



Original

Efecto inhibitorio in vitro de ajoeno sobre aislamientos de *Candida* recuperados de secreciones vaginales

Sarelle Carrero^{a,*}, Hilda Romero^b y Rafael Apitz-Castro^c^a Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela^b Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela^c Laboratorio de trombosis experimental, Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Caracas, Venezuela

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 30 de julio de 2008

Aceptado el 24 de febrero de 2009

On-line el 26 de julio de 2009

Palabras clave:

Ajoeno

Candidiasis vaginal

Antifúngicos

Candida

Sensibilidad in vitro

RESUMEN

Objetivos: El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad in vitro del ajoeno sobre levaduras del género *Candida*, obtenidas de secreciones vaginales.

Métodos: Se analizaron 136 muestras. Las levaduras se aislaron e identificaron por métodos tradicionales. Se evaluó su sensibilidad al ajoeno (20, 15, 12.5, 10, 6.25 y 3.125 µg/ml) según el documento M27-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), con modificaciones del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Se incluyeron las cepas ATCC 90028 (*Candida albicans*), 22019 (*Candida parapsilosis*) y 6258 (*Candida krusei*). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se consideró la menor concentración de ajoeno capaz de inhibir el 80% del crecimiento fúngico.

Resultados: Se recuperaron 55 levaduras, 36 que estaban ocasionando candidiasis (65,4%) y 19 que estaban colonizando (34,5%). De las 6 especies aisladas, *C. albicans* ocupó el primer lugar (81,8%) y predominó en las pacientes con candidiasis (54,5%). Otras especies del género *Candida* se aislaron con menor frecuencia (18,2%); *Candida glabrata* fue la primera en este grupo (7,3%), seguida de *Candida tropicalis* (3,6%), *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii* y *Candida* sp. (cada una 1,8%). Las pruebas de sensibilidad mostraron inhibición del crecimiento fúngico en un 98,2% de los aislamientos, con una CMI inferior o igual a 15 µg/ml de ajoeno, y (un aislamiento de *C. glabrata*) (1,8%) la CMI fue superior a 20 µg/ml. En las cepas control la CMI fue de 3,125 y 10 µg/ml.

Conclusiones: Estos resultados, obtenidos con un número significativo de aislamientos de *Candida*, en especial de *C. albicans*, demuestran una vez más el poder antifúngico potencial del ajoeno en las levaduras resistentes a los antifúngicos más comunes.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

In vitro inhibitory effect of ajoene on *Candida* isolates recovered from vaginal discharges

ABSTRACT

Keywords:

Ajoene

Candidosis

Antifungal drugs

Candida

In vitro susceptibility tests

Aims: The main purpose of this work was to evaluate the in vitro activity of ajoene of the *Candida*, obtained from vaginal discharges.

Methods: For this, 136 samples were analyzed. The yeasts were recovered and identified by conventional mycological methods. The susceptibility to ajoene (at 20, 15, 12.5, 10, 6.25 and 3.125 µg/ml) was performed according to the CLSI M27-A2 document with the EUCAST modifications. The ATCC reference strains 90028 (*Candida albicans*), 22019 (*Candida parapsilosis*), and 6258 (*Candida krusei*) were included in this study. The minimal inhibitory concentration (MIC) was considered as the minimal concentration of ajoena able to inhibit 80% of the fungal growth.

Results: Fifty five yeasts were recovered, 36 (65.4%) of them were causing candidosis and 19 (34.5%) were colonizing. *C. albicans* was the most frequent (81.8%) of the six isolated species, prevailing on the patients with candidosis (54.5%). The non-*albicans* species were less frequently isolated (18.2%), and *Candida glabrata* was the prevailing agent (7.3%) followed by *Candida tropicalis* (3.6%), *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii* and *Candida* sp. (1.8% each of them). The susceptibility tests to ajoeno showed inhibition of fungal growth in 98.2% of the isolates, showing MIC values ≤ 15 µg/ml, and in (one isolate of *C. glabrata*) (1.8%) this value was > 20 µg/ml. The reference strains showed MIC values of 3.125 and 10 µg/ml.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: sarellie@ula.ve (S. Carrero).

Conclusions: The results here presented, obtained from a significant number of isolates, mainly *C. albicans*, demonstrate, once more, the potential of ajoeno as an antifungal agent.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La candidiasis comprende las manifestaciones clínicas ocasionadas por levaduras del género *Candida*, en especial, *C. albicans*. Es una de las infecciones micóticas más comunes de los últimos años, debido al incremento de los pacientes en condiciones de inmunosupresión^{3,6}. Puede clasificarse como candidiasis cutánea, mucocutánea y sistémica. La candidiasis vaginal es una de las localizaciones más frecuentes¹⁵.

La candidiasis vaginal es una vaginitis caracterizada por exantema doloroso con presencia de un exudado blanquecino, bajo el que se pueden formar petequias o erosiones hemorrágicas que suelen ulcerarse¹⁵. Se presenta en la mayoría de las mujeres al menos una vez durante su vida; en la mitad de ellas, ocurren de 2 a 3 episodios infecciosos en un año, y en un 5% aproximadamente la enfermedad se vuelve crónica o recurrente por presentar 4 episodios durante un año¹.

C. albicans es el comensal prevalente y se ha localizado en el 70% del cuerpo en la mujer sana, mientras que *C. glabrata* es el segundo patógeno de origen fúngico aislado y ocasiona del 5 al 8% de las infecciones por *Candida*. Las otras especies de *Candida* se recuperan con menor frecuencia⁷.

Para considerar los aislamientos de *Candida* provenientes de sitios donde habita normalmente como causantes de procesos infecciosos, debe observarse en el examen directo de la muestra un número abundante de levaduras, hifas o pseudohifas y, en el cultivo, el crecimiento levaduriforme. *Candida* suele encontrarse formando sólo blastoconidias cuando está asociada a colonización y formando micelio cuando ocasiona la sintomatología propia de la infección¹.

Las infecciones fúngicas han adquirido gran importancia en las últimas décadas, debido a su mayor frecuencia de aparición (particularmente en pacientes con estado de inmunodepresión avanzada), a su alta morbimortalidad y al surgimiento de nuevas especies patógenas, lo que ha conducido al uso frecuente de antifúngicos y en dosis elevadas, y ha originado en muchos casos la aparición de cepas resistentes, especialmente a los derivados azólicos. Por tanto, los estudios de sensibilidad in vitro a los antifúngicos se hacen cada vez más necesarios a fin de conocer su actividad y predecir el éxito o el fracaso del tratamiento, así como también conocer otras alternativas de tratamientos⁶.

El ajoeno² es un compuesto organosulfurado [(E-Z) 4-5-9 trithiadodeca-1-6-11 trieno 9-óxido] con actividad in vivo^{8-10,14,21,25} e in vitro^{16,18,21,26,27} contra distintas especies de hongos patógenos en los seres humanos. Uno de sus mecanismos de acción como antimicótico lo ejerce sobre la membrana plasmática al inhibir la síntesis de la fosfatidilcolina, lo que trae como consecuencia la alteración en su composición lipídica e incrementa los esteroides. Esta interacción es la causante de los cambios estructurales de la membrana citoplásmica, con aumento de su permeabilidad y su posterior muerte celular^{20,21}.

Debido a lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad in vitro al ajoeno de *Candida* aisladas de secreciones vaginales de pacientes embarazadas con complicaciones (ECC), embarazadas sin complicaciones (ESC) y no embarazadas (NE).

Material y métodos

Población: se tomaron 136 muestras de secreciones vaginales distribuidas de la siguiente manera: 79 provenientes de pacientes

ECC como amenaza de parto pretérmino, trabajo de parto pretérmino y rotura prematura de membrana, que acudieron a la emergencia obstétrica del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes; 22 de pacientes ESC y 35 de mujeres NE que asistieron a la consulta prenatal y de medicina de familia del Ambulatorio Venezuela, Mérida, Estado de Mérida. Las pacientes manifestaron por escrito su voluntad de participar en el estudio (consentimiento informado).

Criterios utilizados para considerar una candidiasis vaginal: se consideró que la paciente presentaba candidiasis vaginal cuando mostraba clínicamente los signos y síntomas de una vaginitis, abundantes levaduras, hifas o pseudohifas en el examen directo de la muestra y una correlación de estos elementos con el crecimiento levaduriforme en los respectivos cultivos¹.

Criterios utilizados para considerar una colonización por *Candida*: se consideró que la paciente presentaba colonización por *Candida* cuando había ausencia o escasas levaduras en el examen directo de la muestra clínica y crecimiento levaduriforme en los medios de cultivos¹.

Estudio micológico

Procesamiento y aislamiento de las levaduras: las muestras se tomaron del fondo de saco vaginal, con hisopos estériles y se colocaron en solución salina fisiológica (SSF) estéril. A cada muestra se le realizó examen directo al fresco y coloración de Gram. Luego se sembraron, por duplicado, en agar de Sabouraud glucosado (ASG), ASG con cloranfenicol y ASG con cloranfenicol y actidiona, y se incubaron a temperatura ambiente y a 37 °C. Las levaduras aisladas se purificaron en placas con ASG.

Identificación: para ello se usó el método convencional con agar bilis, el sistema ID 32C (bioMérieux, Francia) y la lectura con el equipo ATB expression. Se incluyeron las cepas *C. albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, como controles.

Pruebas de susceptibilidad in vitro

Método de microdilución: se siguió la metodología descrita en el documento M27-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)¹³ con las modificaciones del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) y se utilizó el medio RPMI-1640, al que se añadió glucosa al 2% y ácido morfolino propanosulfónico⁵.

El ajoeno se sintetizó y purificó según lo reportado previamente². De una solución madre de ajoeno (539 mg/ml), se prepararon concentraciones de 40, 30, 25, 20, 12,5 y 6,25 µg/ml en dimetilsulfóxido, y se dispensaron 100 µl de cada una de ellas en las placas de microdilución, que se mantuvieron a -5 °C hasta el momento de su uso.

Se preparó una suspensión celular de cada levadura en la SSF para obtener una concentración de 1-5 × 10⁵ UFC/ml y se colocaron 100 µl de esta dilución en las placas de microdilución contentivas de ajoeno, previamente descongeladas; luego se incubaron a 35 °C en agitación constante, durante 24 h. Las concentraciones finales de ajoeno en cada pozo fueron de 20, 15, 12,5, 10, 6,25 y 3,125 µg/ml. Las placas se leyeron usando un lector de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay 'técnica de radioinmunoanálisis') (Bio-Rad, EE. UU.) a 492 nm.

Se consideró la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la menor concentración capaz de inhibir el 80% del crecimiento del microorganismo.

Los resultados se presentaron en valores absolutos y en porcentajes.

Resultados

En 55 (40,4%) de las 136 muestras clínicas se aislaron levaduras, de las que 36 (65,4%) estaban ocasionando candidiasis vaginal, diagnosticada mediante la observación directa de hifas, pseudohifas o blastoconidias y 19 (34,5%) estaban colonizando, lo que se determinó por el crecimiento en los medios de cultivo.

De los 36 casos con candidiasis, 19 (34,5%) correspondieron a pacientes ECC, 5 (9,1%) a ESC y 12 (21,8%) a NE. De las 19 levaduras colonizadoras, 13 (23,6%) provenían de las pacientes ECC, 4 (7,3%) de las ESC y 2 (3,6%) de las NE (tabla 1).

De los aislamientos recuperados de candidiasis vaginal, 30 correspondieron a la especie *C. albicans*, 2 a *C. glabrata* y uno a cada una de las especies *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*; de las mujeres sin candidiasis vaginal se recuperaron 15 aislamientos de *C. albicans*, 2 de *C. glabrata*, uno de *C. tropicalis* y uno de *Candida* sp. De los 30 aislamientos de *C. albicans* de las pacientes con candidiasis, 16 procedían de ECC, 4 de ESC y 10 de NE, y de los 15 recuperados de las mujeres sin candidiasis, 10 eran de ECC, 3 de ESC y 2 de NE. De los 4 aislamientos de *C. glabrata*, 2 provenían de ECC con

candidiasis y 2 de ECC sin candidiasis; el aislamiento de *C. krusei* se obtuvo de una paciente ECC con candidiasis y el de *C. parapsilosis* de una paciente NE con candidiasis, así como el de *C. guilliermondii*. De los 2 aislamientos de *C. tropicalis*, uno procedía de una ESC con candidiasis y el otro de una ECC sin candidiasis; el aislamiento de *Candida* sp. se recuperó de una ESC sin candidiasis (tabla 1).

Como se observa en la tabla 2, los aislamientos de *C. albicans* procedentes de las mujeres con y sin candidiasis, tanto de ECC como de ESC, mostraron valores de CMI para el ajoeno de 6,25 a 15 µg/ml, y para los recuperados de las mujeres NE con y sin candidiasis este valor osciló entre 6,25 y 10 µg/ml. En relación con *C. glabrata*, los valores de la CMI fueron de 3,125 µg/ml en 2 aislamientos provenientes de mujeres ECC, una con candidiasis y la otra sin candidiasis, de 12,5 µg/ml para el aislamiento procedente de una ECC sin candidiasis y superiores a 20 µg/ml para el aislamiento de una ECC con esta micosis. Para los 2 aislamientos de *C. tropicalis*, procedentes uno de una ESC con candidiasis y otro de una ECC sin candidiasis, la CMI fue de 12,5 y 10 µg/ml, respectivamente. En cuanto a los aislamientos de *C. krusei* y de *C. parapsilosis*, recuperados de 2 mujeres con candidiasis, una ECC y otra NE, se reveló una CMI de 10 µg/ml. La cepa de *C. guilliermondii*, recuperada de una mujer NE con candidiasis, mostró una CMI de 12,5 µg/ml y en el aislamiento de *Candida* sp., obtenido de una ESC sin candidiasis, ésta fue de 3,125 µg/ml. Las cepas control *C. albicans* ATCC 90028 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 mostraron valores de CMI de 10 µg/ml; para *C. krusei* ATCC 6258, este valor fue de 3,125 µg/ml de ajoeno.

Tabla 1

Distribución de las especies de *Candida* recuperadas de mujeres con y sin candidiasis, según su condición clínica

Especie	Con candidiasis				Sin candidiasis				Total (%)
	ECC	ESC	NE	Subtotal	ECC	ESC	NE	Subtotal	
<i>Candida albicans</i>	16	4	10	30	10	3	2	15	45 (81,8)
<i>Candida glabrata</i>	2			2	2			2	4 (7,3)
<i>Candida tropicalis</i>		1		1	1			1	2 (3,6)
<i>Candida krusei</i>	1			1					1 (1,8)
<i>Candida parapsilosis</i>			1	1					1 (1,8)
<i>Candida guilliermondii</i>			1	1					1 (1,8)
<i>Candida</i> sp.						1		1	1 (1,8)
Subtotal				36				19	55
Total	19	5	12		13	4	2		55
(%)				(34,5)	(9,1)	(21,8)		(23,6)	(7,3)
(3,6)				(100)					

ECC: embarazadas con complicaciones; ESC: embarazadas sin complicaciones; NE: no embarazadas.

Tabla 2

Valores de la concentración mínima inhibitoria de ajoeno en las especies de *Candida* recuperadas de mujeres con y sin candidiasis

Con candidiasis			Sin candidiasis		
Especies (n)	Condición clínica	CMI (µg/ml)	Especies (n)	Condición clínica	CMI (µg/ml)
<i>Candida albicans</i> (30)	ECC	6,25 a 15	<i>C. albicans</i> (15)	ECC	6,25 a 15
	ESC	6,25 a 15		ESC	6,25 a 15
	NE	6,25 a 10		NE	6,25 a 10
<i>Candida glabrata</i> (2)	ECC	3,125 y >20	<i>C. glabrata</i> (2)	ECC	3,125 y 12,5
<i>Candida tropicalis</i> (1)	ESC	12,5	<i>C. tropicalis</i> (1)	ECC	10
<i>Candida krusei</i> (1)	ECC	10			
<i>Candida parapsilosis</i> (1)	NE	10			
<i>Candida guilliermondii</i> (1)	NE	12,5	<i>Candida</i> sp. (1)	ESC	3,125
Total (36)			(19)		

CMI: concentración mínima inhibitoria; ECC: embarazadas con complicaciones; ESC: embarazadas sin complicaciones; NE: no embarazadas.

Discusión

Las micosis oportunistas, entre éstas la candidiasis, han aumentado en las 2 últimas décadas debido al incremento de situaciones inmunosupresoras, como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, los trasplantes de órganos, el cáncer, los tratamientos con inmunosupresores y la utilización de métodos invasivos con miras a preservar la vida de los pacientes en situaciones de gravedad^{3,12}. La candidiasis vaginal, caracterizada por dolor vulvovaginal, ardor, prurito, flujo blanquecino, inflamación, disuria y por su frecuencia y difícil tratamiento, ocasiona un problema de salud pública¹⁵. Puede presentarse en cualquier etapa de la vida de la mujer; son factores predisponentes el embarazo, los anticonceptivos orales, la alteración de los valores de glucosa y el abuso de antibióticos, entre otros. Son los agentes causales las especies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* y *C. krusei*^{1,23,24}.

La aparición de candidiasis oportunista, sobre todo en niños prematuros, es muy frecuente y ha alcanzado el cuarto lugar en los cuadros de septicemia nosocomial^{3,12}. El nacimiento de un lactante por el canal del parto de una madre con candidiasis aumenta los casos de candidiasis invasiva en los infantes, condición que se incrementa debido a que la candidiasis vaginal es una de las infecciones más comunes del tracto genital femenino⁴. En el presente estudio se obtuvo una frecuencia de candidiasis del 65,4%; se notó que el 74,5% de las levaduras se aisló de las secreciones vaginales de mujeres embarazadas, de las que el 58,1% eran de las ECC y el 16,4% de las ESC.

C. albicans fue la especie recuperada con mayor frecuencia en las mujeres con y sin candidiasis, independientemente de su condición clínica, resultados esperados si se considera que este agente forma parte de la microbiota fúngica vaginal y que, en condiciones favorables, se hace patógeno⁴. En este estudio se evidenció el oportunismo de este agente al observar que se obtuvo el doble de estos aislamientos en las pacientes con candidiasis.

Las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* se aislaron con menor frecuencia (18,2%); *C. glabrata* fue la primera en este grupo (7,3%), resultados que concuerdan con informes previos^{23,24}. En las pacientes con candidiasis se aisló mayor diversidad de especies con relación a las mujeres sin candidiasis (tabla 1). La identificación de las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* es sumamente importante, debido, entre otras cosas, a que se reportan con mayor frecuencia como causantes de enfermedades, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos, además de mostrar menor sensibilidad a los antifúngicos con respecto a *C. albicans*^{1,23}.

El tratamiento de la candidiasis vaginal está limitado al uso de fármacos comerciales, principalmente fluconazol; recientemente, se ha informado acerca de la aparición de resistencia a este antimicótico, por lo que se considera altamente recomendable disponer de nuevas alternativas terapéuticas²⁸. Por esto, se evaluó en el presente estudio el efecto del ajoeno sobre las especies de *Candida* aisladas en las pacientes de la muestra.

Se utilizó el método reportado en el documento M27-A2 del CLSI con las modificaciones del EUCAST, debido a los excelentes resultados que se han obtenido en informes previos que han utilizado fármacos comerciales^{5,13}. Bajo esas condiciones, el 98,2% de los aislamientos clínicos de este estudio mostró una sensibilidad marcada al ajoeno con inhibición de su crecimiento y valores de CMI iguales o inferiores a 15 µg/ml, resultados similares a los reportados previamente en estudios de sensibilidad in vitro a este compuesto en *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Microsporium canis*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Histoplasma capsulatum*^{8,11,16-19,21,22,26,27}.

Con respecto a los aislamientos de *C. albicans*, aunque todos mostraron una CMI inferior o igual a 15 µg/ml, es interesante

resaltar que en los 12 aislamientos procedentes de las NE con y sin candidiasis, los valores de la CMI fueron menores (6,25 a 10 µg/ml), quizá debido a que su estado fisiológico no requiere recibir tratamiento antimicrobiano, que podría inducir a la adquisición de mecanismos de resistencia.

En 3 de los 4 aislamientos de *C. glabrata*, la CMI fue de 3,125 a 12,5 µg/ml, valores de CMI más bajos con respecto al resto de las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* resultados altamente satisfactorios debido a que esta especie manifiesta resistencia secundaria a los azoles, por lo que la posible alternativa del uso terapéutico del ajoeno resolvería los casos de candidiasis ocasionados por *C. glabrata*, segunda especie de *Candida* recuperada con frecuencia en la candidiasis vaginal, principalmente en la recurrente^{1,28}. Con respecto al otro aislamiento de *C. glabrata*, ninguna de las concentraciones utilizadas de ajoeno inhibió su crecimiento, por lo que, para obtener resultados concluyentes, sería necesario realizar ensayos con concentraciones mayores de ajoeno a fin de determinar su CMI.

C. krusei es intrínsecamente resistente a los azoles, en especial al fluconazol^{13,28}. En estos ensayos, esta especie se recuperó de una mujer ECC y con candidiasis. El ajoeno, en una concentración de 10 mg/ml, inhibió al único aislamiento evaluado y las expectativas son estimulantes para realizar estudios posteriores con un mayor número de aislamientos y corroborar estos hallazgos.

En el resto de los aislamientos ensayados, *C. tropicalis* (2), *C. parapsilosis* (1), *C. guilliermondii* (1) y *Candida* sp. (1), se evidenció una inhibición del crecimiento con las concentraciones de 3,125 a 12,5 µg/ml de ajoeno, al igual que con las cepas control.

En conclusión, los resultados del presente estudio, realizado con un número significativo de especies de *Candida*, en especial *C. albicans*, demuestran, una vez más, el potencial poder antifúngico del ajoeno. Con respecto a las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans*, sería importante incluir un mayor número de aislamientos para confirmar estos hallazgos. El ajoeno sería la nueva alternativa de tratamiento en la candidiasis vulvovaginal, sobre todo en las ocasionadas por levaduras resistentes a los antifúngicos de uso frecuente.

Financiación

Este trabajo se financió parcialmente por parte del CDCHT-ULA N° SE-FA-01-07-07 y el proyecto CDCH-UCV N° 0912-4911-04.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud a aquellos que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo: al Dr. Axel Santiago, Laboratorio de Micología del Hospital Universitario de Caracas; a la MSc. María Isabel Ramos, Escuela de Bioanálisis, UCV; a la Lic. Adriana Di Rudolfo, Laboratorio del IPAS-ME; a la MSc. Egleé Borregales, a TSU Oduar Salazar, y a la MSc. Luisa Vizcaya del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA; y, de manera muy especial, a las pacientes que participaron en este proyecto.

Bibliografía

- Barrenetxea G. Vulvovaginitis candidiásica. Rev Iberoam Micol 2002;19:22-4.
- Block E, Ahmad S, Catalfamo J, Jain M, Aplitz-Castro R. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: Structural, mechanistic and synthetic studies. J Am Chem 1986;108:7045-55.
- Cantón E, Viudes A, Pemán J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. Rev Iberoam Micol 2001;18:51-5.
- Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. Int J Antimicrob Agents 2006;27:403-8.

5. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, the AFST Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, et al. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003;9:467–74.
6. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol* 2002;19:133–8.
7. Fidel P, Vazquez J, Sobel J. *Candida glabrata*: An important fungal pathogen for the 21 st century. *Clin Microbiol News* 2001;23:171–6.
8. Lamus D, Maniscalchi M, Ledezma E, Sánchez J, Vivas J, Apitz-Castro R. Susceptibilidad in vitro al ajoene de aislados de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* obtenidos de pacientes con onicomicosis y su relación con el tratamiento tópico. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004;24:34–9.
9. Ledezma E, De Sousa L, Jorquera A, Sánchez J, Lander A, Rodríguez E, et al. Efficacy of ajoene, an organosulphur derived from garlic in short term therapy of *tinea pedis*. *Mycoses* 1996;39:393–5.
10. Ledezma E, López J, Marín P, Romero H, Ferrara G, De Sousa L, et al. Ajoene in the topical short-term treatment of *tinea cruris* and *tinea corporis* in humans. *Drug Res* 1999;6:544–7.
11. Maniscalchi M, Lemus D, Ledezma E, Vivas J, Sánchez L, Apitz-Castro R. Estudio de la susceptibilidad in vitro de aislados de *Microsporum canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004;24:40–5.
12. Mesa LM, Arcaya NM, Pineda MR, Beltrán-Luengo H, Calvo BM. Candidemia en el Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela 2000–2002. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005;25:109–13.
13. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-2nd ed. NCCLS document M27-A2. USA; 2002.
14. Pérez-Blanco M, Hernández V, Fernández Z, Apitz-Castro R. Ajoene and 5-fluorouracil in the topical treatment of *Cladophialophora carrionii* chromoblastomycosis in humans: A comparative open study. *Med Mycol* 2003;41:517–20.
15. Rivero M, Díaz J, Centeno S. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003;23:148–52.
16. Romero H, Torres J, Apitz-Castro R. In vitro inhibitory effect of ajoene on *Histoplasma capsulatum*. *J Mycol Med* 2004;14:181–4.
17. Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R. In vitro anti-proliferative effect of ajoene on *Microsporum canis*. *J Mycol Med* 2000;10:152–5.
18. San-Blas G, Mariño L, San-Blas F, Apitz-Castro R. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993;31:133–41.
19. San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Mariño L, Apitz-Castro R. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by Ajoene. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1641–4.
20. San-Blas G, Urbina J, Marchán E, Contreras L, Sorais F, San-Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology* 1997;143:1583–6.
21. Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Actividad in vitro e in vivo del ajoene sobre *Coccidioides immitis*. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:99–104.
22. Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Efecto inhibitorio y alteraciones ultraestructurales producidas por ajoeno sobre el crecimiento in vitro de los hongos dematiáceos: *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*. *Rev Iberoam Micol* 1993;10:74–8.
23. Silva V, Díaz MC, Febre N, Red de Diagnóstico en Micología Médica. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect* 2002;19:149–56.
24. Sobel JD, Chaim W, Nagappan V, Leaman D. Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: Use of topical boric acid and flucytosine. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1297–300.
25. Thomaz L, Apitz-Castro R, Márquez AF, Travassos LR, Taborda CP. Experimental paracoccidioidomycosis: Alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Med Mycol* 2008;46:113–8.
26. Torres J, Romero H, Santiago A, Apitz-Castro R. Susceptibilidad in vitro de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2006;26:42–7.
27. Vivas J, Romero H, Herrmann G, Ledezma E, Apitz-Castro R. In vitro antiproliferative effect of ajoene on *Cryptococcus neoformans*. *J Mycol Med* 2002;12:149–51.
28. Wingard JR, Leather H. A new era of antifungal therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:73–90.