



**Universidad  
Norbert Wiener**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA  
MÉDICA**

“SUSCEPTIBILIDAD A FLUCONAZOL Y VORICONAZOL EN CEPAS  
DEL GÉNERO *Candida*, AISLADAS EN SECRECIÓN VAGINAL DE  
PACIENTES EN EDAD REPRODUCTIVA ATENDIDOS EN UN  
POLICLÍNICO CATEGORÍA I-3, LIMA.”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO  
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Presentado por:

**AUTOR:** CHANCO LAPA, ROCIO

VEGA ORDINOLA, JEAN PIERRE ANDRÉS

**ASESOR:** Mg. TM. ROJAS LEON, ROBERTO EUGENIO.

**LIMA – PERÚ**

**2020**



## DEDICATORIA

Dedicado a la persona que le debo todo lo soy;  
porque ellas es mi motor y energía para seguir  
adelante. Mi madre: Luz Lapa Castellón

Autor: Chanco Lapa, Rocio

Dedicado a mi madre Luz Magdalena Ordinola  
Guichar, gracias por enseñarme a crecer con  
valores sólidos en el ámbito personal y  
profesional.

Autor: Vega Ordinola, Jean Pierre Andrés

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos con gran afecto y gratitud a nuestro docente y asesor Mg. TM. Roberto Rojas León, por guiarnos en la elaboración y desarrollo de la tesis y todos los profesionales que intervinieron en cada fase con su dedicación y excelente soporte académico.

III

**ASESOR(A) DE TESIS**

Mg. TM. Roberto Rojas León

## **IV**

### **JURADO**

#### **Presidente**

Dr. Juan Carlos Benites Azabache

#### **Secretario**

Dra. Delia Jessica Astete Medrano

#### **Vocal**

MSc Haydee Ana Guadalupe Gómez

## V

### INDICE

INDICE .....	7
INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS .....	9
RESUMEN.....	10
SUMMARY .....	11
CAPITULO I: EL PROBLEMA .....	12
1.1 Planteamiento del problema.....	12
1.2. Formulación del problema.....	14
1.2.1 Problema principal.....	14
1.2.2 Problema específico.....	14
1.3 Justificación.....	15
1.4. Objetivos.....	19
1.4.1. Objetivos Generales.....	19
1.4.2. Objetivos Específicos.....	19
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO .....	20
2.1. Antecedentes.....	20
2.2. Base teórica.....	28
2.2.1. Historia .....	28
2.2.2. Candidiasis Vulvovaginal.....	29
2.2.3. Género <i>Candida</i> de interés clínica humana.....	32
2.2.3.1 Patogénesis.....	33
2.2.3.2 Especies .....	35
2.2.3.3 Sensibilidad y Resistencia del Género <i>Candida</i> .....	38
2.2.4. Agentes Antifúngicos .....	40
2.2.5. Pruebas de identificación de especies de <i>Candida</i> .....	42
2.2.5.1 Pruebas microbiológicas .....	42
2.2.5.2 Pruebas bioquímicas.....	46
2.2.5.3 Pruebas inmunológicas .....	49
2.2.5.4 Pruebas semiautomatizados y automatizados.....	49
2.2.6. Estudios de sensibilidad in vitro para levaduras del género <i>candida</i> .....	52
2.2.6.1 Introducción.....	52
2.2.6.2 Métodos estandarizados .....	53
2.2.6.3 Métodos comerciales ó alternativos.....	59
2.2.6.4 Otros métodos .....	63

2.3. Terminología básica .....	64
2.4. Hipótesis .....	67
2.5. Variables .....	67
CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO .....	68
3.1. Tipo y nivel de Investigación. ....	68
3.2. Población y muestra. ....	68
3.2.1 Población. ....	68
3.2.2 Muestra y Muestreo. ....	68
3.2.3 Criterios de inclusión. ....	69
3.2.4 Criterios de exclusión. ....	69
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos. ....	69
3.4. Fase Analítica. ....	70
3.4.1 Gestiones administrativas y permisos .....	70
3.4.2 Condiciones Pre-Analíticas .....	70
3.4.3 Registro y conservación de las cepas aisladas .....	70
3.4.4 Reactivación de las cepas de <i>Candida</i> . ....	71
3.4.5 Identificación de especies de <i>Candida sp.</i> .....	71
3.4.6 Preparación del medio del agar Mueller Hinton II modificado <sup>36</sup> .....	74
3.4.7 Método difusión en discos para la determinación de susceptibilidad antifúngica de hongos levaduriforme <sup>36</sup> .....	74
3.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico. ....	76
3.6. Aspectos éticos. ....	77
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	78
4.1. Resultados .....	78
4.2. Discusión. ....	82
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	90
5.1 Conclusiones. ....	90
5.2 Recomendaciones. ....	91
REFERENCIAS .....	92
ANEXOS .....	102
ANEXO 01: INSTRUMENTO (FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS) .....	102
ANEXO 02: FLUJOGRAMA DE TRABAJO .....	103
ANEXO 03: EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DEL PROCESO .....	106
ANEXO 04: MATRIZ DE CONSISTENCIA .....	111
ANEXO 05: OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES .....	112

## VI

### INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla N° 01: Prevalencia de especies en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.....78

Gráfico N° 01: Prevalencia de especies en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.....78

Tabla N° 02: Susceptibilidad a fluconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.....79

Gráfico N° 02: Susceptibilidad a fluconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.....79

Tabla N° 03: Susceptibilidad a Voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.....80

Gráfico N° 03: Susceptibilidad a Voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.....80

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

**Materiales y Metodología:** Estudio de diseño no experimental, descriptivo y perspectivo de corte transversal, realizado con un muestreo no probabilístico por conveniencia conformado por 150 cepas aisladas entre el período de octubre 2017 y marzo 2018. Se confirmó la identificación de las especies por pruebas específicas (microbiología y bioquímica) y se evaluó la susceptibilidad a los antifúngicos mediante el método estandarizado de difusión en disco en agar.

**Resultados:** La especie predominante es la *Candida albicans* con 141 cepas (94.0%). La susceptibilidad al fluconazol en el género *Candida* se clasificó como sensible al 80.6%, sensible dosis dependiente al 10.7% y resistente al 8.7%, donde 11 cepas de *Candida albicans* y 2 cepas de *Candida krusei* fueron resistentes. La susceptibilidad al voriconazol en el género *Candida* estaba conformada por el 88.7% sensible, el 7.3% sensible dosis dependiente y el 4.0% resistente, donde sólo 6 cepas de *Candida albicans* fueron resistentes.

**Conclusiones:** Existen cinco especies presente en las cepas de secreciones vaginales estudiadas (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*) que presentan baja resistencia a los antifúngicos estudiados y una significativa de sensibilidad dosis dependiente. Las especies *no albicans* demuestran una alta sensibilidad a los antifúngicos.

**Palabras Clave:** Susceptibilidad, Fluconazol, Voriconazol, Antifúngicos

## SUMMARY

**Objective:** To determine the susceptibility to fluconazole and voriconazole in strains of the genus *Candida*, isolated in vaginal secretion of patients in reproductive age attended in a Polyclinic category I-3, Lima.

**Materials and methods:** Non-experimental, descriptive and prospective cross-sectional design study, carried out with a non-probabilistic sampling for convenience made up of 150 strains isolated between the period of October 2017 and March 2018. Species identification was confirmed by specific tests (microbiology and biochemistry) and antifungal susceptibility was evaluated by means of the standardized agar disk diffusion method.

**Results:** The predominant species is *Candida albicans* with 141 strains (94.0%). Susceptibility to fluconazole in *Candida* genus was classified as sensitive to 80.6%, sensitive to 10.7% dependent dose and resistant to 8.7%, where 11 strains of *Candida albicans* and 2 strains of *Candida krusei* were resistant. Susceptibility to voriconazole in *Candida* genus was conformed by 88.7% sensitive, 7.3% dose dependent sensitive and 4.0% resistant, where only 6 strains of *Candida albicans* were resistant.

**Conclusions:** There are five species present in the strains of vaginal secretions studied (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*) that present low resistance to the antifungal agents studied and a significant dose-dependent sensitivity. Non-albicans species show high sensitivity to antifungal agents.

**Key words:** Susceptibility, Fluconazole, Voriconazole, Antifungals

## CAPITULO I: EL PROBLEMA

### 1.1 Planteamiento del problema.

La candidiasis es producida por el hongo levaduriforme del género *Candida*, existen más de 160 especies sumamente ubicuas y con características muy diversas, de las cuales se considera que sólo 18 son patógenas clínicos para el hombre. La presencia de especies de *Candida* en la vagina como constituyentes de la microbiota normal está bien documentada<sup>1 2</sup>.

El potencial patógeno de las levaduras varía en forma considerable, siendo *Candida albicans* la especie del género *Candida* más virulento, a pesar de que es aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas, en los últimos años se ha informado la emergencia de otras especies de *Candida* como agentes infecciosos debido a la carencia relativa de sensibilidad a fluconazol y otros azoles<sup>1</sup>.

La frecuencia de candidiasis vulvovaginal ha aumentado en los últimos años, llegando a considerarse como la segunda causa más común de infección vaginal y el diagnóstico ginecológico más común entre las edades de 20 y 40 años, en consecuencia, los médicos necesitan de la identificación específica de las especies y sobre la susceptibilidad específica para poder definir una terapéutica específica, y evitar el desarrollo de Candidiasis vulvovaginal recurrente<sup>3,4</sup>.

Se estima que la Candidiasis vulvovaginal a nivel mundial afecta al 75 % de las mujeres con al menos un episodio durante su vida, y 40% a 50% desarrolla recurrencias. Cerca de 5% de las mujeres experimenta infecciones recurrentes, incluso más de 4 episodios por año. Estas recurrencias suponen un reto para los ginecólogos y repercuten negativamente en la calidad de vida de las mujeres que la padecen, debido a que no son de fácil erradicación, ya que pueden estar relacionadas a condiciones más serias, como la infección por VIH, diabetes e inmunosupresión. Aproximadamente

el 85% a 90% de las candidiasis vulvovaginal es ocasionado por *Candida albicans*. Entre 1988 y 1995 se registró que las especies no albicans aumentaron de 9,9% a 17,2%; considerándose a las especies no albicans como responsables del 32% de las infecciones recurrentes<sup>5,2,6</sup>.

En la actualidad, se ha reportado en otros países la resistencia al fluconazol en especies de *Candida* con variaciones locales y regionales muy notorias. Algunos estudios demuestran que en los países industrializados la resistencia a los azoles no es de gran impacto, pero esto no es extrapolable en países de extrema pobreza, donde se siguen reportando porcentajes significativo de *Candida* sp resistente a azoles aislados de pacientes inmunosuprimidos. En México, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos<sup>7 8</sup>.

El tratamiento de infecciones micóticas no cuenta con una gran variedad de medicamentos en comparación con las infecciones bacterianas. Se considera que la anfotericina B es eficaz contra levaduras, pero su nivel de toxicidad es alto. El fluconazol, entre los azoles, es el más usado en casos de candidiasis, sin embargo su uso se encuentra limitado debido al desarrollo de resistencia por cepas de *Candida albicans* y *no-albicans*. Algunos autores consideran que la resistencia se debe al mal uso de antifúngicos (dosis inadecuadas) ó al tratamiento incompleto<sup>4</sup>.

En consecuencia es importante la identificación certera de cada levadura del genero *Candida* aislada, porque presentan diferentes patrones de susceptibilidad antifúngica según las especies. Así mismo se debe poner énfasis en la vigilancia local y regional para conocer el perfil de sensibilidad y la distribución de especies de *Candida*, con la finalidad de instaurar una terapia antifúngica adecuada y eficaz<sup>4,9</sup>.

## **1.2. Formulación del problema.**

### **1.2.1 Problema principal.**

¿Cuál es la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?

### **1.2.2 Problema específico.**

¿Cuál es la prevalencia de especies en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?

¿Cuál es susceptibilidad a fluconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?

¿Cuál es susceptibilidad a voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?

### 1.3 Justificación.

Las infecciones vulvovaginales son un motivo frecuente de consultas en atención primaria, especializada y urgencias hospitalarias de consultas ginecológicas.

En la práctica clínica mediante la anamnesis y exploración no siempre es posible determinar el agente etiológico ni los factores desencadenantes y el tratamiento empírico puede no ser adecuado, teniendo como consecuencia la aparición de recidivas y recurrencias, las cuales representan un problema para la mujer y para el clínico.

Aproximadamente el 25% de las vulvovaginitis infecciosas son candidiasis, donde la *Candida albicans* es la responsable del 90% de los episodios de candidiasis vulvovaginal. Otras especies menos frecuentes, también denominadas no albicans, como *Candida glabrata*, *tropicalis* y *krusei*, representan el 10% de las candidiasis y han registrado en los últimos tiempos un aumento de la incidencia y un incremento en la resistencia al tratamiento habitual<sup>5</sup>.

A nivel mundial la mayor proporción de *Candida albicans* se encuentra en Europa del Norte y Central y en los Estados Unidos. Las especies no albicans son más comunes en Sudamérica, Asia y el Sur de Europa. La *Candida glabrata* se aisló comúnmente en los Estados Unidos y en Europa del Norte y Central; *Candida parapsilosis* en América del Sur, Europa del Sur y varias partes de Asia; *Candida tropicalis* en Sudamérica y Asia. La frecuencia relativa de *Candida krusei* es baja en todas las regiones. La variación geográfica es significativa en los casos de candidemia en diferentes partes del mundo. Así mismo los datos epidemiológicos locales siguen siendo de gran importancia<sup>10</sup>.

En las últimas décadas la infección causada por *Candida* ha aumentado considerablemente, por lo que es importante conocer la resistencia a antifúngicos que presentan las cepas de *Candida*

con el fin de mejorar la terapia farmacológica del paciente. *Candida albicans* es considerada es la que más predomina, no obstante, se ha identificado un aumento en *Candida no albicans*, algunas de ellas resistentes a fármacos antifúngicos como fluconazol; como consecuencia de esto se ha desarrollado en las levaduras como *candida sp*. El riesgo potencial de resistencia<sup>11</sup>.

El desarrollo de resistencia al fluconazol es un proceso complejo en el cual intervienen diversos factores tanto el huésped como el microorganismo. Estos factores ligados a los microorganismos figuran mecanismos celulares y moleculares como las alteraciones de las enzimas 14-a-desmetilasa de lanosterol y aumento de la expresión de los transportadores activos de la membrana que disminuye la concentración intracelular de los azoles. Otros factores están siendo caracterizado por la sustitución de la población sensible de *Candida albicans* por otra especie, como *Candida krusei*, *Candida glabrata*, o aislamientos de *Candida albicans* inicialmente sensibles que se vuelven resistentes a por alteraciones genéticas<sup>12</sup>.

Se ha demostrado en diversos estudios que voriconazol es uno de los antifúngicos más confiables después de que el fluconazol fracase<sup>58</sup>. El mecanismo de acción del voriconazol es similar al resto de azoles, que actúan bloqueando la síntesis de ergosterol<sup>56</sup>. La tendencia de la resistencia de *Candida spp* frente a los azoles va en aumento, en nuestro país es de uso común el fluconazol y voriconazol<sup>59</sup>. Así mismo la incidencia de *Candida sp* representa un porcentaje importante.

En los hospitales la frecuencia de la infección por candidiasis varia debido a los factores de riesgo de los pacientes, simultáneamente se ha venido presentando cambios en la epidemiología de las especies de *Candida*, variaciones en su prevalencia y en la resistencia a los antimicóticos según su localización geográfica<sup>13</sup>.

En nuestro medio se desconoce la incidencia real de este fenómeno, es necesario plantear estudios con mayor fortaleza metodológica para inferir el riesgo de esta infección micótica.

Es necesario realizar una vigilancia antimicótica en nuestras instituciones para permitirnos llegar a conclusiones más cercanas a nuestra realidad.

No menos importante es la frecuencia de *Candida sp.* como causante de otras infecciones comunes como vulvovaginitis, que se reportan con resistencia a azoles y complicaciones infecciosas en huéspedes inmunosuprimidos que reciben terapias inmunosupresoras o terapia biológica que son motivo de preocupación por el cambio en la epidemiología de este tipo de infecciones<sup>14</sup>.

En el Perú son escasas las investigaciones que realizadas acerca de la resistencia antifúngica, especialmente en las especies del género *Candida*. Actualmente la investigación de resistencia antifúngica es limitada, debido a que se sólo se realizan en hospitales que cuenten con la tecnología de microdilución es por ello que se considera importante realizar la investigación de la susceptibilidad antifúngica por metodología de disco difusión en agar, la cual tiene menos complejidad de trabajo y se puede ejecutar en cualquier parte de nuestro país si generar sobre costo excesivos, siendo una gran herramienta de utilidad clínica para la decisión medica terapéutica.

La mayoría de los estudios de vigilancia se han realizado en pacientes hospitalizados con infecciones fúngicas invasoras, son pocos los trabajos que han incluido cepas de pacientes ambulatorios y localizaciones superficiales en estudios epidemiológicos. En estos pocos tipos de investigaciones se ha encontrado que la mayor cantidad de cepas resistentes y sensibles dosis dependiente a fluconazol fueron aisladas de pacientes ambulatorios, específicamente de flujo Vaginal y que la especie

más resistente fue la *Candida glabrata*. Es por ello que hemos considerado conveniente orientar nuestra investigación en pacientes ambulatorios y en tipo de muestra de secreción vaginal<sup>15</sup>.

En resumen, el creciente número de infecciones micóticas por especies de *Candida no-albicans*, y el aumento de resistencias antifúngica, demuestra sobre la necesidad que existe de realizar la investigación de la sensibilidad in vitro, para ayudar al diagnóstico clínico del paciente y reforzar el esquema terapéutico con la única finalidad de obtener una evolución clínica favorable del paciente<sup>16</sup>.

Los estudios de sensibilidad con medicamentos antifúngicos no se ejecutan de forma habitual, no obstante, se evidencia la necesidad de contar con técnicas estandarizadas que permitan orientar el tratamiento correcto de candidiasis, se deber tener en cuenta la creciente frecuencia de aparición de cepas resistentes; por esta razón el propósito en este trabajo fue conocer el comportamiento de los aislamientos clínicos de *Candida* frente a antifúngicos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)<sup>16</sup>.

Este trabajo servirá para poder identificar las especies del género *Candida* frecuentes en secreciones vaginales, además la importancia principal del estudio es la investigación sobre la susceptibilidad a dos antifúngicos de fácil acceso usado por la población, empleando la metodología manual de disco difusión, la cual es considerada como una gran herramienta para el diagnóstico temprano de resistencia antifúngica, debido a que su implementación es económicamente accesible.

## **1.4. Objetivos.**

### **1.4.1. Objetivos Generales.**

Determinar susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

### **1.4.2. Objetivos Específicos.**

Determinar la prevalencia de especies en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

Identificar la susceptibilidad a fluconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

Identificar la susceptibilidad a voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes.

Existen antecedentes sobre esta investigación, según la cronología y el espacio los cuales son:

En el año 2009 (Chile), **Albuquerque C. , Hermosilla G. y Tapia C.** Realizaron un estudio en Chile sobre la distribución y susceptibilidad a fluconazol de levaduras del género *Candida* aisladas en pacientes hospitalizados y ambulatorios. Se analizaron 166 cepas de *Candida*, recolectadas consecutivamente en un período de 6 meses, las cuales fueron aisladas de flujo vaginal (73,5%), orina (7,8%), muestras respiratorias bajas (7,8%), hemocultivos (4,2%), líquidos estériles (2,4%) y heridas (1,8%). Un 71,1% provenía de pacientes ambulatorios. La especies aisladas fueron *Candida albicans* (78,9%), *C. glabrata* (8,4%), *C. tropicalis* (6,0%), *C. famata* (1,8%), *C. krusei* (1,8%), *C. parapsilosis* (1,8%) y *C. sake* (1,2%). Los porcentajes de sensibilidad a fluconazol fueron: 92,3% para *C. albicans*, 85,7% para *C. glabrata* (siendo la mayoría sensible dosis dependiente), 100% para *C. parapsilosis* y 80% para *C. tropicalis*. En los niños, todos hospitalizados, se aislaron sólo cepas sensibles, mientras que en adultos ambulatorios se aislaron más cepas resistentes, fundamentalmente de flujo vaginal. La distribución de especies y la resistencia a azoles, varía de acuerdo al sexo, edad y procedencia de los pacientes. La información de la distribución de especies y susceptibilidad a azoles en pacientes ambulatorios es útil considerando que podría representar reservorios de infecciones fúngicas invasivas<sup>17</sup>.

En el año 2008 (Brasil), **Dalben K., Suemi C. et al.** Presentaron un estudio en el cual se evaluó la susceptibilidad de las levaduras vaginales por microdilución a los antifúngicos más utilizados en Maringa, Parana, Brazil. Se analizaron 78 cepas de levaduras

provenientes de pacientes con candidiasis vulvovaginal, recolectadas durante un año. Los resultados fueron: resistencia al Ketoconazol 41,5% *Candida albicans* y 96% *Candida no-albicans*; resistencia al Fluconazol 3,8% *Candida albicans* y el 8,0% *Candida glabrata*; resistencia al Itraconazol 1,9% *Candida albicans* y 20% *Candida no-albicans*; resistencia a la Anfotericina B 5,7% de las *Candida albicans* y el 8% *Candida no-albicans*. No existió resistencia a Nistatina, pero sí una elevada frecuencia de sensibilidad dosis. Según el autor estos resultados resultan ser un buen sustento para promover la realización de la susceptibilidad antifúngica in vitro<sup>4</sup>.

En el año 2011 (Chile), **Alburquenque C., Beltran S., Olivares R. et al.** Desarrollaron un estudio en Chile sobre la distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp. Obtenido de pacientes internos y externos en un período de 6 meses. En total aislaron 223 cepas del cual el 51.6% provinieron de flujo vaginal, tracto respiratorio inferior (24.7%), orina (20.2%), heridas (1.8%), sangre (0.9%), fluido peritoneal (0.4 %) y uñas (0,4%). Resultados: La distribución de especies fue de *C. albicans* 84.8% (n: 189), *C. glabrata* 7.6% (n: 17), *C. tropicalis* 2.7% (n: 6), *C. parapsilosis* 2.2% (n: 5), *C. kefyr* 0.9% (n: 2) y otros 1.8% (*C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*) (n: 4). La dependencia de la dosis de susceptibilidad (SDD) y la resistencia fueron 3,2% para fluconazol y 2,2% para voriconazol. La mayoría de las cepas SDD y resistentes se aislaron de pacientes ambulatorios. Además, se encontró un mayor porcentaje de CIM con respecto a los nuevos puntos de corte clínico (PBC) y puntos de corte epidemiológico (VCE) en cepas de pacientes ambulatorios y especialmente en aislamientos de *C. glabrata* a caspofungina. Conclusión: Teniendo en cuenta que la mayoría de las infecciones invasivas son causadas por cepas de la microbiota endógena, y que existe una población resistente de *Candida* spp. en la

comunidad, debe ser importante incluir en estudios de vigilancia cepas aisladas de pacientes ambulatorios. Se encontró un mayor porcentaje de CIM con respecto a los nuevos puntos de corte clínico PBC y VCE en cepas de pacientes ambulatorios y especialmente en aislamientos de *C. glabrata* a caspofungina. Los resultados de estos estudios muestran que en la comunidad se encuentran cepas no silvestres de *Candida* spp, lo cual puede estar relacionado al uso poco controlado de antifúngicos para tratar la candidiasis vulvo-vaginales en la comunidad<sup>15</sup>.

En el año 2015 (Cuba), **Perurena L. et al.** Realizó un estudio en el cual se evaluó la susceptibilidad antifúngica de secreciones vaginales aisladas en pacientes cubanas con sospecha de candidiasis vulvovaginal del cual 28 aislados pertenecieron al género *Candida* se les realizó la prueba de susceptibilidad in vitro con la galería ATBTM Fungus 3 frente a diferentes antifúngicos (5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol). Como resultado todas las cepas aisladas fueron sensibles a la anfotericina B y uno de *C.albicans* se informó resistente a los azoles estudiados. Todas las especies diferentes de *C. albicans* fueron susceptibles al voriconazol (CMI $\leq$  1 mg/L). En conclusión, el estudio de patrones de susceptibilidad en aislados de *Candida* provenientes de mujeres con vulvovaginitis permite profundizar en cómo abordar la terapéutica de esta afección; el fluconazol resultó el tratamiento de elección. Los resultados alertan sobre la emergencia de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. inconspicua* y *C. lusitaniae* como agentes causales de la candidiasis vulvovaginal<sup>2</sup>.

En el año 2015 (Ecuador), **Chillogallo C. et al.** Investigaron a las especies de *Candida* y su resistencia al fluconazol en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas. Participaron 67

mujeres embarazadas en cuyas muestras se identificaron un 74.2% (n=23) de *Candida albicans* y un 25.8% (n=8) de *Candida krusei* mientras que la determinación de resistencia a fluconazol fue de 30.4% (n=7) para *C. albicans* y 100% (n=8) para *C. krusei*; además el 44.4% (n=8) presentaron vulvovaginitis recurrente; las edades más frecuentes fueron entre 21 y 44 años correspondientes al 53.3% (n=15). Por lo que se concluye que en la población estudiada la especie más frecuente fue *Candida albicans*; que el 100% de *C. krusei* presentó resistencia a fluconazol; que la presencia de vulvovaginitis recurrente (VVR) no es un factor que se correlaciona a la resistencia a fluconazol y que en la etapa de fertilidad (21 a 44 años) las mujeres pueden ser más susceptibles a estas infecciones<sup>61</sup>.

En el año 2012 (Perú), **Mancilla R. G.** investigó a pacientes con candidiasis vaginal en el Hospital Regional de Ayacucho en el 2012. En sus resultados la sensibilidad a fluconazol de *C. albicans* fue de 75.6% (62/82), *Candida glabrata* de 62.5%, *Candida dubliniensis* 100% y *parapsilosis* 100%; en cambio el perfil de susceptibilidad al voriconazol se mostró de *C. albicans* 12.2% (10/82), *C. glabrata* 6.25% (1/16) y *C. parapsilosis* 100%(1/1). Estos resultados de muestran una considerable resistencia a pesar de que voriconazol es el antifungico más activo que el fluconazol sobre las levaduras de importancia clínica<sup>58</sup>.

En el año 2012 (Perú), **Muñoz E. et al.** Investigaron la prevalencia de especies en hospital Regional de Trujillo encontraron que el 34.7% de secreciones vaginales contenían levaduras del genero *Candida*. Se aisló al *C. albicans* en un 60% y 19% de *C. tropicalis*, 7% de *C. glabrata*, 7% de *C. krusei*, 5% *C. guilliermondi*, 2% de *C. parapsilosis*<sup>57</sup>.

En el 2000 (Perú), **Guevara. J et al.** Obtuvieron cepas de candida provenientes de consultorio externo ginecológico del Hospital Arzobispo Loayza de la ciudad de Lima. De los 24 casos de candidiasis el 50% fue de *Candida albicans* y 25% *Candida tropicalis*, 16% de *Candida fumigata*, 4% de *Candida glabrata* y 4% de *Candida krusei* <sup>56</sup>.

En el año 2012 (Irán), **Salehei Z. et al.** Realizó su investigación en Ahvaz, Irán, donde obtuvieron 2 aislamientos de *C. krusei* fueron sensibles al ketoconazol, clotrimazol y miconazol. Además, ambos aislamientos fueron resistentes a fluconazol, nistatina, econazol y terbinafina. Solo un aislado de *C. tropicalis* fue sensible al miconazol y la terbinafina y dos aislados al clotrimazol. La mayor sensibilidad de *C. albicans* a los medicamentos antimicóticos se observó contra el miconazol (49 de 53 aislamientos) seguido de clotrimazol (41), terbinafina (28) y ketoconazol (13), mientras que 43 aislamientos fueron resistentes al antifúngico fluconazol y econazol. Las pruebas de sensibilidad antifúngica sugieren que los aislados vaginales de *Candida* fueron más sensibles al miconazol, clotrimazol y terbinafina, y menos sensibles al econazol y al fluconazol. <sup>62</sup>

En el 2007 (La India), **Mohanty S. et al.** Investigó a 111 mujeres de un centro rural de atención primaria de salud del norte de India que presentan síntomas de vulvovaginitis y se llegó a islar levaduras, teniendo como resultados: *Candida glabrata* (56 cepas, 50,4%), *C. albicans* (39 cepas, 35,1%), *C. tropicalis* (12 cepas, 10,8%), *C. krusei* (3 cepas, 2,7 %) y *C. parapsilosis* (1 cepas, 0.9%). Las pruebas de sensibilidad realizadas en 30 aislamientos representativos (15 *C. glabrata*, 10 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis* y 1 *C. parapsilosis*) revelaron que 21 aislamientos (70%) eran

susceptibles (MIC,  $<0 = 8$  microg / ml) a fluconazol, mientras que 9 (30%) fueron susceptibles dependientes de la dosis (S-DD, MIC 16-32 microg / ml).<sup>63</sup>

En el 2009 (Colombia), **Duque C. et al.** Recolectaron muestras de 150 mujeres con síntomas compatibles de vulvovaginitis, la prevalencia de las diferentes especies de *Candida* fue de: *C. albicans* 80% (120), *C. parapsilosis* 10% (15), *C. glabrata* 5,3% (8), *C. tropicalis* 2% (3), *C. guilliermondii* 1,3% (2), *C. kefyr* 0,7% (1) y *Candida famata* 0,7% (1). El 90% de los aislamientos de *Candida albicans* fueron sensibles al fluconazol, itraconazol y voriconazol. El 100% de los aislamientos de *C. glabrata* sensibles a Fluconazol y voriconazol. Todas las otras especies aisladas fueron 100% sensibles a los antimicóticos evaluados. *C. albicans* fue la levadura más frecuentemente recuperada, seguida de *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. La sensibilidad en general a los antimicóticos es alta para todos los aislamientos. <sup>64</sup>

En el año 2019 (Perú); **Villalobos B. Vasquez Z. et al.** Investigaron la prevalencia y susceptibilidad a antifúngicos de *Candida no albicans* aislado en pacientes de unidades críticas en diferentes tipos de muestras correspondientes a orina, secreción traqueal, líquido peritoneal y sangre recolectados en febrero del 2018 a mayo del 2019. Se aislaron 46 cepas de *Candida no albicans*, como resultado general el 80.4% (37/46) fueron sensibles y el 19.6% (9/46) fueron resistente al fluconazol. El resultado por especie: *Candida tropicalis* 93.5% sensible y 6.5 % resistente al fluconazol; *Candida glabrata* 75.0% sensible y 25.0% resistente al fluconazol; *Candida parapsilosis* 40% sensible y 60.0% resistente al fluconazol; *Candida krusei* 0% sensible y 100% resistente al fluconazol. Los resultados para voriconazol de las *Candida no albicans* el 78.3% fueron sensibles y el 21.7% fueron resistentes. A

si mismo *Candida tropicalis* 83.9% sensible y 16.1 % resistente al voriconazol; *Candida glabrata* 62.5% sensible y 37.5% resistente al voriconazol; *Candida parapsilosis* 80.0% sensible y 20.0% resistente al voriconazol; *Candida krusei* 50.0 % sensible y 50.0% resistente al voriconazol.<sup>65</sup>

En el año 2017(Perú); **Herrera G. L.** Realizó un estudio sobre la resistencia a los antifúngicos de especies de *Candida* aisladas en pacientes con candidiasis vaginal. Aisló 110 cepas de *Candida* entre diciembre del 2017 y marzo del 2018. La frecuencia de especies: *Candida albicans* 86.4% (95/110), *Candida glabrata* 9.1% (10/110), *Candida parapsilosis* 2.7% (3/110), *Candida tropicalis* 0.9% (1/110) y *Candida krusei* 0.9% (1/110). Asimismo, para el fluconazol, *Candida albicans* fue sensible en un 89.5%(85/95), sensible dosis dependiente 4.2%(4/95) y resistente 6.3%(6/95); *Candida glabrata* fue sensible en un 70%(7/10), sensible dosis dependiente 20%(2/10) y resistente 10%(1/10); *Candida tropicalis* fue sensible en un 100%(1/1); *Candida parapsilosis* fue sensible en un 100%(3/3); *Candida krusei* resistente 100% (1/1). En caso del voriconazol, la *Candida albicans* fue sensible en un 93.7%(89/95), sensible dosis dependiente 3.2%(3/95) y resistente 3.2%(3/95); *Candida glabrata* fue sensible en un 100% (10/10); *Candida parapsilosis* fue sensible en un 100% (3/3); *Candida tropicalis* sensible 100 % (1/1) y *Candida krusei* sensible 100% (1/1).<sup>66</sup>

En el año 2014 (Perú); **Oscoco C. L.** Investigó la sensibilidad antifúngica de especies de *Candida* aisladas de secreción vaginal de gestantes que acudieron al Hospital Regional “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, Ayacucho en el periodo de julio a diciembre de 2014; se reportaron 39 casos positivos para candidiasis. Las especies detectadas fueron *Candida albicans* 84.6% (33/39) y

*Candida guilliermondi* 15.4% (6/39). Para el fluconazol *Candida albicans* fue sensible al 96.9% (32/33), sensible dosis dependiente 3.1% (1/33) y resistente 0%; *Candida guilliermondii* fue sensible al 50 % (3/6), sensible dosis dependiente 50% (3/6) y resistente 0%. En caso del voriconazol *Candida albicans* fue sensible al 100% (33/33); *Candida guilliermondi* fue sensible al 66.6% (4/6), sensible dosis dependiente 33.3% (2/6) y resistente 0%.<sup>67</sup>

## 2.2. Base teórica.

### 2.2.1. Historia

La candidosis es una de las enfermedades micóticas que se conoce desde la antigüedad. En su obra “Epidemics”, Hipócrates describió que en niños recién nacidos y en pacientes debilitados se presentaban placas blanquecinas en la boca, a lo que denominó “estomatitis aftosa”. En Francia Veron y Berg en 1835 describieron diversas variedades clínicas del padecimiento, pero no es sino hasta 1844 cuando Bennet, y en 1853 Robin, aislaron el hongo y propusieron de nueva cuenta que la enfermedad es propia de pacientes debilitados. A través de los años, muchos han sido los autores que han descrito las variedades clínicas de la candidosis y realizados trabajos epidemiológicos. En la actualidad, aún es una de las enfermedades más estudiadas a todos los niveles<sup>19</sup>.

El nombre del agente etiológico ha pasado por diversos géneros y especies; se han llegado a contar hasta 250 sinónimos y acrónimos; entre los más importantes se encuentran *Oidium albicans* (Robin, 1853) y *Monilia candida* (Bonoderm, Hansen, 1868), este último término utilizado hasta 1932, cuando gracias a los trabajos de Langeron y Talice, quedó clasificada como *Candida albicans*<sup>19</sup>.

## 2.2.2. Candidiasis Vulvovaginal

### Definición

La candidiasis vulvovaginal (CCV) es una infección aguda causada por hongos que afecta a la vagina y es producida por especies del género *Candida*, a condiciones fisiológicas alteradas, que determinan una caída de la inmunidad local<sup>5,6</sup>.

### Sintomatología<sup>5</sup>

- Secreción vaginal característica: blanquecina en grumos, aspecto de yogur.
- Prurito, disuria, dispareunia, sensación de escozor en genitales externos.
- Mucosa vaginal eritematosa con leucorrea blanca fácil de desprender.
- Lesiones cutáneas en vulva y periné.

### Factores Predisponentes y de Riesgo<sup>6,20</sup>

- Variación de la barrera mucocutánea causada por diabetes, uso indiscriminado de agentes antimicóticos, drogas citotóxicas y corticoides.
- Desequilibrio hormonal y nutricional a causa de diabetes, embarazo, anticonceptivos orales, desnutrición y uremia.
- Disminución del número de células fagocitarias como resultado de leucemia, granulomatosis, aplicación de radiaciones o quimioterapia contra el cáncer.
- Defectos intrínsecos en las funciones de las células fagocitarias como resultado de enfermedades granulomatosas crónicas y deficiencia de

mieloperoxidasa.

- Alteración de la función fagocitaria causada por uremia, enfermedades virales y el uso de corticoides y agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y sulfamidas.

### **Entre otros factores de riesgo<sup>16,20</sup>**

- Relaciones sexuales: aumenta por las relaciones contacto oro-genital.
- Contracepción: se asocia con las dosis elevadas de estrógenos. El uso de diafragma y espermicidas en los 3 días precedentes se relaciona con un incremento marcado en la colonización por *Candida*.
- Los baños y ciertos productos de aseo femenino: se relacionan como predisponente para la incidencia de candidiasis.
- Antibióticos: Tanto antibióticos como formulaciones tópicas de yodo, metronidazol o clindamicina.

### **Etiología y Epidemiología**

La Candidiasis Vulvovaginal viene a ser la segunda causa más recurrente de infección vaginal. Incide primordialmente a mujeres que tienen de 20 y 40 años, y entre el 50 al 72% de las estas han presentado por lo menos un episodio en el transcurso de su vida<sup>5</sup>. Generalmente es causada por levaduras del género *Candida* las cuales forman parte de la flora comensal del intestino y vagina, siendo el principal agente etiológico de la candidiasis vaginal *Candida albicans*, ya que ésta causa entre un 80%-85% de las infecciones, mientras que las especies de *C. no-albicans* causan entre el 5%-20% de los casos<sup>21</sup>.

La mayoría de las infecciones por *Candidas no-albicans* son causadas por *Candida glabrata* en un 5%-10% de casos o *Candida tropicalis* menor a 5% de los casos. *Candida krusei* es una causa inusual de vaginitis fúngica<sup>60</sup>. En las mujeres afectadas de vaginitis con flujo aumentado, *C. glabrata* corresponde a la especie cultivada con mayor frecuencia después de *C. albicans*, variando según las series desde un 0.6% a un 36% con una frecuencia media entre el 15% y 20%<sup>22</sup>.

### Diagnóstico

La anamnesis tiene un papel destacado en el diagnóstico ya que, tanto la presencia de cualquier factor desencadenante del posible cambio de la microbiota que favorezca el crecimiento de la *Candida* (por ejemplo, la toma previa de antibióticos de amplio espectro), como la presencia de factores personales (antecedentes de diabetes o embarazo), así como la presencia de episodios previos de candidiasis puede resultar orientativo<sup>16,5,6</sup>.

Pruebas complementarias en el diagnóstico de VVC

<b>pH</b>	No suele variar con respecto al pH normal (4-4,5)
<b>Frotis en fresco</b>	
Con suero fisiológico al 0,9 %	Se visualizan esporas o hifas (sensibilidad 50%)
Tinción de Gram	Se visualizan esporas e hifas (sensibilidad 65%)
Con unas gotas de KOH	Se visualizan levaduras en fase de esporas e hifas (sensibilidad 70%)
<b>Cultivo vaginal</b>	Prueba confirmatoria

**Figura 1: Pruebas complementarias en el diagnóstico de VVC**

Fuente: Diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginitis [SEGO, 2016]

El diagnóstico no debe basarse exclusivamente en los síntomas y debe realizarse una exploración minuciosa y exploraciones complementarias, ya que una de las causas más frecuentes del fallo terapéutico es un diagnóstico erróneo<sup>5</sup>.

## Tratamiento

No Farmacológico: el aseo de la vagina se debe realizar a base de agua y jabón secándola con una toalla limpia.

Farmacológico: En Norte América el azol indicado para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal es el fluconazol 150 mg en única dosis, presentando efectos colaterales en el 10% de los pacientes (intolerancia gastrointestinal, cefalea y urticaria). También se puede utilizar ketoconazol 400 mg/día por 5 días (1 comprimido/12 horas por 5 días); o Itraconazol 400 mg/día por un simple día (1 comprimido/12 horas por 1 día), o 200 mg/día por 3 días (1 comprimido/día por 3 días) <sup>16</sup>.

### 2.2.3. Género *Candida* de interés clínica humana

Los hongos del género *Candida* tienen una amplia distribución en la naturaleza, encontrándose en casi todos los hábitats terrestres y acuáticos. Sin embargo, las conocidas como principales responsables de candidiasis humanas tienen una distribución mucho más restringida y se encuentran frecuentemente asociadas al hombre y a otros animales homeotermos. T10 De las especies descritas no llegan a 20 las asociadas en alguna ocasión con el hombre. De ellas, la mayoría de los autores coinciden en designar como los principales agentes etiológicos de enfermedad a las especies como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (sin *C. pseudotropicalis*), *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. glabrata*, *C. viswanathii*, *C. lusitaniae* y *C. dubliniensis* <sup>16,23</sup>.

Las células del género *Candida* se caracterizan por tener un tamaño de 2 a 4 µm, de forma variada incluyendo formas globosas, ovoides, cilíndricas, alargadas, raramente puntiagudas, ojivales, o en forma de botella. La reproducción se

realiza, normalmente, por yemas multilaterales y presentan un pseudomicelio bien desarrollado, rudimentario o ausente. Pueden presentarse clamidosporas, no así ascosporas, teliosporas, balistosporas y artrosporas. No existe pigmentación visible dada la ausencia de pigmentos carotenoides, lo que es fácil establecer una clara diferencia con respecto al género *Rhodotorula*. Pueden formar polisacáridos extracelulares, los cuales dan coloración verde a púrpura al reaccionar con el yodo. La asimilación del inositol es variable. Las cepas inositol positivas forman pseudomicelios. La fermentación de azúcares puede darse o no<sup>24</sup>.

### **2.2.3.1 Patogénesis**

La capacidad de adhesión de *C.albicans* es superior a la de otras especies esto puede ser la causa de mayor frecuencia en este tipo de infecciones. Esta adhesión se manifiesta en la unión del receptor de la membrana, iCb3 y fibronectin; por parte de una proteína transmembrana de la membrana micótica (análoga a la integrina). Esta proteína micótica es capaz de anclarse en el receptor epitelial<sup>25</sup>.

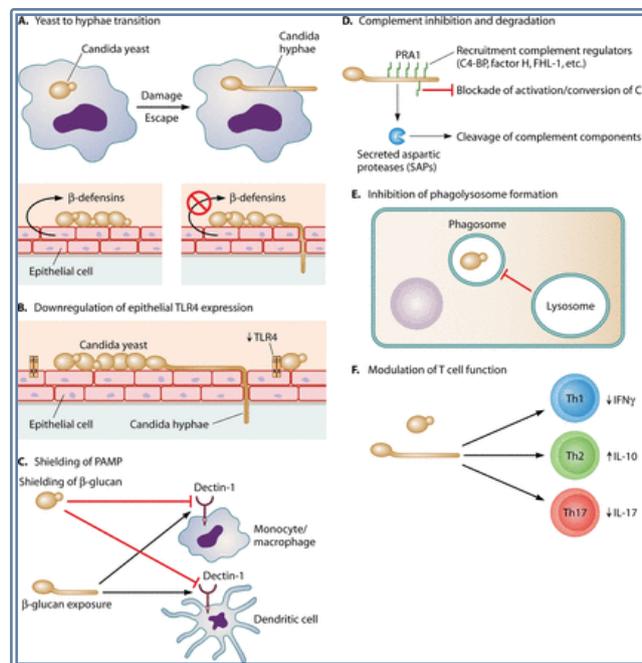
Un medio de niveles elevados de estrógeno aumenta la exposición de los complejos epiteliales glicoproteicos que participan como receptores facilitando así la adherencia de los hongos a la superficie epitelial. La gestación y el consumo de anticonceptivos orales de alta dosis hacen que la persona sea más propensa a este tipo de infecciones.

Parte de la microbiota vaginal y que juegan un papel importante son los lactobacillus, estas impiden la adhesión de las esporas fúngicas a la superficie de las células epiteliales a través de un proceso de congregación y competencia por los receptores. De esta forma una disminución de los lactobacilos en la microbiota vaginal

condiciona un incremento del riesgo de infecciones micóticas<sup>26, 16</sup>.

Las esporas que llegan adherirse al epitelio vaginal germinan y desarrollan micelios e hifas. De esta forma la *Candida* tiene la facilidad de invadir el epitelio vaginal. Este proceso se asocia con la producción de enzimas como las proteasas que destruyen las proteínas en modo de defensa a nivel de la mucosa vaginal por parte de las hifas.

La invasión epitelial ocasiona la liberación de una serie de sustancias (prostaglandinas, bradiquinina) con capacidad de inducir cambios inflamatorios a nivel local: ello ocasiona edema, eritema e incremento del flujo vaginal. De hecho, la leucorrea candidiásica consiste en una mezcla de células vaginales exfoliadas y polimorfonucleares<sup>27,16</sup>.



**Figura 2: Interacción entre *Candida albicans* y la defensa innata de mamíferos.** Fuente: <https://iaa.asm.org/content/early/2012/01/10/IAI.06146-11.short>

### 2.2.3.2 Especies

#### ***Candida albicans***

La capacidad de adhesión de *C.albicans* es superior a la de otras especies esto puede ser la causa de mayor frecuencia en este tipo de infecciones. Esta adhesión se manifiesta en la unión del receptor de la membrana, iCb3 y fibronectin; por parte de una proteína transmembrana de la membrana micótica (análoga a la integrina). Esta proteína micótica es capaz de anclarse en el receptor epitelial<sup>25</sup>.

Un medio de niveles elevados de estrógeno aumenta la exposición de los complejos epiteliales glicoproteicos que participan como receptores facilitando así la adherencia de los hongos a la superficie epitelial. La gestación y el consumo de anticonceptivos orales de alta dosis hacen que la persona sea más propensa a este tipo de infecciones.

Parte de la microbiota vaginal y que juegan un papel importante son los lactobacillus, estas impiden la adhesión de las esporas fúngicas a la superficie de las células epiteliales a través de un proceso de congregación y competencia por los receptores. De esta forma una disminución de los lactobacilos en la microbiota vaginal condiciona un incremento del riesgo de infecciones micóticas<sup>26, 16</sup>.

Las esporas que llegan adherirse al epitelio vaginal germinan y desarrollan micelios e hifas. De esta forma la *Candida* tiene la facilidad de invadir el epitelio vaginal. Este proceso se asocia con la producción de enzimas como las proteasas que destruyen las proteínas en modo de defensa a nivel de la mucosa vaginal por parte de las hifas.

La invasión epitelial ocasiona la liberación de una serie de sustancias (prostaglandinas, bradiquinina) con capacidad de

inducir cambios inflamatorios a nivel local: ello ocasiona edema, eritema e incremento del flujo vaginal. De hecho, la leucorrea candidiásica consiste en una mezcla de células vaginales exfoliadas y polimorfonucleares<sup>27, 16</sup>.

### ***Candida glabrata***

*Candida glabrata* es una levadura saprofita, sus blastoconidios (mide de 1- 4 um) no producen pseudohifas o hifas verdaderas, lo que conduce a pensar que es menos virulenta, si produce proteinasas y presenta hidrofobicidad en su superficie celular, facilitando así su adherencia. Otra característica importante de esta especie es que solo asimila los azúcares glucosa y trealosa, no filamenta en plasma a 37°C. Cabe indicar que el genoma de *C.glabrata* es haploide (*C. albicans* es diploide), lo cual facilita la rápida adquisición de resistencia secundaria<sup>30</sup>.

*Candida glabrata* es la especie que tiene más afinidad por la mucosa genital, cuyo aislamiento es de 5 a 15% de casos de candidiasis vulvovaginal, siendo la especie con mayor incidencia después de *Candida albicans*; se considera un patógeno emergente en asociación con su marcada resistencia a algunos antifúngicos de tipo triazólico, debido al aumento en la síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y de una bomba de eflujo activa para el fluconazol. Las frecuencias de aislamiento más llamativas de *Candida glabrata* para las distintas patologías pueden oscilar entre el 0,4-2.2% de muestras dermatológicas y de 6-14% en candidiasis vulvovaginal. En algunos estudios la presencia de esta levadura en vagina de portadoras asintomáticas es del 28%. Debido a su carácter haploide, se considera que *Candida glabrata* tiene mayores posibilidades de presentar mutaciones que otras especies diploides<sup>16</sup>.

### ***Candida tropicalis***

*Candida tropicalis* microscópicamente presenta blastoconidias de 4-8 x 5 -11 um de tamaño individuales o muy pequeños grupos en cualquier lugar o a lo largo de las pseudohifas y abundantes pseudomicelios, que consiste en elementos largos ramificados, estrechos en la punta con conidios laterales. Distintos autores refieren que al igual que *C. albicans*, *C. tropicalis* puede también puede producir tubos germinales y desarrollar hifas verdaderas. Raramente puede presentar clamidiosporas, generalmente en forma de lágrima, aunque en algunas ocasiones pueden ser pleomorfas<sup>31</sup>.

*Candida tropicalis* es una especie patógeno oportunista que genera infecciones a inmunodeprimidos y diabéticos en los que se manifiesta una alteración de los mecanismos de defensa. Es el mayor agente causal de septicemia y candidiasis diseminada con especial importancia en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes<sup>16</sup>.

### ***Candida krusei***

La levadura de *Candida krusei* tiene la forma generalmente alargada “arroz de grano largo”. Compuesta por seis capas intracitoplasmáticas y organelos como pequeñas vesículas ribosomas. *C. krusei* crece a una temperatura máxima de 43-45 °C fermenta solo la glucosa de un gran panel de carbohidratos. Crece en agar dextrosa de saboraud y las colonias son de color amarillo blanquecino mate o rugoso<sup>32</sup>.

La *Candida krusei* es responsable de infecciones en mucosas y candidiasis profundas en pacientes inmunodeficientes, en especial de fungemias, endoftalmitis, artritis y endocarditis. Otros problemas que puede causar están asociados a diarrea infantil, infecciones sistémicas,

colonizaciones de tracto gastrointestinal, respiratorio y urinario de pacientes con granulocitopenia, aunque carece de los mecanismos de patogenicidad propios de otras especies del género *Candida*<sup>16</sup>.

*Candida krusei* es una causa infrecuente de fungemia. En la mayoría de las instituciones, esta especie de *Candida* representa solo el 3.5 % al 4.5% de las fungemias. Pero presenta resistencia intrínseca al fluconazol<sup>33</sup>.

### ***Candida parapsilosis***

*Candida parapsilosis* presenta células redondeadas, ovales o alargadas y producción de pseudohifas, son microorganismos diploides. Contiene conjunto específico de aminoácidos, principalmente la citrulina lo cual es importante para su morfología celular y colonia. Pero es incapaz de formar hifas verdaderas<sup>34</sup>.

La patogénesis de esta especie se basa en diversos factores de virulencia que posee el microorganismo principalmente su adherencia a las células del hospedero, capacidad de producir extensas biopelículas así como la secreción de ciertas enzimas hidrolíticas<sup>34</sup>.

La *Candida parapsilosis* provoca infección de la uña distal con más frecuencia, pero menos que *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, también se ha identificado como causante de endocarditis, endoftalmitis, y fungemia. Se aísla con más frecuencia en la piel, donde vive como comensal, por lo que es un conocido patógeno oportunista. Su presencia en portadores asintomáticos puede llegar al 12% (vaginal).<sup>16</sup>

### **2.2.3.3 Sensibilidad y Resistencia del Género *Candida***

La resistencia a los antimicóticos se puede clasificar en dos categorías: invitro (primaria o secundaria) y clínica. La

resistencia in vitro primaria, también llamada intrínseca o innata, es la que presenta el microorganismo de forma natural, por ejemplo *Candida krusei* frente a fluconazol<sup>33</sup>. La resistencia in vitro secundaria aparece cuando un microorganismo inicialmente sensible se hace resistente. Esta última forma de resistencia se presenta con frecuencia en los pacientes infectados por el VIH, en tratamiento prolongado con fluconazol <sup>26,16</sup>. La resistencia clínica es aquella que aparece cuando el fracaso del tratamiento antifúngico no se asocia con una disminución de la sensibilidad in vitro <sup>26</sup>.

Entre las especies que desarrollan resistencia secundaria a anfotericina B destaca *Candida parapsilosis*, seguida de *Candida tropicalis* y *Candida lusitanae*. Por lado, las especies, como *Candida guilliermondi* y *Candida glabrata* pueden expresar más fácilmente las mutaciones de resistencia<sup>31, 34, 16</sup>.

El porcentaje de *Candida spp.* Susceptible a los azoles es alto (80-90%), pero algunas cepas de *Candida krusei* poseen resistencia intrínseca al fluconazol. Se ha observado que *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata* pueden ser de 4 a 32 veces menos sensible a fluconazol que *Candida albicans*<sup>16</sup>. En pacientes inmunodeprimidos o que han sido tratados con azoles, se indica el estudio de sensibilidad a estas drogas<sup>26, 16</sup>.

La resistencia intrínseca a 5-fluorocitosina es excepcional y la resistencia primaria es muy variable, según la especie. Pero, sin lugar a dudas, la resistencia secundaria es el mayor inconveniente de este antifúngico cuando se utiliza como mono terapia. Su incidencia varía según el tipo de infección, llegando hasta el 50% en las infecciones mucocutáneas crónicas. Por lo tanto, la repercusión clínica

es notable, constituyendo el único problema grave de resistencia a los fármacos antifúngicos, ya que cualquier especie sensible puede desarrollarla<sup>7</sup>.

Esta situación, unida a la sinergia observada entre la 5-fluorocitosina y la anfotericina B, o con los azoles, ha motivado que su uso actualmente sea siempre en combinación con otro antifúngico, y nunca sola<sup>16</sup>.

Entre los mecanismos bioquímicos implicados en el desarrollo de resistencias a los antifúngicos se incluyen las alteraciones de la membrana celular, los defectos enzimáticos, el aumento de la síntesis de compuestos que compiten con el antifúngico y las alteraciones en las estructuras dianas. La base genética de la resistencia radica, sobre todo, en mutaciones cromosómicas concretas, aunque también se han descrito mutaciones extracromosómicas<sup>26,16</sup>.

#### **2.2.4. Agentes Antifúngicos**

Los antimicóticos pueden ser naturales o artificiales, estas pueden alterar la estructura de la célula micótica alterando así su desarrollo y supervivencia. Hay muchos antifúngicos que se diferencian en su estructura química y mecanismo de acción.

Clasificación química de los antifúngicos:

##### **Polienos**

Entre los polienos más representativos se encuentra la anfotericina B cuyo mecanismo de acción altera la membrana celular fúngica<sup>26,35</sup>.

Estos mecanismos de resistencia pueden ser por la mutación de los genes Po11 a Po15, incrementando la acción de la enzima catalasa y disminuyendo el daño oxidativo de la membrana celular fúngica<sup>25, 35</sup>.

## **Azoles**

Los antimicóticos más usados para tratamientos por candidiasis son los azoles: Voriconazol, Ketoconazol, Fluconazol e Itraconazol estas alteran la producción de ergosterol, al bloquear la 14-alfa-desmetilasa, una enzima dependiente del citocromo P-450 y que transforma lanosterol en ergosterol. Esta inhibición modifica la fluidez de la membrana, incrementando así la permeabilidad y afectando el crecimiento celular y de la replicación. Esta inhibición del citocromo P-450 es responsable de los efectos adversos que los azoles pueden causar en los seres humanos<sup>25, 35</sup>.

Los mecanismos de resistencia se pueden manifestar por modificación en el complejo droga –diana generado por mutaciones que alteran la unión de la droga<sup>7</sup>.

Otros factores como la alteración de la síntesis del ergosterol y la disminución de la producción de la enzima blanco por lo tanto Disminución de la acción de la droga <sup>7, 25, 16, 26</sup>.

El aumento de la síntesis de la de diana puede generar una resistencia cruzada entre el fluconazol e itraconazol<sup>25, 35</sup>.

## **Alilaminas**

La terbinafina acciona sobre la síntesis del ergosterol por ello se produce una reducción de ergosterol y un aumento del nivel de escualeno y así altera la permeabilidad de la membrana celular de este modo afecta la estructura celular.<sup>16</sup>.

## **Lipopéptidos**

Entre los lipopeptidos más destacados, las equinocandinas tienen un mecanismo de acción que altera la estructura de la pared celular fúngica produciendo finalmente lisis de la célula micótica<sup>26, 35</sup>.

### **2.2.5. Pruebas de identificación de especies de *Candida***

#### **2.2.5.1 Pruebas microbiológicas**

##### **Examen directo con hidróxido de potasio al 10%**

Esta prueba es una solución que disgrega la queratina y se utiliza en muestras clínicas de piel, uña y cabello. Secreciones vaginales, otica y heridas<sup>36</sup>.

##### **Procedimiento:**

- Rotular una lámina con el código y nombre de la muestra clínica a examinar.
- Dispensar una gota de KOH al 10 % en el centro de la lámina.
- Agregar con el asa de siembra previamente esterilizada, sobre la gota del KOH 10 % una porción de la muestra clínica.
- Colocar una laminilla y dejar a temperatura ambiente por tres minutos.
- Observar al microscopio con objetos de 10 x y 40 x.

##### **Resultado:**

Negativo: Ausencia de elementos fúngicos

Positivo: Se observa elementos fúngicos

Se visualiza levaduras unicelulares esféricas u ovoides de pared delgada, con un diámetro de 4-10  $\mu\text{m}$ , generalmente gemantes<sup>37</sup>.

### **Cultivo**

El cultivo es un procedimiento de diagnóstico, que permite tipificar con certeza el género y la especie causal de la micosis causada por hongos filamentosos<sup>36</sup>.

### **Agar Sabouraud**

Este agar es un medio enriquecido que se utiliza para el crecimiento de hongos.

En el medio de cultivo las peptonas aportan el nitrógeno necesario para los hongos también contiene glucosa que aportan el carbono. Para evitar el crecimiento de contaminantes se le añade cloranfenicol.

Este medio debe mantenerse de 35 a 37°C por 24 a 48 horas para el crecimiento de las colonias cuyas características macroscópicas son lisas, blandas, de color blanco o beige, pero con el tiempo varían su aspecto a colonias plegadas, rugosas o membranosas<sup>37</sup>.

### **Agar Sabouraud Dextrosa**

Se emplea para el aislamiento primario, identificación y mantenimiento de la mayoría de los hongos patógenos. Para mejorar la inhibición bacteriana se puede adicionar cloranfenicol 0,5 g/L<sup>39</sup>.

### **Mueller Hinton Agar (MHA) suplementado**

El MHA es el medio que se utiliza para realizar el antibiograma para hongos, al cual se le ha adicionado un 2% de glucosa y 0,5 ug/ml de azul de metileno con un pH de 7.2-7.4. La glucosa permite el desarrollo de la levadura y azul de metileno ayudan a obtener halos de inhibición bien definidos<sup>40</sup>.

### **Agar Harina de maíz**

Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del genero *Candida* y producción de clamidoconidios de *C. albicans*<sup>39</sup>.

### **Agar papa dextrosa**

Permite la observación de levaduras a diferentes temperaturas<sup>39</sup>.

### **Agar Arroz**

Sirve para diferenciar la *Candida albicans* de otras especies de *Candida* según la formación de clamidiosporas. El agar arroz es la única fuente de nutrientes, junto a las condiciones de cultivo deficientes de oxígeno, crea un entorno que induce la generación de formas morfológicas específicas (clamidiosporas y pseudomicelio en especial)<sup>41</sup>.

### **Prueba de tubo germinal**

Esta prueba permite detectar y diferenciar presuntivamente la *Candida albicans* de la otras especies ya que solo ellas pueden desarrollar tubos germinales verdaderos <sup>37,39,41</sup>.

El tubo germinal es una filamentación precoz de la levadura, este filamento mide la mitad del ancho de la célula madre y

el largo del filamento es aproximadamente tres veces el tamaño de la célula original <sup>36,41</sup>.

Cabe mencionar que esta prueba pueden dar falsos resultados debido a muchas variables como la naturaleza del suero, el tamaño del inóculo y la técnica de la persona que la realice<sup>41</sup>.

#### **Procedimiento:**

- Inocular una colonia (cepa pura de *Candida* con 24 horas de desarrollo) aislada en un tubo con 0.5 ml de suero <sup>39</sup>.
- Mantener a 35°C - 37°C por 2 horas<sup>41,37</sup>.
- Depositar 2 o 3 gotas sobre el portaobjeto, utilizar un cubre objeto y observar a 40 x <sup>41</sup>.

#### **Interpretación:**

La prueba es positiva si se visualiza el crecimiento de una estructura elongada que se origina de la levadura.

Es importante realizar la prueba empleando cepas controles en paralelo a la cepa de estudio<sup>39</sup>.

#### **Desarrollo a 42 °C**

*C. albicans* y *C. dubliniensis* tienen comportamiento fisiológico y morfológico similar y la prueba que los va a diferenciar en el laboratorio de microbiología es el desarrollo a 42 °C en agar papa dextrosa<sup>39</sup>.

#### **Procedimiento**

Sembrar la cepa aislada en tubo o placa Petri que contenga agar papa dextrosa e incubar a 42 °C por 48 horas.

#### **Interpretación**

Positivo : *C. albicans* (con desarrollo)

Negativo : *C. dubliniensis* (sin desarrollo)

### **Producción de clamidiospora, blastoconidias y artrosporas**

#### **Procedimiento**

- Sembrar la colonia en con estrías en paralelo sobre el medio de cultivo (agar harina de maíz, agar arroz, agar clamidiospora).
- Para la lectura colocar una lámina cubreobjeto estéril sobre el área sembrada e incubar a temperatura ambiente por tres a cinco días.
- Colocar la placa Petri al microscopio y sin retirar la lámina cubreobjeto observar con objetivo de 10X y 40X<sup>39</sup>.

#### **2.2.5.2 Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas para detectar, identificar y diferenciar las especies de *Candida* se fundamentan en la facultad que tienen las levaduras para fermentar y asimilar los carbohidratos o la existencia de enzimas que reaccionan con substratos cromogénicos<sup>42</sup>.

#### **Auxograna**

En esta prueba la levadura se expresa por el tipo de asimilación de los carbohidratos.

Se inocula la levadura en la batería de glúcidos como la glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa; incubado por 24 a 48 horas. El resultado se obtendrá según

el tipo de azúcar que metaboliza la levadura para obtener los carbohidratos para su desarrollo<sup>42</sup>.

### **Medio cromogénico**

Se fundamenta en la identificación de las actividades enzimáticas de la levadura mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima<sup>43, 41</sup>. Estos medios, tienen peptona, glucosa, cloranfenicol y una mezcla de sustratos cromogénicos que producen color al ser degradados por enzimas específicas que permiten la diferenciación de algunas especies de *Candida*<sup>37</sup>.

Procedimiento general:

- Inocular el medio cromogénico
- Mantener de 24 a 48 h a 37°C
- Reconocer la coloración, aspecto y textura de las colonias.

Existen diferentes medios cromogénicos, entre los más usados se encuentran: <sup>43, 37, 39</sup>

<b>MARCA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
<b>CHROMAGAR CANDIDA (CHROMagar Company)</b>	<i>C. albicans</i> (colonias verdes esmeralda). <i>C. dubliniensis</i> (colonias verdes oscuro), que además es incapaz de crecer a 45°C. <i>C. tropicalis</i> (colonia azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea). <i>C. krusei</i> (colonias rugosas con el centro rosado y borde blanco). <i>C. glabrata</i> (violeta morado).
<b>COLOREX CANDIDA</b>	<i>C. albicans</i> (colonias verdes). <i>C. tropicalis</i> (azules- grisáceos).

<b>(BioMed)</b>	<i>C. glabrata</i> (rosas oscuro). <i>C. krusei</i> (rosas rizadas).
<b>CANDIDA ID2 (BioMérieux)</b>	<i>C. albicans</i> (azules).
<b>CANDISELECT (BioRad)</b>	<i>C. albicans</i> (azules).

### **CHROMagarCandida**

Considerado uno de los primeros medios de cultivo cromogénicos que aparecieron en el mercado. La principal ventaja de este medio se identifica en poco tiempo las especies de *Candida* como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, a comparación de otros medios que solo son capaces de discriminar a *C. albicans*, mientras que las otras especies permanecen del mismo color<sup>37, 41</sup>.

### **COLOREX Candida**

Este medio cromogénico permite la identificación presuntiva de algunas de la levaduras de mayor importancia en clínica como la *C. albicans* que se aprecian colonias de color verde, *C. tropicalis* de color azules -grisáceas y *C. krusei* de color rosa<sup>37,41</sup>.

### **Candi Select**

En este medio selectivo se puede la identificación de *C. albicans* que desarrolla colonias de color azul y de superficie lisa<sup>41</sup>. Y las otras especies de *Candida* desarrollan colonias de color blanco<sup>39,44</sup>.

### **2.2.5.3 Pruebas inmunológicas**

Estas pruebas se basan en la detección de antígenos y anticuerpos circulantes contra especies de Candida. Una de las ventajas es que ayudan a un diagnóstico rápido de candidiasis <sup>41</sup>.

Para ello existen pruebas como:

- Bichro-latex albicans
- Krusei-color
- Bichro-Dubli

### **2.2.5.4 Pruebas semiautomatizados y automatizados**

En la Actualidad los laboratorios utilizan estos métodos automatizados, los cuales son rápidos, confiables y muestran una alta especificidad y reproducibilidad. Para procesar las pruebas se pueden usar diferentes tipos de muestras como hisopados y frotices previamente sembrados en agar saboraud<sup>37</sup>.

Entre los más utilizados se encuentran:

- Sistema Vitek 2
- Sistema Biolog YT MicroPlate
- Rapid Yeast Identification Panel MicroScan
- Sistema Microscan WalkAway plus

#### **Sistema Vitek 2**

Este sistema automático detecta el metabolismo fúngico y puede identificar levaduras en un corto tiempo de 15 h. Su tecnología se fundamenta en la fluorescencia y está constituido por tarjetas de análisis con 63 pocillos, que contiene cada uno un sustrato de prueba; estos sustratos

miden la actividad metabólica como la acidificación, alcalinización, hidrolisis enzimática y desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras<sup>45</sup>.

Además el sistema Vitek 2 contiene una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado.

El sistema Vitek 2 permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis* y al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación<sup>41</sup>.

Procedimiento:

- Se prepara una suspensión la cepa de interés en SSF estéril (0.45%) ajustándola con la escala de Mc Farland.
- Insertar la tarjeta en el módulo de llenado, para que la inoculación de la tarjeta con la suspensión de levadura se realice automáticamente.
- Poner la tarjeta inoculada en el módulo incubador (30 °C).
- La lectura de las celdillas se realiza automáticamente y se transfieren los datos al ordenador<sup>41, 46</sup>.

Interpretación:

- El patrón de las lecturas de turbidez se compara con los perfiles de la base de datos, y se logra la identificación del microorganismo.
- Una identificación aceptable debe tener como mínimo una confiabilidad 85% para ser considerada. De lo contrario se deben realizar otras pruebas

complementarias para una identificación aceptable<sup>41</sup>,

45.

### **Sistema MicroScan WalkAway plus**

El equipo WalkAway utiliza dos sistemas ópticos fluorimetría y colorimetría dirigidos por un ordenador para la detección del crecimiento microbiano en los pocillos de los paneles MicroScan.

La medición fluorométrica y colorimétrica proporcionan información acerca de la solución del pocillo, por la intensidad de fluorescencia o de color que es proporcional a la concentración del microorganismo en esos pocillos, las cuales contiene sustrato bioquímico que experimentan cambios de color.

Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por el principio microbiológico de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), la intensidad de luz transmitida a través de cada pocillo es inversamente proporcional a la concentración de microorganismo en dicho pocillo.

La información óptica genera una señal eléctrica, que es convertida a un formato digital y se almacena en la memoria del ordenador<sup>47, 48</sup>.

### **Sistema fluorométrico**

Lee 96 pocillos de un panel y proporciona una medida cuantitativa de la cantidad e fluorescencia de cada pocillo. El sistema consiste en una lámpara de tungsteno halógena, in filtro de 365 nm, un sistema óptico que enfoca la excitación y la emisión, un filtro de emisión de 450 nm y un tubo fotomultiplicador que genera una señal eléctrica que es

proporcional a la emisión, la cual se convierte en información digital<sup>48</sup>.

### **Sistema colorimétrico**

Consiste en una lámpara de tungsteno halógeno, lentes de colimación, una rueda de filtros, filtros de interferencias, cables de fibra óptica y fotodiodos. Una lámpara de tungsteno proporciona una fuente de luz estable y con banda ancha, las lentes de colimación concentran la luz emitida por la fuente de luz de tungsteno en un haz paralelo. Un espejo caliente bloquea el espectro infrarrojo antes de pasar a través de los lentes. Los filtros de interferencia de cristal permite la selección de un filtro para una longitud de onda específica de luz<sup>47, 48</sup>.

## **2.2.6. Estudios de sensibilidad in vitro para levaduras del género *candida***

### **2.2.6.1 Introducción**

Las pruebas de sensibilidad antifúngica se realizan por los siguientes motivos:

- 1) Conocer la actividad in vitro de los antifúngicos.
- 2) Predecir el resultado terapéutico de un determinado tratamiento antifúngico.
- 3) Controlar la aparición de cepas resistentes dentro de la población sensible.
- 4) Correlacionar la actividad in vitro con los resultados in vivo.
- 5) Determinar la utilidad terapéutica de los nuevos antifúngicos.

El principal fundamento de las pruebas de sensibilidad es detectar las cepas aisladas resistentes entre la población sensible o el desarrollo de resistencia durante el tratamiento. Para ello se necesitan métodos de sensibilidad reproducibles y disponer de puntos de corte clínicos para interpretar sus resultados. El CLSI (antes NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards) y el EUCAST han desarrollado métodos reproducibles para determinar la resistencia a los antifúngicos de las levaduras, hongos filamentosos y dermatofitos.

También han definido los puntos de corte clínicos (según CLSI y EUCAST) y los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF, según EUCAST) para interpretar los resultados de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos<sup>49</sup>.

#### **2.2.6.2 Métodos estandarizados**

##### **Microdilución**

En esta técnica se utilizan placas con múltiples pocillos en cada uno de los cuales se coloca una concentración diferente de antifúngico y se inoculan con la cepa en estudio. La CIM se define como el punto en el cual el microorganismo es inhibido en un 80% para los azoles, comparado con el crecimiento en el pocillo control de crecimiento<sup>50</sup>.

##### **CLSI: Método de microdilución para levaduras**

El medio de cultivo que ha dado mejores resultados es el medio sintético RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico, pH  $7 \pm 0,1$  y 0,2% de glucosa<sup>40</sup>.

Para la preparación de las diluciones de antifúngico se recomienda seguir el método de las diluciones dobles seriadas aditivas. Los pasos a seguir son diferentes según el antifúngico sea soluble (fluconazol, 5-fluorocitosina, caspofungina, micafungina) o insoluble (voriconazol, anfotericina B, ravuconazol, anidulafungina, posaconazol, itraconazol, ketoconazol) <sup>40</sup>.

Para la preparación del inóculo en levaduras almacenadas o congeladas, antes de realizar las pruebas de sensibilidad se debe hacer mínimo dos repiques en medio de agar glucosado de Sabouraud (SDA) luego se realiza una suspensión al 0,5 de McFarland <sup>40</sup>.

En los todos ensayos in vitro debe incluirse una cepa control para poder detectar cualquier desactivación ó anomalía antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las cepas: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258, son cepas que han mostrado tener estabilidad genética y para las que la CMI se ha determinado repetidamente<sup>40</sup>.

Las placas se incuban en estufa a 35 °C por 48 horas para especies del género *Candida*.

Para la interpretación de los resultados se puede trabajar de Lectura visual y espectrofotométrica <sup>40</sup>.

Los puntos de corte para *Candida* spp. han sido determinadas por el CLSI en tres categorías: sensible, intermedio, resistente y una nueva categoría aplicable a los azoles: sensible dependiendo de la dosis administrada (S-DD) <sup>40</sup>.

## **EUCAST: Método de Microdilución**

El estándar del EUCAST fue publicado en 2003 (documento 7.1), y ha mostrado una reproducibilidad elevada (mayor del 85%), tanto intra como interlaboratorio, así como una buena correlación con el procedimiento M27-A2 del CLSI<sup>40</sup>.

La técnica se ejecuta en placas de microdilución. El método se basa en la preparación de las soluciones de trabajo del antifúngico en 100 µl de volumen por pocillo (con la adición del inóculo también en un volumen de 100 µl)<sup>51</sup>.

El medio de cultivo recomendado es RPMI 1640 con pH 7.7, glutamina, sin bicarbonato y debe complementarse con glucosa hasta alcanzar una concentración del 2%. Se prefieren tampones zwitteriónicos al uso del Tris, (antagónico con la actividad de la fluorocitosina), y también al tampón fosfato (produce interacciones inesperadas)<sup>40 51</sup>.

Los antifúngicos deben obtenerse en forma de polvo valorado comprándolos a un distribuidor autorizado y si se prepara una solución madre se deberá tener en cuenta las concentraciones recomendadas<sup>40</sup>.

Las placas deben ser de microdilución, estériles, con 96 pocillos de fondo plano. Las placas deben rellenarse con medio de cultivo a concentración doble, ya que al ser inoculadas se producirá una dilución de un medio. El EUCAST recomienda dos formas diferentes de preparación según el tipo de antifúngico<sup>40</sup>.

Control de calidad, Las cepas para el control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMIs están dentro del intervalo de control.<sup>40</sup>.

Lectura de los resultados, las placas deben leerse en un lector de placas de microdilución, en el que se detecte la densidad óptica de los pocillos a una longitud de onda de 530 nm<sup>40</sup>.

Actualmente existen recomendaciones para poder interpretar los resultados in vitro, donde las cepas que muestran una CMI elevada<sup>40</sup>.

## **Macrodilución**

### **CLSI: Método de macrodilución para levaduras**

El método de macrodilución es poco empleado, pero es muy útil cuando se necesita un resultado rápido y no se dispone de medios comerciales, también es útil en aquellas cepas donde se duda en establecer la CMI por el método de microdilución<sup>40</sup>.

En este método se emplean tubos de ensayo estériles de 11x70 y el medio de cultivo es el mismo que el usado en el método de microdilución<sup>40</sup>.

Para la preparación del inóculo si la levadura ha estado almacenada o congelada, antes de realizar las pruebas de sensibilidad conviene hacer por lo menos dos pases en medio de agar glucosado de Sabouraud, luego se realiza una suspensión al 0,5 según la escala de McFarland<sup>40</sup>.

Los puntos de corte para *Candida* spp. Han sido determinadas por el CLSI en cuatro categorías: sensible, sensible dosis dependiente (en azoles), intermedio, resistente<sup>40</sup>.

### **Difusión en agar**

El tamaño de la zona de inhibición se mide para determinar si el microorganismo inhibido es sensible o resistente (prueba de susceptibilidad) o para determinar la concentración del antimicrobiano en el reservorio (bioensayo). Para poder realizar estas pruebas es necesario que los antimicrobianos sean capaces de difundir de forma adecuada a través del agar. Entre las ventajas de este método se encuentra que la tasa de difusión de cada antifúngico en el agar es generalmente predecible y reproducible. La concentración de los antifúngicos disminuye exponencialmente difundiendo desde su punto de origen, siendo los gradientes relativamente estables sobre el periodo de tiempo requerido para ver el crecimiento del hongo<sup>50</sup>.

### **CLSI: Método de difusión en disco**

Es la misma metodología que se emplea para determinar la susceptibilidad bacteriana, donde se estudia la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias pero con algunas modificaciones. La utilidad de los métodos de sensibilidad basados en la difusión del antifúngico a partir de discos o tabletas ha estado limitada por los problemas de difusión en agar de los mismos y por su falta de correlación con la clínica. Se ha encontrado correlación con fluconazol y voriconazol entre los halos de inhibición de discos de 25 µg (fluconazol) y 1 µg (voriconazol: Becton Dickinson, Wheadtridge, Colo.) y las CMI obtenidas por el método M27-A3<sup>40</sup>.

El medio de cultivo empleado es el Mueller Hinton agar (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (pH 7,2 - 7,4). Se puede incorporar los suplementos cuando se prepara el medio o bien incorporar los suplementos a las placas de MHA ya preparadas. La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición<sup>40</sup>.

Se recomienda realizar la lectura a las 24 horas, asimismo es recomendable preparar las placas un día anterior al sembrado, para garantizar una absorción completa<sup>40</sup>.

El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas: *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750. La lectura se basa en la medición del halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento; la lectura es subjetiva y se requiere experiencia para dar medidas exactas. La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo debe ser ignorada<sup>40</sup>.

### **INS PERÚ: Difusión en discos para susceptibilidad antifúngica**

Consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller Hinton II modificado (MHm) previamente inoculada con la cepa *Candida* spp. Procedente de un aislamiento clínico, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antifúngicos fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg). Tan pronto el disco impregnado en antifúngico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antifúngico difunde por el agar,

formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 24 a 48 horas de incubación, los discos pueden, o no, aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento de *Candida spp*<sup>36</sup>.

Se emplea de control de calidad las cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 90028 y *Candida tropicales* ATCC 750; ya que poseen estabilidad genética y su concentración mínima inhibitoria (CMI), ha sido determinada repetidamente. En la siguiente tabla se muestra los rangos de aceptación<sup>36</sup>.

Para la interpretación de los resultados se debe medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición con una regla o caliper y se tendrá como referencia los puntos de corte para fluconazol (25 µg) y voriconazol (1 µg), utilizados con *Candida spp*<sup>36</sup>.

### **2.2.6.3 Métodos comerciales ó alternativos**

#### **Colorimétricos**

##### **Sensititre YeastOne®**

Es un panel de microdilución colorimétrico bien descrito que contiene diluciones en serie secas de hasta diez antimicóticos en pozos individuales, el panel tiene la ventaja de estar listo para usar, fácil de realizar, resultados rápidos y oportunos, y el empaque individual permite la prueba de una placa a la vez<sup>52</sup>.

Este sistema tiene un indicador de crecimiento de oxidoreducción conocido como Alamar Blue®, un indicador colorimétrico de una reacción de oxidación-reducción (el

crecimiento de hongos cambia el color del medio de azul a rosa). Sin embargo se presentan problemas con la lectura de los azoles debido al efecto trailing, donde el viraje de color no es tan evidente, generando confusión en la interpretación de colores: rosa (crecimiento) y púrpura (sin crecimiento parcial) <sup>52,53</sup>.

Para el proceso de incubación los paneles se sellan y se incuban en aerobiosis (nunca en atmósfera de CO<sub>2</sub>) a 35 °C, durante 24-48 h para *Candida* spp. y 48-72 h para *C. neoformans*. Algunas cepas de *C. neoformans* no crecen en este medio<sup>53</sup>.

Antes de proceder a la lectura hay que comprobar que el pocillo control de crecimiento ha virado a rosa; en caso contrario, la incubación debe prolongarse hasta su cambio de color. La interpretación final se basa en la lectura visual o lectura realizada por el software (sistema Vizion®) después de 24-25 h (*Candida* spp.) O 48-72h (*Cryptococcus* spp.) de incubación a 35 ° C. El método Sensititre YeastOne® mostró buenos resultados en términos de reproducibilidad y acuerdo con los métodos de referencia que consideran el fluconazol y *Candida* spp. (EA <sup>3</sup> 95%) aunque se encontró un acuerdo más bajo (EA 79-92%) para los aislamientos de *C. neoformans*. Se informó que el panel YeastOne® producía MIC más altos, en comparación con el método CLSI, para todos los medicamentos excepto para caspofungina y flucitosina<sup>52,53</sup>.

Para el control de calidad se debe utilizar en cada lore cepas de control estandarizada: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258<sup>53</sup>.

## **Fungitest**

Se fundamenta en la Microdilución del CLSI, incluye 6 antifúngicos cada uno de ellos a dos concentraciones críticas: anfotericina B (2 y 8 µg/ml), 5-fluorocitosina (2 y 32 µg/ml), miconazol (0,5 y 8 µg/ml), ketoconazol (0,5 y 4 µg/ml), itraconazol (0,5 y 4 µg/ml) y fluconazol (8 y 64 µg/ml).

El medio utilizado es RPMI 1640 tamponado y suplementado con glucosa. La interpretación se realiza durante 48 h para *Candida spp.* y 72 h para *C. neoformans*, y se clasifica como: Sensible (sin crecimiento en ambos pocillos), Resistente (crecimiento en ambos pocillos) e Intermedio (Crecimiento en el pocillo de menor concentración)<sup>53</sup>.

## **Difusión en agar**

### **Etest**

Es un método cuantitativo de difusión en agar comercializado por AB biodisk (Solna, Suecia) y distribuido en España por Izasa S.A.

Son tiras de plástico inerte que contienen un antifúngico de manera gradiente. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación a 35 °C durante 24-48 h para *Candida spp.* y 48-72 h para *C. neoformans*, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira de Etest<sup>53</sup>.

### **Neo-Sensitab**

Las tabletas Neo-Sensitabs se emplean en los ensayos semicuantitativos in vitro realizados para conocer la sensibilidad a los antimicrobianos mediante difusión en agar con discos<sup>54</sup>.

Las tabletas Neo-Sensitabs han sido estandarizadas por la CLSI para realizar pruebas de susceptibilidad a la difusión de discos antifúngicos de *Candida spp.* Empleando Shadomy Agar modificado o agar RPMI-1640 suplementado, los cuales se producen un resultado cuantitativo (zona de inhibición) y una categoría de interpretación cualitativa según los puntos de interrupción. Los puntos de corte y la concentración mínima inhibitoria son recomendados por el CLSI (NCCLS)<sup>54,55</sup>.

Las tabletas Neo-Sensitabs han sido ajustados a los puntos de corte de Concentración mínima inhibitoria recomendados por los "Grupos de estandarización de ensayos de sensibilidad" (Susceptibility Testing Standardization Groups) en diferentes países europeos (Dinamarca, Francia, Alemania, Holanda, Noruega, Suecia y el Reino Unido). Los criterios de interpretación de los diámetros de zona para cada país se pueden encontrar en el Neo-Sensitabs User's Guide (Manual del usuario de Neo-Sensitabs)<sup>54</sup>.

### **Otros métodos basados en el M27-A**

#### **ATB Fungus®**

Es un sistema fabricado y comercializado por bioMérieux (Francia). Este método podría ser aplicable a la rutina de un laboratorio de microbiología pero no incorpora antifúngicos tan importantes en la clínica, como el fluconazol y el itraconazol, por lo que su utilidad en las micosis sistémicas es limitada. Por otra parte, la correlación con otros métodos es aceptable para los azoles y buena para anfotericina B, nistatina y 5-fluorocitosina.

Se basa en el método del CLSI, utiliza diluciones seriadas para anfotericina B y 5-fluorocitosina y dos concentraciones críticas para el resto de los antifúngicos<sup>53</sup>.

### **ATB Fungus 2®**

Es una modificación del método ATB Fungus, que introduce fluconazol e itraconazol. En datos no publicados se ha obtenido una correlación global del 71,4% en distintas especies de *Candida*, siendo ésta alta para anfotericina B y 5 fluorocitosina (92% y 85%, respectivamente), moderada para fluconazol (65%) y baja para itraconazol (44%).

Emplea diluciones consecutivas de anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol<sup>53</sup>.

## **2.2.6.4 Otros métodos**

### **Dilución en agar**

Ha demostrado ser fácil, económico y rápido para determinar la sensibilidad antifúngica de cepas de *Cándida spp.* y *C. neoformans spp* al fluconazol; pero presenta problemas con la subjetividad en la lectura.

Se pueden emplear placas de placas Yeast Morphology Agar (YMA) (Difco) ó CHROMagar *Candida*, ambas con diferentes concentraciones del antifúngico fluconazol (0,125-256 µg/ml) y (8 y 16 µg/ml), se determina la concentración del antifúngico que produce la inhibición del crecimiento<sup>50, 53</sup>.

### 2.3. Terminología básica

**Susceptibilidad antifúngica:** Proceso conocido habitualmente como antifungigrama, guía la elección del tratamiento antimicótico. Se utilizan diferentes métodos como difusión con discos y la microdilución. La información que se genera (sensible, sensible dosis dependiente o resistente) predice la eficacia clínica en la elección de un antimicótico.

**Disco difusión:** El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad microbiana frente a drogas específicas.

**Antifúngico:** Es una sustancia de origen biológico, semisintético o sintético que inhibe el crecimiento de los hongos. Los desinfectantes, antisépticos y conservantes no están incluidos en esta definición.

**Sensible:** Capacidad de inhibición de un antifúngico de manera in vitro asociado con el éxito terapéutico. Los hongos se clasifican en sensibles al aplicar los puntos de corte adecuados en un test fenotípico definido.

**Sensible dosis dependiente:** Esta categoría determina que la sensibilidad de un aislamiento es dependiente del régimen de dosificación que se utilice del antibiótico ó antifúngico.

**Resistente:** Una cepa fúngica inhibida in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia con una alta probabilidad de fallo terapéutico. Las cepas fúngicas se clasifican en resistentes aplicando los puntos de corte apropiados en un test fenotípico definido.

**Concentración mínima inhibitoria (CMI):** es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento del microorganismo, el cual se caracteriza con disminución considerable del tamaño de las colonias. Se expresa en mg/L.

**Fluconazol:** Es un fármaco hidrófilo y se une a las proteínas séricas en un 11-13%. La vida media más larga se ha observado en los recién nacidos, que luego declina de 21-23h en los niños de 3 meses a 16 años de edad y se eleva aproximadamente 30h en los adultos. Fungistático. A nivel de la membrana celular, su mecanismo de acción es igual al de todos los triazólicos.

**Voriconazol:** Es un antifúngico cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la 14- $\alpha$ -esterol desmetilación dependiente del citocromo P450. Muestra un amplio espectro de actividad in vitro, con actividad anti fúngica frente a especies de *Cándida* (incluyendo *C. krusei* resistente a fluconazol y cepas resistentes de *C. glabrata* y *C. albicans*). Fungistático. A nivel de la membrana celular, inhibiendo a la 14- $\alpha$ -esterol-desmetilasa, similar al de todos los triazoles.

**Punto de corte:** Los puntos de corte son valores de CMI específicos que permiten clasificar los hongos en las siguientes categorías “sensible”, “intermedio” y “resistente”. Los puntos pueden cambiar debido a cambios en determinadas circunstancias (Ej: cambios en las dosis habituales de los fármacos).

**Escala MacFarland:** Los patrones de Mc Farland se utilizan como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. El patrón 0,5 de MacFarland tiene una aplicación especial en la preparación de inóculos para la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

**Inóculo:** El número de unidades formadoras de colonias de levaduras (UFC) en un volumen definido. El inóculo se expresa en UFC/mL.

**Cepa control:** El término cepa control se refiere a una cepa catalogada, caracterizada y con fenotipos y/o genotipos estables y definidos respecto a la sensibilidad a los antifúngicos. Dichas cepas se obtienen de colecciones de cultivos certificadas y se usan como controles de calidad.

**Cepa ATCC:** Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, al cual se le ha realizado pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares.

**Levaduras:** Se visualizan como elemento hialino de forma esférica u ovalada que pueden presentar brote y/o pseudohifas. Hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexualmente.

**Especie:** Categoría o división establecida teniendo en cuenta determinadas cualidades, condiciones o criterios de clasificación.

**Vulvovaginitis:** es una inflamación de la vagina y la piel externa a la vagina y que la rodea (la vulva). Esta inflamación puede ser infecciosa y no infecciosa. Además suele estar asociada a picor o prurito, flujo vaginal de diferentes características, con o sin mal olor, escozor y ardor al orinar.

## 2.4. Hipótesis

No amerita hipótesis.

## 2.5. Variables

Variable: Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol

Clasificación:

- ❖ Relación causal o funcional: independiente.
- ❖ Valor expresado: Cualitativa.
- ❖ Número de valores o estados: Politómica.

<b>VARIABLE</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>DIMENSION</b>	<b>INDICADOR</b>
<i>Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol</i>	CUALITATIVA	FLUCONAZOL	SENSIBLE ( $\geq 19$ mm)
			DOSIS DEPENDIENTE (15-18 mm)
			RESISTENTE ( $\leq 14$ mm)
		VORICONAZOL	SENSIBLE ( $\geq 17$ mm)
DOSIS DEPENDIENTE (14-16 mm)			
RESISTENTE ( $\leq 13$ mm)			

## **CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO**

### **3.1. Tipo y nivel de Investigación.**

Se realizó un estudio de diseño no experimental, descriptivo y prospectivo de corte transversal.

-No experimental, porque no existió intervención del investigador frente a la variable.

-Descriptivo, porque la información sobre la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol fue recolectada a partir de cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

-Prospectivo, porque la variable desenlace está presente desde del inicio del estudio.

-Corte transversal, la variable fue medida en una sola ocasión en la población seleccionada en noviembre del 2019.

### **3.2. Población y muestra.**

#### **3.2.1 Población.**

La población de estudio estuvo constituida por todas las cepas del género *Candida* aisladas de secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva que acudieron con síntomas asociados a candidiasis vulvovaginal a un Policlínico Categoría I-3 en el período de octubre 2017 y marzo 2018 en un policlínico, Lima.

#### **3.2.2 Muestra y Muestreo**

Las muestras fueron conformadas por 150 cepas aisladas del género *Candida* en secreciones vaginales, previamente identificadas y conservadas.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia aplicando criterios de inclusión y exclusión.

### **3.2.3 Criterios de inclusión.**

- Cepas aisladas de pacientes ambulatorios en edad reproductiva que acudieron a realizarse un cultivo de secreción vaginal en un policlínico categoría I-3.
- Cepas aisladas de pacientes sin tratamiento antimicrobiano ni antimicótico por cinco días antes de la toma de muestra.

### **3.2.4 Criterios de exclusión.**

- Cepas aisladas de pacientes que no cumplieron con las condiciones pre-analíticas para la toma de muestra de secreción vaginal.

### **3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.**

**La técnica** que se utilizó para el desarrollo del proyecto fue la observación.

**El instrumento** que se empleó es una ficha de recolección de datos elaborada por los autores (ANEXO 01 – FICHA 01) para la transcripción de datos, el cual contiene información relevante y necesaria para la presente investigación sobre la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima, asimismo esta ficha fue completada cuando los investigadores realizaron las pruebas complementarias.

### **3.4. Fase Analítica**

#### **3.4.1 Gestiones administrativas y permisos**

Para la implementación del estudio se realizó las gestiones correspondientes ante las autoridades de nuestra universidad y el Policlínico categoría I-3, con el propósito de obtener el espacio para realizar el estudio en las ambas instalaciones.

Posteriormente se coordinó con las autoridades y el personal de salud involucrado para la programación de las fechas en las que se realizó la recolección de muestras y el procedimiento estandarizado para la medición de la susceptibilidad antifúngica mediante disco difusión.

#### **3.4.2 Condiciones Pre-Analíticas**

Las cepas aisladas pertenecen a pacientes que cumplieron con las condiciones preanalíticas para la toma de muestra de secreción vaginal:

- No lavar la región genital el día del examen.
- No utilizar espumas o jabones vaginales para la higiene.
- No tomar antibióticos, antimicóticos, ni usar cremas, ni óvulos vaginales 5 días antes de la toma de muestra.
- No tener relaciones sexuales 2 días antes del examen.
- Dejar pasar 5 días terminando el período menstrual.
- Dejar pasar 2 días de alguna manipulación ginecológica.  
Ejemplo: Después del Papanicolaou, ecografía, etc.

#### **3.4.3 Registro y conservación de las cepas aisladas**

Se recolectaron las cepas de *Candida sp*, aisladas de muestras de secreción vaginal en el Policlínico categoría I-3 de Lima entre octubre 2017 y marzo 2018. Las 150 cepas aisladas se

conservaron en crioviales de agua destilada de 2-8°C para ser procesadas después de la recolección de muestras. Se registraron todos los datos en el instrumento de investigación (REVISAR ANEXO 01), diseñado para cumplir con los criterios establecidos.

#### **3.4.4 Reactivación de las cepas de *Candida***

Se atemperó las cepas que fueron recolectadas y guardadas en crioviales. Se rotularon las placas con el código interno que corresponde a cada cepa. Con un hisopo estéril se sembraron las cepas con una suspensión al 0.5 según la escala de McFarland en el medio Agar Saboraud glucosado. Se incubaron las placas sembradas a temperatura de 37°C por 24hrs.

Se realizaron 2 pases en el agar Saboraud.

#### **3.4.5 Identificación de especies de *Candida sp.***

Se diferenció las cepas aisladas en grupo albicans y no albicans, luego se procedió a utilizar los siguientes métodos para la identificación de las especies por las siguientes pruebas:

##### **A. Prueba de tubo germinativo**

Se emulsionó una porción de la colonia de la cepa pura de *Candida spp* en 0.5 ml de suero humano que se incubo de 35°C a 37°C por 2 horas y 30 min. Se colocó una gota de la emulsión sobre un portaobjeto se visualizó a 10x y 40 x y se realizó la lectura.

Características de las especies *Candida no albicans*:

*Candida albicans* - Presencia de tubo germinal con blastoconidias con prolongaciones angostas, no septadas en su origen.

*Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. - Presencia de pseudohifas: blastoconidias acompañadas de prolongaciones

que inician desde un septo y tienen mayor ancho y largo que hifas de los tubos germinativos.

*Candida glabrata*. - Ausencia de cualquier tipo de fermentación; blastoconidias pequeñas redondas y uniformes.

*Candida Krusei*. - Filamentación variable.

## **B. Formación de clamidiosporas**

Se realizó la siembra de la cepa en forma de 3 estrías en paralelo en agar harina de maíz con Tween 80. Luego se colocó una lámina cubre objeto estéril sobre la superficie del agar cubriendo las estrías de siembra. Se incubó a temperatura ambiente aproximadamente a 25°C de 3 a 5 días en condiciones de humedad. Luego se colocó la placa Petri al microscopio y sin retirar la lámina cubre objetos, se examinó con objetivos de 10x y 40x.

Características para la identificación de *Candida no albicans* en la formación de clamidiosporas; según Koehler, Chu, Houang y Chemg,(1999) mencionada en el estudio de buenos aires (Ochiuzzi et al., 2014):

*Candida albicans*: Clamidiosporas de pared gruesa presentes en los ápices de las pseudohifas y grupos de blastoconidias a lo largo de las pseudohifas.

*Candida tropicalis*: Abundantes pseudohifas con escasas blastoconidias en forma aislada o en racimos apariencia variable.

*Candida parapsilosis*: Cadena ramificada de pseudohifas alargadas con grupos de blastoconidias a lo largo de ellas; células gigantes ocasionales, apariencia variable.

*Candida glabrata*: No hay presencia de pseudohifas o hifas solo se observa blastoconidias de tamaño uniforme.

*Candida Krusei*: Pseudomicelio ramificado extenso que dan apariencia de árbol; grupos y cadenas de blastoconidios a lo largo de las pseudohifas, apariencia variable.

### **C. Desarrollo a 42°C**

Se sembró las cepas de *Candida albicans* en tubos que contengan agar papa dextrosa.

Se incubo a una temperatura de 42°C por 48 horas.

Se consideró positivo para *Candida albicans* cuando se observa el desarrollo óptimo y positivo para *Candida dubliniensis* sin desarrollo.

### **D. Medio cromogénico CHROMagar *Candida***

El conjunto de cepas de *Candida no albicans* fueron sembradas en placas de Petri con CHROMagar TM *Candida*. Se incubaron a 37 °C x 24 a 48 horas y las levaduras desarrollaron bien el color.

Se tuvieron en cuenta las interpretaciones de color de las colonias para cada especie según el fabricante.

### **E. Equipo vitek**

Las especies de candida que no pudieron ser identificadas por su baja discriminación, se procesaron en el Equipo vitek.

Se preparó una suspensión de la cepa de candida sp en SSF esteril (0.45%) ajustándolo a la escala de Mc Farland.

Se insertó la tarjeta en el módulo de llenado, para que la inoculación de tarjeta con la suspensión de levadura se realice automáticamente.

Se puso la tarjeta inoculada en el módulo incubador.

La lectura de las celdillas se realiza automáticamente y se transfiere los datos al ordenador.

### **3.4.6 Preparación del medio del agar Mueller Hinton II modificado<sup>36</sup>**

Se realizó la preparación de los medios de cultivos teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad y las consideraciones especiales del proveedor para un óptimo trabajo.

Preparar 1L de Mueller Hinton según las instrucciones del fabricante, agregar 20 gr de glucosa y 100ul de la solución stock de azul de metileno. Autoclavar 15min. A 121°C y 15 libras. Dejar que llegue a 50°C y dispensar 25 ml por placa Petri de modo de alcanzar 4mmm  $\pm$ 1 mm.

### **3.4.7 Método difusión en discos para la determinación de susceptibilidad antifúngica de hongos levaduriforme<sup>36</sup>**

Se realizó la determinación de la susceptibilidad de hongos levaduriformes basado en el manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico del MINSA PERU-INS<sup>36</sup> y teniendo como referencia la CLSI. (REVISAR ANEXO 2 -FLUJOGRAMA)

#### **A. Preparación del inóculo y siembra**

- Se toma con la punta del asa de siembra previamente esterilizada y se resuspende en un tubo con 5 ml de SSE.
- Homogenizar con vortex y ajustar la turbidez a 0.5 en la escala de Mc Farland.
- Colocar el hisopo dentro del tubo que contiene la suspensión del inóculo y rotar contra la pared del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- Sembrar cuidadosamente por agotamiento en la placa de Muller Hinton II modificado en tres direcciones para obtener un crecimiento uniforme.
- Colocar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10 a 15 min, para que se absorba la humedad.

- Colocar inmediatamente el disco de fluconazol y voriconazol en las placas Petri en forma equidistante.

## B. Colocación de los discos de incubación

- Dejar a temperatura ambiente los discos de fluconazol y voriconazol durante 5- 10 min.
- Extraer los discos del frasco con una pinza estéril fina.
- Apoyar el disco en la superficie del agar de la placa previamente inoculada por el método de hisopado y presionar suavemente en centro del disco con una pinza.
- Distribuir los discos de modo que queden a 20 mm del borde de la placa, y separados entre sí por 40 mm.
- Dejar la placa con la placa hacia arriba a temperatura ambiente de 10 a 15 min antes de ser colocados a la incubadora.
- Colocar la placa invertida en la incubadora a 37°C durante 24 horas.
- Si transcurridas las 24 horas los halos no son claramente distinguibles, prologar la incubación 24 horas más para dar crecimiento de especies de desarrollo más lento.

## C. Resultados

Se mide el diámetro del halo externo de la zona de inhibición con una regla o caliper.

La zona a medir es la definida por las colonias con crecimiento inhibido que muestran un diámetro menor al de las colonias externas. Estas colonias deber ser consideradas dentro del halo de inhibición.

Disco	Sensible	S-DD*	Resistente
Fluconazol	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$
Voriconazol	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$

**Figura 3: Puntos de corte para fluconazol y voriconazol en muestras.**

Fuente: Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. MINSA-INS<sub>36</sub>

#### D. Control de Calidad: Uso de cepas ATCC

Para el control de calidad interno se utilizaron como cepas control: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 90028 y *Candida tropicales* ATCC 750.

DISCO	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida tropicales</i> ATCC 750
Fluconazol	-	22-33	28-39	26-37
Voriconazol	16-25	28-37	31-42	26-40

Figura 4: Puntos de corte para fluconazol y voriconazol en cepas ATCC.

Fuente: Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. MINSA-INS<sub>36</sub>

#### 3.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico.

Para la elaboración el procesamiento de los datos se utilizó el programa Excel Microsoft Office Professional Plus 2016 donde se realizará un análisis descriptivo y fueron procesadas todas las informaciones obtenidas en la realización del trabajo.

Para el análisis estadístico se empleó el programa IBM SPSS STATISTICS versión 24, los datos se presentan en columnas de Frecuencias, Porcentajes, Porcentajes válidos y Porcentajes acumulados para cada categoría de la variable.

-*Frecuencia*, es el número de veces que se repite un valor;

-*Porcentaje*, la frecuencia porcentual del valor en relación con otros valores de la variable;

-*Porcentaje válido*, la frecuencia porcentual, calculada sin tener en cuenta los casos perdidos;

-*Porcentaje acumulado*, la frecuencia porcentual, sumando el valor del porcentaje de la categoría anterior;

Posteriormente, se elaboraron tablas y gráficos a fin de presentar organizadamente los resultados obtenidos en la presente investigación.

En este caso la columna de la izquierda nos indica las categorías de la variable y las siguientes columnas presentan datos de Frecuencias, Porcentajes, Porcentajes válidos y Porcentajes acumulados para cada categoría de la variable.

### **3.6. Aspectos éticos.**

Como es un deber ético y deontológico del Tecnólogo médico el desarrollo de trabajos de investigación (título X, artículo 50 del código de ética del tecnólogo médico), dirigidos a crear, perfeccionar o modificar la salud de la población, es que se desarrollará este proyecto de tesis, para lo cual se garantizará que la recolección y utilización de datos obtenidos serán utilizados de forma anónima y con fines académicos e investigativos.

Los aspectos éticos que se tendrán en cuenta en el proyecto son:

**-Riesgo.** No existirá ningún riesgo de contraer enfermedad o sufrir daño físico, puesto que se trabajará con muestras recolectadas por un personal especializado.

**-Beneficencia:** Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación tendrán el fin de promover legítimos intereses de las poblaciones estudiadas suprimiendo perjuicios.

**-No maleficencia:** consistirá en no perjudicar innecesariamente a la población en estudio.

**-Confidencialidad:** Se mantendrá en reserva la información que se encuentre en la ficha y resultados obtenidos.

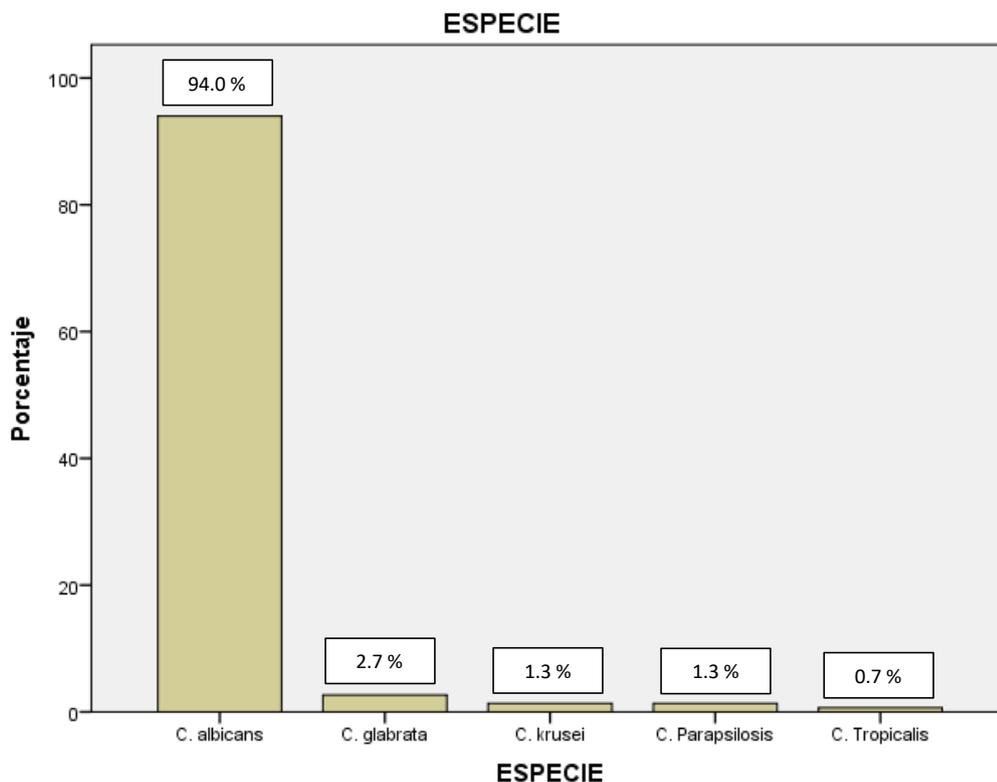
## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Resultados

**TABLA N° 01:** Prevalencia de especies en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

ESPECIE AISLADAS					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	C. albicans	141	94,0	94,0	94,0
	C. glabrata	4	2,7	2,7	96,7
	C. krusei	2	1,3	1,3	98,0
	C. Parapsilosis	2	1,3	1,3	99,3
	C. Tropicalis	1	0,7	0,7	100,0
	Total		150	100,0	100,0

**GRAFICO N° 01:** Prevalencia de especies en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

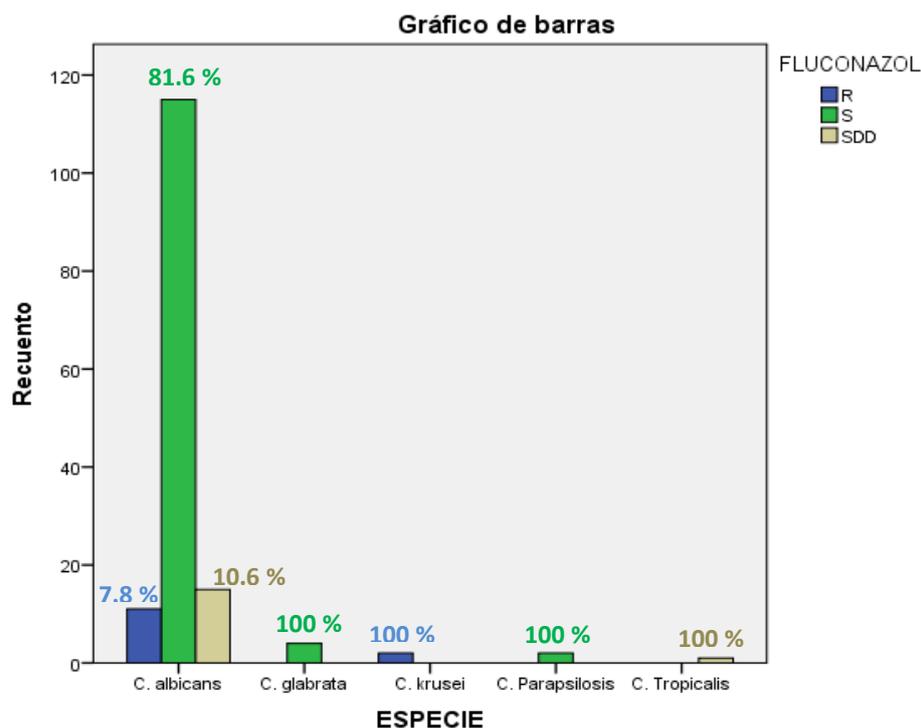


**TABLA N° 02:** Susceptibilidad a fluconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

**Susceptibilidad a fluconazol según la especie**

			FLUCONAZOL			Total
			R	S	SDD	
ESPECIES DEL GENERO CANDIDA	C. albicans	Recuento	11	115	15	141
		% dentro de ESPECIE	7,8%	81,6%	10,6%	100,0%
	C. glabrata	Recuento	0	4	0	4
		% dentro de ESPECIE	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	C. krusei	Recuento	2	0	0	2
		% dentro de ESPECIE	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
	C. Parapsilosis	Recuento	0	2	0	2
		% dentro de ESPECIE	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
	C. Tropicalis	Recuento	0	0	1	1
		% dentro de ESPECIE	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	<b>13</b>	<b>121</b>	<b>16</b>	<b>150</b>	
	<b>% dentro de GENERO</b>	<b>8,6%</b>	<b>80,7%</b>	<b>10,7%</b>	<b>100,0%</b>	

**GRAFICO N° 02:** Susceptibilidad a fluconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

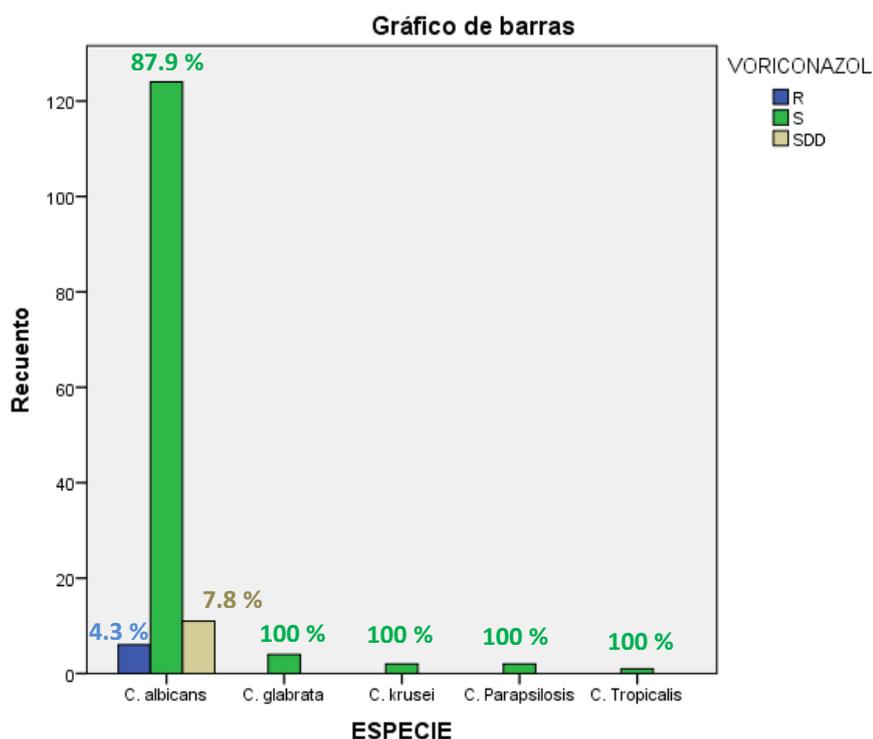


**TABLA N° 03:** Susceptibilidad a Voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.

**Susceptibilidad a voriconazol según la especie**

ESPECIE		VORICONAZOL			Total
		R	S	SDD	
C. albicans	Recuento	6	124	11	141
	% dentro de ESPECIE	4,3%	87,9%	7,8%	100,0%
C. glabrata	Recuento	0	4	0	4
	% dentro de ESPECIE	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
C. krusei	Recuento	0	2	0	2
	% dentro de ESPECIE	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
C. Parapsilosis	Recuento	0	2	0	2
	% dentro de ESPECIE	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
C. Tropicalis	Recuento	0	1	0	1
	% dentro de ESPECIE	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
<b>Total</b>	<b>Recuento</b>	<b>6</b>	<b>133</b>	<b>11</b>	<b>150</b>
	<b>% dentro de GENERO</b>	<b>4,0%</b>	<b>88,7%</b>	<b>7,3%</b>	<b>100,0%</b>

**GRAFICO N° 03:** Susceptibilidad a Voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.



**De la tabla y gráfica N° 01** se puede inferir que la especie predominante es la *Candida albicans* con 141 cepas (94.0%) y de las especies de *Candida no albicans* tenemos a la *Candida glabrata* con 4 cepas (2.7%), *Candida Krusei* con 2 cepas (1.3%), *Candida parapsilosis* con 2 cepas (1.3%) y *Candida tropicalis* con 1 cepa (0.7 %).

**De la tabla y gráfica N° 02** se puede describir de manera global que la susceptibilidad al fluconazol para el género *Candida* en la población estudiada está conformado por cepas resistentes al 8.7%, el 80.7% es sensible y el 10.7% sensible dosis dependiente. Se identificó la susceptibilidad a fluconazol de 141 cepas *Candida albicans*, de las cuales el 7.8% (11/141) fueron resistentes, el 81.6% (115/141) resultó sensible y el 10.6% (15/141) fue clasificada como sensible dosis dependiente.

Se identificó la susceptibilidad a fluconazol de 9 cepas *Candida no albicans*, donde 4 cepas de *Candida glabrata* y 2 cepas de *Candida parapsilosis* fueron sensibles (77.8%), 1 cepa de *Candida tropicalis* resultó sensible dosis dependiente (11.1%) y 2 cepas de *Candida krusei* presentaron resistencia natural (22.2%).

**De la tabla y gráfica N° 03** se puede evidenciar de manera global que la susceptibilidad al voriconazol para el género *Candida* en la población estudiada está conformado por cepas resistentes al 4.0%, el 88.7% es sensible y el 7.3% sensible dosis dependiente. Se identificó la susceptibilidad a voriconazol de 141 cepas *Candida albicans*, de las cuales el 4.3% (6/141) fueron resistentes, el 87.9% (124/141) resultó sensible y el 7.8% (11/141) fue clasificada como sensible dosis dependiente.

También se identificó la susceptibilidad a voriconazol de 9 cepas *Candida no albicans*, donde el 100% de cepas fueron totalmente sensibles, no encontrándose resistencia ni dosis dependencia.

## 4.2. Discusión

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un policlínico categoría I-3, empleando el método de disco difusión, demostrando una alta sensibilidad a los antifúngicos investigados y un interesante porcentaje de resistencia y sensibilidad dosis dependiente.

Al igual que otros estudios nacionales e internacionales, la especie del género *Candida* más frecuente en secreción vaginal fue la *Candida albicans*. En el estudio de Mancilla RG. (Perú, 2012) se aisló 101 cepas de especies de *Candida* de pacientes con candidiasis vulvovaginal, de los cuales el 81.2% fueron *Candida albicans*.<sup>58</sup> Oscco CL. (Perú, 2015) aisló 39 especies de *Candida* en pacientes con candidiasis vulvovaginal, obteniendo como resultado 84.6 % de la especie *Candida albicans*.<sup>67</sup> Herrera GL (Perú, 2017) aisló 110 cepas de *Candida* en pacientes con candidiasis vulvovaginal, de los cuales 86.4% han sido identificadas como *Candida albicans*.<sup>66</sup> En el trabajo de Alburquenque OC. et al (Chile, 2009) se aisló 122 cepas de *Candida* en pacientes candidiasis vulvovaginal, el 86% fue *Candida albicans*.<sup>17</sup> Salehi Z. et al (Irán, 2012) aisló 67 cepas de *candida* en pacientes con candidiasis vulvovaginal, ellos obtuvieron 79.0% de *Candida albicans*.<sup>62</sup> Otro autor que coincide con nuestro hallazgo es Chillogallo GC. et al (Ecuador, 2015) aisló 31 cepas de *Candida* de gestantes con vulvovaginitis, de los cuales 74.2% fueron identificadas como *Candida albicans*.<sup>61</sup> La mayor incidencia de la especie *Candida albicans* pueden deberse a que esta presenta características que favorecen a su supervivencia tal como su capacidad de conversión y adhesión que es superior a otras especies; además de presentar enzimas que favorecen la producción de la infección del hospedero

de esto se podría deducir él porque esta especie se presenta en varios tipos de infecciones.

En nuestro trabajo se identificó 4 especies *de Candida* no *albicans*, cuya distribución porcentual de especies concuerda con otros estudios como Albuquerque OC et al (Chile, 2009) aisló 16 cepas de *Candida no albicans*, 9.0% *Candida glabrata*, 1.6% *Candida tropicalis*, 0.8% *Candida krusei*, 0.8 % y 1.6% otras especies *no albicans*.<sup>17</sup> Herrera GL (Perú, 2017) aislaron 6 cepas de *candida no albicans*; 9.1 % de *Candida glabrata*, 2.7% *Candida parapsilosis*, 0.9% *Candida tropicalis* y 0.9% de *Candida krusei*.<sup>66</sup> Salehei Z. et al (Irán, 2012) obtuvieron 11.9% *Candida glabrata*, 5.9% *Candida tropicalis*, 2.9 % *Candida krusei*.<sup>62</sup> Estos estudios demuestran que la segunda levadura más frecuente en candidiasis vulvovaginal es la *Candida glabrata*, lo cual concuerda con más autores como Carlos RJ, Rodriguez SM (Peru, 2006)<sup>16</sup> ,Martos AI et al ( España, 2007)<sup>9</sup>, Dalben DK et al (Brasil, 2008)<sup>4</sup> y Albuquerque C et al (Chile, 2009)<sup>17</sup> y (Chile, 2013)<sup>15</sup>. Las investigaciones ejecutadas a lo largo del tiempo confirman el incremento de la frecuencia y resistencia de la *Candida no albicans* en diferentes tipos de muestras, en consecuencia estos datos avalan la creciente necesidad de realizar la identificación y susceptibilidad del antifúngico para establecer un correcto tratamiento.

Existe la posibilidad de que se identifiquen otras especies *no albicans* en el tipo de muestra estudiada. Mancilla RG (Perú, 2012) obtuvo 1% de *Candida dubliniensis* y 1% de *Candida lucitaniae*.<sup>58</sup> Oscoco CL (Perú, 2014) registró un 15.4% de *Candida guilhermondii*, *cuya población eran gestantes*.<sup>67</sup> La presencia de otras especies del género *Candida* no encontradas en nuestro trabajo de investigación se puede deber a que las poblaciones no comparten los mismos patrones de nuestro estudio (ejemplo: edad, estado de salud, país, tipo de muestra, factores sociales, factores demográficos, tiempo de estudio, etc.).

De acuerdo a nuestros resultados obtenidos, existe un mayor predominio de cepas *Candida albicans* sensibles y un porcentaje inferior de resistencia al fluconazol, además se presenta una interesante sensibilidad dosis dependiente, coincidimos con otros estudios. Mancilla RG (Perú, 2012) reportó susceptibilidad al fluconazol de 82 cepas de *Candida albicans*, encontrando sensibilidad al 75.6% (62/82), resistencia al 15.9% (13/82), y sensibilidad dosis dependiente al 8.5% (7/82).<sup>58</sup> Herrera GL (Perú, 2017) reportó la susceptibilidad al fluconazol en 95 cepas de *Candida albicans*, encontrándose sensible al 89.5% (85/95), resistente al 6.3% (6/95) y sensible dosis dependiente 4.2% (4/95).<sup>66</sup> Alburquenque OC. et al (Chile, 2009) reportó la susceptibilidad al fluconazol en 106 cepas de *Candida albicans* provenientes de flujo vaginal en pacientes hospitalizados y ambulatorios, encontrándose sensible al 92.3% (98/106), resistente al 0.8% (1/106), y sensible dosis dependiente al 6.8% (7/106).<sup>17</sup> Perurena ML. et al (Cuba, 2015) reportó como susceptibilidad al fluconazol en 16 cepas de *Candida albicans*, encontrándose sensible al 81.2% (13/16), resistente al 12.5% (2/16) y sensible dosis dependiente al 6.3% (1/16).<sup>2</sup> Se observa que al igual que estos estudios existe un predominio de cepas sensibles a comparación de las resistentes, lo cual garantiza la consistencia y analogía de nuestros resultados. Sin embargo debemos alertarnos e iniciar vigilancia sobre la existencia variable de cepas “sensible dosis dependiente” en los estudios citados, dado que estas podrían obtener resistencia al antifúngico, lo cual puede deberse al uso indiscriminado de este azol de modo que la población de levaduras este cambiando su perfil de susceptibilidad. Otros autores confirman en sus reporte el incremento de la resistencia antifúngica en cepas *Candida albicans* como Dalben DK (Brasil, 2008)<sup>4</sup>, Martos AI et al (España, 2007)<sup>9</sup>, Gutiérrez C et al (Colombia, 2007)<sup>12</sup>, Alburquenque C et al (Chile, 2013)<sup>15</sup>, Rodríguez SM (Peru, 2006)<sup>16</sup> y Alburquenque C et al (Chile, 2009)<sup>17</sup>.

Existen otros estudios en mujeres embarazadas que concuerdan con nosotros en el predominio de la sensibilidad a fluconazol, pero discuerdan en otros puntos con nuestros resultados. Oscoco CL (Perú, 2014) reportó la susceptibilidad al fluconazol en 33 cepas de *Candida albicans* de pacientes gestantes, encontrándose sensible al 96.9% (32/33), resistente al 0.0% (0/33) y sensible dosis dependiente al 3.1% (1/33).<sup>67</sup> Chillogallo GC. et al (Ecuador, 2015) reportó la susceptibilidad al fluconazol en 23 cepas de *Candida albicans* de pacientes gestantes, encontrándose sensible al 69.6% (16/23), resistente al 30.4% (7/23) y sensible dosis dependiente al 0.0% (0/23).<sup>61</sup> Estos estudios discuerdan con nuestros resultados en la ausencia de cepas resistentes y sensible dosis dependiente, esto se puede deber principalmente a que la población en estudio se encuentra conformada por mujeres embarazadas, además de otros factores (geográfico, étnico, social, económico, etc.); no obstante también se destaca la importancia de iniciar la vigilancia de la cepas sensible dosis dependiente en las cepas *Candida albicans*.

En nuestros hallazgos obtuvimos una baja cantidad de *Candida non albicans*, no obstante resulta importante realizar el estudio de susceptibilidad al fluconazol para prevenir fallas terapéuticas, ya sea debido a la resistencia natural de la *Candida krusei* o cepas que estén variando su perfil de susceptibilidad. Los resultados de nuestra investigación coinciden con otros estudios.

Respecto a la especie *Candida krusei* y el fluconazol, encontramos que el 100% (2/2) de cepas estudiadas presentaban resistencia, lo cual concuerda con los reportes de varios autores en cepas de secreción vaginal y se justifica teóricamente con la resistencia natural intrínseca que presenta la especie al antifúngico. Herrera GL (Perú, 2017), aisló 01 cepa *Candida krusei* que sólo demostró resistencia al 100% sobre el fluconazol.<sup>66</sup> Alburquenque OC. et al (Chile, 2009) aisló 01 cepa *Candida krusei*, donde se evidenció

resistencia a fluconazol al 100%.<sup>17</sup> Chillogallo GC. et al (Ecuador, 2015) aisló 08 cepas *Candida krusei*, donde obtuvo el 100% de resistencia al flucozanol.<sup>61</sup> Salehei Z. et al (Irán, 2012) aisló 02 cepas *Candida krusei*, donde se evidenció que el 100% fue resistente al fluconazol.<sup>62</sup> Estos resultados garantizan la consistencia y analogía de nuestra investigación. Por otro lado existen otros trabajos de investigación que discrepan con nuestros resultados y el de los autores anteriormente mencionados. Perurena ML. et al (Cuba, 2015) describe que de sus 02 cepas *Candida krusei* aisladas, el 50% (1/2) es sensible y el otro 50% (1/2) es sensible dosis dependiente, no encontrando la resistencia natural intrínseca de la especie frente al fluconazol.<sup>2</sup> Respecto a la especie *Candida parapsilosis* y el fluconazol, encontramos que el 100% (2/2) de cepas estudiadas presentaron sensibilidad, nuestros resultados son iguales a lo reportado por otros autores. Mancilla RG (Perú, 2012) aisló 1 cepa *Candida parapsilosis* que resultó sensible al 100% (1/1) al fluconazol.<sup>58</sup> Herrera GL (Perú, 2017), aisló 3 cepas *Candida parapsilosis*, donde se evidenció que el 100% (3/3) demostró ser sensible al fluconazol.<sup>66</sup> Perurena ML. et al (Cuba, 2015) describe que el 100% (1/1) de sus cepas aisladas de *Candida parapsilosis* resultaron sensibles.<sup>2</sup> Respecto a la especie *Candida tropicalis* y el fluconazol, encontramos que el 100% (1/1) es sensible dosis dependiente, lo cual discrepa con lo reportado por otros autores como Alburquenque OC. et al (Chile, 2009)<sup>17</sup> y Perurena ML. et al (Cuba, 2015)<sup>2</sup> que obtuvieron cepas sensibles al 100%; por otro lado Herrera GL (Perú, 2012)<sup>66</sup> y Salehei Z. et al (Irán, 2012)<sup>62</sup> manifiestan que han hallado resistencia antifúngica al fluconazol; esta diferencia encontrada entre los trabajos de investigación mencionados son consecuencia de diferentes factores y/o características de la población en estudio, además de la poca cantidad de cepas de esta especie que se encuentra (baja prevalencia), lo cual no puede hacer significativo los resultados obtenidos y la susceptibilidad de esta especie se clasifica como variable.

Sobre la susceptibilidad al voriconazol nuestros resultados muestran que la especie de *Candida albicans* presenta un alto grado sensible y una baja incidencia de resistencia al voriconazol. Nuestros resultados se asemejan a otros estudios donde se observa un elevado porcentaje de sensibilidad al antifúngico. Mancilla RG (Perú, 2012) analizó 101 cepas de especies de *Candida albicans* obteniendo cepas al 84.1% (69/82) sensibles, 3.7%(3/82) sensible dosis dependiente y 12.2%(10/82) resistente.<sup>58</sup> Ossco CL (Perú, 2014) identificó 39 cepas de *Candida* de muestras de secreción vaginal de lo cual el 100% de *Candida albicans* fueron sensibles al voriconazol.<sup>67</sup> Perurena ML. et al (Cuba, 2015) trabajó 26 cepas de especies de *Candida* de muestras de secreción vaginal de los cuales 16 se identificaron como *Candida albicans*, donde el 93.8% (15/16) fueron sensibles y el 6.2% (1/16) resistentes al voriconazol.<sup>2</sup> Herrera GL (Perú, 2017) investigó 95 cepas *Candida albicans*, donde el 93.6%(89/95) fueron sensibles, 3.2% (3/95) sensible dosis dependiente y 3.2%(3/95) resistentes al voriconazol.<sup>66</sup>

La acción del voriconazol fue efectiva para todas las especies de *Candida no albicans* que hallamos en nuestra investigación; lo cual muestra que el voriconazol sigue siendo el antimicótico triazólico de 2da generación más efectivo contra la candidiasis producidas por estas especies en secreciones vaginales. Nuestros resultados coinciden con los reportes de otros autores como Perurena ML (2015 Cuba) identificó 10 cepas de *Candida no albicans* (05 *C. glabrata*, 02 *C. krusei*, 02 *C. parapsilosis* y 01 *C. tropicalis*), obteniendo una sensibilidad al 100% sobre el voriconazol.<sup>2</sup> Herrera GL (Perú, 2017) aisló 15 cepas de *Candida no albicans* (10 *C. glabrata*, 01 *C. krusei*, 01 *C. parapsilosis*, 01 *C. tropicalis*), obteniendo el 100% de cepas sensibles al voriconazol.<sup>66</sup>

Existen otras literaturas que consideran importante la investigación de la susceptibilidad antifúngica en cepas de *Candida no albicans*, dado que se ha reportado la presencia de casos resistentes al voriconazol en otros tipos de muestras. Mancilla RG (Ayacucho, 2012) identificó 19 Cepas de *Candida no albicans* (16 *C. glabrata*, 01 *C. dublinisenses*, 01 *C. lucitaniae*, 01 *C. parapsilosis*) procedentes de secreción vaginal, en el estudio de susceptibilidad obtuvo cepas resistentes al voriconazol: 6.3% (1/16) *Candida glabrata* y 100% (1/1) *C. parapsilosis*.<sup>58</sup> La diferencia de resultados que hemos obtenido en nuestro estudio puede ser consecuencia de la variación geográfica, tiempo y características de la población; sin embargo el que hayan reportado cepas no albicans resistentes es indicativo de seguir haciendo vigilancia y estudio de la susceptibilidad de las especies de *Candida* y trabajados en mayor población. Villalobos BK et al. (Perú, 2019) trabajaron con 46 cepas de *Candida no albicans* aisladas en diversos fluidos biológicos (líquido peritoneal, sangre, secreción traqueal, orina) procedente de unidades críticas hospitalarias, obteniendo el 78.3% (36/46) sensible y el 21.0% (10/46) resistente al voriconazol. En estos resultados se evidencia una marcada resistencia al antifúngico, la discordancia que presenta este estudio con nuestro trabajo de investigación se debe a las características de la población y muestra; el trabajo de Villalobos BK et al. (Perú, 2019) está conformada por pacientes hospitalizados en una unidad crítica con diversos tratamientos específicos, profilaxis antibiótica y antimicótica para prevenir infecciones intrahospitalarias, es por ello que estos pacientes son más propensos a presentar microorganismos resistentes, lo cual coincide con sus resultados.<sup>65</sup>

En comparación con la mayoría de estudios existentes, se demuestra que predomina la sensibilidad al fluconazol y voriconazol, pero se evidencian cepas resistentes y sensible dosis dependiente en proporciones interesantes; observándose en la

actualidad que estas dos últimas muestran un incremento en las posibles causas de estas dos últimas puede deberse a la automedicación (fármaco de libre acceso sin receta médica) ó a la medicación genérica, donde se ignoran los ajustes de dosis necesario para el tratamiento y la combinación correcta con otros medicamentos. En consecuencia se puede abrir un camino a la vigilancia de las cepas sensible dosis dependiente a fluconazol y voriconazol.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones.

- ✓ El 94% (141/150) de cepas aisladas corresponden a *Candida albicans*, en consecuencia se considera como la especie con mayor frecuencia en secreciones vaginales.
- ✓ Las especies de *Candida* no *albicans* encontradas en las muestras de secreción vaginal fueron: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*.
- ✓ La *Candida albicans* tiene una resistencia al fluconazol de 8.7%, una sensibilidad al 80.7% y una interesante sensibilidad dosis dependiente al 10.7%.
- ✓ La *Candida Krusei* es la única cepa del grupo no *albicans* que presentó resistencia al fluconazol, según diversas literaturas esta resistencia es clasificada como natural.
- ✓ La *candida albicans* tiene una resistencia al voriconazol de 4.3%, una sensibilidad al 87.9% y una interesante sensibilidad dosis dependiente al 7.8%.
- ✓ El voriconazol se considera como el antifúngico mas efectivo para tratar candidiasis vulvovaginal ocasionado por las cepas no *albicans* de nuestro estudio, dado que su sensibilidad fue al 100%.
- ✓ Se determinó una alta sensibilidad del género *Candida* al fluconazol (80.7%) y voriconazol (88.7%).

## 5.2 Recomendaciones.

Según las conclusiones del presente estudio, se recomienda:

- ✓ Investigar más en el estudio de las especies no albicans, con el propósito de obtener mayor información sobre su perfil de susceptibilidad antifúngico.
- ✓ Es necesario realizar el presente estudio en grupos de pacientes que compartan características propias (Tuberculosis, HIV, oncológicos, hospitalizados, entre otros), con el fin de poder determinar el perfil de susceptibilidad antifúngico específico a la población.
- ✓ Realizar la genotipificación a las cepas de *Candida* resistentes a fluconazol y Voriconazol con la finalidad de conocer sus patrones de bandas prevalentes.
- ✓ Se sugiere determinar la susceptibilidad antifúngica mediante el método de difusión en discos con la finalidad de asegurar el tratamiento terapéutico, dado que es una prueba de bajo costo a comparación de la CMI y se puede llegar a todo el territorio peruano.
- ✓ Se invoca a los pacientes y médicos a tomar conciencia sobre las consecuencias y riesgos para la salud que implica la automedicación en todos sus aspectos, y el uso de antifúngicos en dosis inadecuadas o en forma incompleta.

## REFERENCIAS

1. López C, Giro L, Ramos L, Ramadán S, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2005 [citado 09 Feb 2019]; 37(1):16-21. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/2130/213016778003/>
2. Perurena ML, Perez MY, Fernandez AC, Martinez MG, Zaragozi IM. Susceptibilidad antifúngica de aislados vaginales de *Candida* spp. Rev Cubana de Med Trop [Internet]. 2016 [citado 09 Feb 2019]; 68(3): 248-254. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602016000300007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602016000300007)
3. Sanchez PJ. Identificación de las especies del genero *Candida* en gestantes con Candidiasis vulvovaginal que acuden al Hospital Gineco-obstetrico. [Tesis ]. Sucre:Universidad Mayor Real;2011.
4. Dalben D k, Suemi SC, Patussi E, Lopes CM, Estivalet ST. Susceptibilidad de levaduras vaginales a los antifúngicos más utilizados en Maringá, Paraná, Brasil. Acta Bioquím Clín Latinoam [Internet]. 2008 [citado 09 Feb 2019]; 42 (4): 561-566. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/235339596\\_Susceptibilidad\\_de\\_levaduras\\_vaginales\\_a\\_los\\_antifungicos\\_mas\\_utilizados\\_en\\_Maringa\\_Parana\\_Brasil](https://www.researchgate.net/publication/235339596_Susceptibilidad_de_levaduras_vaginales_a_los_antifungicos_mas_utilizados_en_Maringa_Parana_Brasil)
5. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginales. Rev Ofic Sociad Española de Ginecol y Obstrec [Internet]. 2016 [citado 09 Feb 2019]; 59 (1):350-362. Disponible en: <http://residenciamflapaz.com/Articulos%20Residencia%2017/30%20Diagn%C3%B3stico%20y%20tratamiento%20de%20las%20infecciones%20vulvovaginales..pdf>
6. Ciudad RA. Infecciones vaginales por *Cándida*: diagnóstico y tratamiento. Rev Per Ginecol Obstet [Internet]. 2007 [citado 09 Feb 2019]; 53(3):159-166. Disponible en:

[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53\\_n3/pdf/a04v53n3.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol53_n3/pdf/a04v53n3.pdf)

7. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Rev Biomed [Internet]. 2016 [citado 19 Abr 2018]; 27(3):127-136. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb162735.pdf>
8. Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannit CA. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida* no *albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2004 [citado 09 Feb 2019]; 36(3): 107-112. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412004000300003](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412004000300003)
9. Martos AI, Oviedo LE, Perez L, Gonzalez A, Castilla JP, Romero A et al. Incidencia comparativa y patrón de sensibilidad de *Candida* no *albicans* en la U.C.I. del H.U. Valme (Sevilla), respecto al global del área hospitalaria. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2007 [citado 09 Feb 2019];25(95):1-118. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-sesion-3-epidemiologia-resistencia-los-13111983>
10. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. IJID [Internet]. 2010 [citado 15 Abr 2018]; 14(11): 954-966. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797887>
11. Guerrero MJE. Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de *Cándida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016. [Tesis]. Quito (Ecuador): Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Bioanálisis; 2016.
12. Gutierrez C, De Bedout C, Tobon A, Cano L, Arango M, Tabares A et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de *Candida* spp.,

- obtenidos de mucosa oral de pacientes con sida. *Infectio* [Internet]. 2007 [citado 09 Feb 2019]; 11(4): 183-189. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S012393922007000400005&lng=es&nrm=isso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S012393922007000400005&lng=es&nrm=isso&tlng=es)
13. De Bedout C, Gómez BL. Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Rev Infectio* [Internet]. 2010 [citado 09 Feb 2019]; 14(2):159-171. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-articulo-candida-candidiasis-invasora-un-reto-S0123939210701338>
  14. Mujica MT, Finkelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannit CA. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2004 [citado 09 Feb 2019]; 36(3): 107-112. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412004000300003](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412004000300003)
  15. Albuquerque OC, Beltrán S, Olivares R, Falconer M, Amaro J, Fuentes M et al. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida spp*: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2013 [citado 18 Abr 2018]; 30(3): 244-251. Disponible en : [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0716-10182013000300002&lng=es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0716-10182013000300002&lng=es&nrm=iso)
  16. Carlos RJ y Rodríguez SM. Determinación del perfil de sensibilidad in vitro frente a antifúngicos en *Candida spp*. Aisladas de flujo vaginal. [Tesis]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos;2006.
  17. Albuquerque OC, Hermosilla DG, Tapia PC. Distribución y susceptibilidad a fluconazol de levaduras del género *Candida* aisladas en pacientes hospitalizados y ambulatorios. *Rev Chil Infect* [Internet]. 2009 [citado 18 Abr 2018]; 26(5): 435-439. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182009000600007](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000600007)

18. Aguilar, G, Araujo P, Godoy E, Falcón M, Centurión M, Ortiz R et al. Identificación y características de *Candida* spp. en secreción vaginal de pacientes embarazadas y no embarazadas. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud [Internet]. 2017 [citado 19 Abr 2018]; 15(3):6-12. Disponible en: <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/1262>
19. Bonifaz A. Micología Médica Básica. Vol 1. 4th ed. México: Mac Graw Hill; 2012.
20. Gorka BZ. Vulvovaginitis candidiásica. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2002 [citado 20 Abr 2018]; 19(1): 22-24. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/10786777\\_Vulvovaginal\\_candidiasis](https://www.researchgate.net/publication/10786777_Vulvovaginal_candidiasis)
21. Flores PR, Rivera SR, García JE, Arriaga AM. Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. Salud pública de México [Internet]. 2003 [citado 16 Abr 2018]; 45(5): 694-697. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/salpubmex/sal-2003/sals035p.pdf>
22. Gatica MJL, Goic BI, Martínez TMA, Reid SI, Céspedes PP, Arias EMC et al.. UTILIDAD DEL AGAR CROMOCANDIDA PARA EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE *CANDIDA* spp AISLADAS DE MUESTRAS VAGINALES. Rev Chil Obstet Ginecol [Internet]. 2002 [citado 19 Abr 2018]; 67(4): 300-304. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071775262002000400007&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775262002000400007&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262002000400007>.
23. Asociación Española de Micología. Presentación [Internet]. 2001 [citado 19 Abr 2018]; Disponible en: <https://es.scribd.com/document/187369682/Guia-Practica-de-Identificacion-y-Diagnostico-en-Micologia-Clinica>.
24. Cardenes PC. Levaduras del genero *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de la Laguna;2000.

25. Myslide .net [Internet]. Lambayeque:Myslidenet;2015[actualizado 12 oct 2015; citado 09 abril 2019]. Disponible en: <https://myslide.es/documents/seminario-de-candidiasis-2u.html>
26. Mahmoud A. Ghannoum, Louis B. Rice. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1999 [citado 19 Abr 2018]; 12(4): 501-517. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515900>
27. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. Infect Immun [Internet] . 2012 [citado 19 Abr 2018]; 80(4): 1304-13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252867>
28. Scribd.net [Internet]. Coro: scribd; 2014 [Actualizado 17 jan 2014; citado 3 oct 2019]. Disponible en : <https://es.scribd.com/doc/295797898/Unidad-de-Micologia-Completa-Alejandra-Alvarado-Samuel-Reyes>
29. Poton J, Moragues M, Gene J, Guarro J, Quindos G. Hongos y actinomicetos alergénicos. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2002 [Citado 3 de oct 2019]; 25- 28. Disponible en : <https://es.scribd.com/document/128261000/Hongos-y-actinomicetos-alergenicos-Revista-Iberoamericana-de-Micologia-2002>
30. Cecilia TP. *Candida glabrata*. Rev Chil Infect [Internet]. 2008 [citado 20 Jun 2018]; 25(4): 293. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182008000400009](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000400009)
31. Galán LM. Factores de patogenicidad en *Candida Tropicalis*. [Tesis]. Extremadura (España): Universidad de Extremadura. Departamento de Ciencias Biomédicas; 2014.
32. Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. J Med Microbi [Internet]. 1994 [citado 19 Abr 2018]; 41(1): 295-310. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7966200>

33. Manzano GP, Mendez TL, Hernandez HF, Lopez MR. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Méd Méx* [Internet]. 2008 [citado 09 Feb 2019]; 144 (1), 23-26. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=15838>
34. Treviño RR, González GJ, Garza GE, González G. Candida parapsilosis, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria* [Internet]. [citado 25 Jun 2018];14(56):155-163. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/288687341\\_Candida\\_parapsilosis\\_una\\_amenaza\\_desafiante](https://www.researchgate.net/publication/288687341_Candida_parapsilosis_una_amenaza_desafiante)
35. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. Candida albicans Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2003 [citado 19 Abr 2018]; 47(8): 2404-2412. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12878497>
36. Zurita MS, Urcia AF. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. Perú: Instituto Nacional de Salud; 2017.
37. Sánchez HG. Diagnóstico de candidiasis y candidemias en neonatos. [Tesis]. Bogotá (Colombia): Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Bacteriología; 2009.
38. Zapata GF, Cardona CN. Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Rev CES Med* [Internet]. 2012 [citado 02 Jul 2018]; 26(1): 71-89. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v26n1/v26n1a07.pdf>
39. Guevara RM, Urcia AF, Casquero CJ. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Perú: Instituto Nacional de Salud; 2007.
40. Asociación Española de Micología. Guía Práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica: Capítulo 15a Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos

- (documentos M27-A3, M38-A y M44-A. Rev Iberoamericana de Micología [Internet]. 2007 [citado 19 Abr 2018]; Disponible en: <https://es.scribd.com/document/187369682/Guia-Practica-de-Identificacion-y-Diagnostico-en-Micologia-Clinica>.
41. Asociación Española de Micología. Guía Práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica: Capítulo 11 Identificación de levaduras. Rev Iberoamericana de Micología [Internet]. 2007 [citado 19 Abr 2018]; Disponible en: <https://es.scribd.com/document/187369682/Guia-Practica-de-Identificacion-y-Diagnostico-en-Micologia-Clinica>.
  42. Núñez SWE. Determinación de la resistencia al fluconazol y nistatina mediante el fungigrama en vaginosis crónica causada por candida albicans en mujeres de 18-35 años que acuden a cemoplaf (centro médico de orientación y planificación familiar) Iatacunga. [Tesis]. Ambato (Ecuador): Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias de la Salud; 2014.
  43. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. Procedimientos en microbiología clínica: Capítulo 21. Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Rev Enf Inf y Microb Clinic.[Internet].2006 [Citado 19 Abr 2019];Disponible en : [http://coesant-seimc.org/documents/Sensibilidad\\_Antifungicos.pdf](http://coesant-seimc.org/documents/Sensibilidad_Antifungicos.pdf)
  44. Researchgate.net [Internet]. Sevilla: Researchgatenet [Actualizado 14 jul 2012; citado 10 abr 2019]. Disponible en:[https://www.researchgate.net/publication/264876238\\_DIAGNOSTICO\\_DE\\_LA\\_INFECION\\_FUNGICA\\_POR\\_LEVADURAS\\_DEL\\_GENERO\\_Candida\\_Candida\\_dubliniensis](https://www.researchgate.net/publication/264876238_DIAGNOSTICO_DE_LA_INFECION_FUNGICA_POR_LEVADURAS_DEL_GENERO_Candida_Candida_dubliniensis)
  45. Vitek 2 Technology. Manual de usuario software online. [Internet].2005[Citado 3 oct 2019].Disponible en: <https://manualzz.com/doc/6707887/vitek-2-systems-online-software-user-manual>
  46. Vitek 2 Compact. Guía simple para el usuario [Internet].2005[Citado 3 oct 2019].Disponible en:<https://es.scribd.com/doc/85404523/V2C-Simplified-User-Guide-NOV-2010-ESPANOL>

47. MicroScan. Proyecto del manual de instrucciones. [Internet]. 2016 [Citado 4 Abr 2019]. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/agosto\\_2016/Dispo\\_9433-16.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/agosto_2016/Dispo_9433-16.pdf)
48. Beckman Coulter. MicroScan Microbiology System. [Internet]. 2016 [Citado 24 Abr 2019]. Disponible en: <https://media.beckmancoulter.com/-/media/diagnostics/products/microbiology/microscan-systems/docs/pdfs/microbiology-microscan-brochure-en.pdf>
49. Canton E, Cerceano E. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. Rev Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. 2014 [citado 09 Feb 2019]; 32 (6):375-379. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/journal/enfermedades-infecciosas-y-microbiologia-clinica>
50. Trejos LE. Evaluación de parámetros para pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos mediante la técnica de difusión en agar. [Tesis]. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
51. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para las levaduras. Rev. Enf y Microb Clinic. [Internet]. 2006 [citado 22 Abr 2019]; Disponible en: <http://coesant-seimc.org/documents/Dil%20Caldo%20Levaduras.pdf>
52. Alastruey LA, Melhem M, Bonfietti LC, Rodriguez TJ. Prueba de sustentabilidad para hongos: correlaciones clínicas y de laboratorio en micología médica. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2015 [citado 08 Jun 2019]; 57(19): 57–64. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4711191/>
53. Asociación Española de Micología. Guía Práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica: Capítulo 16: Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Rev Iberoamericana de Micología [Internet]. 2007 [citado 19 Abr 2018]; Disponible en: <https://es.scribd.com/document/187369682/Guia-Practica-de-Identificacion-y-Diagnostico-en-Micologia-Clinica>.

54. Rosco Diagnostica. Instrucciones para uso de NEO SENSITABS. [Internet]. 2005 [citado 19 Jun 2019]. Disponible en: <http://www.rosco.dk/gfx/pdf/Neo-S%20-%20Print%20Insert%20-%20es.pdf>
55. Canton E, Peman J, Sastre M, Valentin A, Bosch M, Espinel IA. Evaluación y utilidad de los métodos E-test y Neo-Sensitabs para estudiar la sensibilidad de las levaduras al fluconazol. Rev Esp Quimioterap [Internet]. 2006 [Citado 09 de feb 2019]; 19(3):267-274. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/28142795\\_Evaluacion\\_y\\_utilidad\\_de\\_los\\_metodos\\_EtestRy\\_NeoSensitabsR\\_para\\_estudiar\\_la\\_sensibilidad\\_de\\_las\\_levaduras\\_al\\_fluconazol](https://www.researchgate.net/publication/28142795_Evaluacion_y_utilidad_de_los_metodos_EtestRy_NeoSensitabsR_para_estudiar_la_sensibilidad_de_las_levaduras_al_fluconazol)
56. Guevara J, Bejar V, Caceres A, Valencia E. Variedad de *Candida* en mujeres con flujo vaginal anormal. An. Fac. Med. 2000; Vol(61):51-54.
57. Muñoz GE, Angulo CI, Chavez CM, Lujan VM, Wilson KJ, Alayo EG. Aislamiento de *Candida albicans* de mujeres con Candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Peru. REBIOL. 2012; Vol(32) :42-47.
58. Mancilla RG. Sensibilidad antifungica de especies de *Candida* aisladas de mujeres con candidiasis vaginal, Hospital Regional de Ayacucho, 2012. [Tesis de grado]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2012.
59. Enciperu.net [Internet]. Lima: Enciperu.net: 2015 [actualizado 7 ene 2016; citado 27 set 2019]. Disponible en: <https://enciperu.net/wpcontent/uploads/2016/08/eci2015vprograma20141130.pdf>
60. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Candida glabrata*: Un patógeno emergente. Rev. Enf y Microb Clin. [Internet]. 2006 [citado 22 Abr 2019]; Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/cglabra.pdf>

61. Chigallo GC. Especies de *Candida* y su resistencia a fluconazol en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas atendidas en el Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja. [Tesis] Ecuador: Universidad Nacional De Loja Área De La Salud Humana Laboratorio Clínico; 2015.
62. Salehei Z, Seifi Z, Mahmoudabadi A. Sensitivity of Vaginal Isolates of *Candida* to Eight Antifungal Drugs Isolated from Ahvaz, Irán. Rev Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2012 [Citado 9 Feb 2019]; 5 (4): 574-577. Disponible en: <http://jjmicrobiol.com/en/articles/18489.html>
63. Mohanty S, Xess I, Hasan F, Kapil A, Mittal S, Tolosa J. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. Rev Indian J Med Res [Internet]. 2007 [Citado 9 Feb 2019];126(3):216-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037716>
64. Duque C. Gomez B, Uribe O, Alarcon J, Soto F. Uran L, et al. En el estudio caracterización de la candidiasis vulvovaginal en mujeres de la ciudad de Medellin, Colombia. 2009. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/316650783\\_Caracterizacion\\_d\\_e\\_la\\_Candidiasis\\_Vulvovaginal\\_en\\_Mujeres\\_de\\_la\\_Ciudad\\_de\\_Medellin\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/316650783_Caracterizacion_d_e_la_Candidiasis_Vulvovaginal_en_Mujeres_de_la_Ciudad_de_Medellin_Colombia)
65. Villalobos BK. y Vasquez ZK. Prevalencia y susceptibilidad a antifúngicos de *Candida* no-albicans aisladas de pacientes de unidades críticas (UCI, UCIN). Hospital Regional Lambayeque. Febrero 2018 - Mayo 2019. [Tesis de grado]. Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2019.
66. Herrera GL. Resistencia a antifúngicos de elección de especies de *Candida* aisladas de pacientes con candidiasis vaginal, Ayacucho 2017. [Tesis de grado]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017.
67. Oscoco CL. Sensibilidad antifúngica de especies de *Candida* aisladas de secreción vaginal de gestantes que acuden al hospital Regional "Miguel Angel Mariscal Llerena". Ayacucho 2014. [Tesis de grado]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2015.

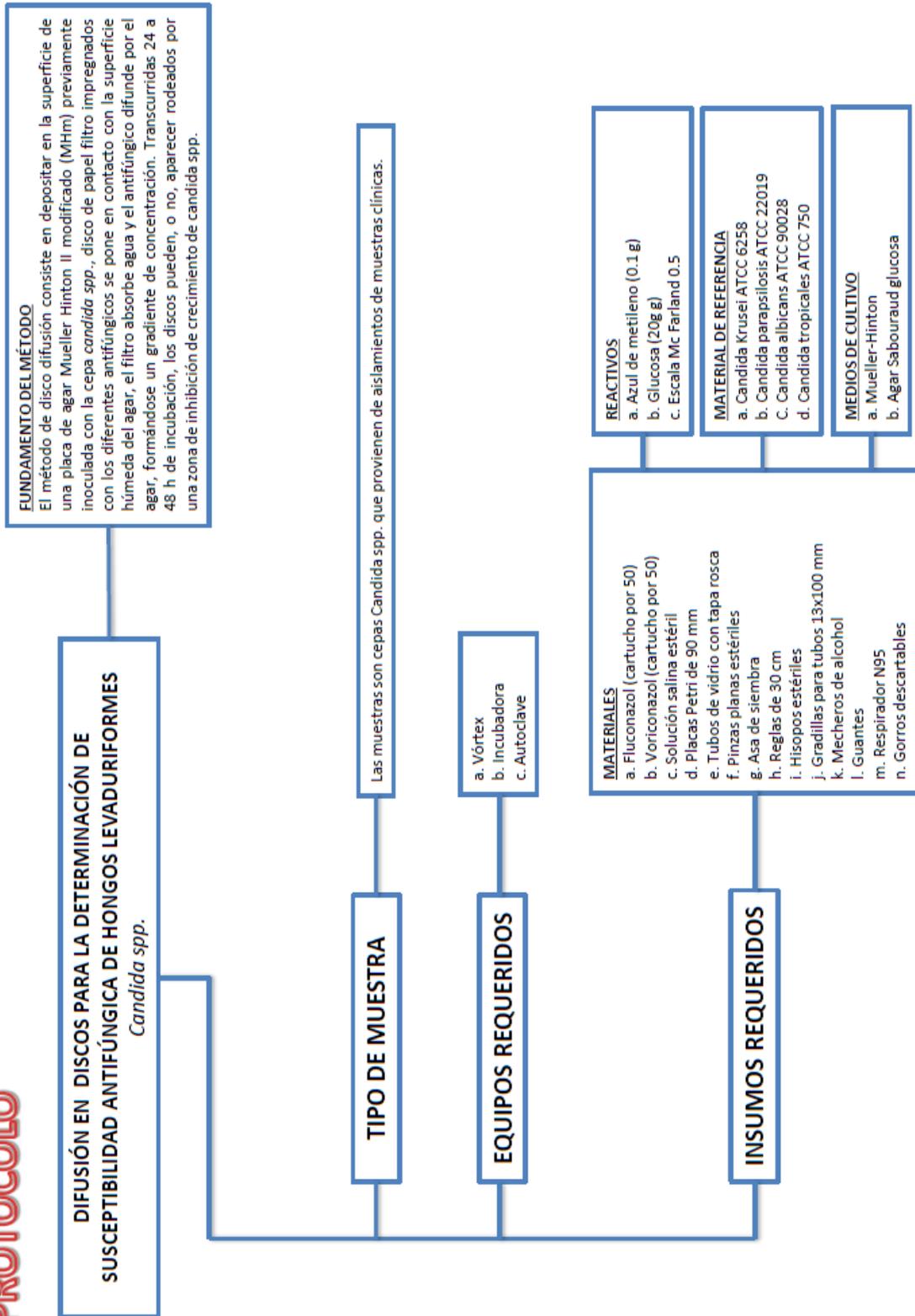
## ANEXOS

### ANEXO 01: INSTRUMENTO (FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS)

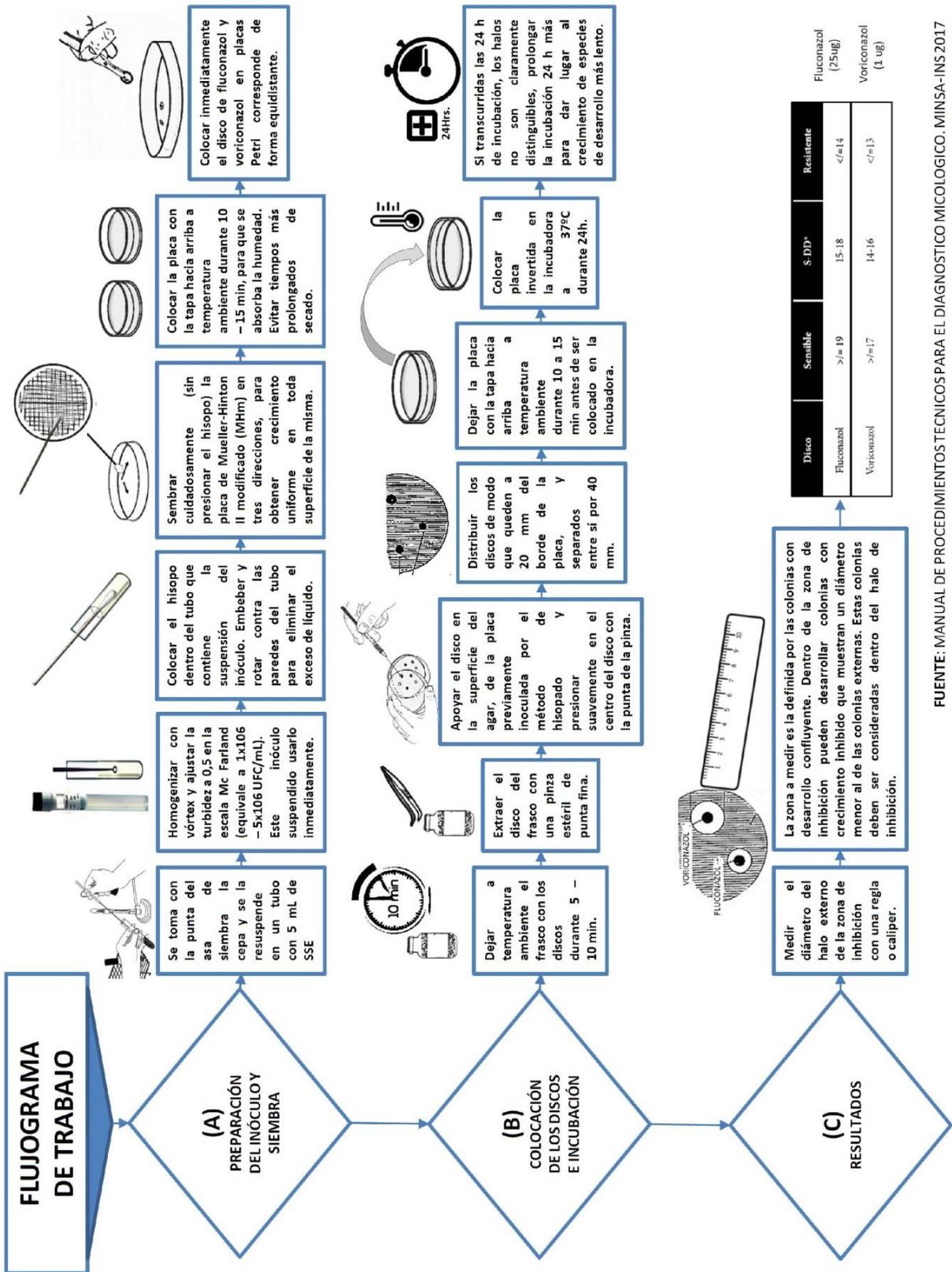
	REGISTRO DE INFORMACIÓN		IDENTIFICACION DE LA ESPECIE				SISTEMA COMERCIAL	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA	
	ORDEN	EDAD	CHROM AGAR	HARINA DE MAIZ CON TWEEN 80 (TECNICA DE DALMAU)	TUBO GERMINATIVO	ESPECIE DE <i>Candida</i>	VITEK	Fluconazol	voriconazol
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
32									
33									

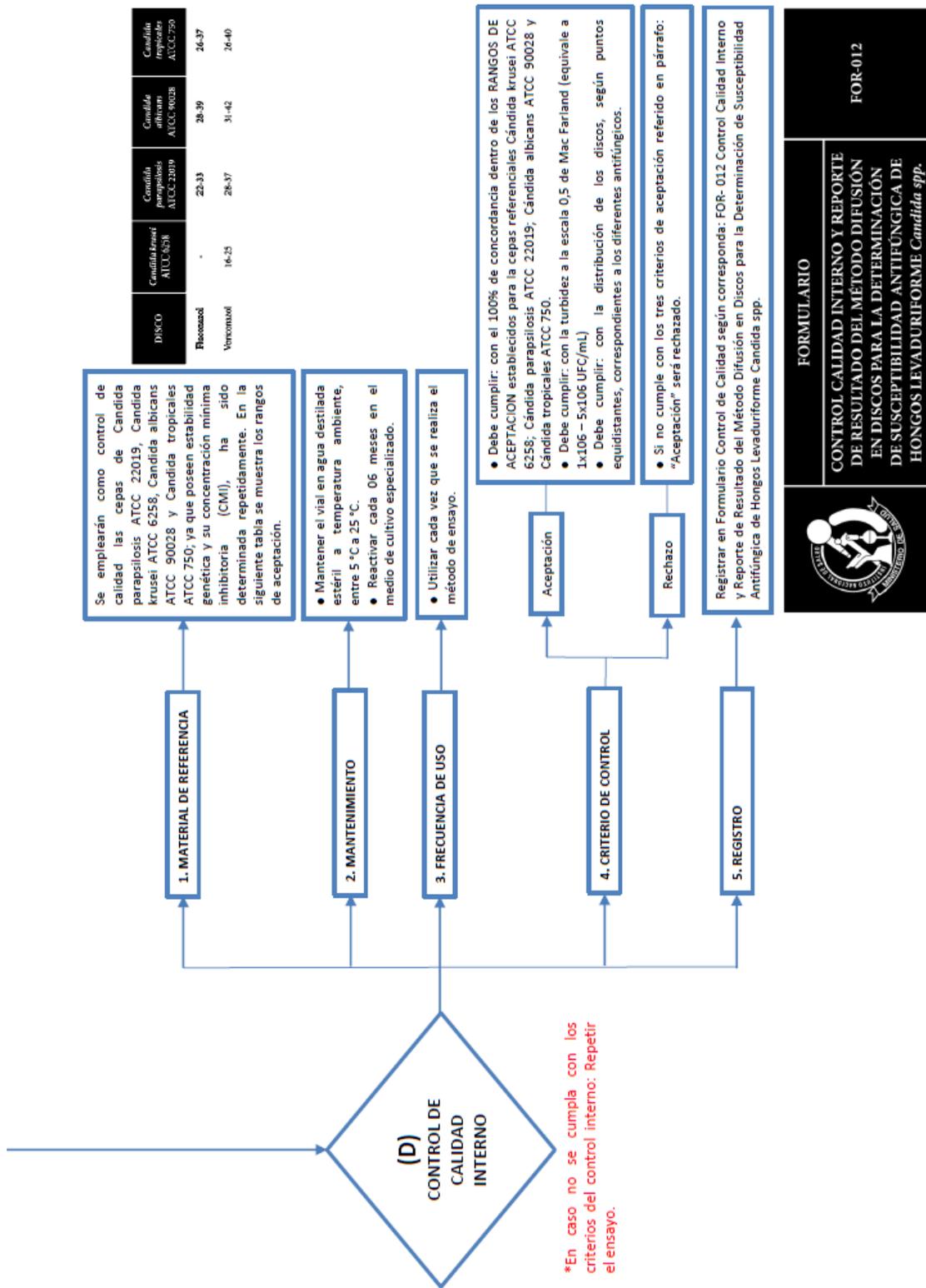
## ANEXO 02: FLUJOGRAMA DE TRABAJO

# PROTOCOLO



FUENTE: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO. MINSA-INS 2017





### **ANEXO 03: EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DEL PROCESO**

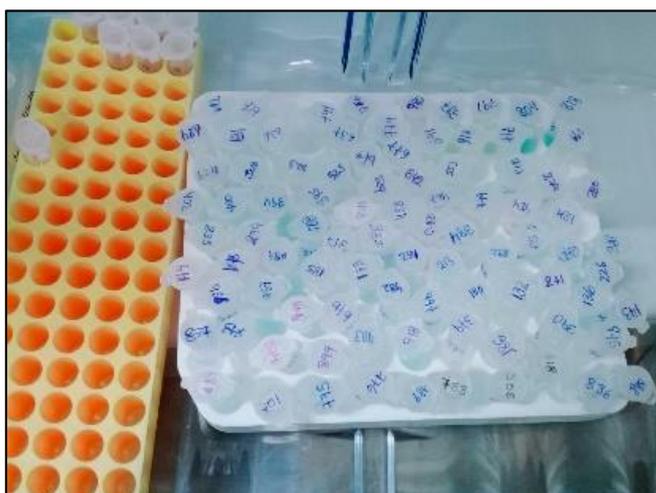
#### **Uso de EPP para la ejecución práctica de la investigación**

El empleo de equipo de protección personal garantiza la seguridad del personal y garantiza la inocuidad del producto.



#### **Conservación de la muestra**

Se recolectaron las cepas de *Candida* sp, aisladas de muestras de secreción vaginal en el policlínico categoría I-3 de Lima durante el mes de octubre I 2017 y marzo 2018. Las 150 cepas aisladas se conservaron en crioviales en agua destilada de 2-8°C para ser procesadas después de la recolección de muestras.



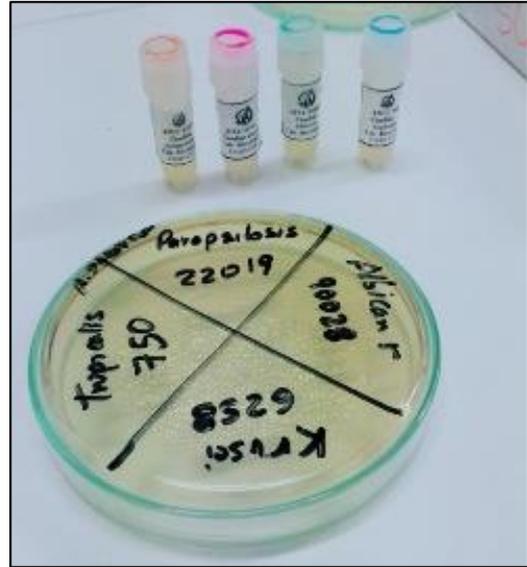
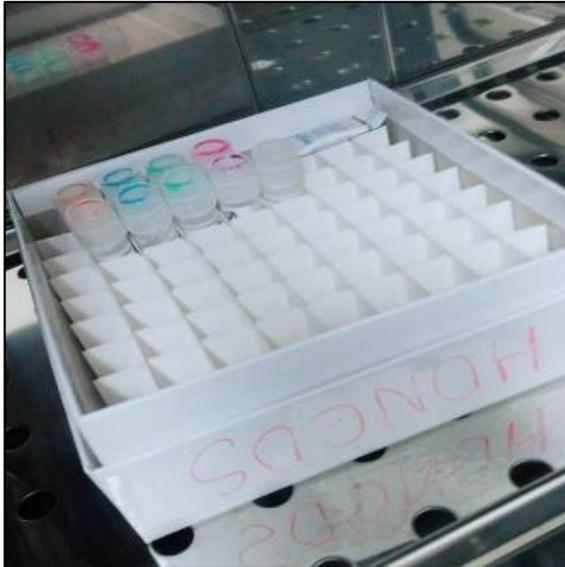
## Preparación de medios cultivos

Se realizó la preparación de los medios de cultivos teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad y las consideraciones especiales del proveedor para un óptimo trabajo. En el medio Mueller Hinton se tuvo que llenar las placas a razón de 67-70 ml de medio si son de 15 cm de diámetro (altura de la capa de agar 4 mm).



## Control de Calidad: Uso de cepas ATCC

Para el control de calidad interno se utilizaron como cepas control: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 90028 y *Candida tropicalis* ATCC 750.



## Identificación de especies por CHROMagar Candida

Se emplea un medio de cultivo cromogénico, obteniendo como principal ventaja la identificación de las especies de *Candida* en poco tiempo



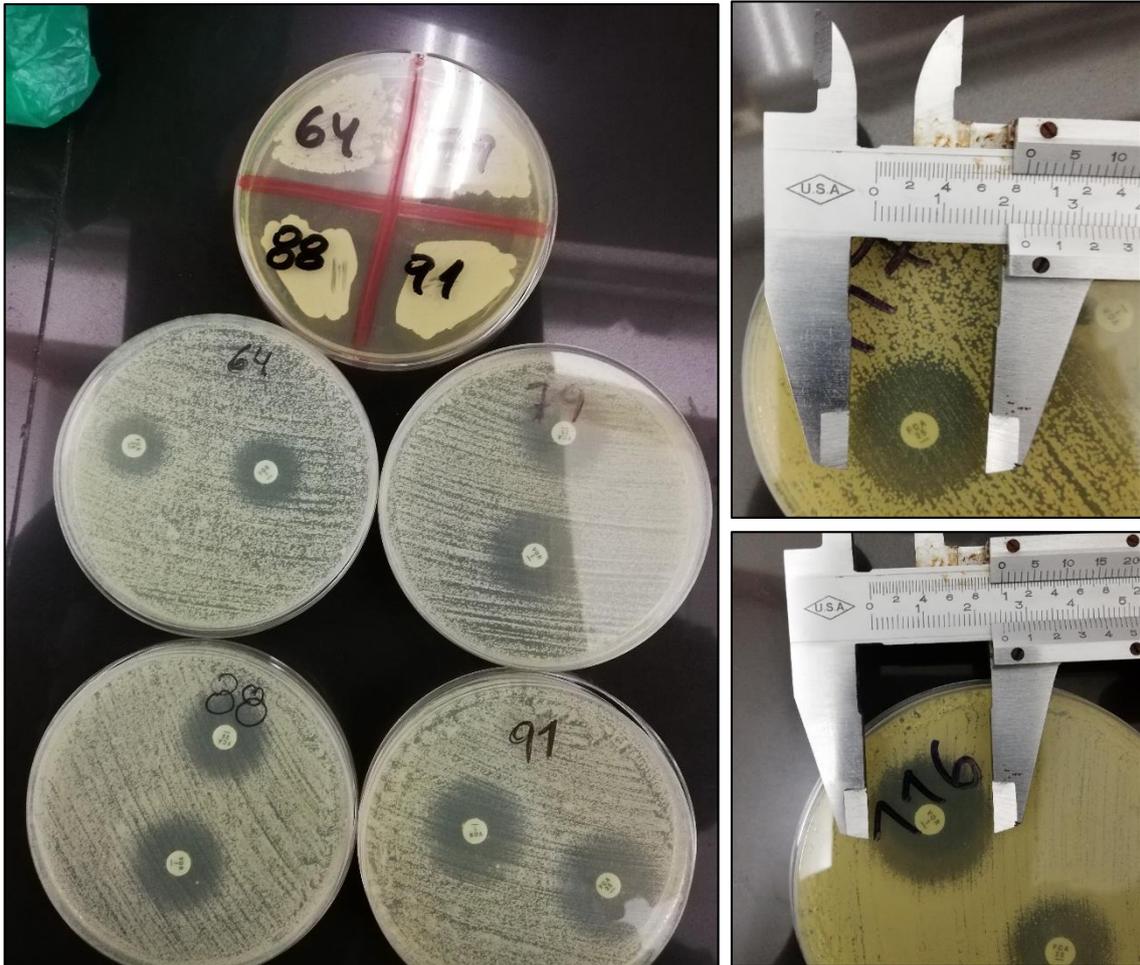
## Preparación del inóculo y siembra

Homogenizar las suspensiones de las cepas en 5ml de solución salina estéril, homogeneizar con vortex y ajustar la turbidez a 0.5 en la escala de Mc Farland.



## Lectura

Se empleó Vernier "Pie de Rey" para realizar la lectura correcta del diámetro de los halos de inhibición externo obtenido en las placas.

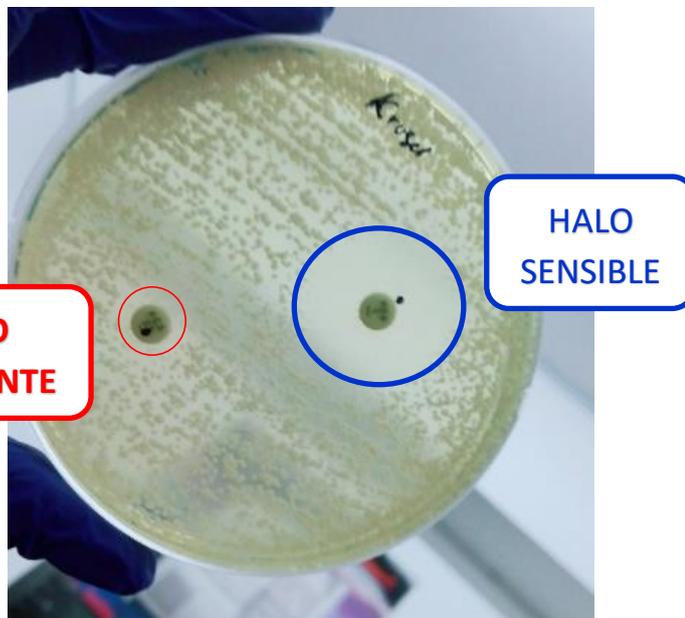
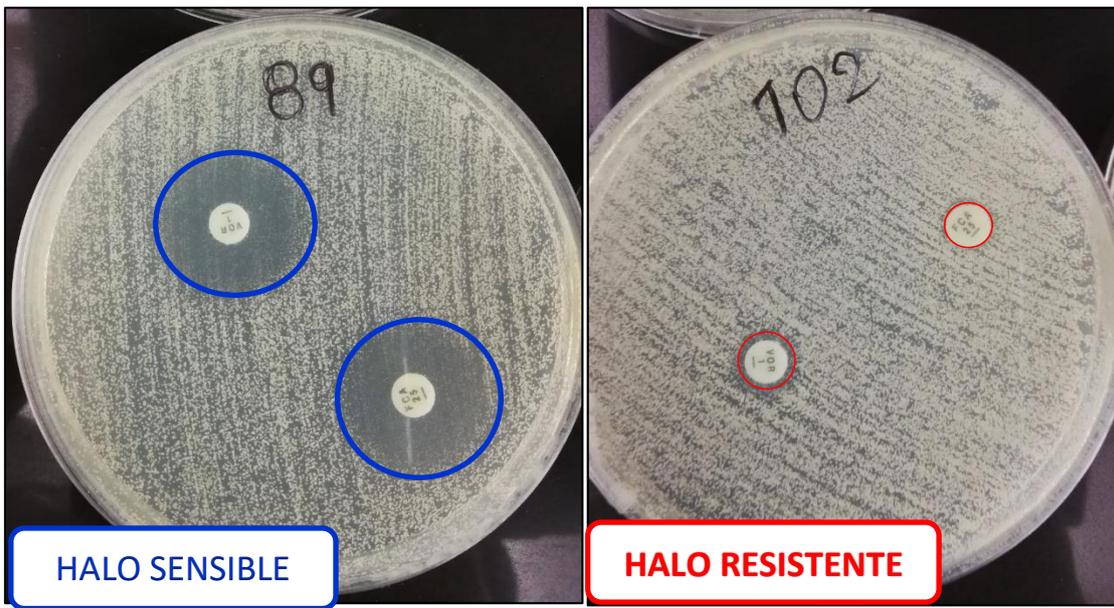


## Interpretación

Disco	Sensible	S-DD*	Resistente
Fluconazol (25ug)	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$
Voriconazol (1 ug)	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$

Fluconazol  
(25ug)

Voriconazol  
(1 ug)



## **ANEXO 04: MATRIZ DE CONSISTENCIA**

“Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima”

<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>VARIABLE</b>
<p><b>PROBLEMA PRINCIPAL:</b> ¿Cuál es la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?</p> <p><b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS:</b></p> <p>¿Cuál es la prevalencia de especies en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?</p> <p>¿Cuál es susceptibilidad a fluconazol en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?</p> <p>¿Cuál es susceptibilidad a voriconazol en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima?</p>	<p><b>OBJETIVO GENERAL:</b> Determinar la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b></p> <p>Determinar la prevalencia de especies en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.</p> <p>Identificar la susceptibilidad a fluconazol en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.</p> <p>Identificar la susceptibilidad a voriconazol en cepas del género <i>Candida</i>, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima.</p>	<p><b>VARIABLES INDEPENDIENTE:</b></p> <p>Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol</p>

## **ANEXO 05: OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES**

“Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol en cepas del género *Candida*, aisladas en secreción vaginal de pacientes en edad reproductiva atendidos en un Policlínico categoría I-3, Lima”

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol	Es el antifungigrama que determina la susceptibilidad del microorganismo micológico de las especies de <i>Candida</i> frente a los medicamentos antifungicos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del germen a estos casos fármacos.	Es un método de disco difusión en agar Muller Hinton suplementado con 2% de glucosa y 0.5 ug/ de azul de metileno. En la que se usara como antimicóticos como fluconazol y voriconazol a los cuales se les identificara sensibles, dosis dependiente o resistente.	FLUCONAZOL	<p style="text-align: center;">Sensible (<math>\geq 19</math> mm)</p> <p style="text-align: center;">Dosis Dependiente (15-18 mm)</p> <p style="text-align: center;">Resistente (<math>\leq 14</math> mm)</p>
			VORICONAZOL	<p style="text-align: center;">Sensible (<math>\geq 17</math> mm)</p> <p style="text-align: center;">Dosis Dependiente (14-16 mm)</p> <p style="text-align: center;">Resistente (<math>\leq 13</math> mm)</p>