6)

CMI= concentración mínima inhibitoria.

LDCA= levaduras diferentes de *C. albicans*

^P=0,0007 para la comparación entre la proporción global de especies resistentes en los pacientes infectados frente a los pacientes colonizados.

* P=0,0068 para la comparación de especies resistentes de LDCA con especies resistentes de *C. albicans* en pacientes colonizados.

**P=0.01 para la comparación de especies resistentes de LDCA con especies resistentes de *C. albicans* en pacientes infectados

*** P=0,0001 para la comparación global de especies resistentes de LDCA con especies resistentes de *C. albicans*.

Las CMI de las LDCA fueron superiores a las de *C. albicans* (tabla 11 y **fig. 10**). La proporción de especies resistentes entre las LDCA fue del 31%, y del 7% en *C. albicans* ($P < 0.001$). La sensibilidad de cada una de las LDCA se expone en la tabla 12. La CMI₅₀ (CMI para el fluconazol del 50% de las cepas) fue de 16 mcg/mL (0.25-128) para las LDCA, y de 0.25 mcg/mL (0.125-128) para *C. albicans*. Las CMI₉₀ (CMI para el fluconazol del 90% de las cepas) fueron 128 mcg/mL y 8 mcg/mL respectivamente ($p = 0.0054$).

Tabla 12. Sensibilidad al fluconazol de las diferentes especies

Especie (n° de cepas)	CMI ₅₀ fluconazol (mcg/mL) (rango)
<i>C. albicans</i>	0.25 (0.125-128)
LDCA	16 (0.25-128)
<i>C. glabrata</i> (n=15)	32 (0.25-128)
<i>C. inconspicua</i> (n=6)	32 (16-64)
<i>C. tropicalis</i> (n=4)	64 (0.5-128)
<i>S. cerevisiae</i> (n=4)	4 (2-8)
<i>C. sphaerica</i> (n=1)	0.25
<i>C. krusei</i> (n=1)	64
<i>C. albidus</i> (n=1)	1
<i>G. penicillatum</i> (n=1)	2

LDCA= levaduras diferentes de *Candida albicans*
CMI= concentración mínima inhibitoria.



Las **fig. 11** y **fig. 12** y la tabla 11 reflejan las CMI al fluconazol de *C. albicans* y las LDCA, separando los enfermos colonizados de los infectados. En ellas se pone de relieve el mayor porcentaje global de especies con sensibilidad disminuida (CMI=16-32 mcg/ml) o resistentes (CMI>=64 mcg/ml) entre las LDCA (P=0.0001 en el último caso) . Cuando se analizaron por separado los enfermos colonizados, se comprobó que la proporción de especies resistentes era significativamente superior en las LDCA (P=0.0068) (tabla 11). Lo mismo sucedió cuando se analizaron por separado los enfermos infectados (P=0.01). La proporción de enfermos colonizados e infectados por especies sensibles fue similar en los enfermos con *C. albicans* y LDCA, y también lo fue la proporción de enfermos colonizados e infectados por especies resistentes





3. FACTORES ASOCIADOS CON LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR LEVADURAS DIFERENTES DE *CANDIDA ALBICANS*

En el análisis univariable, no hubo diferencias en las características demográficas de los pacientes en los que se aisló *C. albicans* y en los que se aisló alguna LDCA en el cultivo (tabla 13). Los enfermos con LDCA tuvieron con más frecuencia infecciones oportunistas previas o actuales ($P=0.005$ y 0.001 respectivamente), y habían tenido en más ocasiones candidiasis oral previa y candidiasis recidivante que los enfermos en los que sólo se identificó *C. albicans* ($P=0.05$ y 0.04 respectivamente) (tablas 14 y 15). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de pacientes con candidiasis oral en el momento de la evaluación en los enfermos con LDCA o con *C. albicans* (22% frente a 17% respectivamente).



Tabla 13. Características demográficas de los pacientes con levaduras diferentes de *Candida albicans* en comparación con *Candida albicans*

Variable	LDCA (%) N=32	<i>C. albicans</i> (%) N=121	P
Sexo			
Varón	25 (78)	101 (83)	0.5
Edad			
Media ± DE	36 ±7.9	35 ±7.4	0.72
Mediana	33.5	34	
Rango	26-58	24-67	
Grupo de riesgo			
UDVP	18 (56)	62 (51)	
Homosexual	6 (19)	27 (22)	0.35
Heterosexual	6 (19)	21 (17)	
Otro/desconoc	2 (6)	11 (9)	
Tiempo desde diagnóstico de la infección por el VIH			
Media ± DE	59.6 ±40	57.6 ±38	0.85
Mediana*	49	52	
Rango	0-132	1-198	

* En meses. DE= desviación estándar

LDCA= levaduras diferentes de *Candida albicans*

UDVP= usuarios de drogas por vía parenteral

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes con LDCA

Variable	LDCA N=32 (%)	<i>C. albicans</i> N=121 (%)	P
Categoría			
A	7 (22)	45 (37)	
B	5 (16)	28 (23)	0.1
C	20 (63)	47 (39)	
Infecciones oportunistas previas	Sí		
	22 (69)	50 (41)	0.005
	No	71 (59)	
Infecciones oportunistas actuales	Sí		
	15 (47)	24 (20)	0.001
	No	97 (80)	
Tratamiento			
Antirretroviral			
Cualquiera	94 (78)	27 (84)	
AZT+DDC	45 (37)	14 (44)	0.3
AZT+DDI	27 (22)	6 (19)	
IP	10 (8)	3 (9)	

LDCA= levaduras diferentes de *Candida albicans*

Categoría A=asintomático o infección primaria. B=muguet, leucoplasia vellosa oral, displasia o CIS cervical uterina, angiomas bacilar, Herpes Zoster recurrente o multimetamérico. C=infección oportunista que define sida

AZT= zidovudina, DDI= didanosina, DDC= zalcitabina, IP= inhibidores de la proteasa

Tabla 15. Variables relacionadas con la existencia previa o actual de candidiasis oroesofágica en enfermos con levaduras diferentes de *Candida albicans*

Variable	LDCA N=32 (%)	<i>C. albicans</i> N=121 (%)	OR (IC 95%)	P
Candidiasis oral	7 (22)	21 (17)	0.75 (0.26-2.2)	0.75
Candidiasis oral previa	23 (72)	61 (50)	0.4 (0.16-1.04)	0.05
Candidiasis esofágica previa	6 (19)	12 (10)	0.35 (0.1-1.25)	0.06
Candidiasis recidivante	17 (53)	40 (33)	0.42 (0.17-1.01)	0.04
Candidiasis en la pareja	3 (9)	14 (12)	1.37 (0.3-6.5)	0.4

DE= desviación estándar

OR= odds ratio

IC= intervalo de confianza

LDCA= levaduras diferentes de *Candida albicans*

La cifra mediana de linfocitos CD4 en los pacientes con LDCA fue de 66 cels/mm³, frente a 195 cels/mm³ en los que sólo se aisló *C. albicans* (P= 0.009) (tabla 16). Cuando se analizó exclusivamente el grupo de pacientes colonizados, la mediana de CD4 en los que tenían LDCA fue de 93 cels/mm³ frente a 245 cels/mm³ en los que sólo se aisló *C. albicans* (P=0.02). No se encontraron diferencias en la cifra de leucocitos totales, neutrófilos, monocitos ni en las de IgG, IgA o IgM.

Tabla 16. Variables relacionadas con el estadio inmunológico en los enfermos con levaduras diferentes de *Candida albicans*

Variable	LDCA N=32	<i>C. albicans</i> N=121	P
Nº CD4			
Media ± DE	140±168	234±206	0.009
Mediana	66	195	
Rango	3-700	2-840	
CD4/CD8			
Media ± DE	0.18±0.2	0.25±0.2	0.02
Mediana	0.1	0.2	
Rango	0.01-0.7	0.02-1.0	
Neutrófilos			
Media ± DE	3900± 5717	2625±1358	0.78
Mediana	2450	2400	
Rango	700-33000	300-8000	
Monocitos			
Media ± DE	477±286	574±462	0.49
Mediana	470	465	
Rango	100-11400	50-2600	
IgG			
Media ± DE	2055±715	2031±1038	0.58
Mediana	1910	1860	
Rango	786-6950	786-6950	
IgA			
Media ± DE	375±266	349±197	0.92
Mediana	306	297	
Rango	75-1000	80-1060	
IgM			
Media ± DE	229±173	217±233	0.53
Mediana	174	165	
Rango	52-767	37-1689	

DE= desviación estándar

LDCA= levaduras diferentes de *Candida albicans*

De los 32 pacientes con LDCA, 10 (31%) no habían estado expuestos previamente a ningún antifúngico (tabla 17). La mediana de linfocitos CD4 en estos enfermos fue de 317/mm³ (60-700). El 56% de los pacientes con LDCA habían estado expuestos al fluconazol, en comparación con el 39% de aquéllos en los que sólo se aisló *C. albicans* (OR 0.49, IC 0.21-1.17, P=0.1). No se encontraron tampoco diferencias significativas en la exposición a otros antifúngicos azólicos. Los enfermos con LDCA habían recibido

con mayor frecuencia antifúngicos poliénicos (P=0.03).

Tabla 17. Tratamiento antifúngico previo a la entrada en el estudio en enfermos con LDCA.

Característica	LDCA N=32	<i>C. albicans</i> N=121	P
Tratamiento antifúngico	22 (69)	61 (51)	0.07
Cualquier azólico	19 (59)	52 (43)	0.09
Fluconazol	18 (56)	47 (39)	0.1
Ketoconazol	4 (13)	14 (12)	0.8
Itraconazol	1 (3)	5 (4)	0.7
Nistatina	12 (38)	26 (22)	0.06
Anfotericina B	2 (6)	5 (4)	0.6
Cualquier polieno	14 (44)	30 (25)	0.03

LDCA= levaduras diferentes de *Candida albicans*

4. FACTORES ASOCIADOS A LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR ESPECIES DE *CANDIDA* RESISTENTES AL FLUCONAZOL

4.1 Características clínicas de los enfermos.

En el análisis univariable, no se encontraron diferencias significativas en la distribución por edad, sexo o grupo de riesgo entre los enfermos con especies sensibles y resistentes (tabla 18).

Tabla 18. Características demográficas de los pacientes con especies de *Candida* resistentes al fluconazol

Variable	CMI \geq 64 (n=19) (%)	CMI<64 (n=132) (%)	P
Sexo			
Varón	15 (79)	109 (83)	0.7
Mujer	4 (21)	23 (17)	
Edad			
Media \pm DE	33.3 \pm 6.6	35.8 \pm 7.6	0.17
Mediana	36	38	
Rango	26-31	24-31	
Grupo de riesgo			
UDVP	13 (68)	68 (52)	0.52
Homosexual	4 (21)	28 (21)	
Heterosexual	2 (11)	24 (18)	
Otro/desconocido	0	12 (9)	
Tiempo desde el diagnóstico de la infección por el VIH			
Media \pm DE	56.1 \pm 39.9	55.1 \pm 39.4	0.86
Mediana*	84	84	
Rango	1-84	0-72	

DE= desviación estándar

UDVP= usuario de drogas por vía parenteral

* En meses

La cifra mediana de linfocitos CD4 fue significativamente más baja en los pacientes con especies de *Candida* resistentes (OR 3,58, IC 95% 1,12-17,80, P=0,01), que con mayor frecuencia pertenecían a la categoría C del CDC (P=0.02). En el momento de la evaluación, un número significativamente mayor de enfermos con especies resistentes tenía infecciones oportunistas activas (P=0.02) y antecedentes de infecciones oportunistas previas (P=0.02). La infección oportunista previa más frecuente fue la tuberculosis (OR 7,69, IC 95% 1,82-32,45, P=0,002), que también representó la infección activa más común, si bien en este último caso sin que la diferencia alcanzase significación estadística (OR 3,21, IC 95% 0,59-15,98, P=0,09). La segunda infección más frecuente entre las previas fue la neumonía por *Pneumocystis carinii* (OR 5,0, IC 95% 0,99-25,15, P= 0.05) en los enfermos con una infección oportunista previa, y en los enfermos con una infección oportunista activa el sarcoma de Kaposi.



Tabla 19. Características clínicas de los pacientes con especies de *Candida* resistentes al fluconazol

Variable	CMI \geq 64 (n=19) (%)	CMI<64 (n=132) (%)	P
Categoría			
A	4 (21)	48 (36)	0.02
B	1 (5)	32 (24)	
C	14 (74)	51 (39)	
Nº CD4 (cls/mm ³)			
>200	4 (21)	63 (48)	0.03
<200	15 (79)	66 (50)	
Infecciones			
oportunistas	15 (79)	52 (39)	0.02*
	5 (27)	13 (10)	
previas	3 (16)	12 (9)	
	7 (36)	27 (20)	
Cualquier infección			
Tuberculosis			
Neumonía por PC			
Otras infecciones			
Infecciones oportunistas activas			
Cualquier infección	10 (53)	29 (22)	0.02*
Tuberculosis	3 (16)	8 (6)	
Infección por MAI	2 (11)	0	
Sarcoma Kaposi	0	7 (5)	
Desconocida	2 (11)	4 (3)	

PC= *Pneumocystis carinii*

MAI= *Mycobacterium avium intracelulare*

** Diferencia significativa en la proporción global de enfermedades oportunistas entre los enfermos con especies sensibles y resistentes

Categoría A=asintomático o infección primaria. B=muguet, leucoplasia vellosa oral, displasia o CIS cervical uterina, angiomatosis bacilar, Herpes Zoster recurrente o multimetamérico. C=infección oportunista que define sida

Se estratificó a los enfermos por el número de linfocitos CD4, agrupados en intervalos de 50 cls/mm³ hasta 300 cls/mm³, y en intervalos de 100 cls/mm³ hasta >500 cls/mm³, y se encontró que no había diferencias significativas en la frecuencia de especies sensibles y resistentes entre estos grupos (P=0.5) (tabla 20). Tampoco hubo diferencias cuando se seleccionaron exclusivamente los enfermos colonizados (tabla 21).

Tabla 20. Proporción de especies resistentes por grupos de linfocitos CD4

Nº de linfocitos CD4	CMI ≥ 64	CMI < 64
<50 cls/mm ³	9 (21)	35 (79)
50-100 cls/mm ³	3 (21)	11 (79)
100-150 cls/mm ³	2 (18)	9 (82)
150-200 cls/mm ³	1 (10)	9 (90)
200-250 cls/mm ³	1 (9)	10 (91)
250-300 cls/mm ³	0	10 (100)
300-400 cls/mm ³	1 (5)	20 (95)
400-500 cls/mm ³	1 (10)	9 (90)
>500 cls/mm ³	1 (7)	14 (93)

Tabla 21. Proporción de especies resistentes por grupos de linfocitos CD4 en pacientes colonizados

Nº de linfocitos CD4	CMI \geq 64	CMI<64
<50 cls/mm ³	4 (17)	20 (83)
50-100 cls/mm ³	4 (31)	9 (69)
100-150 cls/mm ³	1 (11)	8 (89)
150-200 cls/mm ³	2 (20)	8 (80)
200-250 cls/mm ³	1 (10)	9 (90)
250-300 cls/mm ³	0	9 (100)
300-400 cls/mm ³	2 (11)	17 (89)
400-500 cls/mm ³	3 (30)	7 (70)
>500 cls/mm ³	2 (14)	12 (86)



La candidiasis oral en el momento de la evaluación fue más frecuente en los enfermos con especies resistentes ($P<0.001$), y también el antecedente de esofagitis por *Candida* ($P=0.001$) (tabla 22).

Tabla 22. Variables relacionadas con la existencia previa o actual de candidiasis oral en enfermos con especies de *Candida* resistentes al fluconazol

Variable	CMI ≥ 64 (N=19) (%)	CMI ≤ 64 (N=132) (%)	OR	IC 95%	P
Candidiasis oral	9 (47)	19 (14)	5.7	2.0-15.9	<0.001
Candidiasis oral previa	13 (68)	65 (50)	1.92	0.6 – 6.1	0.2
Candidiasis esofágica previa	6 (43)	10 (9)	7.9	2.2-27.5	0.001
Candidiasis recidivante	10 (56)	44 (33)	2.3	0.7 – 7.2	0.08
Candidiasis en la pareja	1 (5)	16 (12)	0.3	0.02 - 3.1	0.3

OR= odds ratio

IC= intervalo de confianza

Cuando se compararon el número de leucocitos totales, neutrófilos, monocitos e inmunoglobulinas, la IgA fue significativamente más alta en los que tenían especies resistentes ($P=0.01$). La mediana de monocitos fue de $350 \times 10^6/L$ en los pacientes con especies resistentes y de $485 \times 10^6/L$ en los pacientes con especies sensibles ($P=0.07$). No hubo diferencias significativas en el cociente de linfocitos CD4/CD8 (tabla 23).

Tabla 23. Algunas variables relacionadas con el estadio inmunológico de los pacientes con especies de *Candida* resistentes al fluconazol

Variable	CMI \geq 64	CMI<64	OR	IC 95%	P
N° CD4					
Media \pm DE	127 \pm 171	224 \pm 204	0.99	0.99-1.0	0.01
Mediana	72	191			
Rango	3-651	2-840			
CD4/CD8					
Media \pm DE	0.19 \pm 0.18	0.24 \pm 0.21	0.25	0.16-3.90	0.3
Mediana	0.14	0.2			
Rango	0.02-0.69	0.01-1.0			
IgG					
Media \pm DE	2405 \pm 1424	1951 \pm 847	1.0	0.99-1.0	0.14
Mediana	1968	1790			
Rango	1064-6381	786-6950			
IgA					
Media \pm DE	459 \pm 219	336 \pm 208	1.0	0.99-1.0	0.05
Mediana	490	264			
Rango	85-1000	75-1060			
IgM					
Media \pm DE	200 \pm 73	226 \pm 237	0.99	0.99-1.0	0.7
Mediana	249	284			
Rango	82-337	37-1689			

DE= desviación estándar

OR= odds ratio

IC= intervalo de confianza

Tabla 24. Variables relacionadas con los leucocitos en los pacientes con especies de *Candida* resistentes al fluconazol

Variable	CMI \geq 64	CMI<64	P
Leucocitos			
Media \pm DE	4477 \pm 2504	4855 \pm 2087	0.17
Mediana	3700	4610	
Rango	1570-11400	700-11800	
Neutrófilos			
Media \pm DE	3126 \pm 2135	2638 \pm 1460	0.5
Mediana	2450	2400	
Rango	1120-8800	300-8100	
Monocitos			
Media \pm DE	407 \pm 252	568 \pm 445	0.07
Mediana	350	485	
Rango	100-1090	50-2600	

DE= desviación estándar

4.2 Consumo de fármacos.

Los enfermos con especies resistentes habían consumido con más frecuencia fármacos antituberculosos (P<0.001) y un grupo de antibióticos que incluyó ciprofloxacino, cotrimoxazol, macrólidos y fármacos

antitoxoplasma ($P < 0.001$), y esteroides ($P = 0.03$). El tratamiento con ciprofloxacino por sí solo se asoció con significación estadística con el aislamiento de especies resistentes (OR 6.0). No hubo diferencias entre ambos grupos con respecto al consumo de pentamidina, antiácidos y, en general, de antirretrovirales (tablas 25 y 26).



Tabla 25. Tratamiento farmacológico recibido por los pacientes con especies resistentes

Variable	CMI \geq 64 (N=19) (%)	CMI<64 (N=132) (%)	OR	IC 95%	P
CIP, TMP-SMX, CLA, AZI, PR, SZ, CL,					
Sí	7 (36)	9 (7)	7.97	2.51-25.23	<0.001
No	12 (64)	120 (91)			
Antituberculosos (INH, RIF, PZ, EMB)					
Sí	8 (42)	13 (10)	6.13	2.11-17.80	<0.001
No	11 (58)	116 (89)			
Ciprofloxacino					
Sí	3 (16)	4 (3)	6.0	0.94-36.66	0.04
No	16 (84)	128 (97)			
Cotrimoxazol					
Sí	2 (11)	4 (3)	3.76	0.43-27.28	0.1
No	17 (89)	128 (97)			
Esteroides					
Sí	4 (21)	8 (6)	4.13	1.11-15.39	0.03
No	15 (79)	121 (92)			
Otros antibióticos					
Sí	8 (42)	23 (18)	3.38	1.09-10.42	0.02
No	11 (58)	107 (81)			
Pentamidina					
Sí	4 (21)	23 (17)	1.26	0.32-4.66	0.4
No	15 (79)	109 (83)			
Antiácidos					
Sí	4 (21)	15 (12)	2.04	0.50-7.84	0.2
No	15 (79)	115 (87)			

OR= odds ratio

IC= intervalo de confianza

CIP= ciprofloxacino (7pacientes, 3/4), TMP-SMX= trimetoprim-sulfametoxazol (6 pacientes 2/6), CLA= claritromicina (3 pacientes, 2/1), AZI= azitromicina (1 paciente, 1/0), PR=pirimetamina (1 paciente, 1/0), SZ=sulfadiazina (1 paciente, 1/0), CL=clindamicina (1 paciente, 1/0) Fármacos antituberculosos: INH=isoniazida, RIF=rifampicina, PZ=pirazinamida, EMB=etambutol.

Tabla 26. Tratamiento antirretroviral recibido por los pacientes con especies resistentes

Variable	CMI \geq 64 (N=19)	CMI<64 (N=132)	OR	IC 95%	P
Antirretrovirales					
Sí	16 (84)	103 (78)	1.50	0.37-7.07	0.39
No	3 (16)	29 (22)			
AZT+DDC					
Sí	10 (53)	48 (36)	1.94	0.66-5.72	0.17
No	9 (47)	84 (64)			
AZT+DDI					
Sí	1 (5)	31 (23)	0.18	0.01-1.38	0.07
No	18 (95)	101 (77)			
Inhibidores prot.					
Sí	2 (2)	11 (8)	1.29	0.0-1.29	0.7
No	17 (98)	121 (92)			

Inhibidores prot.=inhibidores de la proteasa

OR= odds ratio

IC= intervalo de confianza

AZT=zidivudina, DDI=didanosina, DDC=zalcitabina.



4.3 Exposición a antifúngicos.

En los pacientes expuestos al fluconazol se aislaron con más frecuencia especies resistentes que en los pacientes no expuestos ($P=0.01$) (tabla 27). Estas diferencias mantuvieron significación estadística cuando se valoró la exposición en general a azoles o a cualquier antifúngico ($P=0.03$ en ambos casos). También se asoció con resistencia al fluconazol el consumo previo de nistatina, si bien la mayoría de estos enfermos también habían tomado fluconazol. El 32% de los pacientes que presentaban una CMI al fluconazol de 64 mcg/mL o superior, no había recibido tratamiento con ningún fármaco azólico, y el 22% no había sido expuesto a ningún antifúngico. Esta proporción de pacientes no expuestos al fluconazol aumentó hasta un 38% cuando se valoraron también los pacientes con sensibilidad \square dosis-dependiente \square del fluconazol. Por otra parte, hubo un 39% de enfermos colonizados o infectados expuestos al fluconazol en los que no se aislaron especies resistentes.

Tabla 27. Tratamiento antifúngico previo a la entrada en el estudio en relación con la sensibilidad al fluconazol de las especies de *Candida*

Característica	CMI \geq 64 N=19	CMI<64 N=130	Total N (%) N=149	P
Tratamiento antifúngico	14 (78)	66 (51)	80 (54)	0.03
Cualquier azólico	13 (68)	55 (42)	68 (46)	0.03
Fluconazol	13 (68)	50 (39)	63 (42)	0.01
Ketoconazol	1 (5)	16 (12)	17 (11)	0.3
Itraconazol	2 (11)	4 (3)	6 (4)	0.1
Cualquier poliénico	9 (47)	33 (25)	42 (28)	0.04
Nistatina	8 (42)	28 (22)	36 (24)	0.03
Anfotericina B	2 (11)	5 (4)	7 (5)	0.1
No tratamiento	4 (22)	64 (49)	68 (46)	
Desconocido	1	0	1	

Con respecto a las características del tratamiento antifúngico (tabla 28), el consumo reciente de fluconazol, definido como el tratamiento con este fármaco en los 3 meses previos a la evaluación, se asoció con la existencia de alguna especie resistente en la cavidad orofaríngea, frente al consumo antiguo (más de 3 meses antes) (OR 5.56, IC 95% 1.61-19.12, P=0.02), o el consumo de otros antifúngicos diferentes al fluconazol. La cantidad total ingerida de fluconazol, independientemente del período en que se tomó, se cuantificó como exposición total superior a 1 mes (aproximadamente 3 gramos del fármaco), o inferior a este período. No se demostró que el mayor consumo se asociase más con resistencia que el consumo inferior.

Tabla 28. Características del tratamiento antifúngico en relación con la sensibilidad al fluconazol

Variable	CMI \geq 64 (N=19) (%)	CMI<64 (N=132) (%)	OR	IC 95%	P

Tratamiento antifúngico					
No tratamiento	4 (21)	69 (52)			
Antifúngico no fluconazol	1 (5)	13 (10)	1.32	0.13-12.84	
Fluconazol >3 meses antes	3 (16)	16 (12)	3.23	0.65-15.90	<0.001
Fluconazol < 3 meses antes	10 (53)	31 (24)	5.56	1.61-19.12	
Tratamiento antifúngico					
No tratamiento	4 (21)	69 (52)			
Antifúngico no fluconazol	1 (5)	13 (10)	1.33		
Fluconazol >3 meses antes	3 (16)	16 (12)	3.23		
Fluconazol < 3 meses antes, (menos de 21 días)	7 (37)	24 (18)	5.03		<0.001
Fluconazol < 3 meses antes (más de 21 días)	3 (16)	7 (6)	7.39		
Desconocido	1 (5)	3 (3)			
Duración del tratamiento					
No tratamiento	6 (32)	84 (64)			
Fluconazol < 1 mes	7 (36)	23 (17)	4.26	0.99-11.34	0.03
Fluconazol > 1 mes	6 (32)	25 (19)	3.36	1.30-13.92	

OR= odds ratio; IC= intervalo de confianza

En la tabla 29 se exponen juntas todas las variables que se asociaron significativamente con el aislamiento de especies resistentes.

Tabla 29. Variables significativas en el análisis simple en relación con la sensibilidad al fluconazol

Variable	CMI \geq 64 (N=19)	CMI<64 (N=132)	OR	IC 95%	P
Categoría					
A	4 (21)	48 (36)			
B	1 (5)	32 (24)	0.37	0.40-3.51	0.02
C	14 (74)	51 (39)	3.29	1.01-10.71	
Infecciones oportunistas previas					
Cualquier infección	15 (79)	52 (39)			
Neumonía por PC	3 (16)	12 (9)	5.0	0.99-25.15	
Tuberculosis	5 (27)	13 (10)	7.69	1.82-32.45	0.02
Otras infecciones	7 (36)	27 (20)	5.18	1.40-19.10	
Infecciones oportunistas actuales					
No infecciones	9 (47)	103 (78)			
Cualquier infección	8 (42)	25 (19)	3.66	1.28-10.44	0.02
Desconocida	2 (11)	4 (3)	5.72	0.91-35.64	
Candidiasis oral	9 (47)	19 (14)	5.70	2.03-15.94	<0.001
Candidiasis esofágica previa	6 (32)	10 (9)	7.95	2.29-27.51	0.001
N° CD4					
>200	4 (21)	63 (48)			0.03
<200	15 (79)	66 (50)	3.58	1.12-17.80	
IgA					
Mediana	490	264	1.002	0.99-1.0	0.05
Rango	85-1000	75-1060			
Tratamiento antifúngico					
No tratamiento	4 (21)	69 (52)			
Fluconazol > 3 meses antes	3 (16)	16 (12)	3.23	0.65-15.90	
Fluconazol < 3 meses antes	10 (53)	31 (24)	5.56	1.61-19.12	0.05
Otros antifúngicos/desc.	2 (10)	16 (12)	2.15	0.36-12.82	
TMP-SMX, PR, SZ, CL, CLA,AZI, CIP:					
Sí	7 (36)	9 (7)	7.97	2.51-25.23	<0.001
No	12 (64)	120 (91)			
INH, RIF, PZ, EMB					
Sí	8 (42)	13 (10)			
No	11 (58)	116 (88)	6.13	2.11-17.80	<0.001
Tratamiento antimicrobiano					
Sí	10 (53)	18 (14)	7.25	2.23-22.52	<0.001
No	9 (47)	114 (86)			
Esteroides					
Sí	4 (21)	8 (6)	4.13	1.11-15.39	0.03
No	15 (79)	121 (92)			

TMP-SMX= trimetoprim-sulfametoxazol, PR=pirimetamina, SZ=sulfadiazina CL=clindamicina CLA= claritromicina, AZI= azitromicina, CIP= ciprofloxacino, INH=isoniazida, RIF=rifampicina, PZ=pirazinamida, EMB=etambutol.

La tabla 30 refleja el valor predictivo de resistencia al fluconazol en relación con la presencia de

alguna de las variables predictoras, o de varias de ellas de forma simultánea en un enfermo. El mayor poder predictivo positivo, como muestra la tabla, se consigue cuando se produce la agrupación del mayor número de variables en un mismo enfermo, y llega hasta un 57%. Los valores predictivos negativos son altos, en todos los casos superiores o iguales al 90%.

La tabla 31 refleja el valor predictivo de resistencia al fluconazol en relación con la presencia de alguna de las variables expuestas, pero no de forma simultánea, sino alternativa. Los valores predictivos negativos de hallar una especie resistente son algo superiores que en la tabla anterior



Tabla 30. Probabilidad de aislar una especie resistente en un enfermo en relación con la presencia de diferentes variables de forma simultánea en un enfermo

CD4<200	Fluconazol*	Muguet	IO previa	Tto. TBC	VP(+)	VP(-)	OR	IC 95%
					19%	94%	3.58	1.03-13.57
+					22%	94%	4.59	1.41-15.82
	+				33%	92%	5.7	1.80-18.16
		+			16%	93%	2.44	0.70-9.25
			+		36%	91%	6.13	1.85-20.44
+	+				25%	93%	4.57	1.52-14.01
+		+			41%	92%	8.24	2.51-27.41
	+	+			41%	92%	8.24	2.51-27.41
+	+	+			45%	92%	9.90	2.93-34.08
+	+		+		30%	94%	6.37	2.08-20.02
+	+			+	46%	91%	8.24	2.06-33.39
+	+	+		+	50%	90%	8.53	1.58-46.80
+	+	+	+	+	57%	90%	11.47	1.91-73.37

* Tratamiento previo con fluconazol

IO previa= infección oportunista previa

Tto. TBC: tratamiento tuberculostático en el presente

VP(+)= valor predictivo positivo

VP(-)= valor predictivo negativo

OR= Odds ratio

IC 95%: intervalo de confianza al 95%

Tabla 31. Probabilidad de aislar una especie resistente en un enfermo en relación con la presencia de diferentes variables de forma alternativa.

CD4<200	Fluconazol*	Muguet	IO previa	Tto. TBC	VP(+)	VP(-)	OR	IC 95%
+	+				20%	94%	4.03	1.74-9.57
+		+			22%	92%	3.65	1.71-7.88
+	+	+			17%	95%	3.64	1.73-7.72
+	+			+	22%	93%	3.74	2.02-6.99
+	+	+		+	23%	94%	4.48	2.65-7.77

* Tratamiento previo con fluconazol

IO previa= infección oportunista previa

Tto. TBC: tratamiento tuberculostático en el presente

VP(+)= valor predictivo positivo

VP(-)= valor predictivo negativo

OR= Odds ratio

IC 95%: intervalo de confianza al 95%



5. FACTORES DETERMINANTES DE LA COLONIZACIÓN E INFECCIÓN POR LEVADURAS RESISTENTES

Para conocer los factores determinantes de la resistencia al fluconazol se efectuó en primer lugar un análisis por el procedimiento “stepwise” para explorar las variables que mejor predicen la presencia de resistencia desde el punto de vista estadístico. Con estas variables, y aquellas que la literatura y el conocimiento médico han relacionado con la resistencia al fluconazol, se construyó un modelo “paso a paso”, hasta llegar al que mejor ajuste mostró.

El modelo demostró que los factores de riesgo independientes que determinan el desarrollo de resistencia al fluconazol son el consumo de antimicrobianos y una de las dos siguientes variables: el consumo de fluconazol y la candidiasis oral (tablas 32 y 33). La razón de riesgo para la resistencia al fluconazol asociada con el consumo de antimicrobianos fue de 5.54 (IC 1.87,16.44, P=0.002). La razón de riesgo asociada a la presencia de candidiasis oral, ajustada para el consumo de antimicrobianos, fue de 4.22 (IC 1.39, 12.81, P=0.01). La razón de riesgos asociada al consumo de fluconazol, también ajustada para los antimicrobianos, fue de 3.41 (IC 1.10, 10.60, P=0.03). Los resultados del análisis multivariable demostraron que el recuento de linfocitos CD4 no es un factor independiente que cause resistencia al fluconazol, ya que cuando se ajustó para cualquiera del resto de las variables explicativas, no se encontró asociación en ningún caso con la existencia de resistencia.

El recuento de linfocitos CD4 y el resto de los otros parámetros clínicos y analíticos evaluados que no demostraron ser factores de riesgo independientes en el análisis multivariable, predicen la existencia de resistencia en un paciente concreto, como se refleja en las tablas 30 y 31, pero no son factores determinantes de resistencia al fluconazol.

Tabla 32. Modelo de regresión logística sobre los determinantes resistencia al fluconazol en relación con el tratamiento con antimicrobianos, y la presencia de candidiasis oral.

Variable	OR	IC 95%	P
Tratamiento con antimicrobianos (INH, RIF, PZ, CIP, TMP-SMX, CLA,AZI, PR, SZ, CL).	5.54	1.87-16.44	0.002
Candidiasis oral	4.22	1.39-12.81	0.01

INH=isoniazida, RIF=rifampicina, PZ=pirazinamida, EMB=etambutol, CIP= ciprofloxacino ,
TMP-SMX= trimetoprim-sulfametoxazol, CLA= claritromicina, AZI= azitromicina,
PR=pirimetamina, SZ=sulfadiazina, CL=clindamicina.
OR= odds ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Tabla 33. Modelo de regresión logística sobre los determinantes de candidiasis oral resistente al fluconazol en relación con el tratamiento previo con antimicrobianos y con fluconazol

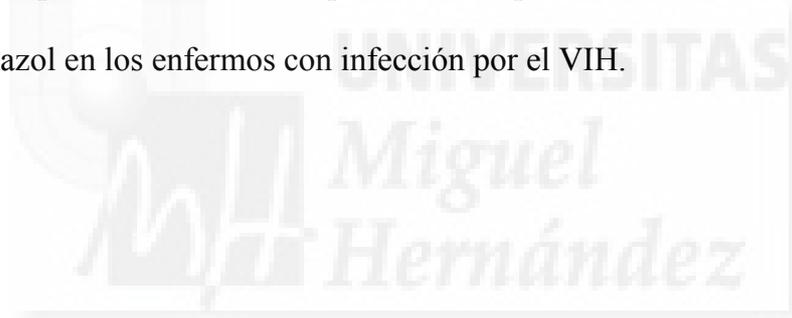
Variable	OR	IC 95%	P
Tratamiento con antimicrobianos (INH, RIF, PZ, CIP, TMP-SMX, CLA,AZI, PR, SZ, CL)	5.56	1.90-16.26	0.002
Tratamiento con fluconazol	3.41	1.10-10.60	0.03

INH=isoniazida, RIF=rifampicina, PZ=pirazinamida, EMB=etambutol, CIP= ciprofloxacino,
TMP-SMX= trimetoprim-sulfametoxazol , CLA= claritromicina, AZI= azitromicina,
pirimetamina, SZ=sulfadiazina, CL=clindamicina.
OR= odds ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.



VI. DISCUSIÓN

Las infecciones por *Candida* sp. resistente al fluconazol constituyen un problema cada vez más frecuente en la práctica médica (Sangeorzan *et al.*, 1994, Ruhnke *et al.*, 1994, Chavanet *et al.*, 1994, Laguna *et al.*, 1997, Maenza *et al.*, 1996, Martins *et al.*, 1997). Aunque el aumento en la prevalencia de estas infecciones se ha atribuído fundamentalmente al consumo de fluconazol (Maenza *et al.*, 1996, Chavanet *et al.*, 1994, Ruhnke *et al.*, 1994) algunos de los datos disponibles son contradictorios (White *et al.*, 1994, Winston *et al.*, 1993, Goodman *et al.*, 1992, Revankar *et al.*, 1996, Laguna *et al.*, 1997). Este trabajo fue ideado con el propósito fundamental de conocer cuáles son los factores que desencadenan la aparición de especies de *Candida* resistentes al fluconazol en los enfermos con infección por el VIH.



Uno de los hallazgos más significativos del presente estudio es que el fluconazol no es el único, y ni siquiera es el factor de riesgo principal que determina la infección o la colonización por *Candida* sp. resistente en los enfermos con infección por el VIH. Los resultados del análisis multivariable demostraron que el consumo de un grupo de antimicrobianos fundamentalmente representado por fármacos antituberculosos, ciprofloxacino y cotrimoxazol, constituye el factor de riesgo independiente que mejor explica la resistencia al fluconazol. Además, el haber tomado fluconazol o bien la candidiasis oral en el momento de la evaluación se asocian también de forma independiente con resistencia al fluconazol, si bien la candidiasis oral tuvo un mayor poder de predicción. Ambas variables están íntimamente ligadas, y por este motivo son excluyentes entre sí como factores de riesgo independientes en el análisis multivariable. Es difícil asegurar cuál de las dos determina la resistencia al fluconazol y además es muy compleja su investigación incluso en estudios de seguimiento, ya que la exposición a una de ellas (por ejemplo, la candidiasis oral) se suele acompañar de exposición a la otra (consumo de fluconazol).

Además de éstos, se encontraron muchos otros parámetros clínicos y analíticos predictores de resistencia a fluconazol, pero no son factores determinantes causales como los anteriores, ya que el análisis multivariable demostró que su asociación con la resistencia estaba confundida por los factores anteriormente expuestos. No obstante resultan útiles desde el punto de vista clínico en la medida que proporcionan información sobre la probabilidad de aislar una especie de *Candida* resistente en un paciente concreto. Entre ellos destacan el recuento de linfocitos CD4, las infecciones oportunistas, tanto previas como presentes en el momento de la evaluación, de las que la más frecuente fue la tuberculosis, y la esofagitis por *Candida*.

Otro de los hallazgos relevantes del trabajo es que existe una proporción importante de levaduras resistentes al fluconazol en los enfermos con infección por el VIH en todos los estadios, y no sólo en los más avanzados: en el 17% de los pacientes se aíslan especies con sensibilidad disminuida al fluconazol, y en el 11% se identifican especies resistentes. Existen muy pocos datos sobre la prevalencia de resistencia al fluconazol en los enfermos con infección por el VIH, y casi todos se

limitan a los pacientes con candidiasis oral o a los más inmunodeprimidos (Laguna *et al.*, 1997, Maenza *et al.*, 1996, Revankar *et al.*, 1996, Ruhnke *et al.*, 1994). En el presente estudio, el 45% de los enfermos tenía una cifra de linfocitos CD4 superior a 200 cels/mm³, y más de la mitad no había tenido ninguna infección oportunista grave previa.

A pesar de que la resistencia al fluconazol ha dado lugar a diversas publicaciones en la literatura médica en los últimos años, las causas de la aparición de especies de *Candida* resistentes y la frecuencia con la que se produce este fenómeno en los enfermos con infección por el VIH no son bien conocidos. Aunque desde que se proyectó este estudio -hace casi ya tres años- hasta el momento actual se han publicado algunos trabajos con un diseño aparentemente similar, existen varias diferencias importantes con respecto a los demás que le confieren indudables ventajas.

En el presente trabajo se ha evaluado un elevado número de pacientes, y por tanto se ha obtenido información directa de una gran parte de la población objetivo del estudio, en este caso los enfermos con infección por el VIH de un área sanitaria. Esto ha sido posible por las características del diseño: un estudio transversal de los enfermos con infección por el VIH que acuden regularmente al hospital. Para ello se incluyeron todos los pacientes que acudieron de forma consecutiva al hospital por cualquier motivo, sin que se estableciera ningún criterio previo de selección. Puesto que ésta es hoy en día la única institución donde se ubican las Unidades de Seguimiento de estos enfermos, la muestra es representativa de la población de la que se ha extraído, en este caso los pacientes con infección por el VIH de dos áreas sanitarias diferentes. Esto permite hacer inferencias y generalizar los resultados al conjunto de los enfermos con infección por el VIH.

La mayoría de los estudios (Maenza *et al.*, 1996, Laguna *et al.*, 1997, Revankar *et al.*, 1996, Ruhnke *et al.*, 1994, Powderly *et al.*, NEJM 1995, Johnson *et al.*, 1995) publicados hasta ahora, seleccionaban grupos específicos de enfermos, habitualmente con niveles de CD4 inferiores a un determinado valor o con candidiasis oral, lo que no permite extraer datos sobre prevalencia ni

universalizar los resultados a toda la población. En otros casos el número de pacientes incluido era reducido, como sucede en dos publicaciones previas, una de ellas muy reciente (Martins *et al.*, 1997, Sangeorzan *et al.*, 1994), lo que puede suponer una limitación en el valor de las conclusiones.

Otra de las ventajas del presente estudio es que la recogida de todos los datos se hizo de forma oculta. Para valorar los factores de riesgo asociados con el aislamiento de especies resistentes, se efectuó un estudio de casos y controles en el que los investigadores no conocían *a priori* a qué grupo pertenecían los enfermos, ya que en el momento de la evaluación no estaban disponibles los estudios de sensibilidad. De este modo se minimizó el sesgo de información en la recogida de los datos, en este caso fundamentalmente en lo referente al consumo de antifúngicos, que podría existir en otros estudios similares de carácter retrospectivo en los que no se especifica cómo se recogió la información. Se tomaron asimismo medidas para reducir al mínimo el sesgo de recuerdo inherente a todos los estudios retrospectivos, que implica una pérdida o cierto grado de imprecisión en la información obtenida de la anamnesis del enfermo, como la que se refiere al consumo previo de antifúngicos.

En este trabajo se incluyen también enfermos colonizados, a diferencia de la inmensa mayoría de los anteriores, en los que se valoraron sólo enfermos con candidiasis oral, como ya se ha comentado (Revankar *et al.*, 1996, Laguna *et al.*, 1997, Maenza *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994). El estudio de la colonización como fase previa a la infección orofaríngea por especies de *Candida* es probablemente imprescindible para conocer la historia natural de las infecciones por levaduras resistentes.

Una novedad importante con respecto a otros estudios es que se investigaron otros posibles factores de riesgo de resistencia al fluconazol además de la cifra de linfocitos CD4 y el consumo de antifúngicos. En este trabajo además se incluyeron en los análisis univariable y multivariable diferentes enfermedades y tratamientos concomitantes recibidos por los enfermos que podrían

influir en la aparición de especies resistentes, tanto por su relación con defectos inmunitarios específicos, como por la alteración sobre la ecología de la flora orofaríngea que pueden producir.

Además, a diferencia de otros trabajos, se utilizó un método ya estandarizado para el estudio de la sensibilidad al fluconazol, y se emplearon los puntos de corte recientemente propuestos por el NCCLS para definir resistencia al fluconazol (Rex *et al.*, 1997). Estas recomendaciones se apoyan en estudios previos sobre correlación *in vivo-in vitro*. Hasta la actualidad sólo en el estudio recientemente publicado por Martins *et al.* se había empleado esta nueva definición de consenso (Martins *et al.*, 1997).

La candidiasis orofaríngea es una de las infecciones oportunistas más comunes en los enfermos con infección por el VIH. La frecuencia de colonización e infección por *Candida* sp. en nuestro área es de un 88%, cifra comparable a la de otras series publicadas hasta la actualidad (Coleman *et al.*, 1989, Phelan *et al.*, 1987). La mayor frecuencia de colonización con respecto a los inmunocompetentes se ha atribuido fundamentalmente al defecto en la inmunidad celular que se asocia a la infección por el VIH.

En el presente trabajo predominan los pacientes colonizados, que constituyen globalmente el 72%. Aunque se han publicado numerosos estudios en los últimos años sobre candidiasis oral en pacientes con infección por el VIH, existe hasta ahora poca información de lo que ocurre en la orofaringe de estos enfermos en las etapas que preceden a la infección. Muy pocos trabajos incluyen además enfermos con una buena situación inmune. Los escasos estudios realizados en estadios precoces de la infección por el VIH (Sangeorzan *et al.*, 1994, Chavanet *et al.*, 1994, Martins *et al.*, 1997), han incluido un número limitado de casos (Sangeorzan *et al.*, 1994, Martins *et al.*, 1997), o bien han empleado métodos diferentes a los estándar para la determinación de la sensibilidad, o puntos de corte de la CMI muy inferiores a los que se asocian con resistencia clínica (Chavanet *et al.*, 1994). El estudio de las fases más precoces no sólo es esencial para comprender los factores implicados en la etiopatogenia de las frecuentes infecciones fúngicas que padecen

estos enfermos, sino que, además, permite conocer la flora fúngica que posee el paciente antes de que se desarrolle la candidiasis oral, y por tanto antes de que intervengan los factores que se han implicado tanto en la infección como en la aparición de especies resistentes. Este trabajo contribuye por lo tanto al mejor conocimiento de la historia natural de las infecciones fúngicas y de su etiología en la medida que proporciona información sobre las especies que colonizan la orofaringe de estos sujetos y sus perfiles de sensibilidad en todos los estadios de la infección por el VIH, y las características clínicas que diferencian a los enfermos colonizados de los infectados.

Según los resultados obtenidos, la candidiasis oral en el momento de la evaluación se asocia con una cifra de linfocitos CD4 considerablemente más baja que la colonización. Algunos autores también habían encontrado una asociación entre los recuentos bajos de linfocitos CD4 y la infección orofaríngea por *Candida* (Sangeorzan *et al.*, 1994, Martins *et al.*, 1997). Es conocido que los defectos en la inmunidad celular predisponen a infecciones superficiales por *Candida* sp. en mucosas preferentemente, como sucede por ejemplo en la candidiasis mucocutánea crónica. En enfermos con infección por el VIH se ha puesto de manifiesto una disminución o ausencia de respuesta inmune celular a las mananoproteínas de *Candida*, lo que apoyaría la predisposición a la candidiasis mucosa. Sin embargo, los mecanismos implicados en el control de las infecciones fúngicas por parte de los linfocitos T son sólo parcialmente conocidos hasta ahora (Nose *et al.*, 1981, Blanchard *et al.*, 1991).

La infección oral por *Candida* sp. se asoció también con una menor cifra de leucocitos totales y de monocitos que la colonización. Los monocitos de la sangre periférica intervienen en la fagocitosis de *Candida in vitro*, y existe por ello una mayor predisposición a infecciones por esta levadura en las situaciones en las que se altera la función del sistema monocito-macrofágico, como durante el tratamiento esteroideo o en infecciones por algunos virus como el citomegalovirus (Vartivarian *et al.*, 1993). No obstante, no puede descartarse que existan defectos cualitativos de los neutrófilos, cuya evaluación no era uno de los objetivos del presente trabajo, ya que se ha descrito por ejemplo su participación en la destrucción de las levaduras diferentes de *Candida albicans* (LDCA), y

como coadyuvantes del fluconazol, con el que poseen efecto sinérgico (Brummer *et al.*, 1996). No sorprende por último que no se encontraran diferencias en el recuento global de inmunoglobulinas entre pacientes colonizados e infectados, puesto que la inmunidad humoral se ha probado que tiene escasa importancia en la defensa contra infecciones por *Candida* (Epstein *et al.*, 1982, Kagaya & Fukazawa 1981). Sin embargo, recientemente se ha descrito una predisposición al desarrollo simultáneo de infecciones por *Candida* y micobacterias en enfermos con defectos inmunes humorales, aunque esto no se refleje necesariamente en el recuento de las inmunoglobulinas (Conti *et al.*, 1988).

Los enfermos con candidiasis oral habían tenido más infecciones oportunistas previas que los colonizados. Aunque la conocida relación entre las infecciones oportunistas y el recuento de linfocitos CD4 es una probable explicación para este fenómeno, también los enfermos con infecciones consumen antibióticos, en algunos casos durante períodos de tiempo muy prolongados, como ocurre en la tuberculosis, que fue la infección oportunista más frecuente entre los pacientes del presente estudio. Este podría ser otro de los mecanismos que contribuye al desarrollo de la candidiasis oral.

Además de los factores intrínsecos del huésped, se evaluó también la intensidad de la colonización como factor de riesgo para adquirir infección oral por *Candida* sp. Los resultados demostraron que los enfermos con una mayor intensidad de colonización habían tenido una frecuencia significativamente superior de infecciones orofaríngeas y esofágicas previas por *Candida*, y de candidiasis recidivante. La mayor parte de los pacientes infectados tenía un recuento de colonias superior al de los colonizados, hecho que ya pusieron de manifiesto Sangeorzan *et al.* en un estudio anterior. Esto sugiere la existencia de una asociación entre la infección y la concentración de colonias en una determinada localización. Además, cuando se excluyeron los pacientes con candidiasis oral y se analizaron sólo los que estaban colonizados, siguió observándose una frecuencia significativamente mayor de candidiasis recidivante y también de candidiasis oral y esofágica previas en aquéllos con una mayor intensidad de colonización, si bien en estos dos

últimos casos la diferencia no alcanzó significación estadística. En un estudio prospectivo en el que se evaluaban pacientes de alto riesgo colonizados por *Candida* sp. que desarrollaron diversas infecciones por esta levadura, la mayoría invasivas, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad de colonización y la probabilidad de una subsecuente infección (Pittet *et al.*, 1994). Por tanto, éste podría ser otro de los parámetros que nos permiten predecir en qué casos existe un mayor riesgo de sufrir una infección posterior por *Candida*.

Hubo además una asociación inversa entre el recuento de colonias en el cultivo y la cifra de linfocitos CD4. Los enfermos con mayor número de colonias en el cultivo habían tenido con más frecuencia infecciones oportunistas anteriores. Todo esto apoya la relación entre el deterioro en la inmunidad celular inherente a la infección por el VIH y el riesgo aumentado de colonización e infección por levaduras. No se encontró sin embargo asociación entre el recuento de colonias y otras variables relacionadas con el estadio inmunitario de los enfermos, como la cifra de leucocitos totales, de neutrófilos, monocitos o inmunoglobulinas.

El consumo de antibióticos, de tuberculostáticos y de fármacos para profilaxis frente a *Pneumocystis carinii* fue superior en los pacientes infectados, que a su vez estaban tomando con menos frecuencia tratamiento antirretroviral, lo que probablemente tenga implicaciones directas en la inmunidad celular de los enfermos. Con respecto al consumo de antifúngicos, la intensidad de la exposición a estos fármacos en general, y al fluconazol particularmente, fue significativamente superior en el grupo de pacientes infectados que en los colonizados.

No hubo diferencias significativas cuando se compararon entre sí los enfermos colonizados y los que tuvieron un cultivo orofaríngeo negativo. No obstante, los enfermos con cultivo negativo son probablemente un grupo heterogéneo, que incluye tanto a pacientes que nunca han tenido candidiasis oral, como a aquéllos que han recibido recientemente tratamiento antifúngico, y en los que por tanto no se detecta crecimiento de levaduras. Las conclusiones sobre estos enfermos han de ser analizadas por consiguiente en este contexto.

Existen muy pocos estudios sobre los mecanismos de defensa del huésped que operan en la boca y el esófago (Roseff *et al.*, 1993). Además de los parámetros que se evaluaron en el presente trabajo, numerosos factores locales contribuyen a una mayor predisposición a la colonización por levaduras, como alteraciones en la hidratación de la mucosa, en su pH, en la concentración de nutrientes o en la flora que habitualmente la coloniza. Algunos autores han detectado, por ejemplo, una actividad antifúngica defectuosa en la saliva asociada a la infección por el VIH (Pollock *et al.*, 1992).

Sin embargo, el estudio de los factores que se asocian a la colonización no era el objetivo principal de este estudio. No obstante sería extremadamente útil conocer los mecanismos locales o sistémicos relacionados con el frecuente aislamiento de levaduras en los pacientes con infección por el VIH, tanto por el interés que despierta el conocimiento profundo de una patología frecuente, como por las posibles aplicaciones prácticas, entre ellas el ahorro en el consumo de antifúngicos que supondría el poder evitar el desarrollo de la infección en etapas más precoces con medidas alternativas a los fármacos.

Además de la alta prevalencia de colonización por levaduras, un hallazgo destacable del actual estudio es que en el 12% de los pacientes con algún aislamiento en el cultivo, la especie encontrada fue resistente al fluconazol (CMI \geq 64). Esta

proporción difiere de la encontrada en estudios previos en enfermos con infección por el VIH, en uno de los cuales llegaba a ser del 41% (Maenza *et al.*, 1997, Revankar *et al.*, 1996, Laguna *et al.*, 1997). Existen varias razones que explican esta discrepancia. En primer lugar, como ya se ha dicho, hasta hace muy poco tiempo no existía un consenso en cuanto a la definición de resistencia al fluconazol. Por este motivo, en los diferentes estudios, el punto de corte en la CMI para considerar a una especie como resistente era variable, habitualmente inferior al recomendado actualmente por el NCCLS. En un trabajo realizado en España, Laguna *et al.* escogieron un valor de la CMI igual o superior a 16 mcg/mL para definir la resistencia al fluconazol, y encontraron

una frecuencia del 21%, que es una proporción similar, aunque algo superior a la de nuestro estudio para ese punto de corte (Laguna *et al.*, 1997). Sin embargo, tanto en éste como en la mayoría de los trabajos recientes, se estudiaron pacientes en fases avanzadas de la enfermedad, con un marcado deterioro inmunológico, y por tanto no eran representativos de toda la población de enfermos con infección por el VIH. En un artículo publicado en 1994, Sangeorzan *et al.* estudiaron la colonización e infección por *Candida* en pacientes con infección por el VIH en todos los estadios; sin embargo, sólo se determinó la sensibilidad en un subgrupo, y no se correlacionó ni ésta ni las diferentes especies encontradas con las características clínicas de los enfermos (Sangeorzan *et al.*, 1994). En ese mismo año se evaluaron 154 pacientes con un diseño transversal, de los que 106 tuvieron cultivos positivos para *Candida* sp., y se estimó la frecuencia de especies resistentes en un 20%. Sin embargo, el 74% de las cepas provenían de enfermos con candidiasis oral (Chavanet *et al.*, 1994), y se empleó un punto de corte de la CMI de 1.56 mg/L para definir resistencia al fluconazol. En una publicación reciente, Martins *et al.* estudiaron la sensibilidad al fluconazol en un grupo de 82 enfermos VIH-positivos en diferentes estadios, y en el 17% hallaron cepas resistentes; en los enfermos colonizados la frecuencia fue del 14%, y en los infectados del 21%. Sin embargo, en su trabajo el porcentaje de enfermos con candidiasis oral en el momento de la evaluación era del 30% (Martins *et al.*, 1997), frente al 16% en nuestro estudio, lo que aumenta por lo tanto la probabilidad de detectar especies resistentes, como se justificará más adelante.

El 32% de los pacientes del presente estudio tenía candidiasis oral producida por especies resistentes al fluconazol, lo que supone que habría que emplear tratamientos alternativos en una tercera parte de ellos, ya que la resistencia *in vitro*, aunque no en todos los casos, suele predecir fracaso terapéutico (Rex *et al.*, 1997). Aunque existen alternativas al tratamiento que incluyen desde medidas locales a nuevos antifúngicos azólicos, alguno de los cuales está todavía en estudio, muchos de estos enfermos es probable que acaben precisando finalmente tratamiento con anfotericina B parenteral, que tiene serios inconvenientes por su modo de administración y por su toxicidad. Por otra parte, un 10% de los enfermos sin lesiones orales son portadores de cepas de *Candida* resistentes al fluconazol en la orofaringe, y por tanto cabe la posibilidad de que en un

futuro desarrollen infecciones que no respondan a las medidas habituales. La expansión de los nuevos antirretrovirales altamente eficaces ha producido una disminución en la frecuencia de candidiasis oral entre los pacientes, probablemente por la recuperación del sistema inmune que producen. Sin embargo, en el momento actual apenas disponemos de información sobre si también han sido capaces de modificar las especies que causan la colonización o la infección.

La identificación de las especies resistentes al fluconazol reveló que en el 53% de los casos eran levaduras diferentes de *Candida albicans* (LDCA). El aumento progresivo en el aislamiento de estas especies ya se había puesto de manifiesto en otros pacientes inmunodeprimidos en varios trabajos publicados en los últimos años y en enfermos con infección por el VIH (Gutiérrez *et al.*, 1995, Nguyen *et al.*, 1996, Ruhnke *et al.*, 1994, Revankar *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994, Maenza *et al.*, 1997), y se había atribuido fundamentalmente al tratamiento previo con fluconazol. Globalmente, en el 21% de todos los enfermos con algún aislamiento en el cultivo se identificaron LDCA, proporción similar a la descrita en otros estudios en pacientes con infección por el VIH (Maenza *et al.*, 1997, Martins *et al.*, 1997, Chavanet *et al.*, 1994). Sin embargo, teniendo en cuenta el elevado número de enfermos colonizados y no expuestos anteriormente a azólicos que se han incluido en este estudio, el porcentaje de aislamientos de LDCA resulta llamativo

Tradicionalmente se ha considerado que las LDCA tienen un menor poder patógeno que *C. albicans* (Drona *et al.*, 1996), y se ha señalado que algunas especies, como *C. krusei*, pueden tener una menor capacidad de adhesión a las células del epitelio bucal (Samaranayake *et al.*, JMM 1994). En la mayoría de los estudios en pacientes con infección por el VIH, las LDCA se encontraban en cultivo mixto con *C. albicans* (Sangeorzan *et al.*, 1994, Maenza *et al.*, 1997, Drona *et al.*, 1996). Dos estudios publicados en los últimos sugerían que las LDCA se comportan como colonizadores, y cuestionaban su capacidad para producir infección orofaríngea (Drona *et al.*, 1996, Baily *et al.*, 1994).

Sin embargo, en el presente trabajo, aunque en el 34% de los enfermos las LDCA se aislaron en cultivo mixto con *C. albicans*, se confirmaron 5 casos de candidiasis oral en los que sólo se identificaron LDCA. Además, la proporción de enfermos infectados por una sola especie de levadura fue incluso superior en los pacientes en los que sólo se aislaron LDCA que en los que tenían *C. albicans* en cultivo puro (26% y 17% respectivamente). Otros estudios epidemiológicos recientes apoyan la capacidad patógena de las LDCA (Maenza *et al.*, 1996, Revankar *et al.*, 1996) y, de hecho, se han descrito numerosas infecciones graves por estas levaduras en pacientes inmunodeprimidos (Nguyen *et al.*, 1996, Mc Quillen *et al.*, 1992). La menor sensibilidad al fluconazol de estas especies, algunas de las cuáles son intrínsecamente resistentes, como *C. krusei*, puede suponer un serio problema en el manejo de las infecciones que producen.

Después de *C. albicans*, *Candida glabrata* fue la especie más frecuentemente aislada. Esta levadura se ha descrito también como las más común entre las LDCA, incluso en pacientes sin infección por el VIH (Maenza *et al.*, 1997, Revankar *et al.*, 1996, Nguyen *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994, Dronda *et al.*, 1996, Law *et al.*, 1994). No se encontraron diferencias significativas en la proporción de aislamientos de LDCA entre los pacientes con candidiasis oral y los colonizados (25% frente a 19%), ni globalmente en la distribución de las diferentes especies de LDCA en cada caso, aunque *C. glabrata* se aisló más frecuentemente en los enfermos con muguet que en los colonizados. En otro estudio, esta levadura se aisló exclusivamente en los enfermos con candidiasis oral (Chavanet *et al.*, 1994). Las concentraciones mínimas inhibitorias de fluconazol fueron significativamente superiores en las LDCA que en las *C. albicans*, y casi dos terceras partes de estas especies tuvieron una sensibilidad al menos disminuída al fluconazol (CMI₅₀>8 mcg/mL). El 40% de las cepas de *C. glabrata* eran resistentes (CMI₅₀>64 mcg/mL), y su CMI₅₀ fue superior a la comunicada en la mayoría de los estudios previos (Chavanet *et al.*, 1994, Maenza *et al.*, 1997, Nguyen *et al.*, 1996, Dronda *et al.*, 1996). La sensibilidad al fluconazol de *C. inconspicua* fue similar a la de *C. glabrata*, y la mayor parte de las cepas de *Candida tropicalis* fueron resistentes. Aunque es conocido que estas especies son intrínsecamente menos sensibles al fluconazol, el nivel

de resistencia hallado en este estudio fue incluso más elevado que en los trabajos previos, en los que generalmente se incluyeron pacientes en estadios más avanzados de la infección por VIH.

La inmunodepresión avanzada fue un factor significativamente asociado a la presencia de LDCA; la cifra mediana de linfocitos CD4 en los enfermos con *C. albicans* fue de 195/mm³, y de 66/mm³ en los que tenían LDCA. En los enfermos con infecciones oportunistas, tanto activas como previas, se aislaron también con más frecuencia estas especies. Aunque en la literatura revisada no se ha encontrado específicamente referencia a esta asociación, sí se ha descrito la relación entre la inmunodepresión y el hallazgo de cepas de *Candida* sp. resistentes en enfermos con infección por el VIH, o de LDCA en los pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes (Anaisie *et al.*, 1989, Mc Quillen *et al.*, 1992).

El tratamiento previo con azoles ha sido uno de los principales factores implicados en la adquisición de LDCA ((Chavanet *et al.*, 1994, Maenza *et al.*, 1997, Nguyen *et al.*, 1996, Drona *et al.*, 1996), Ruhnke *et al.*, 1994, Revankar *et al.*, 1996). En el presente estudio, aunque la exposición al fluconazol fue más frecuente en el grupo de pacientes con LDCA, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Es probable que ello sea debido a las características de los enfermos, que en su mayoría estaban sólo colonizados y tenían una cifra de linfocitos CD4 no muy reducida, a diferencia de lo que sucedía en muchos de los trabajos anteriores. Sin embargo, 10 de los 32 pacientes en los que se aislaron LDCA no habían recibido tratamiento antifúngico previo, y en ellos la inmunidad celular estaba relativamente preservada, con una cifra mediana de linfocitos CD4 de 317/mm³. De hecho, se han comunicado también aislamientos de LDCA en pacientes inmunocompetentes, como colonización por *C. krusei* de la mucosa esofágica en individuos sanos, e infecciones invasivas por esta levadura en pacientes inmunodeprimidos no expuestos al fluconazol (Vermeersch *et al.*, 1989, Iwen *et al.*, 1995). Esto sugiere que, además de la exposición a los antifúngicos y el descenso en los linfocitos CD4, deben existir otros factores implicados en la colonización e infección por LDCA.

A pesar de que la resistencia de *Candida* sp. al fluconazol es un problema preocupante en pacientes inmunodeprimidos, los factores determinantes de su aparición no eran bien conocidos. Los escasos estudios publicados se han realizado en pacientes con infección por el VIH y hasta este momento se habían investigado exclusivamente el deterioro inmunológico y el consumo previo de fluconazol como las posibles causas, y ambas habían sido implicadas como responsables. Este estudio confirma que existen varios factores que se asocian con el aislamiento de especies resistentes al fluconazol que hasta ahora no se habían descrito. Habitualmente estos factores están muy relacionados entre sí, y es frecuente que concurran en un mismo enfermo. Por ejemplo, algunos de los datos obtenidos de la anamnesis, como los antecedentes de esofagitis por *Candida*, y las infecciones oportunistas (tanto las previas, entre las que destacan la neumonía por *Pneumocystis carinii* y la tuberculosis, como las presentes en el momento de la evaluación), o bien obtenidos de la exploración, como la candidiasis oral, se asociaron significativamente con el aislamiento de cepas de *Candida albicans* o LDCA resistentes al fluconazol. El consumo previo de antibióticos, de esteroides, de tuberculostáticos, y de un grupo de antibióticos que incluyó ciprofloxacino, cotrimoxazol, los macrólidos azitromicina y claritromicina, y fármacos con actividad antitoxoplasma como la clindamicina y la sulfadiazina, también se asociaron con la existencia de especies resistentes. El número de pacientes tratados con antirretrovirales no fue significativamente diferente en ambos grupos. Sin embargo, en la época en la que se realizó el estudio, muy pocos enfermos estaban recibiendo tratamientos combinados de alta eficacia que incluyeran los modernos inhibidores de la proteasa. La introducción de estas pautas terapéuticas se ha asociado con una recuperación inmunológica manifestada por un ascenso de los linfocitos CD4 en la mayoría de los pacientes, y en algunos casos, resolución de la candidiasis resistente al fluconazol y de otras infecciones oportunistas (Flexner *et al.*, 1998). Otro de los factores asociados de forma significativa con el aislamiento de levaduras resistentes al fluconazol fue la cifra de linfocitos CD4, que era visiblemente inferior en los enfermos con especies resistentes (72 cels/mm^3 frente a 191 cels/mm^3 en quienes se hallaron especies sensibles). Entre el resto de los parámetros hematológicos evaluados, sólo la IgA más elevada predijo la existencia de especies resistentes. Por último, el consumo de cualquier antifúngico, de fluconazol, el tratamiento reciente con fluconazol

(definido como el consumo del fármaco en los 3 meses previos a la entrevista), y la mayor intensidad de la exposición (más de un mes de tratamiento, que equivale a más de 3 gramos de fluconazol aproximadamente), se asociaron con significación estadística con una CMI al fluconazol igual o superior a 64 mcg/L.

Por lo tanto existen otros muchos factores, además de los clásicamente descritos, que predicen resistencia al fluconazol. Todos ellos se pueden conocer con facilidad y de forma inmediata en la aproximación inicial al enfermo, y pueden resultar útiles cuando haya que tomar una decisión terapéutica con respecto al tratamiento antifúngico. El número de estas variables que reúna un paciente estará en relación directa con el riesgo de resistencia al fluconazol. Para aplicar estos conocimientos a la práctica médica habitual hemos calculado en unas tablas el valor predictivo positivo de resistencia para la presencia de estos factores por separado y de forma simultánea, lo que en este último caso aumenta el valor predictivo. Además, la ausencia de estas variables permitirá también predecir con un valor predictivo determinado la probabilidad de que nos hallemos ante una especie sensible.

El objetivo del trabajo era determinar los factores asociados con el desarrollo de resistencia al fluconazol y conocer la importancia de cada uno de estos factores. El análisis multivariable demostró que la variable independiente que mejor explicaba la resistencia era el consumo de antimicrobianos, y a continuación el haber tomado fluconazol, o bien la existencia de candidiasis oral en el momento de la evaluación del enfermo. Estos factores, según nuestros resultados, serían los principales determinantes de la aparición de resistencia al fluconazol. El resto de los factores de riesgo, aunque son útiles en la medida que se comportan como predictores clínicos, no parece que determinen la aparición de especies resistentes y, muy probablemente, su asociación con la resistencia estaba confundida por las otras variables, que serían los auténticos factores determinantes.

Entre los antimicrobianos se incluyeron los antibióticos que se emplean para el tratamiento de las infecciones oportunistas más frecuentes, y que son probablemente por ello los más consumidos, en muchas ocasiones durante períodos prolongados de tiempo. Los más representativos entre ellos fueron los fármacos antituberculosos. El consumo de estos fármacos resultó ser una variable independiente predictora de resistencia al fluconazol en el análisis global de los datos en el presente estudio. Además, cuando se excluyeron los enfermos infectados y se analizaron sólo los pacientes colonizados, el único factor que predijo resistencia al fluconazol fue el tratamiento antituberculoso. Asimismo, cuando se estableció el punto de corte para definir la resistencia en una CMI > 8 mcg/mL, es decir, se evaluaron todos los enfermos con sensibilidad disminuída la fluconazol, el único factor de riesgo independiente de resistencia al fluconazol fue el tratamiento antituberculoso, y en el límite de la significación estadística, la candidiasis oral.

La relación entre la candidiasis oral y las infecciones por micobacterias en los enfermos con infección por el VIH ya se había sugerido previamente (Cavaliere *et al.*, 1994, Nieto *et al.*, 1992). Se ha descrito, por ejemplo, un aumento en la frecuencia de aislamientos de *Candida* sp. del esputo de enfermos con sida y tuberculosis pulmonar frente a los que no tenían la enfermedad (Cavaliere *et al.*, 1994). En un estudio en 266 enfermos con infección por el VIH se encontró que la candidiasis oral era un marcador precoz de tuberculosis, con un período medio de 2.5 meses entre el diagnóstico y el desarrollo de la enfermedad (Nieto *et al.*, 1992). En un trabajo recientemente publicado, se relacionó la infección por otra micobacteria, *Mycobacterium avium*, con candidiasis oral que no respondía al fluconazol (Fichtenbaum & Powderly 1998). Una de las posibles explicaciones que daban los autores era que la infección por micobacterias simplemente refleja un estado de inmunodeficiencia grave, en el que se aíslan de forma más frecuente especies de *Candida* resistentes al fluconazol. No obstante, en España la infección más común por micobacterias es la tuberculosis, que no necesariamente se asocia con un deterioro inmune celular severo, a diferencia de lo que sucede con *Mycobacterium avium* o con otros patógenos oportunistas. Es por lo tanto posible, como también sugerían Fichtenbaum *et al.*, que estos individuos tengan una alteración

inmunitaria específica no relacionada con el recuento de linfocitos CD4, que les predisponga a infecciones por micobacterias y por levaduras simultáneamente.

De hecho, se ha descubierto recientemente una actividad micobactericida *in vitro* en anticuerpos que habían sido previamente caracterizados como candidicidas, e incluso los más activos frente a *Mycobacterium tuberculosis* demostraron ser también los más activos frente a *C. albicans* (Conti *et al.*, 1988). Según los autores, esto apoya la teoría de que debe existir un receptor compartido en ambos microorganismos. Por lo tanto sería posible que un deterioro específico de la inmunidad humoral facilite simultáneamente las infecciones por *Candida* y por micobacterias. En la misma línea que esta teoría, en enfermos con tuberculosis se ha descrito una disminución en la respuesta linfoproliferativa de las células mononucleares periféricas a antígenos de *Candida* y de micobacterias (Hirsch *et al.*, 1996). Es decir, que la infección por micobacterias facilita de algún modo las infecciones por *Candida* sp. Todo esto sugiere la existencia de un nexo común desde el punto de vista inmune entre las infecciones por levaduras y por micobacterias.

Una explicación alternativa y no excluyente es que el tratamiento con antimicrobianos por sí mismo favorezca las infecciones por levaduras, o que se produzcan modificaciones en la ecología fúngica. Se ha descrito una disminución en la actividad fagocítica de los leucocitos contra *Candida albicans* en postoperados de cirugía cardiovascular en relación con el uso previo de antibióticos, aunque el mecanismo por el

que sucede esto no es conocido (Tran *et al.*, 1997). Por otra parte, la eliminación de la flora saprofítica con el tratamiento antibiótico puede predisponer *per se* a la colonización e infección por *Candida* sp. (Seelog *et al.*, 1966). Así, en enfermos con fibrosis quística se demostró que las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas cepacia* aisladas del esputo fueron capaces de inhibir el crecimiento de 10 cepas diferentes de levaduras, la mayoría *Candida* sp., y de *Aspergillus* sp., lo que los autores atribuyeron a la producción de sustancias antifúngicas por parte de las bacterias. Además, la reducción en la competencia con otras especies saprofíticas cuando

son eliminadas por los antibióticos, también favorece el crecimiento de *Candida* sp. (Kerr *et al.*, 1994).

Después de los fármacos antituberculosos, el siguiente fármaco más frecuentemente utilizado del grupo de los antimicrobianos que predijeron resistencia al fluconazol fue el ciprofloxacino. El tratamiento con quinolonas, en concreto con norfloxacino, ya fue descrito en enfermos trasplantados de médula ósea como un factor de riesgo independiente para la colonización por *C. krusei*, que es una especie intrínsecamente resistente al fluconazol (Wingard *et al.*, 1991). Es posible que este fenómeno tenga alguna relación con la eliminación de cepas de *Pseudomonas*, frente a las que son activas las quinolonas, y de las que se ha descrito que tienen capacidad de inhibir el crecimiento de algunas levaduras, como ya se ha comentado. Una explicación alternativa sería que las quinolonas posean actividad antifúngica, con lo que podrían ser capaces de seleccionar la flora micótica. De cualquier forma es plausible que este antibiótico, al igual que el resto de los que forman parte del grupo implicado en la resistencia al fluconazol, produzca cambios en el ecosistema de la cavidad oral.

Además del tratamiento antimicrobiano, los resultados de este trabajo demuestran que el tratamiento con fluconazol es otro de los factores de riesgo que determinan la aparición de especies resistentes. Sin embargo, no es el único o principal responsable. No sólo el consumo de antimicrobianos fue el factor etiológico que mejor explicó la resistencia al fluconazol, sino que la candidiasis oral tuvo mayor poder predictor de resistencia que el propio fluconazol. La candidiasis y el tratamiento con fluconazol tienen mucha relación entre sí, y por este motivo resulta difícil saber cuál de las dos desencadena realmente la resistencia. Probablemente la candidiasis, además del consumo de fluconazol que implica, refleja también las diferentes alteraciones inmunitarias que predisponen a que las levaduras dejen de comportarse como colonizadores, lo que podría también suponer una mayor tendencia a que asienten diferentes tipos de levaduras con menor poder patógeno intrínseco.

El tratamiento previo con fluconazol ha sido el factor principalmente relacionado con la existencia de especies de *Candida* resistentes (Ruhnke *et al.*, 1994, Johnson *et al.*, 1995, Revankar *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994, Laguna *et al.*, 1997, Maenza *et al.*, 1996, Chavanet *et al.*, 1994), y la única variable que se consideró un predictor independiente de resistencia después de efectuar un análisis estratificado en dos estudios previos en pacientes con infección por el VIH (Laguna *et al.*, 1997, Chavanet *et al.*, 1994).

Se acepta por la mayoría de los autores que la presión selectiva ejercida por los antibióticos es un mecanismo que explica la resistencia bacteriana. Esta misma teoría se ha aplicado al tratamiento con fluconazol, apoyándose en el incremento demostrado en el aislamiento de especies resistentes en los últimos años coincidiendo con su uso extenso desde principios de los 90. En varios trabajos en enfermos con infección por el VIH y candidiasis oral recurrente tratados con fluconazol en los que se han intentado tipar por diferentes métodos las cepas de *Candida*, se describen fundamentalmente dos mecanismos de adquisición de resistencia. Según algunos autores (Johnson *et al.*, 1995), existiría una población mixta de cepas resistentes y sensibles en la orofaringe de los pacientes, lo que estaría apoyado por el hecho de que se encuentren varias concentraciones inhibitorias para los antifúngicos en las múltiples colonias de un mismo enfermo. El tratamiento prolongado con fluconazol seleccionaría a las cepas menos sensibles, lo que conduciría a un predominio progresivo de éstas. En la misma línea, Pfaller *et al.* (Pfaller *et al.*, 1994), que utilizaron técnicas genéticas de tipado de las especies, observaron que un número limitado de los pacientes infectados por una sola cepa de *Candida* mostraban un aumento en las CMI para fluconazol, que sin embargo seleccionaba las cepas resistentes en los enfermos que tenían simultáneamente más de una. Estas nuevas cepas podrían ser una nueva especie de *Candida* con una mayor resistencia intrínseca al fluconazol, como *C. krusei* o *C. glabrata*, o bien una cepa de *C. albicans* con menor sensibilidad (White, 1997).

No obstante, la mayoría de los autores sostienen que un mismo individuo es portador de una única clona predominante de *Candida* en la orofaringe, que persiste *in situ* durante los episodios de

candidiasis recurrente (Sangeorzan *et al.*, 1994, Boerlin *et al.*, 1996, Redding *et al.*, 1994). Por lo tanto, el desarrollo de resistencias durante el tratamiento no se produciría por la sustitución de unas clonas por otras con menor sensibilidad. Lo que sí se han detectado son cambios en las CMI sólo en los individuos expuestos, lo que haría pensar que una misma cepa incrementa progresivamente su nivel de resistencia al fármaco. Millon *et al.*, en un trabajo en el que se determinó por dos métodos diferentes el genotipo de las cepas de *Candida* de enfermos con infección por el VIH y candidiasis oral recurrente tratados con fluconazol, llegaron a la conclusión de que el tratamiento con dosis altas de fluconazol seleccionaba mutantes resistentes que mantenían un genotipo idéntico a lo largo del tiempo en cada enfermo, y que por tanto la aparición de resistencia no se debía a la adquisición de nuevas especies (Millon *et al.*, 1994). Boerlin *et al.*, utilizando 3 métodos diferentes de tipado molecular también concluyeron que el desarrollo de resistencia al fluconazol se producía sobre una misma clona, y que no se debía a la sustitución de ésta por otra diferente. (Boerling *et al.*, 1996). Observaron también que existían subpoblaciones de *C. albicans* de una misma cepa con diferentes susceptibilidades al fluconazol, lo que podría constituir un mecanismo de modificación sucesiva de la sensibilidad a este fármaco. Por lo tanto, para la mayoría de los autores, los sucesivos episodios de candidiasis oral experimentados por los enfermos VIH positivos no constituirían realmente una reinfección, sino una recidiva producida por la misma especie en la que se producen mutaciones. Tanto el deterioro de la inmunidad celular que caracteriza a estos enfermos, como la acción fungistática y no fungicida del fluconazol, serían los responsables de que el tratamiento antifúngico no consiga erradicar las levaduras de la cavidad oral, y la exposición sucesiva al fluconazol de una misma cepa produzca modificaciones progresivas en sus CMI al fármaco.

No obstante, a pesar de que existen métodos cada vez más discriminativos, resulta difícil tipar con fiabilidad *Candida albicans* o cualquier otra especie, por lo que todas estas teorías son cuestionables. Algunos trabajos muy recientes en los que se comparan entre sí cuatro métodos moleculares diferentes para evaluar la diversidad genética de *C. albicans*, han llegado a la conclusión de que existe una amplia diversidad genética en los aislamientos procedentes de la

orofaringe de los pacientes con infección por el VIH, tanto para las especies resistentes como para las sensibles, y por lo tanto cuestionan la idea de un origen clonal para las cepas resistentes en estos enfermos (Díaz-Guerra *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista molecular, se han encontrado varios mecanismos de resistencia antifúngica a los azoles en *Candida*, aunque la frecuencia relativa de cada uno de ellos no se ha determinado todavía. La mayoría de los trabajos se han centrado en *C. albicans*, y en menor medida en *C. glabrata* y *C. krusei*. Se han descrito fundamentalmente 4 modos de adquisición de resistencia a los azoles (White, 1997). Uno de ellos sería la alteración en los componentes de los esteroides de la membrana celular, lo que dificultaría la difusión de los antifúngicos azólicos al interior del hongo. Aunque se han identificado estas anomalías desde el punto de vista bioquímico en las membranas de las especies resistentes, todavía no se conocen las alteraciones genéticas específicas que las producen. Una vez que los antifúngicos han penetrado en el interior de la célula, se unen con la enzima diana 14 α -desmetilasa (14 DM), que interviene en la biosíntesis del ergosterol, que es un componente fundamental de la membrana plasmática. La interacción con esta enzima se puede modificar de dos formas al menos. Una de ellas sería por mutaciones puntuales en el gen ERG16 que codifica su síntesis, y que haría a la enzima menos sensible a la acción de los azoles. Otro mecanismo de resistencia sería una sobreexpresión de la enzima, que implicaría la necesidad de mayores concentraciones de los azoles para conseguir su efecto inhibitorio sobre el crecimiento. Aunque esta sobreexpresión de la enzima 14 DM se ha demostrado en un aislamiento altamente resistente de *Candida glabrata* (Warnock *et al.*, 1988), aún no se ha encontrado en *C. albicans*.

Las alteraciones de otras enzimas de la ruta de la biosíntesis del ergosterol también podrían contribuir a una menor sensibilidad a los azoles. En algunas cepas de *Candida albicans* y de *Saccharomyces cerevisiae*, el mecanismo de resistencia es la alteración en la enzima desaturasa de esteroides $\square^{(5,6)}$. En condiciones normales, los azoles inhiben la enzima 14 DM, y, con la participación de la desaturasa de esteroides $\square^{(5,6)}$, dan lugar a la formación de 14-metil-3,6 diol,

que es un esteroide fungistático en ausencia de ergosterol. Las mutantes de esta enzima bloquean la formación de este esteroide y causan acumulación de 14-metilfecosterol, que favorece el crecimiento.

Las concentraciones intracelulares reducidas de los azólicos se relacionan directamente con la resistencia a estos fármacos. La proporción entre la tasa de penetración y de salida de un fármaco azólico es probablemente el determinante más importante de la actividad de ese fármaco frente a una cepa determinada (Parkinson *et al.*, 1995). La salida del fármaco es un proceso que requiere energía, y está mediado por 2 clases de sistemas, los "transportadores ABC", y los "facilitadores mayores" (Sanglard *et al.*, 1995). Los genes que codifican los transportadores ABC se han clonado para *C. albicans*, y han sido denominados CDR (*Candida Drug Resistance*). Sólo se ha identificado genéticamente uno de los "facilitadores mayores", que está codificado por los genes MDR1 (*Multi Drug Resistance*). Las proteínas de los CDR actúan como transportadores sobre la mayoría de los fármacos antifúngicos, mientras que las MDR1 son aparentemente más selectivas para el fluconazol. La sobreexpresión de estos genes es un fenómeno probablemente inducible, ya que algunas veces se ha comprobado que la resistencia desaparece cuando se evita la exposición a los antifúngicos. Existe una sobreexpresión de ambos genes en muchos de los aislamientos resistentes a los azoles de *C. albicans*, y posiblemente también de *C. glabrata*. En ambos casos se ha comprobado que las concentraciones del fármaco a nivel intracelular aumentan con la adición de un inhibidor metabólico, lo que aumenta también la sensibilidad al antifúngico. En el caso de *C. krusei* se han demostrado también bajas concentraciones del fármaco azólico en los aislamientos resistentes. Sin embargo, las concentraciones de itraconazol no se alteraban cuando se añadían inhibidores metabólicos, lo que indica que la salida del fármaco no es el principal mecanismo en este caso, en el que la impermeabilidad de la membrana jugaría un papel determinante.

Es muy probable que existen, además de los mencionados, otros mecanismos de resistencia que hasta ahora aún no se han identificado. Aunque todos ellos contribuyen a la resistencia a los azoles en las diferentes especies de *Candida*, no se conoce cuál es el más frecuente. Es probable que en una cepa concreta participe alguno, y no todos estos mecanismos de forma simultánea. No

obstante, en un estudio de 17 aislamientos en los que se desarrolló resistencia a los azoles de forma gradual, se identificaron al menos 5 alteraciones genéticas que contribuyeron al fenotipo resistente final. Estos cambios incluyeron una sobreexpresión de 3 genes (MDR1, CDR1 y ERG16), y una mutación puntual y una conversión del gen ERG16 (White, 1997).

Los resultados del presente estudio no apoyan el que las características del tratamiento con fluconazol sea un factor decisivo en la aparición de especies de *Candida* resistentes. Aunque el análisis simple demostró que la exposición reciente e intensa al fluconazol se asociaban con un mayor riesgo de adquisición de especies resistentes (OR de 5,5 y 7,3 respectivamente), en el análisis multivariable las características del tratamiento perdieron significación cuando se introdujeron otras variables estadísticamente más potentes, lo que indica que no son factores independientes que determinen resistencia al fluconazol.

La intensidad de la exposición al fluconazol se había evaluado previamente en pacientes con infección por el VIH y candidiasis resistente (Jonhson *et al.*, 1995, White, 1997, Sangeorzan *et al.*, 1994). Jonhson *et al.* habían encontrado que un tratamiento prolongado a dosis bajas se asociaba con mayor frecuencia a cepas resistentes que los tratamientos cortos de forma intermitente (Johnson *et al.*, 1995). Sin embargo también se han descrito especies resistentes con esta última forma de administración (White, 1997). Se han observado incrementos en las CMI de las cepas de *Candida* sp. en los pacientes que recibían profilaxis con fluconazol tras unos meses de tratamiento en otro estudio, incluso tras períodos de 1 mes de tratamiento supresivo (Sangeorzan *et al.*, 1994, Newman *et al.*, 1994), y tanto en los que efectuaban profilaxis diaria (Sanguinetti *et al.*, 1993), como en los que la efectuaban con periodicidad semanal (Baily *et al.*, 1994, Laguna *et al.*, 1997, Millon *et al.*, 1994) encontraron que la dosis total administrada de fluconazol se asociaba con la aparición de especies resistentes, de forma que sólo se aislaron éstas cuando la dosis superó los 5 gramos. En una publicación muy reciente, Maenza *et al.* demostraban con un análisis multivariable que la duración del tratamiento con fluconazol junto con el número de episodios de candidiasis oral tratados eran factores predictores independientes de resistencia (Maenza *et al.*, 1997). No

obstante, una limitación importante de este trabajo es que la únicas variables analizadas eran las relacionadas con la exposición al fluconazol y la cifra de linfocitos CD4. Con respecto a la exposición reciente o antigua al fluconazol, sólo en un trabajo previo se había estudiado como una posible variable predictora de resistencia, y se llegó a la conclusión de que lo era después de efectuar un análisis multivariable (Chavanet *et al.*, 1994). En un estudio prospectivo publicado por Johnson *et al.* (Jonson *et al.*, 1995) ya se había encontrado que las CMI al fluconazol de las especies de *Candida* disminuyeron en un enfermo cuando se interrumpió el tratamiento, lo que sugiere que al disminuir la presión selectiva que ejerce el fármaco, al menos algunas cepas tenderían de nuevo a recuperar su sensibilidad primitiva, y por tanto esto apoyaría la necesidad de una exposición prolongada para que la resistencia se mantenga.

El hecho de que en nuestro estudio la candidiasis oral en el momento de la evaluación se asociase, incluso más que el consumo de fluconazol, con resistencia también podría indicar que los enfermos que estén recibiendo fluconazol de forma cercana en el tiempo, o que lo tomen en mayor cantidad, tengan más probabilidad de desarrollar una especie resistente. Sin embargo, en este caso es también posible que intervengan otros factores y, de cualquier modo, los resultados del análisis multivariable no apoyan el que por sí mismos constituyan factores determinantes de resistencia al fluconazol. Se ha descrito que las mutaciones genéticas en las cepas de *Candida* inducidas por el fluconazol pueden producir resistencia definitiva, y por lo tanto persistente aunque desaparezca la exposición al fármaco, o en algunos casos transitoria o epigenética, si por el contrario se produce un aumento en la expresividad de un gen cuya persistencia dependa de la exposición mantenida (White, 1997). El predominio de uno u otro tipo podría, entre otros factores, explicar la necesidad de una exposición reciente y la □resensibilización □ al fluconazol que se ha demostrado en algunos trabajos en los que se interrumpe el tratamiento con este fármaco, y la posibilidad de que en otros casos la resistencia perdure en el tiempo, independientemente de que se produzca una nueva exposición.

Dada la importante participación del sistema inmune celular en la defensa contra los hongos, sería esperable que su alteración predispusiera a infecciones o a la colonización por especies que en condiciones normales estarían reprimidas. Varios autores han señalado la importancia del nivel de inmunodepresión en el desarrollo de resistencia al fluconazol. De hecho, en la mayor parte de los trabajos, las especies resistentes se aislaban en los sujetos más inmunodeprimidos (Ruhnke *et al.*, 1994, Johnson *et al.*, 1995, Laguna *et al.*, 1997, Maenza *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994, Revankar *et al.*, 1996, Chavanet *et al.*, 1994, Imbert Bennard *et al.*, 1994), y muchos de los autores sostenían que la caída en la cifra de linfocitos CD4 era uno de los factores determinantes de la aparición de estas especies (Johnson *et al.*, 1995, Maenza *et al.*, 1996, Revankar *et al.*, 1996). En los estudios que incluían enfermos con un rango más amplio de células T *helper* se comprobó que prácticamente no se aislaron especies resistentes en los que tenían los recuentos más elevados (Chavanet *et al.*, 1994, Revankar *et al.*, 1996), y tampoco se desarrollaron resistencias en el seguimiento prospectivo aunque se tratara a estos enfermos con fluconazol. Se ha sugerido que los pacientes con cifras más bajas de linfocitos CD4, y por tanto más inmunodeprimidos, tienen una menor capacidad para eliminar las infecciones. Dado que el fluconazol es un fármaco fungistático, y no fungicida, la respuesta inmune del huésped es un factor importante para erradicar la levadura. Si falta esta respuesta, los microorganismos permanecen durante períodos prolongados de tiempo en la boca, durante los cuáles puede haber modificaciones en la sensibilidad al fármaco, o la sustitución de unas cepas por otras (Johnson *et al.*, 1995). En los enfermos con mejor situación inmune la infección se eliminaría en cada episodio, por lo que podría utilizarse sin prácticamente riesgo el fluconazol. Sin embargo, por una parte no se tuvo en cuenta la importancia de otros factores endógenos o exógenos en el desarrollo en ninguno de estos casos.

No obstante, dos estudios anteriores que, a diferencia de los demás, evaluaron con un análisis multivariable los factores que condicionan la resistencia al fluconazol, encontraron que el recuento de linfocitos CD4 no era realmente un factor determinante de resistencia. Los resultados del presente trabajo coinciden con esta conclusión, ya que aunque los linfocitos CD4 fueron significativamente más bajos en los enfermos con especies resistentes, en el análisis multivariable

no resultaron ser un factor independiente predictor de resistencia, ya que siempre que se ajustaba para cualquier otra variable, dejaba de explicar por sí mismo la resistencia al fluconazol. Del mismo modo, cuando se estratificaron los enfermos por subgrupos de linfocitos CD4, aunque se observó una proporción creciente de especies de *Candida* resistentes al fluconazol a medida que la cifra linfocitos descendía, y esta tendencia se mantuvo cuando se evaluaron sólo los pacientes colonizados, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Lo que probablemente refleje la situación inmune del enfermo sea la mayor probabilidad de exposición a los factores verdaderamente determinantes (los fármacos antimicrobianos o antifúngicos) más que una influencia directa en la aparición de resistencia al fluconazol.

Del resto de los parámetros inmunológicos analizados, sólo la IgA predijo de forma significativa la resistencia al fluconazol en el análisis univariable, con unas concentraciones séricas significativamente más altas en los pacientes con especies resistentes. Sin embargo, tampoco se comportó como factor de riesgo independiente en el análisis multivariable. Habitualmente los enfermos con candidiasis oral tienen niveles más elevados de IgA en la saliva que los colonizados, lo que no implica necesariamente que a nivel sistémico se produzca el mismo fenómeno. Sí es conocido sin embargo que la IgA es un marcador de progresión en la infección VIH, y dado que las especies resistentes se aíslan en los enfermos más inmunodeprimidos, su elevación sería probablemente un reflejo indirecto del deterioro inmune del enfermo más que un parámetro independiente predictor de resistencia.

Además de los factores expuestos, es probable que existan algunos otros que determinen la adquisición de resistencia al fluconazol. Un fenómeno probablemente poco valorado es la existencia de cepas de *C. albicans* que son “primariamente” resistentes al fluconazol, como ya han descrito otros autores (White) 1997). De hecho, 4 de los 19 pacientes del presente estudio con especies resistentes nunca habían sido tratados con antimicrobianos o fluconazol, y esta cifra aumentó hasta 10 pacientes cuando se valoraron también las especies con sensibilidad □dosis-dependiente□ del fluconazol. Esto discrepa de algunas publicaciones anteriores, en que no se

encontraron resistencias primarias para el fluconazol (Rhunke *et al.*, 1994). Sin embargo, en artículos posteriores también se han descrito especies resistentes de *C. albicans* y LDCA en pacientes con infección por el VIH que no habían sido previamente tratados con este fármaco (Laguna *et al.*, 1997, Martins *et al.*, 1997, Revankar *et al.*, 1996). Revankar *et al.* (1996) encontraron un 19% de especies de *Candida* con una CMI para el fluconazol mayor o igual a 8 mcg/mL en pacientes con infección VIH que no habían sido expuestos al fluconazol, y Laguna *et al.* (1996) comunicaron también este hecho posteriormente. Sin embargo, en estos casos se desconoce si existía algún otro factor de riesgo para la adquisición de especies resistentes. Se han aislado también cepas de *Candida albicans* con resistencia primaria al fluconazol en pacientes inmunodeprimidos sin infección por el VIH que no habían sido previamente expuestos al fármaco (Goff *et al.*, 1995), y se ha encontrado también resistencia primaria a otros antifúngicos, como la flucitosina, en pacientes con infección por el VIH (Law *et al.*, 1994).

Los resultados del presente estudio demuestran que una proporción elevada de los pacientes en los que se aislaron especies de *Candida* primariamente resistentes al fluconazol se encontraban en estadios precoces de la enfermedad. Su cifra mediana de linfocitos CD4 fue de 258 cels/mm³. De hecho, se han descrito especies de *Candida* resistentes a antifúngicos colonizando la boca de sujetos sanos (Hauman *et al.*, 1993). Algunos trabajos en que se utilizaron técnicas de aglutinación para determinar el biotipo de *C. albicans*, pusieron de manifiesto que las cepas de los pacientes inmunocompetentes eran diferentes a las de los pacientes inmunodeprimidos, y que las cepas resistentes pertenecían en su mayoría a un serotipo diferente a las cepas sensibles (Imbert-Bernard *et al.*, 1994, Brawner *et al.*, 1989). Sin embargo, en un reciente estudio en que se emplearon técnicas de biología molecular, se comprobó que no había diferencias entre las cepas de *Candida albicans* aisladas de la orofaringe de individuos sanos, con infección por el VIH o con candidiasis invasiva, ni las cepas resistentes tenían alguna característica particular que las diferenciase del resto (Boerlin *et al.*, 1996).

Sería por lo tanto posible que las especies con resistencia primaria al fluconazol formasen parte de la flora habitual del tracto digestivo en estos sujetos, independientemente de su estado inmunitario. El menor poder patógeno intrínseco que poseen (Imbert Bernard *et al.*, 1994, Samaranayake *et al.*, 1994) quizá sería el responsable de que produzcan infección con menos frecuencia que las especies sensibles. La exposición posterior a antimicrobianos o al fluconazol favorecería la selección de especies resistentes en los pacientes tratados, o la transformación de cepas sensibles en resistentes (Johson *et al.*, 1995, Pfaller *et al.*, 1994, Boerlin *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994).

Además de éstos, es probable que existan más factores implicados en el aislamiento de especies resistentes al fluconazol en los pacientes con infección por el VIH. Se ha sugerido en algunos estudios la posibilidad de transmisión nosocomial, la existencia de portadores de *Candida* sp. entre el personal sanitario y la transmisión entre parejas como mecanismos alternativos de adquisición de especies resistentes (Barchiesi *et al.*, 1995, Dronda *et al.*, 1996, Sangeorzan *et al.*, 1994, Revankar *et al.*, 1996) . Es también posible que existan otras circunstancias todavía no identificadas que modulen la relación huésped-levadura en la cavidad orofaríngea de estos pacientes.

El tratamiento de la candidiasis oral resistente al fluconazol plantea a menudo a los clínicos un problema de difícil solución para el que existen, sin embargo, algunas alternativas. Se ha comunicado buena respuesta terapéutica en algunos enfermos con el empleo de dosis muy elevadas de fluconazol, de 400 a 800 mg diarios, si previamente no habían respondido a la pauta convencional de 100-200 mg/día durante 7-14 días (Revankar *et al.*, 1997). Aunque se han descrito resistencias cruzadas, en algunos casos se ha obtenido una respuesta favorable con otros antifúngicos azólicos, como el ketoconazol o el itraconazol (Chavanet *et al.*, 1994, Laguna). Sin embargo, ambos presentan el inconveniente de la absorción subóptima en los enfermos en las fases más avanzadas de la infección por el VIH, en los que suele existir una disminución de la secreción ácida gástrica (Como *et al.*, 1994).

Recientemente se han comercializado soluciones orales de itraconazol y de anfotericina B. Con respecto al itraconazol, con la formulación en solución ciclodextrina se alcanzan concentraciones plasmáticas de aproximadamente el doble que con la formulación convencional en cápsulas, y tiene además la ventaja de que posee acción tópica. En algunos ensayos en candidiasis oral refractaria que incluían enfermos que no habían respondido a la formulación convencional de itraconazol o al ketoconazol, la solución ha demostrado ser eficaz, con una tasa de respuesta clínica en torno al 60% (Cartledge *et al.*, 1994, Phillips *et al.*, 1996).

La solución oral de anfotericina B también constituye una alternativa para el tratamiento de la candidiasis orofaríngea que no responde al fluconazol. Recientemente ha finalizado un ensayo abierto realizado en los EE.UU. en el se trató a enfermos con candidiasis oral refractaria al fluconazol con 500 mg de solución de anfotericina B, con una tasa de respuesta del 44% y con buena tolerancia (Zingman *et al.*, 1997).

Otra alternativa terapéutica atractiva entre los tratamientos es la asociación de itraconazol y flucitosina, cuya interacción es sinérgica. En un trabajo en el que se comparaban estos dos fármacos con fluconazol en enfermos con infección por el VIH y esofagitis por *Candida*, se obtuvo una tasa de respuestas similar, y se encontró un incremento del 30% de los efectos terapéuticos de cada uno de ellos por separado cuando se utilizaban combinados (Barbaro *et al.*, 1996).

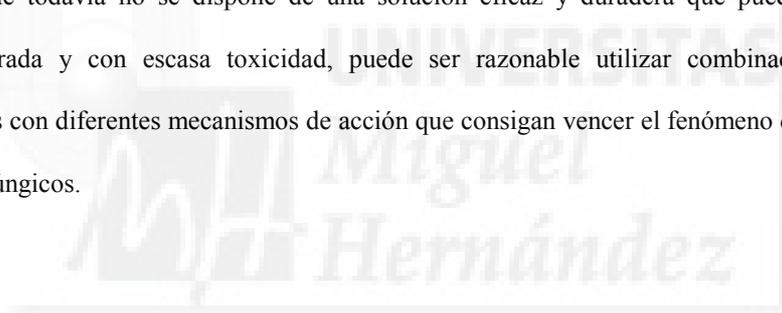
La anfotericina B constituye la opción final para los episodios que no responden a otras medidas, sobre todo si existe enfermedad severa o afectación esofágica. Sin embargo, tiene el inconveniente de su toxicidad y la necesidad de administración endovenosa.

Se están investigando también nuevos antifúngicos, como las equinocandinas o las neumocandinas, pero la experiencia es todavía muy limitada. Recientemente se ha sintetizado un nuevo triazólico oral (D0870), que tiene actividad frente a cepas de *Candida* resistentes al fluconazol *in vitro*. Su mayor liposolubilidad con respecto al fluconazol le confiere la ventaja de una mayor capacidad de

penetración en las células con permeabilidad reducida. Se especula también con la posibilidad de que no comparta todos los mecanismos de transporte fuera de la célula con el fluconazol, lo que le permitiría permanecer más tiempo dentro de la levadura. En un estudio piloto que incluyó 26 enfermos con infección por el VIH y candidiasis oroesofágica refractaria al tratamiento con fluconazol, 15 enfermos mejoraron sintomáticamente, aunque ninguno de los pacientes con candidiasis resistente *in vitro* tuvo una respuesta completa (Cartledge *et al.*, 1998).

Se están también ensayando inhibidores de las bombas de eliminación de los antifúngicos del interior de las células, con el fin de aumentar la actividad de los azoles. El verapamil, por ejemplo, es un inhibidor de los transportadores ABC en los mamíferos, aunque hasta ahora no se ha podido demostrar su eficacia en las cepas de *Candida albicans* resistentes al fluconazol.

Dado que todavía no se dispone de una solución eficaz y duradera que pueda ser fácilmente administrada y con escasa toxicidad, puede ser razonable utilizar combinaciones de varios fármacos con diferentes mecanismos de acción que consigan vencer el fenómeno de la resistencia a los antifúngicos.



Además del uso de antifúngicos, existen medidas complementarias que pueden mejorar la evolución de los enfermos con infecciones por especies *Candida* resistentes,. Puesto que se producen con más frecuencia en los estadios terminales de la infección por el VIH, la recuperación de la situación inmune de los pacientes puede contribuir a mejorar los resultados. Se ha comunicado resolución clínica de episodios de muguet refractario a diversos tratamientos antifúngicos en algunos enfermos con un recuento previo de linfocitos CD4 muy bajos coincidiendo con la introducción del tratamiento antirretroviral con inhibidores de la proteasa. Además, existe entre los clínicos la sensación subjetiva de que se ha reducido la incidencia de candidiasis refractaria desde la introducción del tratamiento antirretroviral altamente eficaz, aunque todavía existen pocos datos que confirmen esta hipótesis. De hecho, se ha comunicado mejoría en los casos de escasa respuesta al tratamiento en un primer momento tras la instauración de los nuevos antirretrovirales, pero con una elevada proporción de recaídas (Fichtenbaum *et al.*, 1998).

Por otra parte, como se deduce de nuestros resultados, la cifra de linfocitos CD4 no es uno de los factores determinantes de la resistencia al fluconazol, aunque sí del desarrollo de candidiasis oral. Por lo tanto, no sería sorprendente encontrar especies resistentes colonizando en los enfermos tratados con las pautas antirretrovirales de alta eficacia que no tienen en la actualidad lesiones, y podrían así producirse infecciones por estas especies cuando existiera un fracaso del tratamiento antirretroviral. El estudio de la sensibilidad de las cepas que colonizan en el momento actual a los enfermos en los que se aislaron especies resistentes antes de la introducción de los nuevos antirretrovirales sería interesante para comprobar si ha habido variación en la prevalencia de especies de *Candida* resistentes al fluconazol.



VIII. BIBLIOGRAFIA



Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis 1997; 24: 1122-8.

Anaissie EJ, Bodey GP, Rinaldi MD. Emerging fungal pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8: 323-30.

Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol 1980; 25: 1-10.

Ausina V. Introducción a la micología médica. Terapéutica antifúngica. En: G. Verger Garau (ed). Enfermedades Infecciosas. Ediciones Doyma. Barcelona. 1988: 351-58.

Azole antifungal agents. Clin Infect Dis 1992; 14 (Supl 1): S161-169.

Baily GG, Perry FM, Denning DW, Mandal BK. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. AIDS 1994; 8: 787-92.

Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, Edwards JR, Tolson J, Henderson T, Martone WJ. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. Am J Med 1991; 91, Suppl 3B:86-89.

Barbaro G, Barbarini G, Di Lorenzo G, on the behalf of the *Candida* Esophagitis Multicenter Italian Study (CEMIS) Group. Chest 1996; 110: 1507-14.

Barchiesi F, Hollis RJ, Del Poeta M, McGough DA, Scalise G, Rinaldi MG, Pfaller MA. Transmission of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and

oropharyngeal candidiasis documented by pulsed-field gel electrophoresis. Clin Infect Dis 1995; 21: 561-4.

Beck-Sague CM, Jarvis WR, the National Nosocomial Infectious Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. J Infect Dis 1993; 167: 1247-51.

Blanchard DK, Michelini-Norris MB, Djeu JY. Production of granulocytic-macrophage colony-stimulating factor by large granular lymphocytes stimulated with *Candida albicans*: role in activation of human neutrophil function. Blood 1991; 77: 2259-65.

Bodey G, Bueltmann B, Duguid W, *et al.* Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11: 99-10.

Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Durussel C, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1996; 34: 1235-48.

Boken D, Swindells S, Rinaldi M. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. Clin Infect Dis 1993; 17: 1018-21.

Brawner DL, Cutler JE. Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 1989; 27: 1335-41.

Brummer E, Stevens DA. Synergy of human neutrophils with fluconazole in killing *Candida* species. Mycopathologia 1996; 134: 115-20.

Calderone RA, Lehrer N, Segal E. Adherence of *Candida albicans* to buccal and vaginal epithelial cells: ultrastructural observations. *Can J Microbiol* 1984; 30: 1001-7.

Cartledge JD, Denning DW, Dupont B, Clumeck N, De Wit S, Midgley J, Hawkins DA, Gazzard BG. Treatment of HIV-related fluconazole-resistant oral candidosis with D0870, a new triazole antifungal. *AIDS* 1998; 12: 411-16.

Cartledge JD, Midgley J, Youle M, Gazzard BG. Itraconazole cyclodextrin solution-effective treatment for HIV-related candidosis unresponsive to other azole therapy. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33: 1071-3.

Cavaliere MJ, Maeda MY, Longatto-Filho A, Shirata NK, Santos RT, Kitamura C, Ueki SY, Martins MC. Frequency of *Candida* spp. infection in tuberculous patients with acquired immunodeficiency syndrome: morphological and immunocytochemical study in sputum. *Pathologica* 1994; 86: 409-11.

Chavanet P, López J, Grappin M, *et al.* Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and *in vitro-in vivo* correlation in HIV infected patients. *AIDS* 1994; 8: 945-50.

Clift RA. Candidiasis in the transplant patient. *Am J Med* 1984; 77 (suppl 4D): 34-8.

Coleman D, Russell R, Harwood M, Mulachy F, Shanley D. Clinical and microbiological analysis of oral candidiasis in HIV positive patients. *J Dent Res* 1989; 68: 893.

Como JA, Dismukes WE. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N Engl J Med* 1994; 4: 263-272.

Conti S, Fanti F, Magliani W, Gerloni M, Bertolotti D, Salati A, Cassone A, Polonelli L. Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J Infect Dis* 1998; 177: 807-11.

DeGregorio M, Lee W, Linker C, *et al.* Fungal infection in patients with acute leukaemia. *Am J Med* 1992; 73: 543-48.

Denning DW, Baily GG, Hood SV. Azole resistance in *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 261-80.

Dennis H, Itkin IG. Effectiveness and complications of aerosol dexamethasone phosphate in severe asthma. *J Allergy* 1964; 35: 70-3.

Diamond R. The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 480-86.

Díaz-Guerra MT, Martínez-Suárez JV, Laguna F, Rodríguez-Tudela JL. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 856-61.

Dixon DM, Fromtling RA. Morphology, Taxonomy and Classification of the Fungi. En: Ballows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds). *Manual of Clinical Microbiology* (5th ed). American Society for Microbiology, Washington, DC. 1991: 579-87.

Drona F, Rodríguez-Tudela JL, Mera P, *et al.* Esofagitis por *Candida albicans* resistente al fluconazol: fracaso terapéutico y correlación *in vitro*. *Med Clin Barc* 1992; 5: 199.

Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL, González-López A, Valencia E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 446-52.

Edwards JR. Invasive *Candida* infections. Evolution of a fungal pathogen. *N Engl J Med* 1991; 324: 1060-62

Epstein JB, Kimura LH, Menard TW, Truelove Pearsall NN. Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 469-74.

Fichtenbaum CJ, Powderly G. Refractory mucosal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 556-65.

Flexner C. HIV- protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998; 338: 1281-92.

Frasser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 414-21.

Fox R, Neal KR, Leen CLS, Ellis ME, Mandal BK. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. *J Infect* 1991; 22: 201-2.

Fulton & Phillips, 7th International Aids Conference, 1990, abstract ThB468.

Gefter WB, Lawfer I, Edell S, Gohel VK. Candidiasis in the obstructed esophagus. *Radiology* 1981; 138: 25-8.

Goff DA, Koletar SL, Buesching WJ, Barnishan J, Fass RJ. Isolation of fluconazole-resistant *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-negative patients never treated with azoles. Clin Infect Dis 1995; 20: 77-83.

Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, *et al.* A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. N Engl J Med 1992; 326: 845-51.

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. N Engl J Med 1981; 305: 1425-30.

Gross MH, Pickard WW, Perfect JR. Retrospective review of the use of amphotericin B use in a tertiary-care medical centre. Am J Hosp Pharm 1987; 44: 1353-57.

Greenspan D, Overby G, Feigal DW, Macphail L, Miyasaki S, Greenspan JS. Sites and relative prevalence of hairy leukoplakia, pseudomembranous candidiasis and erythematous candidiasis. 5 Int Conf AIDS, Montreal, 1989; Abstr ThBP 320.

Gundry SR, Borkon AM, McIntosh CL, Morrow AG. *Candida* esophagitis following cardiac operation and short term antibiotic prophylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 1980; 80: 661-8.

Gutiérrez F, Wall P, Cohen J. An audit of antifungal use in a United Kingdom university hospital. J Antimicrob Chemother 1995

Gutiérrez F, Wall P, Cohen J. Trends in antifungal use and antifungal isolates in a university hospital 1990-1992. J Hosp Infect 1995

Gutiérrez F, Wall P, Cohen J. Uso de anfotericina B en un hospital general. Med Clin Barc 1995; 105: 89-93.

Hauman CH, Thompson IO, Theunissen F, Wolfaardt P. Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV seropositive persons. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76: 570-2.

Hawkins C, Armstrong D. Fungal infections in the immunocompromised host. *Clinical Haematol* 1984; 13: 599-630.

Hay RJ. Overview of studies of fluconazole in oropharyngeal candidiasis. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl 3): S334-S337.

Hendel L, Svejgaard E, Walsøe I, Kieffer M, Stenderup A. Esophageal candidosis in progressive systemic sclerosis: occurrence, significance and treatment with fluconazole. *Scan J Gastroenterol* 1988; 23: 1182-6.

Hennequin C, Labenne M, Benkerrou M, *et al.* Fluconazole-resistant *Candida albicans* in an immunocompetent child. *Clin Infect Dis* 1994; 19:1179-80.

Herrero JA, Lumbreras C, Sanz F, Lizasoain M, Aguado JM, Pastor C, Noriega AM. Fungemia nosocomial por *Candida parapsilosis*. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 520-24.

Hirsch CS, Hussain R, Toossi Z, Dawood G, Shahid F, Ellner JJ. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3193-8.

Imbert-Bernard C, Valentin A, Reynes J, Mallié M, Bastide JM. Relationship between fluconazole sensitivity of *Candida albicans* isolates from HIV positive patients and serotype, adherence and CD4+ lymphocyte count. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 711-16.

Iwen PC, Kelly DM, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. Clin Infect Dis 1995; 20: 342-7.

Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995; 20: 1526-30.

Johnson EM, Warnock DW, Luker J, Porter SR, Scully C. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. J Antimicrob Chem 1995; 35: 103-14.

Just-Nubling G, Gentschew J, Meissner K, *et al.* Fluconazole prophylaxis of recurrent oral candidiasis in HIV-positive patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10: 917-21.

Kagaya K, Fukazawa Y. Murine defense mechanisms against *Candida albicans* infection II. Microbiol Immunol 1981; 25: 807-18.

Kerr J. Inhibition of fungal growth by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis despite their extensive treatment with broad spectrum antibiotics. J Infect 1994; 28: 305-10.

King RD, Lee JC, Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. Infect Immun 1980; 27: 667-74.

Kimura LG, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1980; 28: 464-68.

Kitchen VS, Savage M, Harris JRW. *Candida albicans* resistance in aids. J Infect 1991; 22: 204-5.

Klein RS, Harris CA, Small CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1984; 311: 354-8.

Korting HC, Ollert M, Georgii A, Froschl M. *In vitro* susceptibilities and biotypes of *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1989; 26: 2626-31.

Laguna F, Valencia E, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL, Chaves F, Dronda F. Differences between fluconazole-resistant and fluconazole-sensitive oropharyngeal candidiasis in HIV positive patients. 34th ICAAC, American Society for Microbiology. Orlando, october 1994 (abstract I 213).

Laguna F, Rodríguez-Tudela JL, Martínez-Suárez JV, Polo R, Valencia E, Díaz-Guerra TM, Dronda F, Pulido F. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 124-30.

Laine L, Dretler RH, Contreas CN, Tuazon C, Koster FM, Sattler F, Squires K, Islam MZ. Fluconazole compared with ketoconazole for the treatment of *Candida* esophagitis in AIDS. A randomized trial. *Ann Intern Med* 1992; 117: 655-60.

Laine L. The natural history of esophageal candidiasis after successful treatment in patients with aids. *Gastroenterol* 1994; 107: 744-6.

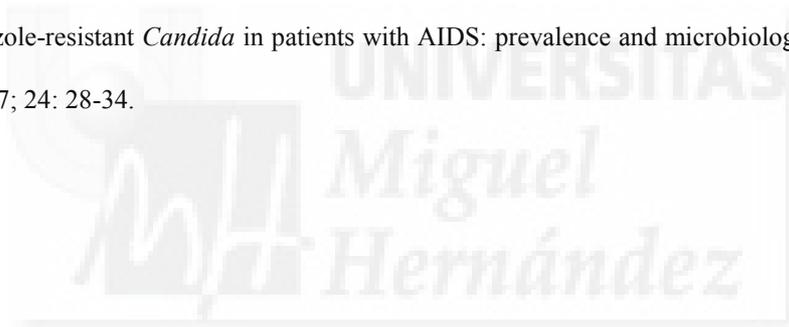
Oral candidosis in HIV infection (letter). *Lancet* 1989; 23/30: 1491-1492.

Law D, Moore CB, Wardle HM, Ganguli LA, Keaney MGL, Denning DW. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chem* 1994; 34: 659-68.

Lehrer RI, Cline MJ. Leukocyte *Candidacidal* activity and resistance to systemic candidiasis in patients with cancer. *Cancer* 1971; 27: 1211-17.

Luna MA, Tortoledo ME. Histologic Identification and Pathologic Patterns of Disease Caused by *Candida*. En: Bodey GP (ed). *Candidiasis. Patogenesis, Diagnosis and Treatment* (2nd ed). Raven Press. New York. 1993: 21-42.

Maenza JR, Merz WG, Romagnoli MJ, Keruly JC, Moore RD, Gallant JE. Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 28-34.



Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, Chaisson RE, Merz WG, Gallant JE. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 173: 219-25.

Maksymiuk AW, Thongprasert S, Hopfer R, Luna MA, Fainstein V, Bodey Gp. Systemic candidiasis in cancer patients. *Am J Med* 1984; 77: 20-7.

Marodi L, Korchak HM; Johnston RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1991; 146: 2783-89.

Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Point prevalence of oropharyngeal carriage of fluconazole-resistant *Candida* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 843-6.

Mc Quillen DP, Zingman BS, Meunier F, Levitz MS. Invasive infections due to *Candida krusei*: report of ten cases of fungemia that include three cases of endophthalmitis. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 472-78.

Medoff G, Kobayashi G. Strategies in the treatment of systemic fungal infections. *N Engl J Med* 1980; 302: 145-55.

Meunier F. Fungal infections in the compromised host. En: RH Rubin, LS Young (eds). *Clinical Approach to the Infection in the Compromised Host* (2nd ed). Plenum Medical Book Company. New York. 1988.

Mildvan D, Mather U, Enlow RW, *et al.* Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann Intern Med* 1982; 96: 700-4.

Millon L, Manteaux A, Reboux R, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. J Clin Microbiol 1994; 32: 1115-18.

Newman SL, Flanigan TP, Fisher A, Rinaldi MG, Stein M, Vigilante K. Clinically significant mucosal candidiasis resistant to fluconazole treatment in patients with AIDS. Clin Infect Dis 1994; 19: 684-6.

Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. Am J Med 1996; 100: 617-23.

Nieto A, Guix J, Navarro V, Roig P, Bernacer B. Papel de la candidiasis oral como marcador predictivo de enfermedad tuberculosa en los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). An Med Interna 1992; 9: 318-21.

Nose Y, Komori K, Inouye H, Nomura K, Yamamura M, Tsuji K. Role of macrophages in T lymphocyte response to *Candida* allergen in man with special reference to HLA-D and DR. Clin Exp Immunol 1981; 45: 152-7.

Odds FC. *Candida* and candidosis. A review and bibliography. 2nd ed. London: Balliere Tindall; 1988.

Odds FC. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. J Antimicrob Chem 1993; 31: 463-71.

Pannuti CS, Gluingrich RD, Pfaller MA, Wenzel RP. Nosocomial pneumonia in adult patients undergoing bone marrow transplantation: a 9 years study. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1-5.

Parkinson T, Falconer DJ, Hitchcock CA. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1696-99.

Perfect JR, Pickard WW, Hunt DL, Palmer B, Schell W. The use of Amphotericin B in nosocomial fungal infection. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 474-9.

Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, *et al.* Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 59-64.

Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 287-91.

Phelan JA, Saltzman JR, Friedland GH, *et al.* Oral findings in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64:50-56.

Phillips P, Zemcov J, Mahmood W, Montaner JSG, Craib K, Clarke AM. Itraconazole cyclodextrin solution for fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in AIDS: correlation of clinical response with *in vitro* susceptibility. *AIDS* 1996; 10: 1369-76.

Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220: 751-58.

Pollock JJ, Santarpia RP, Heller HM, Xu L, Lal K, Fuhrer J, Kaufman HW, Steigbigel RT. Determination of salivary anticandidal activities in healthy adults and patients with AIDS: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5: 610-8.

Powderly WG, Saag MS, Cloud GA, *et al.* A controlled trial of fluconazole or amphotericin B to prevent relapse of cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 793-8.

Powderly WG, Finkelstein DM, Feinberg J, *et al.* A randomized trial comparing fluconazole with clotrimazole troches for the prevention of fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 700-5.

Redding S, Smith J, Faranacci G, Rinaldi M, Fothergill A, Rhine-Chalberg J, Pfaller M. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by *in vitro* susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 240-2.

Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 174: 821-7.

Revankar SG, Dib OP, Kirkpatrick WR, *et al.* Clinical evaluation and microbiology of fluconazole resistant oropharyngeal candidiasis [abstract 324]. In: Program and proceedings of the 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. (Washington, D.C.). 1997.

Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, *et al.* Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 40-4.

Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-47.

Rex JH, Bennet JE, Sugar AM *et al.* A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* 1994; 331: 1325-30.

Reynolds R, Braude AI. The filament-inducing property of blood for *Candida albicans*: its nature and significance. *Clin Res Proc* 1956; 4: 40-46.

Roseff SA, Sugar AM. Oral and esophageal candidiasis. In: Bodey GP (ed): *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. New York: Raven Press, Ltd.; 1993.

Roy S, Wainberg MA. Role of mononuclear phagocyte system in the development of acquired immunodeficiency syndrome. *J Leukoc Biol* 1988; 43: 91-7.

Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2092-98.

Samaranayake LP, Hughes A, Weetman DA, MacFarlane TW. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol* 1986; 15: 251-54.

Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med* 1989;18:554-564.

Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M, Yuen KY. Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. *J Med Microbiol* 1994; 41: 250-8.

Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, Kauffman CA. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994; 97: 339-46.

Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates in AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2378-86.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2300-305.

Sanguineti A, Carmichael JK, Campbell K. Fluconazole-resistant *Candida albicans* after long-term suppressive therapy. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1122-4.

Saral R. *Candida* and *Aspergillus* infections in immunocompromised patients: an overview. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 487-92.

Schuman P, Capps L, Peng G, *et al.* Weekly fluconazole for the prevention of mucosal candidiasis in women with HIV infection. A randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; 126: 689-96.

Seelig MS. The role of antibiotics in the pathogenesis of *Candida* infections. *Am J Med* 1966; 40: 887-917.

Smith PD, Kiyoshi O, Masur H, Lane HC, Fauci AS, Wahl SM. Monocyte function in the acquired immune deficiency syndrome. Defective chemotaxis. *J Clin Invest* 1984; 74: 2121-28.

Stevens DA, Greene SI, Lang OS. Thrush can be prevented in patients with the acquired immunodeficiency syndrome and the acquired immunodeficiency syndrome-related complex: randomized, double-blind, placebo-controlled study of 100-mg oral fluconazole daily. *Arch Intern Med* 1991; 151: 2458-64.

Stone HH, Geheber CE, Kolb LD, Kitchens WR. Alimentary tract colonization by *Candida albicans*. *J Surg Res* 1973; 14: 273-76.

Syrjanen S, Valle SL, Anttonen J, Suni J, Saxinger C, Krohn K, Ranki A. Oral candidal infection as a sign of HIV infection in homosexual men. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 65: 36-40.

Silverman S, Luangjarmekorn L, Greenspan D. Occurrence of oral *Candida* in irradiated head and neck cancer patients. *J Oral Med* 1984; 39: 194-6.

Taper-Jones LM, Alfred MJ, Walker DM, Hayes TM. Candidal infections and populations of *Candida albicans* in mouths of diabetics. *J Clin Pathol* 1981; 24:706-11.

Tavitian A, Raufman JP, Rosenthal LE. Oral candidiasis as a marker for esophageal candidiasis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Int Med* 1986;104:54-55.

Torres-Rodriguez JM, Martínez-Quesada J. Introducción histórica. En: JM Torres Rodríguez (ed). *Micosis que afectan piel y mucosas*. Ed. Doyma SA. Barcelona. 1979: 1-11.

Tran TL, Auger P, Marchand AR, Carrier M, Pelletier C. Perioperative variation in phagocytic activity against *Candida albicans* measured by a flow-cytometric assay in cardiovascular-surgery patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 447-51.

Vartivarian S, Smith CB. Pathogenesis, host resistance, and predisposing factors. In: Bodey GP (ed): *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. New York: Raven Press, Ltd.; 1993.

Vermeersch B, Kyselaere M, Dekeyser K, Rasquin K, De Vos M, Elewaut A, Barbier F. Fungal colonization of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 1079-83.

Vogt FC. The incidence of oral candidiasis with the use of inhaled corticosteroids. *Ann Allergy* 1979; 43: 205-10.

Walsh TJ, Jarosinski PF, Fromtling RA. Increasing usage of systemic antifungal agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; 13: 37-40.

Warnock DW, Burke J, Cope NJ, Johson EM, von Fraunhofer NA, Willams EW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* 1988; ii: 1310.

Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1531-4.

Whehy SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* 1988; 148: 2642-45.

Whehy SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2349-53.

White TC. Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *ASM News* 1997; 63: 427-33.

White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1482-87.

White A, Goetz MB. Azole-resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 687-92.

Wilcox CM, Straub RF, Clark WS. Prospective evaluation of oropharyngeal findings in human immunodeficiency virus-infected patients with esophageal ulceration. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1938-41.

Wilkieson C, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey P-J, MacKenzie D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 13-16.

Willcocks R, Leen CLS, Brettle RP, Urquhart D, Russell TB, Milne LJR. Fluconazole resistance in AIDS patients. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28: 937-39.

Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* 1991; 325: 1274-77.

Wingard JR, Merz WG, Saral R. *Candida tropicalis*: a major pathogen in the immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 1979; 91: 539-43.

Winston DJ, Chandrasekar PH, Lazarus HM et al. Fluconazole prophylaxis of fungal infections in patients with acute leukemia. Results of a randomized placebo-controlled, double blind, multicenter trial. *Ann Intern Med* 1993; 118: 495-503.

Zingman BS. Resolution of refractory aids-related mucosal candidiasis after initiation of didanosine plus saquinavir. *N Engl J Med* 1996; 334: 1674-5

Zingman B, Zackin R, Wheat J, et al. Amphotericin B oral suspension for fluconazole-resistant oral candidiasis in HIV-infected patients [abstract no. I-152]. In: Program and proceedings of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Toronto). Washington, D.C: American Society for Microbiology 1997.

