



1859

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO**

**“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 previa a la obtención
del título de Licenciada en
Laboratorio Clínico.

AUTORA:

Carol Sofía Chillogallo Granda

DIRECTORA:

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg.Sc.

2015

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg.Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación: “**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.**”, elaborado por la proponente Carol Sofía Chillogallo Granda estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico, ha sido revisado, asesorado y desarrollado bajo mi dirección de manera que certifico que cumple con los requerimientos establecidos en el Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja, por lo que autorizo su presentación para los fines legales consiguientes.

Loja, Octubre 2015



.....

Lic. Carmen Alejandra Ullauri González, Mg.Sc.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, Carol Sofía Chillogallo Granda declaro ser la autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional Biblioteca Virtual.

Autora: Carol Sofía Chillogallo Granda

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carol Sofía Chillogallo Granda', written over a light blue grid background.

Firma:

N° de cédula: 1105809451

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Carol Sofía Chillogallo Granda, declaro ser el autor de la tesis: **“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.”**, como requisito para optar por el título de Licenciada en Laboratorio Clínico, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los diez días del mes de Noviembre del 2015 firma la autora.

Firma:



Autora: Carol Sofía Chillogallo Granda

Cédula: 1105809451

Correo electrónico: caritosofia_1993@hotmail.com

Directora de tesis: Lic. Carmen Alejandra Ullauri González. Mg. Sc.

Tribunal de Grado: Dra. Paola Benítez Castrillòn

Dra. Maricela del Rocío López Morocho

Dra. Mariela Alexandra Idrovo Vallejo

DEDICATORIA

A Dios por derramar todas sus bendiciones en mi vida y no dejarme vencer ante ningún obstáculo que se me ha presentado.

A mis padres que gracias a su apoyo incondicional y trabajo constante me han sabido dar todo lo necesario para poder culminar con un peldaño más en mi vida, son y serán siempre mi impulso y mi ejemplo a seguir y a ellos va todo el esfuerzo que hago y espero recompensar todo el tiempo y sacrificio que me han dado para poder culminar ésta etapa de mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

Quisiera dejar en constancia de mi eterna gratitud a todos quienes de una u otra manera han sido artífices de una larga jornada de sacrificios e ilusiones durante todo este camino.

A la Universidad Nacional de Loja a través de sus docentes que fueron un apoyo intelectual y me permitieron adquirir a través de sus metodologías un aprendizaje ágil, dinámico, analítico, actualizado y central que sin duda alguna se convirtió en una base sólida dentro mi campo profesional, y que con su calidad humana han sabido convertirse en ejemplo en mi vida.

A la Lic. Mg. Carmen Ullauri González, por su presencia incondicional y relevantes aportes, orientaciones y críticas durante el desarrollo de esta investigación, a quien a más de su valioso aporte académico como Directora de Tesis, agradezco sus dones de confianza y amistad hacia mi persona.

A mis padres a quienes estaré eternamente agradecida por su apoyo moral y confianza depositada para poder culminar con éxito mi carrera, además de mis familiares por siempre darme ánimos y estar a mi lado en los momentos de necesidad.

Y a Dios quien en cada circunstancia en mi vida es mi apoyo espiritual.

1. TÍTULO

“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.”

2. RESUMEN

En el presente estudio de tipo descriptivo y corte transversal denominado: “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”, se usaron técnicas de laboratorio y de recolección de datos para determinar la frecuencia y especies de *Candida* y su susceptibilidad frente al antimicótico más usado; además de la distribución de los datos según edad y vulvovaginitis recurrente (VVR) Para la identificación de *Candida* se usaron técnicas de análisis con KOH al 10%; cultivo en agar Sabouraud e identificación de especies en Cromo agar; para determinar la sensibilidad a fluconazol se usó la técnica de difusión en disco en agar Muller Hinton con glucosa y azul de metileno basado en el protocolo de métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos M 44-A. 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 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.

PALABRAS CLAVE: *Candida spp*, *embarazadas*, *vulvovaginitis recurrente*, *fluconazol*

3. SUMMARY

In this descriptive and cross-sectional study, called "*Candida* species and their resistance to fluconazole in vaginal secretion samples of pregnant women attending Health Center N° 1 in the city of Loja", laboratory and data collection techniques were used to determine the frequency and species of *candida* and their susceptibility to the most commonly used antifungal; in addition to the data distribution according to age and recurrent vulvovaginitis disease (VVR). In order to identify *Candida*, analysis techniques with 10% KOH; Sabouraud agar culture and species identification in Chrome agar were used. To determine the sensitivity to fluconazole, the technique of disk diffusion in Muller Hinton agar with glucose and methylene blue based on the protocol standardized by the CLSI methods for studying antifungal susceptibility M 44-A were applied. Sixty-seven pregnant women participated, within whose samples 74.2% (n = 23) of *Candida albicans* and 25.8% (n = 8) of *Candida krusei* were identified. Meanwhile the determination of resistance to fluconazole was 30.4% (n = 7) for *C. albicans* and 100% (n = 8) for *C. krusei*. Additionally 44.4% (n = 8) had recurrent vulvovaginitis; the most common ages for these occurrences were between 21 and 44 years old, corresponding to 53.3% (n = 15). Thus, in the population studied, it was concluded that the most frequent species was *Candida albicans*, 100% of *C. krusei* showed resistance to fluconazole, the presence of VVR is not a factor that correlates to a resistance to fluconazole and women in their fertility (21 to 44) may be more susceptible to these infections.

KEYWORDS: *Candida spp*, *pregnant*, *recurrent vulvovaginitis*, *fluconazole*

4. INTRODUCCIÓN

La candidiasis vulvovaginal (CVV), particularmente en la mujer en edad reproductiva, es una causa frecuente de consulta ginecológica, tanto la colonización como la infección vaginal micótica son más frecuentes en el embarazo y en mujeres con otros factores predisponentes (Heredía, 2010).

La portación asintomática de *Candida spp.* en vagina en mujeres no gestantes oscila entre 10 y 17% y aumenta hasta un 35% en el embarazo. La resistencia de *Candida spp.*, representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones que se caracterizan, a su vez, por una alta morbimortalidad, el representante más importante para el tratamiento es el fluconazol que es un antifúngico triazólico, cuyo mecanismo de acción es reducir la concentración de ergosterol, esencial para la integridad de la membrana citoplásmica fúngica y su efecto es fungistático, la disponibilidad en el mercado facilitó su uso; sin embargo, como consecuencia de ese uso tan generalizado, se ha desarrollado en levaduras como *Candida spp.*, el riesgo potencial de resistencia. En la actualidad, la resistencia informada al fluconazol (FCZ) en especies de *Candida albicans* es cercana al 3%, con variaciones regionales y locales muy notorias (Quintero, 2011).

El surgimiento de aislamientos resistentes a los antifúngicos en el género *Candida* plantea la necesidad de identificar las levaduras y determinar la sensibilidad a drogas antifúngicas, especialmente en aquellos casos de fracasos terapéuticos (Duque, 2010).

Se realizó un estudio sobre la evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* a fluconazol por el método de difusión de disco en los países de Colombia, Ecuador y Venezuela, donde se obtuvieron 2.139 aislamientos de *Candida spp.*, cuya clasificación reveló que *Candida albicans* era la especie más frecuentemente aislada, seguida por *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*, al analizar los datos se encontró que *C. albicans* eran susceptibles al fluconazol, ligeramente menos susceptible resultaron ser *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* y la menor susceptibilidad se encontró en las especies *C. glabrata* y *C. krusei*, lo cual indicó que en ellas estaba la mayor resistencia (Catalina Bedout, 2012).

En la ciudad de Loja se realizó un estudio en mujeres embarazadas en la que la prevalencia de infección vaginal fue en su mayoría causada por hongos (Briceño, 2009).

Por lo que el fin de este trabajo de tipo descriptivo fue determinar la frecuencia de las 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, y relacionar la presencia de resistencia a fluconazol de las especies de *Cándida* con la recurrencia de la vulvovaginitis (VVR) y la edad. Cuyos resultados reflejaron que *Candida albicans* fue la especie que se presentó con mayor frecuencia seguida de *Candida krusei*, así mismo ambas presentaron resistencia a fluconazol en algunas cepas identificadas siendo *C. krusei* la que presentó una resistencia total a este antimicótico. También se identificó que la presencia de VVR no se relaciona con la resistencia a fluconazol y que se manifiesta principalmente en las mujeres en edades fértiles cuyos rangos etarios corresponden desde los 21 a los 44 años (OMS, 2010).

5. REVISIÓN LITERARIA

5.1. *Candida*

5.1.1. Generalidades

Los hongos del genero *Candida* por lo común crecen como levaduras redondeadas, ovals o con forma de yema de 4 a 6 μm que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas (Olivares., 2011).

5.1.2. Taxonomía del género *Candida*

- **Clase:** *Ascomycetes*
- **Subclase:** *Hemiascomycetes*
- **Orden:** *Saccharomycetales*
- **Familia:** *Saccharomycetes*
- **Género:** *Pichia, Hansenula, Arxiozyma* (Bonifaz, 2012).

Candida es un hongo que está presente en todos nosotros, se encuentra en las membranas superficiales y en las mucosas. En cantidades pequeñas es indemne pero cuando su crecimiento aumenta drásticamente puede estar devastando su salud. El hongo *Candida* suelta toxinas en el torrente sanguíneo que tiene un efecto devastador en el sistema nervioso y el sistema inmune (UNPA, 2012).

5.2. Morfología

El género *Candida* comprende más de 200 especies, pero solo cerca de 50 tienen un interés médico y de estas alrededor de ocho son las más frecuentes; sobresale *Candida albicans*, la que puede aislarse entre 40 hasta 85% de los casos. *Candida spp.*, son levaduras que no producen pigmentos melánicos, y su forma puede variar según la especie: globosas, ovoides, elípticas y cilíndricas; su reproducción asexual o anamórfica es por blastoconidios (holoblastica) (Bonifaz, 2012).

Los cultivos de *Candida spp.*, son similares; se desarrollan en diversos medios, como Sabouraud dextrosa, papa dextrosa y extracto de levadura agar; su promedio de crecimiento es entre dos y tres días a temperatura de 25-35°C; algunas especies son

termoresistentes, la mayoría forma colonias cremosas, limitadas, planas, opacas, y en ocasiones rugosas o surcadas, de color blanco o blanco-amarillento, con excepción de *C. guilliermondii*, que es rosa-pálido. Todas las especies patógenas oportunistas de *Candida* presentan pseudohifas largas, ramificadas, con pequeños o grandes cúmulos de levaduras o blastoconidios (excepto *C. glabrata*). La formación de clamidoconidios se hace a partir del pseudomicelio y solo dos especies lo generan; *C. albicans* con estructuras terminales o intercalares de 10 y 12 μm de diámetro, y *Candida dubliniensis*, con estructuras múltiples o en racimos del mismo tamaño (Bonifaz, 2012) (Koneman, 2008).

5.3. Especies

Los agentes patógenos son levaduras del género *Candida* pertenecientes al Phylum Ascomycotina. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos (Olivares., 2011).

Las especies de *Candida* más importantes son:

- *C. albicans*,
- *C. glabrata*,
- *C. tropicalis*,
- *C. parapsilosis*,
- *C. dubliniensis* (Bonifaz, 2012).

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* (Olivares., 2011).

5.4. Patogenicidad

Frecuentemente la candidosis de las mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal), es el primer signo del deterioro de la función inmunológica; por lo tanto, los episodios de candidosis en las superficies mucosas son muy frecuentes y difíciles de tratar, el deterioro de la respuesta inmune y a los factores de virulencia que posee *Candida*, como la propiedad de adherencia, la habilidad de competir con otros microorganismos por nutrientes y la capacidad de evadir las defensas del hospedero, interactúan entre sí, aumentando la frecuencia de la candidosis en el paciente inmunosuprimido (Panizo, 2011).

La candidiasis se genera en pacientes que tienen factores que predisponen a la invasión o sobre crecimiento de las levaduras. Los mecanismos de defensa de nuestro organismo ante una infección por *Candida* son muy complejos. En primer lugar es necesario que la piel y las mucosas estén intactas; cualquier proceso que produzca maceración o daño en la epidermis favorece a la invasión de levaduras. Una vez que las levaduras han llegado a la dermis o a la submucosa se inicia la respuesta inmune. Macrófagos, linfocitos y eosinófilos son capaces de fagocitar levaduras y dañar los filamentos y blastosporas de *Candida* (Panizo, 2011).

5.5. Identificación en laboratorio

Para el diagnóstico de laboratorio de hongos se usan métodos directos e indirectos; los métodos directos son aquellos que ponen en evidencia el agente o sus formas evolutivas, fragmentos, etc, y los métodos indirectos son aquellos que nos permiten suponer la presencia de un hongo en el organismo, mediante la respuesta del hospedero con producción de antígenos, anticuerpos, etc (Levaduras de interes médico, 2012).

5.5.1. Tipos de muestra

Para el análisis de *Candida* se pueden utilizar muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, muestras cutáneas como grandes y pequeños pliegues: axilar, interglúteo, inguinal, submamario, supra púbico, uñas, granuloma candidiásico; muestras de la mucosa oral, digestiva, bronquial, biopsias y las muestras que se usaron en este estudio fue de secreción vaginal (Biasoli, 2013).

5.5.2. Exámenes en fresco

El material se coloca sobre una lámina portaobjetos, montado en algún líquido o no, cubierto con una laminilla, para su observación al microscopio. Los líquidos de montaje: solución salina fisiológica, hidróxido de potasio (KOH) 10-20 %, lactofenol - azul algodón; estos facilitan la observación microscópica evitando distorsiones de la luz, reblandeciendo el material y/o aumentando el contraste de los objetos buscados (CEFA, 2012).

➤ **Exámen directo de KOH**

Examen que determina la presencia de hongos a través de una muestra de diferentes partes del cuerpo como: uñas, cuero cabelludo, lesiones, y en este caso secreción vaginal, entre otros (Risaraldal, 2011).

El KOH disuelve rápidamente la queratina de las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación y posee una sensibilidad del 70 al 80% en el hallazgo de levaduras. Adicionalmente, se puede emplear colorante para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización. Una vez realizado el examen en fresco o directo, la preparación se debe calentar suavemente en una fuente directa de calor (mechero, estufa); el objetivo de esto es acelerar la degradación de la queratina y saponificación de las grasas; un inconveniente de este procedimiento radica en que la potasa puede cristalizarse y dejar agujas que pueden obstruir la muestra o dar falsos positivos; este efecto se puede minimizar agregando 10% de glicerol, que además evita la evaporación y mantiene la concentración de la solución (Luis López, 2014).

Procedimiento

- Identificar la lámina portaobjeto con un rotulador o marcador
- Colocar una gota en el portaobjeto con la solución junto con la muestra y cubrir con laminilla cubre objeto, con el cuidado de no formar burbujas de aire.
- Examinar toda la preparación al fresco en el microscopio con objetivo 10x y 40x.
- Buscar presencia de levaduras o pseudohifas que se encuentren en la muestra.
- Anotar lo observado en el respectivo registro (Risaraldal, 2011).

Riesgos

- Muestra mal tomada.
- Muestra mal procesada.
- Ruptura de la preparación.
- Confusión de la muestra (Risaraldal, 2011).

Indicaciones al usuario

- No utilizar cremas o talcos antes del examen, ya que pueden enmascarar el hongo.
- No realizar tratamiento para hongos, 10 días previos al estudio (Risaraldal, 2011).

➤ **Exámen con solución salina (solución fisiológica)**

Es el exámen directo de la muestra en el microscopio se observa con objetivo de 10x y 40x, puede también detectar células indicadoras que son células epiteliales vaginales. Además ayuda a detectar hifas de hongos, pseudohifas y levaduras (Luis López, 2014).

Muestra requerida

Secreción vaginal, tomada con un hisopo estéril y colocado en un tubo con solución salina estéril (Luis López, 2014).

Procedimiento

- Identificar la lámina portaobjeto con un rotulador o marcador
- Colocar una gota en el portaobjeto con la solución junto con la muestra y cubrir con laminilla cubre objeto, con el cuidado de no formar burbujas de aire.
- Examinar toda la preparación al fresco en el microscopio con objetivo 10x y 40x.
- Buscar presencia de levaduras o pseudohifas que se encuentren en la muestra (Luis López, 2014).

Fuentes de error

- Contaminación de la muestra.
- Solución salina contaminada.
- Dejar secar la preparación.
- Formación de burbujas de aire en la preparación (Luis López, 2014).

➤ **Azul de lactofenol**

El examen microscópico es de gran importancia en micología para la observación de las diferentes especies de hongos de interés clínico. Se deben utilizar tinciones que logren preservar la integridad de las estructuras fúngicas. Para la correcta identificación de hongos de interés clínico, ya sea con fines de diagnóstico o estudios taxonómicos, es necesario observar las estructuras fúngicas con una alta calidad y contraste; para ello se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas. La tinción de azul algodón de lactofenol no es considerada una tinción diferencial, sin embargo, posee características tintoriales que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación (Luis López, 2014).

5.5.3. Tinciones

La ventaja de los colorantes es facilitar la identificación de células, bacterias, hongos o en general objetos microscópicos, los colorantes tiñen de forma parcial, total o gradual las diferentes estructuras que integran los objetos y principalmente los productos que se desean observar ayudando a la identificación morfológica del microorganismo. (Slidershare, 2011).

➤ Tinción de GRAM

La microscopía directa tiene una clara utilidad en el diagnóstico de las micosis, aunque puede obtener resultados falsos negativos y falsos positivos. La microscopía dispone de una sensibilidad menor que los cultivos, y la obtención de resultados negativos no descarta la existencia de una micosis. La tinción Gram tiñe la mayor parte de levaduras y las hifas presentes en las mismas. Casi todos los hongos son gram positivos, aunque algunos muestran un patrón motado o aparecen como gramnegativos como el *Cryptococcus neoformans*. Es útil para observar blastoconidias y pseudomicelios de las especies del género *Candida*, *Malassezia* y *Cryptococcus*, las cuales actúan como gram positivas con variaciones en la intensidad de la coloración (CEFA, 2012).

Procedimiento

- Colocar el frotis en un soporte para tinción y recubra la superficie con solución de violeta de genciana
- Luego de un minuto lave exhaustivamente con agua destilada o buffer.
- Cubra el frotis con lugol durante un minuto. Nuevamente lave con agua destilada.
- Colocar alcohol cetona por 10 segundos o hasta que la decoloración sea evidente.
- Enjuagar suavemente con agua destilada.
- Cubrir el frotis con safranina diluida por un minuto.
- Enjuagar suavemente con agua destilada
- Colocar el frotis en posición vertical, para permitir que el exceso de agua drene y el frotis se seque.
- Posteriormente se observará al microscopio con el objetivo de 100x (de inmersión), utilizando aceite de inmersión (Gardeweg., 2012).

5.5.4. Cultivo

Sirven para el aislamiento primario de una variedad de agentes. Pueden ser modificados con el agregado o cambio de algún componente para darle mayor especificidad (CEFA, 2012).

➤ **Tipos de cultivo**

- El más característico y clásico es el agar Sabouraud con glucosa (AGS). Se utiliza como medio de cultivo general y fundamentalmente para la realización de la descripción de las características morfológicas de la mayoría de los hongos
- Agar infusión cerebro-corazón (BHI) con o sin sangre de cordero al 5%, con o sin antibacterianos
- Agar papa dextrosa. Sin embargo, los hongos también pueden crecer en medios no selectivos, incluidos la mayoría de los medios bacteriológicos, si se incuban el tiempo suficiente.
- Medios cromogénico para levaduras: Cromocandida contienen diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromogénico. Muy útil para el estudio de levaduras (Manuel Estrella, 2012).

Agar Sabouraud dextrosa

Este medio de cultivo es utilizado para cultivo de mohos y levaduras patógenas y no patógenas. Es un tipo de medio de cultivo selectivo que contiene peptonas. Es utilizado para el cultivo de hongos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras, las colonias de candida que crecen son blanquecinas, opacas, cremosas, lisas, rugosas, algunas cerebróides (CLÍNICA, 2013).

Agar BHI (cerebro-corazón) con 5% sangre de oveja

El agar infusión cerebro-corazón con 5-10% de sangre de oveja adicionado de cloranfenicol y gentamicina inhibe el crecimiento de bacterias, pero permite el crecimiento de hongos, incluso de los más exigentes. Este agar se emplea como medio de aislamiento primario para el crecimiento de hongos, ya que permite una mejor recuperación de patógenos que el agar glucosa de Sabouraud (CLÍNICA, 2013).

El agar de patata y dextrosa (APD)

Es un medio común de cultivo microbiológico que se prepara a partir de infusión de patata y dextrosa. Es el medio más utilizado para el crecimiento de hongos y levaduras, puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano. Este medio es recomendado para realizar el recuento colonial. También puede ser utilizado para promover el crecimiento de hongos y levaduras de importancia clínica (CLÍNICA, 2013).

Cromo agar para *Candida*

Cromo agar *Candida* permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio. La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37°C durante 48 h para que las levaduras desarrollen completamente el color. Al cabo de este tiempo, las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45 °C, *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea. *C. krusei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco. *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio (CLÍNICA, 2013).

5.5.5. Otros exámenes de laboratorio

➤ Prueba del tubo germinal o filamentación precoz

El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans*, y en menor medida *C. dubliniensis*, son capaces de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* y *C. dubliniensis* del resto de las especies de *Candida* (Sicilia, 2013).

Falsos negativos: aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* dan negativa la prueba de los tubos germinales. Si se utiliza un inóculo demasiado abundante de levaduras (Sicilia, 2013).

Metodología:

- Emulsionar una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano, de caballo o de conejo.
- Incubar a 35°C durante 2 horas.
- Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubreobjetos y visualizar a 100 X, 400 X ó 1000 X. (Sicilia, 2013)

Interpretación: La prueba es positiva si se visualizan tubos germinales (Sicilia, 2013).

➤ Pruebas bioquímicas

Al igual que en la mayoría de levaduras, las pruebas bioquímicas se basan en el empleo de carbohidratos, ya que existe un perfil para cada uno de ellos, se usan dos métodos: Zimograma o fermentación y Auxonograma o utilización. El primero se hace en cultivo líquido adicionando el carbohidrato en estudio más un indicador de pH ácido y campana de fermentación (gas); el segundo se realiza en medio sólido con base peptona, y los carbohidratos se agregan en forma de disco de papel impregnado con el sustrato. Similar a sensidiscos de antibióticos (Bonifaz, 2012).

➤ Técnicas de biología

Se basan en PCR, son rápidos para la identificación de *Candida spp*, que los métodos fenotípicos, permite identificar aquellas especies que no han podido ser determinadas por métodos fenotípicos, la desventaja de este método es que son muy costosos, no son aplicables a laboratorios clínicos sino a laboratorios de referencia y requiere de personal especializado (Levaduras de interés médico, 2012).

➤ Técnicas alternativas al cultivo

- Detección de manano y anti-manano
- Detección de (1-3)-β-D-glucano
- Detección de anticuerpos anti-micelio
- Detección de ácidos nucleicos (SEIMC, 2010).

5.6. CANDIDIASIS

Son micosis producidas por hongos saprofitos o saprobios que, en condiciones normales, no generan enfermedad a humanos o animales, también se la define como micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *Candida albicans*; presenta una variedad de cuadros clínicos; afecta en particular mucosas (boca, vagina, etc.), piel, unas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestino (Bonifaz, 2012).

5.6.1. Superficiales

Candida albicans es la más frecuente en micosis superficiales 60-90%. Dentro de las micosis superficiales tenemos:

- Candidiasis cutáneas: afecta a los pliegues, causa foliculitis, onicomycosis (perionixis, onicólisis y onixis), micosis en el área del pañal, pustulosis, granulomatosa, cutánea congénita (Candidiasis Superficiales., 2012) (Bonifaz, 2012).
- Candidiasis mucosas: orofaríngea, vulvovaginal, balanitis, mucocutánea crónica, gastrointestinal, bronquial/pulmonar (Candidiasis Superficiales., 2012) (Bonifaz, 2012).

5.6.2. Profundas

Candidiasis profunda o sistémica, es producida por *Cándida albicans* y otras especies del mismo género, capaces de invadir sangre y otros órganos profundos. Las levaduras de *Cándida* son colonizadoras de la mucosa rectal, vaginal y bucal, por lo que las infecciones pueden ser endógenas; también se ha demostrado la transmisión interpersonal o como resultado de contaminación con sondas y catéteres (Micosis Profundas., 2010).

Hay diversas clases de candidiasis profundas como:

- Candidiasis profunda localizada: esofágica, pulmonar, renal, entre otros.
- Candidiasis profundas sistémicas: puerta de entrada variable con diseminación linfohemática y compromiso de uno o varios parénquimas (Micosis Profundas., 2010).

5.6.3. Vulvovaginitis

La vulvovaginitis es la inflamación de la vulva, la vagina o ambas estructuras a la vez. Alrededor del 90% están causadas por *Candida*, *Trichomonas* o son vaginosis bacterianas (Benito Ibarrola, 2011).

5.6.3.1.Generalidades

La vulvovaginitis candidiásica representa el 25% de las vaginitis y el 90% de las mismas está producido por *Cándida albicans*. Se entiende por vulvovaginitis recurrente cuando existen más de cuatro episodios en un año. La clínica característica es el prurito intenso acompañado de leucorrea blanquecina en forma de grumos y no maloliente. A su vez produce eritema, edema vulvar y dispareunia (Benito Ibarrola, 2011).

5.6.3.2.Agente etiológico

El género *Candida* incluye cerca de 154 especies, de las cuales seis son las aisladas más a menudo de infecciones humanas. *Candida albicans*, es el agente causal más frecuente como colonizador y responsable de la mayor parte de los casos de vulvovaginitis por hongos, las demás comprenden *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Sin embargo, en los últimos decenios se ha incrementado la incidencia de infecciones causadas por especies no *albicans*, principalmente *Candida glabrata* (Reascos, 2012).

5.6.3.3.Factores de riesgo

Un factor de riesgo es algo que hace que las probabilidades de contraer una enfermedad o condición aumenten (Quintanilla, 2010).

5.6.3.3.1. Embarazo

Es uno de los estados por los cuales pasan las mujeres a lo largo de la vida, que tiene una serie de cambios fisiológicos hormonales, tolerancia inmunitaria y elevadas concentraciones de glucógeno en la vagina por el cambio de pH, lo cual predispone a una colonización por *Candida* (Quintanilla, 2010).

5.6.3.3.2. Edad

Se presenta en todas las edades principalmente en las mujeres de edad fértil entre 15 y 45 años; el padecimiento afecta a ambos sexos por igual; solo los casos genitales son más

frecuentes en la mujer por las condiciones anatómicas propias de la vagina y debido al cambio de las condiciones climáticas, el aumento de la humedad y el uso de ropa interior, no adecuada o en forma inadecuada, que no permita la transpiración de la piel de la vulva aumentan el número de gérmenes patógenos presentes que generan síntomas: el más frecuente es el prurito o picazón (Quintanilla, 2010) (Bonifaz, 2012).

5.6.3.3.3. Actividad sexual

El 75% de las mujeres con actividad sexual son afectadas al menos una vez en su vida, y un 10% se hacen recurrentes y dan síntomas crónicos, relaciones sexuales sin la adecuada lubricación o demasiado agresivas causando este tipo de infecciones (Martín, 2011).

5.6.3.3.4. Genética

Estas infecciones no tienen ningún factor hereditario, si una persona tiene procesos de infecciones por micosis o vulvovaginitis recurrentes, se debe investigar si hay algún estado de inmunodepresión o alteración del nivel de glucemia (diabetes) ya que este tipo de enfermedades favorecen la aparición de este tipo de infecciones en forma recurrente (Suzuki, 2011).

5.6.3.3.5. Otros factores

Se debe considerar como factores externos que contribuyen a que se desarrollen infecciones por *Candida* las terapias donde se utiliza antibióticos de amplio espectro, donde actúan destruyendo los agentes patológicos y la flora saprófita del organismo del paciente (Quintanilla, 2010).

5.6.3.4. Tratamiento

Depende del tipo de candidosis y del factor predisponente al que esté ligado; por tanto, a veces la terapia es muy sencilla y solo requiere tratamientos tópicos, mientras que en otras situaciones es necesario que sea por vía sistémica y por tiempo prolongado (Bonifaz, 2012).

5.6.3.4.1. Generalidades

Hay diversos tratamientos que se pueden utilizar entre ellos tenemos:

➤ **Tratamientos tópicos**

Algunos son tan sencillos que su único objetivo es corregir el pH; por ejemplo, las soluciones ácidas (una cucharada de vinagre blanco en un litro de agua) son muy útiles para lavados vaginales y en la candidosis del área del pañal. Se utilizan soluciones básicas (solución saturada de bicarbonato de sodio), para las lesiones mucocutánea se usa tópicamente con buenos resultados en forma de ungüentos, cremas, óvulos, cremas vaginales y geles (Bonifaz, 2012).

➤ **Tratamiento sistémico**

Las candidiasis producidas por *Candida albicans* se trata con azoles por vía oral, entre los principales azoles tenemos: ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, posaconazol y ravuconazol. En muchos casos son la terapia de elección para la mayoría de las candidosis; se deben emplear en casos muy extensos, crónicos y rebeldes a tratamientos tópicos (Bonifaz, 2012) (Quintanilla, 2010).

5.6.3.4.2. Antimicóticos para tratar candidiasis superficiales – vulvovaginitis

El único azol aprobado 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) (PUBMED, 2010).

Los azoles tópicos pueden ser utilizados en el primer trimestre del embarazo. En la candidiasis vulvovaginal no complicadas todas las formas de antimicóticos disponibles son altamente efectivas, tanto orales como tópicos. En la candidiasis vulvovaginal complicadas se debe realizar un tratamiento más prolongado de 5-7 a 10-14 días de terapia convencional. Algunos datos sugieren que se requiere más de una dosis de fluconazol. (PUBMED, 2010).

5.7. FLUCONAZOL

El fluconazol es un antifúngico, que pertenece al grupo de los azoles, concretamente a la clase de los triazoles, su mecanismo de acción reduce la concentración de ergosterol, esencial para la integridad de la membrana citoplásmica fúngica y su efecto es fungistático.

Su espectro de acción incluye: *Candida albicans* y otras especies de *Candida* excepto *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. ciferri* y *C. inconspicua*. El 50% de las cepas de *C. glabrata*, casi un 50% de las de *C. famata* y en torno al 10% de las de *C. tropicalis* son parcial o totalmente resistentes (Villa, 2012).

Es una alternativa terapéutica habitual en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas específicas, su actividad se basa en inhibir al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14- α -dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (SciELO, 2010).

Se ha asociado con casos aislados de toxicidad hepática severa, incluyendo fatalidades, principalmente en pacientes con condiciones médicas subyacentes severas. En raras ocasiones, los pacientes han desarrollado desórdenes exfoliativos de la piel durante el tratamiento con fluconazol (Facmed, 2011).

5.7.1. Desarrollo de resistencia a fluconazol

➤ Resistencia en hongos

- Primaria: posee una resistencia natural al mismo sin necesidad de haber estado en contacto con el compuesto. Ejemplo: *C. krusei* y fluconazol
- Secundaria: una cepa previamente sensible adquiere resistencia al compuesto tras haber entrado en contacto con él. Ejemplo: *C. albicans* y fluconazol /tratamiento prolongado con la droga (Biasoli, 2013).

➤ Mecanismos de resistencia

Los derivados triazólicos como el fluconazol (FCZ) inhiben de forma selectiva la enzima 14 α esterol demetilasa en la síntesis del ergosterol, que es dependiente del citocromo p450. La depleción del ergosterol, en conjunto con la acumulación de compuestos intermedios en la síntesis del mismo, conlleva a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática. Se describen tres posibles mecanismos en la génesis de la resistencia: el primero es la modificación del enzima blanco; el segundo, la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antibiótico en el sitio de acción por la presencia de

barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo; y por último, la inactivación del antibiótico por modificación del mismo. De todos éstos, en el caso de los azoles sólo se conocen los dos primeros como potenciales causas de resistencia (Quintero, 2011).

En las especies de *Candida* y en muchos otros hongos, el gen ERG11 se encarga de la síntesis de la Erg11p o la enzima 14 α demetilasa indispensable para la síntesis del ergosterol. La resistencia a los azoles se ha descrito en aislamientos clínicos en los que se demuestra una disminución de la expresión de dicha enzima o la presencia de mutaciones específicas que la afectan en su estructura o función; y puede ser inducida por regulación negativa de su síntesis tras la exposición prolongada al fluconazol (Quintero, 2011).

5.7.2. Antifungigrama

Mide la susceptibilidad de las levaduras a distintos agentes antifúngicos. (Micológico, 2011)

5.7.2.1.Métodos de susceptibilidad a los antimicóticos

➤ Métodos de dilución en caldo

Los métodos de dilución en caldo constituyen el estándar de oro para determinar la susceptibilidad in vitro, tanto de levaduras como de hongos filamentosos y miden la concentración inhibitoria mínima de distintos fármacos antifúngicos, como anfotericina B, fluocitosina, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y los nuevos triazoles como voriconazol, posaconazol y ravuconazol (CLSI, 2007).

➤ Método de microdilución- levaduras (M27-A3)

El medio de cultivo que ha dado mejor concordancia, tanto intra como interlaboratorio, es el medio sintético RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M, ajustado a pH 7 \pm 0,1 y con 0,2% de glucosa (CLSI, 2007).

Preparación:

- Disolver en 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución.
- Ajustar el pH a 6,9 - 7,1
- Añadir agua destilada hasta completar 1 litro.

- Filtrar estérilmente.
- Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses) (CLSI, 2007)

➤ **Inóculo para *Candida spp.***

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) que se resuspenden en un tubo de solución salina (CINa 0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml. Posteriormente se realiza una dilución 1:1000 con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute). Esta última dilución es la que se utiliza para inocular las placas de antifúngico (Tapia, 2012).

La concentración final de levaduras en las placas será de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ (Tapia, 2012)

Inoculación de las placas

- El día del ensayo se sacan las placas del congelador y se dejan a temperatura ambiente hasta su completa descongelación.
- Se inoculan con 100 μ l de la suspensión de levadura desde el pocillo 2 hasta el 12.
- El pocillo n° 1 contiene 200 μ l de RPMI, se utiliza para el control de esterilidad del medio. También sirve para leer la absorbancia del medio.
- El pocillo n° 12 no contiene antifúngico pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento (Tapia, 2012).

Incubación de las placas

Las placas se incuban a 35 °C. Las inoculadas con especies del género *Candida* durante 48 h y las inoculadas con *C. neoformans* durante 72 h (Tapia, 2012).

➤ **Método de macrodilución - levaduras**

Se utilizan tubos estériles de 11x70 mm.

Volumen final: 1 ml. El medio de cultivo y preparación del mismo, la solución madre y diluciones del antifúngico igual al método de microdilución (Tapia, 2012).

Preparación del inóculo

Se siguen las mismas recomendaciones que para el método de microdilución. A partir de la suspensión ajustada a la escala 0,5 de McFarland se diluye 1/100 en medio RPMI y se inoculan los tubos que contienen las concentraciones de antifúngico con 0,9 ml del inóculo diluido lo cual diluye estas concentraciones 1/10 (Tapia, 2012).

Temperatura y tiempo de incubación

Igual que para el método de microdilución.

Lectura de los resultados

La lectura se hace visualmente a las 48 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control. Por ejemplo: La CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de los azoles, anfotericina B y 5-fluorocitosina es la concentración de antifúngico más baja que produce una inhibición total del crecimiento debe leerse a las 24 h en *Aspergillus spp* y a las 48 h en *Sedosporium spp* (Tapia, 2012).

Lectura visual

La lectura visual debe realizarse con ayuda de un espejo invertido.

0 = ópticamente claro

1 = ligeramente turbio

2 = disminución prominente de la turbidez

3 = ligera disminución de la turbidez

4 = sin disminución de la turbidez

Lectura espectrofotométrica: Aunque no es la recomendada por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), puede hacerse una lectura espectrofotométrica a 405 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio), también puede leerse a 490 y 530

nm ya que, prácticamente, la CMI no varía. Antes de realizar la lectura espectrofotométrica es conveniente agitar las placas para obtener una suspensión homogénea (Tapia, 2012).

➤ **Métodos de difusión de disco**

Es un método simple, idóneo para ser realizado en agentes solubles en agua como flucitosina, fluconazol y voriconazol. Fue estandarizado por el CLSI en el documento M44-A para especies de *Candida*. Este método provee una zona de inhibición y la medida de ésta puede ser correlacionada con el valor de CIM, el cual fue demostrado por varios miles de levaduras aisladas en un estudio multinacional. La desventaja es que sólo existen puntos de corte para fluconazol y voriconazol. La utilización de azul de metileno, disperso en la superficie de la placa, parece mejorar los límites de la zona de inhibición y facilitar la lectura (CLSI, 2007).

Medio de cultivo

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. Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas sensibles y resistentes a fluconazol, presentando buena correlación con el método M27-A3 y con los datos in vivo. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a las 24 y 48 h, se recomienda realizarla a las 24 h (CLSI, 2007).

Solución Madre de Glucosa (40%)

- Glucosa 40 g
- Agua destilada 100 ml

Calentar suavemente hasta completa disolución de la glucosa.

Solución Azul Metileno (5 MG/ML)

- Azul metileno 0,1 g

Solución Madre de Glucosa-Azul de Metileno (GAM)

- Añadir 200 µl de la solución de azul de metileno a 100 ml de la solución madre de glucosa para obtener una solución GAM con una concentración final de glucosa de 0,4 mg/ml y 10 µg/ml de azul de metileno.
- Dispensar en viales en alícuotas de 3,5 o 1,5 ml.
- Esterilizar en autoclave 25 min a 121 °C.
- Guardar a temperatura ambiente (máximo 1 año) (CLSI, 2007).

Preparación de Placas MHA Suplementado con Glucosa y Azul de Metileno

- Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.
- Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.
- Esterilizar en autoclave.
- Dejar enfriar el medio a 45-50 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9-10 cm de diámetro y 67-70 ml si son de 5 cm (altura de la capa de agar 4 mm).
- Dejar enfriar y guardar en nevera (CLSI, 2007).

Una vez preparadas las placas se pueden almacenar durante 7 días a menos que se tomen precauciones adicionales que eviten el secado de las placas

Preparación del inóculo

- Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento.
- Se resuspenden en un tubo de solución salina estéril como se ha descrito para el método M27-A3.
- Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina (CLSI, 2007).

Inoculación de las placas

- Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
- Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.

- Sembrar la placa uniformemente.
- Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.
- Aplicar los discos (CLSI, 2007).

Temperatura y tiempo de incubación

Incubar a 35 °C durante 20-24 h para *Candida spp.* y 48 h para *Cryptococcus spp.*

Lectura

Si no hay suficiente crecimiento a las 24 h reincubar y leer a las 48 h. Medir el 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. *C. glabrata* y *C. krusei*, pueden necesitar 48 h de incubación (CLSI, 2007).

➤ **Etest**

Es uno de los métodos más utilizados debido a su fácil implementación y lectura. Actualmente se encuentra aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para susceptibilidad in vitro de *Candida spp* contra fluconazol e itraconazol.

- Involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar.
- Aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, lo cual permite determinar la CIM.
- La placa se incuba a 37 °C por 24-48 h y se genera una elipse de inhibición que permite obtener la CIM.

Este método ha sido uno de los más eficaces comparado con el método de referencia de microdilución para detectar resistencia a anfotericina B en especies de *Candida*. Presenta dificultades en la lectura con *C. tropicalis*, *C. neoformans* y *Trichosporon asahii* (SciELO, Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos , 2012).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación de tipo descriptivo y corte transversal se realizó en la ciudad de Loja en el Centro de Salud N° 1 durante el periodo Marzo – Junio del 2015

6.2. ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en la ciudad de Loja ubicada al este de la provincia de Loja, en el Sur de la sierra ecuatoriana. El lugar de estudio fue el Laboratorio Clínico del Centro de Salud N° 1 durante el periodo Marzo – Junio del 2015 ubicado en las calles Sucre entre Lourdes y Carimanga al cual acudieron las mujeres embarazadas que participaron en la investigación y cuyas muestras fueron analizadas en el Laboratorio Clínico “Centro de Diagnóstico Médico” de la Universidad Nacional de Loja ubicada en la avenida Manuel Ignacio Monteros.

Durante el año 2014 fueron atendidas 216 mujeres embarazadas en el Laboratorio Clínico del Centro de Salud N° 1 para realizarse un examen de secreción vaginal.

6.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

6.3.1. Universo

Las 127 mujeres embarazadas con pedido de secreción vaginal que asistieron al Laboratorio del Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja en el periodo Marzo – Junio del 2015.

6.3.2. Muestra

Estuvo conformada por 67 mujeres embarazadas que se realizaron el examen de secreción vaginal en el Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja durante el periodo Marzo – Junio del 2015; 60 se excluyeron del estudio ya que las condiciones de toma de muestra no eran las indicadas y en otros casos no se dio consentimiento.

6.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Mujeres embarazadas que acudieron al laboratorio clínico del Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja con pedido de análisis de secreción vaginal durante el periodo Marzo – Junio del 2015.

2. Mujeres embarazadas que voluntariamente dieron el consentimiento informado y contestaron la encuesta.

6.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Mujeres no embarazadas.
2. Mujeres embarazadas con tratamiento antifúngico.
3. Mujeres embarazadas que no se encuentren en condiciones adecuadas para la toma de muestra.

6.6. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

6.6.1. FASE PREANALÍTICA

- Oficio de aprobación para la realización de la investigación en el Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja dirigido al Director del mismo. (Anexo 1).
- Oficio de aprobación dirigido a la Directora del Área de la Salud Humana para la realización del análisis de las muestras en el Laboratorio Clínico “Centro de Diagnóstico Médico” de la Universidad Nacional de Loja. (Anexo 2).
- Aplicación del consentimiento informado y encuesta a las mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N° 1 de la ciudad de Loja (Anexo 3 y 4).
- Se comunicaron las condiciones adecuadas para la toma de muestra de la paciente, recolección y toma de muestras con solución salina y KOH. (Anexo 5).
- Transporte de las muestras al laboratorio para su análisis. (Anexo 6).
- Se realizaron medios de cultivo Sabouraud, Chromo Agar y Mueller Hinton, los cuales una vez preparados se incubaron por 48 horas a 35°C para realizar control de esterilidad. (Anexo 7,8 y 9 respectivamente).
- Se realizaron pruebas piloto con muestras de secreción vaginal positivas con hongos y se cultivaron en los medios de cultivo Sabouraud, Cromo Agar y Mueller Hinton. (Anexo 16).

6.6.2. FASE ANALÍTICA

- Examen con KOH a las muestras recolectadas. (Anexo 10).

- Cultivo en medio Sabouraud a las muestras recolectadas con solución salina. (Anexo 11).
- En las muestras que hubo crecimiento se hizo un pase a Cromo agar y se incubó por 24 horas a 35°C. (Anexo 12).
- Posteriormente se hizo un inóculo de las muestras con crecimiento para el cultivo en agar Mueller Hinton y se realizó el antifungigrama por el método de difusión en disco según la técnica del CLSI para el estudio de la sensibilidad de los antifúngicos M44-A. (Anexo 13).

6.6.3. FASE POST- ANALÍTICA

- Registro de resultados. (Anexo 14).
- Entrega de resultados (Anexo 15).
- Fotos relatoria del trabajo de ensayo (Anexo 16).

6.7. ANÁLISIS Y TABULACIÓN DE DATOS

Los resultados se tabularon mediante el cálculo de frecuencias utilizando estadística descriptiva, lo que se presenta en tablas y gráficos de barras porcentuales para su interpretación.

7. RESULTADOS

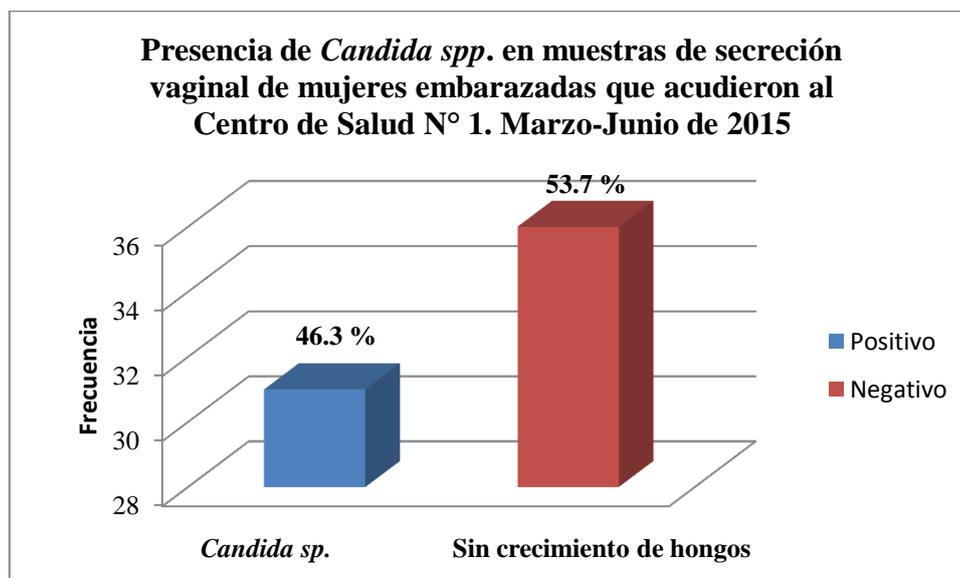
TABLA N°1

Presencia de *Candida spp.* en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N° 1. Marzo-Junio de 2015

RESULTADO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Positivo	31	46.3%
Negativo	36	53.7%
TOTAL	67	100 %

FUENTE: Registro de resultados de investigación
ELABORADO POR: Carol Chillogallo

GRÁFICO N° 1



FUENTE: Registro de resultados de investigación
ELABORADO POR: Carol Chillogallo

INTERPRETACIÓN: Se analizó un total de 67 muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas, de las cuales 31 pacientes (46.3%) dieron positivas para *Candida sp.*; demostrándose así que hay una mayor frecuencia de infecciones vaginales que podrían ser provocadas por otro microorganismo que no son hongos (Alonso, 2014).

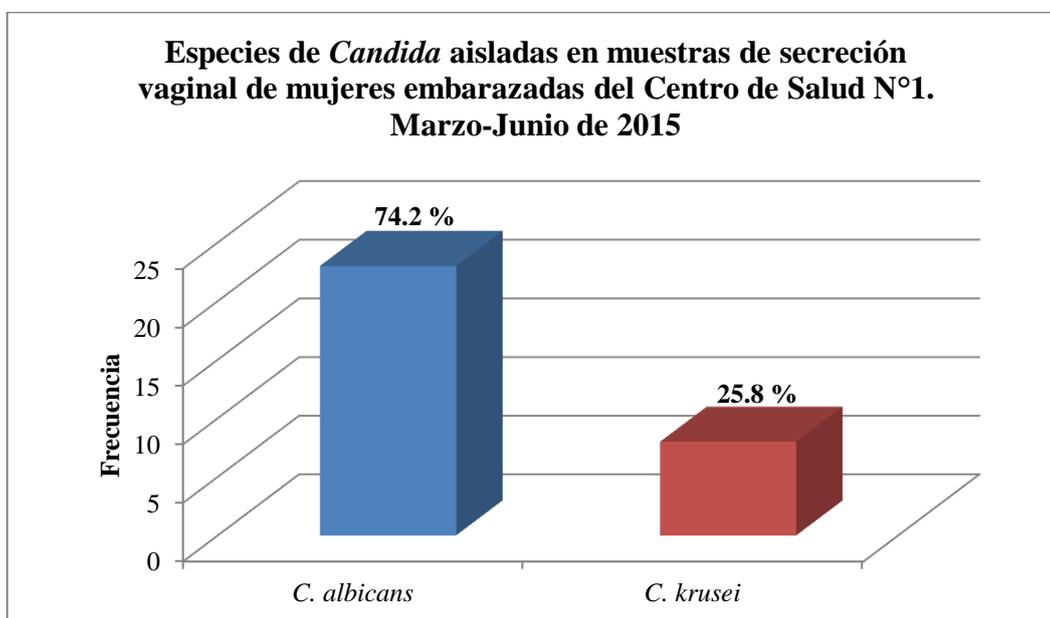
TABLA N° 2

Especies de *Candida* aisladas en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas del Centro de Salud N°1. Marzo-Junio de 2015

ESPECIES	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>C. albicans</i>	23	74.2%
<i>C. krusei</i>	8	25.8%
TOTAL	31	100 %

FUENTE: Registro de resultados de investigación
ELABORADO POR: Carol Chillogallo

GRÁFICO N° 2



FUENTE: Registro de resultados de investigación
ELABORADO POR: Carol Chillogallo

INTERPRETACIÓN: La especie de *Candida* mayormente aislada que causó vulvovaginitis en las mujeres embarazadas que participaron en este estudio fue *C. albicans* con una frecuencia de 23 casos que corresponden al 74.2%, seguida de *C. krusei* con 8 casos con el 25.81%, que fueron las especies que se presentaron en esta investigación, probablemente porque *Candida sp* forma parte de la flora endógena normal de la vagina (López, 2014).

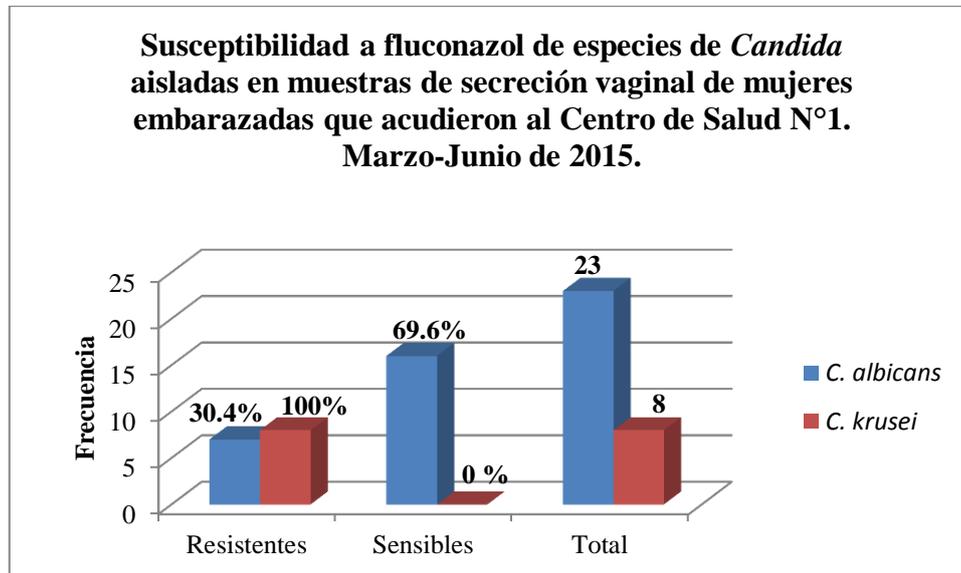
TABLA N°3

Susceptibilidad a fluconazol de especies de *Candida* aisladas en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N°1. Marzo-Junio de 2015.

Especies	Resistentes	Porcentaje	Sensibles	Porcentaje	Total	% Total
<i>C. albicans</i>	7	30,4%	16	69.6 %	23	100%
<i>C. krusei</i>	8	100%	0	0%	8	100%

FUENTE: FUENTE: Registro de resultados de investigación
ELABORADO POR: Carol Chillogallo

GRÁFICO N° 3



FUENTE: Registro de resultados de investigación
ELABORADO POR: Carol Chillogallo

INTERPRETACIÓN: De lo descrito se destaca que el 30.4% de *Candida albicans* son resistentes a fluconazol mientras que el 100% de *Candida krusei* lo son; situación que obedece a la resistencia natural de *C. krusei* al antimicótico probado (Villa, 2012).

TABLA N°4

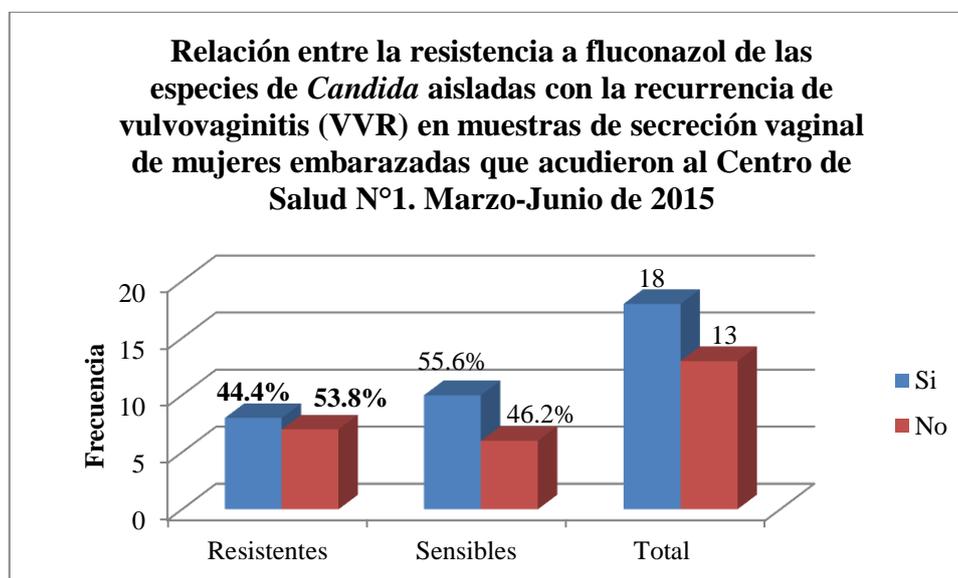
Relación entre la resistencia a fluconazol de las especies de *Candida* aisladas con la recurrencia de vulvovaginitis (VVR) en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N°1. Marzo-Junio de 2015.

VVR	Resistentes	Porcentaje	Sensibles	Porcentaje	Total	% Total
Si	8	44.4 %	10	55.6 %	18	100%
No	7	53.8 %	6	46.2 %	13	100%

FUENTE: Registro de resultados de investigación

ELABORADO POR: Carol Chillogallo

GRÁFICO N° 4



FUENTE: Registro de resultados de investigación

ELABORADO POR: Carol Chillogallo

INTERPRETACIÓN: Se define como vulvovaginitis recurrente (VVR) aquella que se presenta en cuatro o más episodios al año, es por ello que de las 31 personas con candidosis vaginal, 18 presentaron VVR de las cuales 8 casos que corresponden al 44.4% fueron resistentes; mientras que el 53.8% (n=7) de las mujeres que no presentan VVR también tienen especies resistentes; de manera que en este estudio no se correlaciona la recurrencia de las infecciones con la susceptibilidad del hongo al fluconazol (Tapia, 2012).

TABLA N° 5

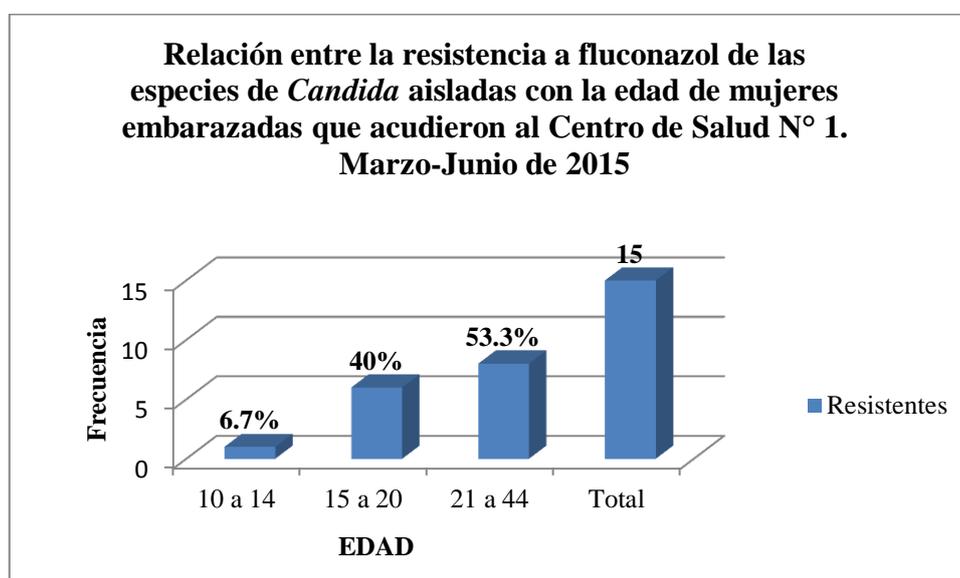
Relación entre la resistencia a fluconazol de las especies de *Candida* aisladas con la edad de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N° 1. Marzo-Junio de 2015

Edad	10 a 14	15 a 20	21 a 44	Total
Resistentes	1	6	8	15
Porcentaje	6.7 %	40%	53.3 %	100%

FUENTE: Registro de resultados de investigación

ELABORADO POR: Carol Chillogallo

GRÁFICO N° 5



FUENTE: Registro de resultados de investigación

ELABORADO POR: Carol Chillogallo

INTERPRETACIÓN: Para cumplir con este objetivo se realizó la clasificación en 3 rangos etarios de acuerdo a la OMS; se observa que la mayor frecuencia de resistencia a fluconazol se presenta en el rango etario de 21 a 44 años de edad que son las edades de fertilidad de la mujer en la etapa adulta (OMS, 2010).

8. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos de la presencia y distribución de especies de *Candida* en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas corroboran estudios similares en varios países como Brasil donde un estudio involucró a 300 mujeres embarazadas que fueron confirmadas con levaduras en 90 casos (30%), resultando las especies más frecuentes *C. albicans* (61.1%), *C. krusei* (16.7%), *C. tropicalis* (6.7%), *C. glabrata* (4.4%) y *Candida sp* (11.1%); en los casos de vulvovaginitis recurrente, *C. albicans* fue la especie más encontrada con una prevalencia superior, en cambio, *C. krusei* apareció como la segunda especie más prevalente en todas las muestras además hubo un predominio en los grupos de edad de 21 a 30 años y de 41 a 50 años; estos resultados son similares a esta investigación en donde las muestras positivas con levaduras fue de un 46.3% (n=31), en cuanto a la especie más prevalente fue *C. albicans* con 74.2% (n=23) seguida de *C. krusei* con 25.8% (n=8) que fueron las especies que se presentaron en este estudio (Basso, 2012).

En Argentina se realizó un estudio con el método de difusión en disco del CLSI M44-A con 46 muestras donde los porcentajes de identificación fueron: *C. albicans* 70%, *C. glabrata* 15%, *C. guilliermondii* 11%, *C. krusei* 4% y la resistencia a fluconazol fue de un 100% para *C. krusei*, resultado similar en cuanto a la resistencia a fluconazol de *C. krusei* con el mismo porcentaje para nuestro estudio (Florida, 2011).

En Caracas de 63 gestantes 24 (38%) presentaron candidiasis vaginal donde *Candida albicans* fue la especie más frecuente (88%), seguida por *C. glabrata* (8%) y *C. krusei* (4%) y el grupo etario de 15 a 20 años fue el más afectado, 12 casos (50%), se observa que al igual que en esta investigación la especie más frecuente es *C. albicans* sin embargo la edad más afectada difiere ya que en este estudio el grupo etario prevalente fue entre 21 a 44 años (Torres, 2010).

En Medellín en el año 2009 se hizo un estudio a 300 mujeres gestantes; se usó el método de difusión en disco del CLSI M44-A, la prevalencia de *Candida spp.* fue de 33,3% (*C. albicans*, 77%; *C. parapsilosis*, 11%; *C. tropicalis*, 5%; *C. glabrata*, 3%; *C. guilliermondii*, 2%; *C. kefyr* 1%, y *C. famata*, 1%). Todos los aislamientos mostraron sensibilidad al fluconazol, sin embargo en esta investigación el 30,4% (n=7) de *C. albicans* fueron resistentes a fluconazol y 100% (n=8) *C. krusei* datos comparables a nuestro estudio (Duque C., 2010).

En nuestro país en la ciudad de Latacunga se realizó un estudio a 108 pacientes con candidiasis vaginal de las cuales el 93% (n=100) presentaron vulvovaginitis recurrente (VVR) provocadas por *C. albicans*, el 72% resultaron resistentes a fluconazol cuyas edades eran de 30 a 35 años, aquí la resistencia a fluconazol se realizó sólo en las especies de *C. albicans* lo cual nos lleva a plantear la necesidad de realizar la identificación de las demás especies debido los datos descritos tanto en este estudio como en otros mencionados (Solís, 2014).

En la ciudad de Portoviejo se hizo un estudio a 420 mujeres embarazadas de las cuales 134 presentaron candidiasis cuyo rango de edad más prevalente oscilaba entre 24 y 27 años, a pesar de que hay un gran número de embarazadas con candidiasis vaginal en esta investigación no hay la identificación de especies, dato muy importante para un diagnóstico correcto (Murillo, 2013).

En la ciudad de Catamayo se realizó un estudio a 106 mujeres entre los 16 y 60 años, 68 pacientes (64%) presentaron levaduras presumibles de *Cándida*, lo que sugiere la importancia del diagnóstico completo en el laboratorio para la identificación de levaduras, la especie y completar con el ensayo de susceptibilidad a un antimicótico como el fluconazol considerando que es una de las opciones de tratamiento empírico (Gomez, 2013).

Se puede concluir que en la población estudiada de mujeres embarazadas las levaduras del género *Candida* presentan un porcentaje preocupante de resistencia a los antifúngicos; condición que se debe sospechar si se aísla *C. krusei*. Se recomienda la identificación a nivel de especie y si es posible pruebas de sensibilidad a los antifúngicos en caso de falla terapéutica y candidiasis recurrente.

9. CONCLUSIONES

- La especie más común aislada en muestras de secreción vaginal es la *Candida albicans* (n=23); presentando un porcentaje preocupante de resistencia a fluconazol (n=15) que es el principal antimicótico usado para el tratamiento.
- La resistencia a fluconazol de *Candida krusei* (n=8) fue mayoritaria al de *C. albicans* (n=7), por lo que se debe considerar la identificación a nivel de especie para un buen diagnóstico, dado que algunas especies de *Candida* presentan una resistencia natural a este antimicótico.
- En el presente estudio la vulvovaginitis recurrente (VVR), no fue un factor determinante para la resistencia a fluconazol, el grupo más vulnerable que presento VVR se encuentra entre las edades de 21 a 44 años, es decir, en su etapa de fertilidad.

10. RECOMEDACIONES

Culminada la investigación se recomienda:

- A pesar que los aislados de *Candida albicans* continúan siendo más frecuentes, se recomienda la identificación de especie, con la finalidad de tener información confiable que guie en el tratamiento, ya que conocemos de la resistencia intrínseca a fluconazol expresada por *C. krusei*; lo cual contaría como una falla terapéutica.
- Realizar la investigación de sensibilidad antifúngica, para asegurar el tratamiento terapéutico adecuado.
- Es necesario realizar estudios similares ampliando las variables de población y lugares de estudio, con el fin de contar con un perfil epidemiológico confiable que permita estandarizar tratamientos empíricos de acuerdo a nuestra realidad.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alonso, S. F. (2014). Flujo vaginal . Obtenido de <http://www.flujovaginal.com/c/infeccion-vaginal/>

Basso, R. (Septiembre de 2012). Etiología de la candidiasis vulvovaginal recidivante en la Atención Primaria de Salud en Santa Catarina, Brasil. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572012000300008

Benito Ibarrola, A. Z. (2011). Patología infecciosa: vulvovaginitis, enfermedades de transmisión sexual, enfermedad inflamatoria pélvica, abscesos tubo-ováricos. Obtenido de <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v32s1/ginecologia3.pdf>

Biasoli, D. M. (03 de Diciembre de 2013). Candidiasis. Recuperado el 12 de Noviembre de 2014, de Candidiasis : http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf

Bonifaz, A. (2012). Micología Médica Básica. Mexicana, Reg. Núm. 736.

Briceño, L. (2009). Vaginitis y vaginosis en mujeres de edad fértil . Obtenido de http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/8696/1/UTPL_Ligia_Gabriela_Brice%C3%B1o_Mogrovejo_1074415.pdf

Candidiasis Superficiales. (2012). Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/teo09/micsup.pdf>

Catalina Bedout, J. A. (2012). Evaluación de la susceptibilidad de *Candida* a fluconazol. Obtenido de Biomedica: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.revistabiomedica.org%2Findex.php%2Fbiomedica%2Farticle%2Fdownload%2F1195%2F1310&ei=85FiVduFGYnksATezIGwCA&usq=AFQjCNG35e-GoPR3QHE8sje_f3mhP

Cefa. (2012). Métodos de estudio parasitología y micología. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/teo09/metest.pdf>

Clínica, M. (2013). Medios de Cultivo. Obtenido de <http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/12/medios-de-cultivo.pdf>

CLSI, M. e. (2007). Estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>.

Duque, C. M. (junio de 2010). Obtenido de Candidiasis vulvovaginal en un grupo mujeres gestantes de Medellín : http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922009000100003

Facmed. (2011). Fluconazol. Obtenido de http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Fluconazol.htm

- Florida, R. (2011). Caracterización de las especies de *Candida* halladas en muestras de exudado vaginal de mujeres sintomáticas. Obtenido de <http://www.revistabioanalisis.com/arxius/notas/cr1A7WLV.pdf>
- Gardeweg., M. L. (2012). Diagnóstico de Hongos y Levaduras. Tercera Edición. Obtenido de http://www.lablinsan.cl/manual/MANUAL_PARTE_2.pdf
- Gomez, V. (2013). Gardnerella, Cándida y Trichomona como agentes causantes de infecciones vaginales en mujeres del Barrio La Merced Alta-Catamayo . Obtenido de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/4041/1/G%C3%93MEZ%20G%C3%93MEZ%20VER%C3%93NICA%20ANABEL.pdf>
- Heredia, G. (Marzo de 2010). Prevalencia de candidiasis vaginal en embarazadas. Identificación de levaduras y sensibilidad a los antifúngicos. . Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-75412006000100003&script=sci_arttext
- Himedia. (2010). Agar Mueller Hinton, con Glucosa al 2% y Azul de Metileno. Obtenido de <http://himedialabs.com/TD/M1825.pdf>
- Himedia. (2011). Agar Sabouraud Dextrosa. Obtenido de <http://himedialabs.com/TD/M063.pdf>
- Koneman, E. (2008). Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Legnani, C. B. (2011). Manual Microdiagnóstica Tercera Parte . Obtenido de http://www.lablinsan.cl/manual/MANUAL_PARTE_3.pdf
- Leonardo Anzalone, C. A. (2011). Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Obtenido de <http://www.bvsops.org.uy/pdf/laboratorio.pdf>
- Levaduras de interés médico. (2012). Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/identlev.pdf>
- López, J. M. (6 de agosto de 2014). Vaginosis Bacteriana. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/vaginosis-bacteriana.html>
- Luis López, M. H. (marzo de 2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología . Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
- Madrid, A. (Abril de 2014). Instructivo para la Toma de Muestras de Laboratorio. Obtenido de <http://redsalud.uc.cl/medios/laboratorios/pdf/IP009.pdf>
- Manuel Estrella, I. G. (2012). Diagnóstico Microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia21.pdf>

Martín, M. R. (2011). Vaginitis. Obtenido de <http://www.tuotromedico.com/temas/vaginitis.htm>

MAST. (2011). Agar Dextrosa Sabouraud . Obtenido de http://www.mastgrp.com/ifus/ifu343_spa.pdf

Micológico, B. (2011). Antifungigrama. Obtenido de http://micologia.uv.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=36&Itemid=1

Micosis Profundas. (2010). Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/parasito/teo09/Ciclip/Micprof.pdf>

Murillo, S. E. (02 de Junio de 2013). Incidencia de candidiasis vaginal en mujeres gestantes entre las edades comprendidas de 20 a los 30 años atendidas en el Hospital Verdi Cevallos Balda de la ciudad de Portoviejo durante Septiembre 2012 a Febrero del 2013. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1786/1/Tesis%20Sandra%20Murillo.pdf>

Olivares., D. L. (2011). Candidiasis O Candidosis. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>

OMS. (Noviembre de 2010). Salud de la mujer. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/es/>

Panizo, M. (2011). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas . Obtenido de <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=332245&indexSearch=ID>

Pronadisa. (Mayo de 2010). Agar cromogénico para *Candida*. Obtenido de http://www.condalab.com/uploads/media/1382_AGAR_CROMOGENICO_CANDIDA_Reev_0_Mayo_2010_01.pdf

Pubmed. (2010). Candidiasis Vulvovaginal. Obtenido de <http://www.intermedicina.com/Avances/Ginecologia/AGO12.htm>

Quintanilla, E. (2010). Porcentaje de candidiasis vaginal en mujeres embarazadas del seguro universal materno infantil. Obtenido de <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/505/1/TN944.pdf>

Quintero, G. (2011). Resistencia de levaduras del género *Candida* a fluconazol. Obtenido de <http://revistainfectio.org/site/portals/0/ojs/index.php/infectio/article/view/28/40>

Reascos, R. G. (01 de Febrero de 2012). Incidencia de vaginosis y vaginitis, y determinación de los agentes etiológicos más frecuentes en mujeres de edad fértil sintomáticas y asintomáticas que acuden a consulta externa del Hospital Regional Isidro Ayora de la ciudad de Loja. Recuperado el 12 de Noviembre de 2014, de Incidencia de vaginosis y vaginitis, y determinación de los agentes etiológicos más frecuentes en mujeres

de edad fértil sintomáticas y asintomáticas que acuden a consulta externa del hospital regional Isidro Ayora de la ciudad de Loja:
<http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1867>

Risaralda., H. S. (2011). Guía examen directo de hongos KOH. Obtenido de <http://www.eselavirginia.gov.co/archivos/guias/guiaexamendirectodehongoskoh.pdf>

Scielo. (2010). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas . Obtenido de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182004000100004

Scielo. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. Obtenido de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-87052012000100007&script=sci_arttext

Scrib. (2010). Toma de muestra de secreciones. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/57045983/Toma-de-Muestra-de-Secreciones#scribd>

Seimc. (2010). Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica . . http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/4_guias_clinicas/agente_causal/hongos/28v29n01a90000380pdf001.pdf.

Sicilia, M. J. (2013). Identificación de levaduras . Obtenido de <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>

Slidershare. (2011). Técnicas de tinción más utilizadas en el campo de la histología . Obtenido de <http://es.slideshare.net/medicinac/tcnicas-de-tincin>

Solís, W. E. (Noviembre de 2014). Determinación de la resistencia a fluconazol y nistatina mediante el fungigrama en vaginosis crónica causada por *Candida albicans* en mujeres de 18 a 35 años que acuden al Centro Médico de Orientación Familiar (CEMOPLAF) Latacunga. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8713/1/N%C3%BA%C3%B1ez%20Sol%C3%ADs,%20Wilma%20Elizabeth.pdf>

Suzuki, S. T. (2011). Afecciones ginecológicas . Obtenido de <http://www.revistabuenasalud.com/afecciones-ginecologicas/>

Tapia, C. (25 de Agosto de 2012). Candidiasis vulvovaginal. Scielo, 1.

Torres, K. (Junio de 2010). Candidiasis vaginal en primigestas . Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322005000200002

Unpa. (Mayo de 2012). Microbiología y Parasitología. Obtenido de <http://grupoenfermeriaunpa.blogspot.com/2012/05/candida-candida-albicas-caracteristicas.html>

Villa, L. (2012). Comité de medicamentos pediamecum Fluconazol. Obtenido de <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Fluconazol.pdf>

Villarroel, P. (2011). Identificación de especies de levaduras del género *Candida* aislados de exudados vaginales de pacientes en el Hospital Materno Germán Urquidí . Obtenido de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662011000200006

12. ANEXOS

ANEXO 1

Loja, 02 de Febrero del 2015

Dr.

Santiago Morocho

DIRECTOR DEL SUBCENTRO DE SALUD N° 1

Ciudad.-

De mi consideración

Yo **Carol Sofia Chillogallo Granda** con cédula de identidad **1105809451**; estudiante del **SEPTIMO MODULO** de la carrera de **LABORATORIO CLINICO** en la Universidad Nacional de Loja, por medio de la presente me dirijo a Usted para solicitarle de la manera más comedida me autorice el permiso para la realización de mi trabajo de tesis cuyo título es: **"ESPECIES DE CANDIDA Y SU RESISTENCIA AL FLUCONAZOL EN MUESTRAS DE SECRECIÓN VAGINAL EN EMBARAZADAS ATENDIDAS EN EL SUBCENTRO N°1 DE LA CIUDAD DE LOJA."**

En el cual requiero de las muestras de secreción vaginal de las mujeres embarazadas que a criterio médico deban realizarse, por lo que proporcionare mi propio material para la obtención de las mismas, además informo que las pruebas no se realizaran en el laboratorio del subcentro sino en un laboratorio aparte por lo que le solicito me ayude con el permiso respectivo para la obtención de las muestras; los resultados serán enviados en un informe a su autoridad.

Por la favorable atención que le dé al presente desde ya le expreso mis más sinceros agradecimientos.

Atentamente

Carol Sofia Chillogallo Granda
1105809451



ANEXO 2



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
DIRECCIÓN

Oficio Nro. 20150183-D-ASH-UNL
Loja, 13 de febrero de 2015

Señorita
Carol Chillogallo Granda
ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA UNL
Ciudad.-

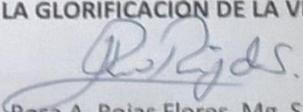
De mi consideración:

En atención a la solicitud Nro. 20150081, con trámite Nro. 003569 de fecha 30 de enero de 2015, visto en esta Dirección el 03 de febrero de 2015, y luego del informe presentado por Lic. Carmen Ullauri, le informo que el Laboratorio Clínico cuenta con las instalaciones y equipos necesarios para la ejecución de su trabajo de investigación; sin embargo no cuenta con los discos de fluconazol, mismos que deberían ser adquiridos por usted, tomado en cuenta que la ejecución de la parte analítica del trabajo de tesis no forma parte de la colegiatura.

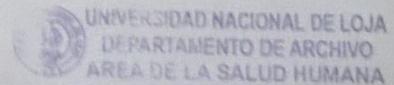
Particular que pongo en su conocimiento para los fines consiguientes.

Muy atentamente,

EN LOS TESOROS DE LA SABIDURÍA,
ESTÁ LA GLORIFICACIÓN DE LA VIDA.


Lic. Rosa A. Rojas Flores, Mg. Sg.
DIRECTORA (E)

cc. Archivo
RARF/pss



RECIBIDO POR *THO*
FECHA *18-02-2015*
HORA *1.04.10*

*Recibido
18-02-2015
11h05*

Dirección Manuel Y. Monteros V.
TELEFAX: (593)(7) 2571379
Loja-Ecuador

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha:

Yo.....con cédula de identidad númerooriunda de la ciudad de declaro que he sido informada de los aspectos correspondientes al estudio: “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” , en el que participare voluntariamente:

- Se me realizará una toma de muestra de secreción vaginal.
- Contestaré una encuesta realizada por la tesista voluntariamente.
- Mi muestra será utilizada para realizar cultivo y antifungigrama.
- Mi participación en este proyecto es de carácter voluntario, y en caso de no participar en él, esta decisión no afectará la relación médico-paciente.

Como sujeto del estudio declaro que estoy de acuerdo con lo anterior y que participo voluntariamente y no he sido sometido a ninguna intervención con coacción para esta decisión. En constancia firmo a continuación.

Firma:

HUELLA DIGITAL INDICE DERECHO (en caso de pacientes que no sepan leer ni escribir)

ANEXO 4

ENCUESTA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.
ÁREA DE LA SALUD HUMANA.
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO.

Muy respetuosamente me dirijo a usted con la finalidad de pedir su colaboración para llenar la presente encuesta, la misma que me permitirá obtener datos sobre mi investigación.

Estimada paciente, le solicito comedidamente dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. **Edad:** _____

2. **¿Está tomando antifúngicos?**

Si () No ()

Hace cuántos días inicio el tratamiento?.....

3. **¿Ha presentado infecciones vaginales frecuentes?**

Si () No ()

Cuántas veces en el año usted tiene molestias o presenta síntomas?.....

Durante su embarazo cuántas ha presentado vulvovaginitis?.....

4- **¿Se realizó una ducha vaginal antes de realizarse el examen?**

Si () No ()

OBSERVACIONES:.....
.....
.....

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN.



ANEXO 5

CONDICIONES DEL PACIENTE, RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRA DE SECRECIÓN VAGINAL

CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA TOMA DE SECRECIÓN VAGINAL

- Una semana antes de la realización del examen, NO debe aplicarse óvulos ni ningún otro medicamento intravaginal.
- No se realice baño con ducha vaginal el día de la muestra.
- Absténgase de tener relaciones sexuales 3 días antes del examen (Madrid, 2014).

RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRA

➤ MATERIALES

- Camilla ginecológica
- Hisopos estériles
- Tubo con de suero fisiológico
- Tubo con KOH

➤ PROCEDIMIENTO

- El usuario se acuesta boca arriba con los pies apoyados en los estribos en la mesa de exploración.
- Se introduce suavemente un hisopo o aplicador de algodón estéril y húmedo dentro de la vagina para tomar una muestra de la secreción.
- La muestra se toma de las paredes de la vagina hasta el fondo del saco vaginal posterior.
- Se retira el hisopo y se lo coloca en los tubos con solución salina y otro con KOH, se tapan con tapones de gasa y algodón para evitar contaminación con agentes externos como el polvo (Leonardo Anzalone, 2011) (Scrib, 2010).

ANEXO 6

PROTOCOLO DE TRANSPORTE DE MUESTRA DE SECRECIÓN VAGINAL

- Se transportó las muestras de secreción vaginal de las mujeres embarazadas atendidas en el laboratorio del Centro de Salud N°1 de la ciudad de Loja hasta el lugar de procesamiento en el Laboratorio Clínico “Centro de Diagnóstico Médico” del Área de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- Una vez tomadas las muestras según el protocolo del Anexo N° 5 se colocó el tapón de gasa en los tubos que contenían las muestras con KOH y suero fisiológico estéril.
- Cada tubo se lo colocó en una gradilla para un mejor sostén de los mismos.
- Se colocó la gradilla junto con los tubos en una caja térmica y se transportó antes de 2 horas después de obtenidas las muestras al laboratorio para su análisis en el mismo día de toma de muestra (Legnani, 2011).

ANEXO 7

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE AGAR SABOURAUD

➤ USO

Sabouraud Dextrosa Agar se utiliza para el cultivo de levaduras, mohos y bacterias acidúricas. (HIMEDIA, 2011)

➤ FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Composición	Gms/litro
Dextrosa	40.00
Peptona de Caseína	10.00
Agar	15.00
pH final	5.6 ± 0.2

Fórmula ajustada, estandarizado para adaptarse a los parámetros de rendimiento (HIMEDIA, 2011)

➤ PREPARACIÓN

- Suspender 65 gramos en 1000 ml de agua destilada.
- Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- Esterilizar en autoclave a presión de 15 libras (121 ° C) durante 15 minutos (HIMEDIA, 2011)

➤ PRINCIPIO

Agar Sabouraud Dextrosa es una modificación de la formulación descrita por Sabouraud para el cultivo de hongos (levaduras, mohos), particularmente útiles para el hongos asociados con infecciones de la piel. También se emplea este medio para determinar la contaminación microbiana en los alimentos, cosméticos, y muestras clínicas

Las peptonas proporcionan factores de crecimiento y fuente de nitrógeno. La dextrosa es la fuente de energía para el crecimiento de microorganismos y el pH bajo favorece el crecimiento de hongos e inhibe bacterias contaminantes de las muestras de ensayo.

Algunos hongos patógenos pueden producir esporas infecciosas que son fácilmente dispersadas en el aire, por lo que el examen debe ser realizado en cabina de seguridad. Para muestras muy contaminadas, la placa debe ser complementado con agentes inhibidores para inhibir bacterias el crecimiento con un pH más bajo (HIMEDIA, 2011).

➤ **CONTROL DE CALIDAD**

- **Apariencia**

Crema a amarillo polvo fluido homogéneo (HIMEDIA, 2011).

- **Gelificación**

Firma, comparable con un 1,5% en gel de agar (HIMEDIA, 2011).

- **El color y la claridad del medio preparado**

Ámbar claro coloreado formas de gel transparente a ligeramente opalescente en placas de Petri (HIMEDIA, 2011).

ANEXO 8

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE CROMO AGAR

➤ USO PREVISTO

Agar Cromogénico *Candida* es un medio cromogénico selectivo y diferencial, recomendado para la rápida identificación de *Candida* spp, a partir de muestras clínicas (Pronadisa, 2010).

➤ FÓRMULA EN g/l

Glucosa	20.00	Mezcla cromogénicos	0.40
Peptona	10.00	Agar Bacteriológico	15.00
Cloranfenicol	0.50		
Final pH 6.1 ± 0.2 a 25°C			

➤ PREPARACION

Agar Cromogénico *Candida* presentación 500 gramos, 5, 25, 50 kilos. Catálogo 1382 (Medio deshidratado) (Pronadisa, 2010).

- Suspender 45.9 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente. Dejar hervir durante un minuto o hasta disolución completa. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Verter en placas Petri. Las placas preparadas deben almacenarse entre 8-15°C. El color del medio preparado es ámbar ligeramente opalescente (Pronadisa, 2010).
- El medio deshidratado debe ser homogéneo, libre de floculos y de color beige claro. Si hay algún cambio físico no utilizar el medio (Pronadisa, 2010).

➤ PRINCIPIO Y APLICACIÓN

AGAR CROMOGENICO CANDIDA es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento (Pronadisa, 2010).

En el medio la glucosa es el carbohidrato fermentable aporta carbono y energía. La Peptona aporta nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El Cloranfenicol es un antibiótico que ayuda en el aislamiento de hongos

patógenos de muestras clínicas altamente contaminadas. La mezcla de cromogénicos permite la identificación y la diferenciación de las 3 especies de candidas (Pronadisa, 2010).

Las distintas especies de *Candida* producen distintos tipos de infecciones. *Candida albicans* es la más común de las especies y generalmente susceptible al grupo azole de los agentes antifúngicos. Mientras que *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* son tolerantes a los azoles, por lo tanto la rápida identificación de las distintas especies de *Candida* es fundamental para el diagnóstico y el tratamiento adecuado. Las colonias de *Candida* se presentan de la siguiente manera:

ESPECIES DE <i>Candida</i>	COLOR
<i>Candida albicans</i>	verde
<i>Candida tropicalis</i>	azul
<i>Candida krusei</i>	morado-rosa
<i>Candida parapsilosis</i> y <i>C. glabrata</i>	beige o morado

(Pronadisa, 2010)

ANEXO 9

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE AGAR MUELLER HINTON

➤ **USO:**

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (Himedia, 2010).

➤ **FUNDAMENTO:**

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad (Himedia, 2010).

➤ **FÓRMULA:** (en gramos por litro)

Infusión de carne: 300.0

Peptona ácida de caseína: 17.5

Almidón: 1.5

Agar: 15.0

pH final: 7.3 ± 0.1

➤ **INSTRUCCIONES:**

Suspender el polvo en agua purificada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total (Himedia, 2010).

Para este estudio se añadió glucosa y azul de metileno para realizar el antifungigrama en disco de acuerdo al documento CLSI para el estudio de sensibilidad a los antifúngicos M44-A (Ver anexo 13); donde se añadió 5.5 gr de glucosa y 30 ul de azul de metileno para la preparación de 12 cajas de agar. Luego se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°-50°C y distribuir en placas de Petri estériles, 23 ml de volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal con ayuda de una jeringa (Himedia, 2010).

➤ **ALMACENAMIENTO:**

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C (Himedia, 2010).

ANEXO 10

PROTOCOLO PARA EXAMEN CON KOH

➤ DEFINICIÓN

Es el medio de montaje de las muestras clínicas universalmente aceptado. Permite clarificar todo tipo de muestras clínicas con abundantes células y restos celulares y observar la morfología fúngica. El KOH disuelve más rápidamente los elementos celulares que los hongos (protegidos por la pared celular) (Risaralda., 2011).

Se realizó la identificación de hongos a través de una muestra de secreción vaginal.

➤ MATERIALES Y REACTIVOS:

- Tubos de vidrio
- Gradilla para tubos.
- Lámina portaobjetos.
- Laminilla cubreobjetos.
- Hisopos estériles.
- Marcador de vidrio o rotulador.
- KOH al 10% (Risaralda., 2011).

➤ EQUIPO

- Microscopio (Risaralda., 2011).

➤ PROCEDIMIENTO

- Identificar la lámina portaobjeto con un rotulador o marcador
- Colocar una gota en el portaobjeto con la solución junto con la muestra y cubrir con laminilla cubre objeto, con el cuidado de no formar burbujas de aire.
- Examinar toda la preparación al fresco en el microscopio con objetivo 10x y 40x.
- Buscar presencia de levaduras o pseudohifas que se encuentren en la muestra.
- Anotar lo observado en el respectivo registro (Risaralda., 2011).

ANEXO 11

PROTOCOLO PARA CULTIVO EN AGAR SABOURAUD

➤ **PROCEDIMIENTO**

- Sembrar las muestras tan pronto lleguen al laboratorio para su proceso y siembra.
- Incubar las cajas sembradas en una atmósfera húmeda a 25-35°C.
- Examinar los cultivos después de 24 horas de incubación para reportar resultados de crecimiento (MAST, 2011).

➤ **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

En las muestras positivas se observa el crecimiento de hongos y levaduras con su morfología colonial típica o confluencia de colonias (MAST, 2011).

➤ **ALMACENAMIENTO:** 2-35° C.

➤ **CADUCIDAD:** 5 años en frasco cerrado (MAST, 2011).

ANEXO 12

PROTOCOLO PARA CULTIVO EN CROMO AGAR

➤ TIPO DE MUESTRA

Muestras de secreción vaginal (Pronadisa, 2010).

➤ PROCEDIMIENTO

- Inocular en superficie y realizar estrías paralelas con el asa.
- Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24, 48 y 72 horas
- Lectura e interpretación de los resultados (Pronadisa, 2010).

➤ ALMACENAMIENTO

- Una vez abierto guardar el medio cerrado para evitar la hidratación
- Utilizable hasta la fecha de caducidad (Pronadisa, 2010).

ANEXO 13

PROTOCOLO PARA ANTIFUNGIGRAMA EN DISCO

MÉTODOS ESTANDARIZADOS POR EL CLSI PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS (DOCUMENTO M 44-A)

➤ FUNDAMENTO

Es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio 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 (CLSI, 2007).

➤ MEDIO DE CULTIVO

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 (CLSI, 2007).

La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición. Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas S y R a fluconazol, presentando buena correlación con el método M27-A3 y con los datos in vivo. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a las 24 y 48 h, se recomienda realizarla a las 24 h (CLSI, 2007).

➤ PREPARACIÓN DE PLACAS MHA SUPLEMENTADO CON GLUCOSA Y AZUL DE METILENO

- Preparar el medio de Agar Muller Hinton (MHA) siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.
- Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.
- Esterilizar en autoclave.
- Dejar enfriar el medio a 45-50 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9-10 cm de diámetro y 67-70 ml si son de 5 cm (altura de la capa de agar 4 mm).

- Dejar enfriar y guardar en nevera (CLSI, 2007).

Una vez preparadas las placas se pueden almacenar durante 7 días a menos que se tomen precauciones adicionales que eviten el secado de las placas (CLSI, 2007).

➤ **PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

- Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento.
- Se resuspenden en un tubo de solución salina estéril.
- Se agita bien y con ayuda de un densitómetro, se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina (CLSI, 2007).

➤ **INOCULACIÓN DE LAS PLACAS**

- Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
- Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
- Sembrar la placa uniformemente.
- Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.
- Aplicar los discos.

➤ **TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN**

Incubar a 35 °C durante 20-24 h para *Candida* spp y 48 h para *Cryptococcus* spp.

➤ **LECTURA**

Si no hay suficiente crecimiento a las 24 h reincubar y leer a las 48 h. Medir el 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 deben ser ignoradas. *C. glabrata* y *C. krusei*, pueden necesitar 48 h de incubación (CLSI, 2007).

En la Tabla 15a.8 se especifican los diámetros equivalentes a los puntos de corte. (CLSI, 2007)

En la Tabla 15a.8. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para <i>Candida</i> spp							
Antifúngico	Carga de disco	Diámetro (mm)			CMI(ug/ml)		
		R	S-DD	S	R	S-DD	S
Fluconazol	25 ug	≤ 14	15-18	≥19	≥64	16-32	≤8
Voriconazol	1 ug	≤ 13	14-16	≥17	≥4	2	≤1
Caspofungina	5 ug	≤ 10*	-	≥11	≥2*	-	≤2

S, sensible. S-DD, sensible dependiente de la dosis. R, resistente. *No sensible

(CLSI, 2007)

ANEXO DOCUMENTO CLSI PARA ANTIFUNGIGRAMA MÉTODOS DE DIFUSIÓN DE DISCO

15a-10

Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

Utilidad de la macrodilución

- El método de macrodilución se utiliza muy poco, pero a veces puede ser útil cuando se requiere un resultado rápido y no se dispone de medios comerciales o placas preparadas.
- También es útil en aquellas cepas de *C. albicans* en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (*trailing growth*).

Tabla 15a.6. Resumen del método M27-A3.

Medio de cultivo	RPMI 1640, con glutamina, sin bicarbonato sódico y con un indicador de pH
pH	6,9 - 7,1
Tampón	Ácido mololito propano sulfónico (MOPS) a una concentración 0,164 moles/litro
Inóculo	Entre $0,5 \times 10^4$ y $2,5 \times 10^4$ UFC/ml
Inoculación	<i>Candida</i> spp., 48 h a 35 °C con todos los antifúngicos, excepto las equinocandinas que se incuban durante 24 h <i>C. neoformans</i> , 72 h a 35 °C
Concentraciones a ensayar	Fluconazol y 5-fluoroditosina: 64-0,06 µg/ml Anfitericina B, itraconazol, keticonazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol, caspofungina: 16-0,03 µg/ml
Definición de la CMI	Antitericina B: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento de 100% Azoles y 5-fluorocitosina: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ (por microdilución) a las 48 h de incubación Equinocandinas: la CMI es la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento $\geq 50\%$ a las 24 h de incubación
Puntos de corte	Fluconazol: S ≤ 8 µg/ml; S-DD 16-32 µg/ml; R ≥ 64 µg/ml Itraconazol: S $\leq 0,12$ µg/ml; S-DD 0,25-0,5 µg/ml; R ≥ 1 µg/ml Voriconazol: S ≤ 1 µg/ml; S-DD 2 µg/ml; R ≥ 4 µg/ml 5-fluoroditosina: S ≤ 4 µg/ml; I B-16 µg/ml; R ≥ 32 µg/ml Equinocandinas: S ≤ 2 µg/ml; NS > 2 µg/ml
Cepas control	<i>C. krusei</i> ATCC 6258 y <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
NS: no sensible.	

15a.4. Método de difusión en disco M44-A

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, Wheatridge, Colo.) y las CMI obtenidas por el método M27-A3. En 2003, el CLSI estandarizó el método de difusión-disco (documento M44-P) y en 2004 publicó el documento definitivo (documento M44-A) [3] para *Candida* spp. con fluconazol y voriconazol.

15a.4.1. Fundamento

Es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio 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.

15a.4.2. Medio de cultivo

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. Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas S y R a fluconazol, presentando buena correlación con el método M27-A3 y con los datos *in vivo*. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a las 24 y 48 h, se recomienda realizarla a las 24 h.

Solución madre de glucosa (40%)

- Glucosa 40 g
- Agua destilada 100 ml

Calentar suavemente hasta completa disolución de la glucosa.

Solución azul metileno (5 mg/ml)

- Azul metileno 0,1 g
- Agua destilada 20 ml

Solución madre de glucosa-azul de metileno (GAM)

1. Añadir 200 µl de la solución de azul de metileno a 100 ml de la solución madre de glucosa para obtener una solución GAM con una concentración final de glucosa de 0,4 mg/ml y 10 µg/ml de azul de metileno.
2. Dispensar en viales en alícuotas de 3,5 o 1,5 ml.
3. Esterilizar en autoclave 25 min a 121 °C.
4. Guardar a temperatura ambiente (máximo 1 año)

Preparación de placas MHA suplementado con glucosa y azul de metileno

1. Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.
2. Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Dejar enfriar el medio a 45-50 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9-10 cm de diámetro y 67-70 ml si son de 15 cm (altura de la capa de agar 4 mm).
5. Dejar enfriar y guardar en nevera.

Una vez preparadas las placas se pueden almacenar durante 7 días a menos que se tomen precauciones adicionales que eviten el secado de las placas (Figura 15a.8).

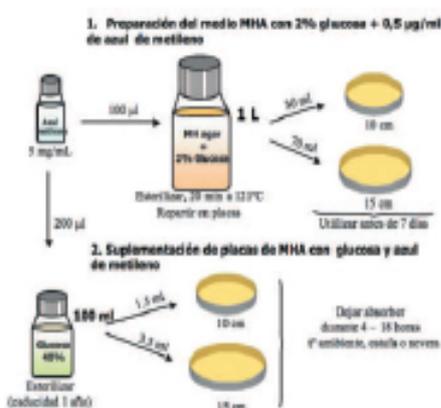


Figura 15a.8. Preparación del medio de Mueller-Hinton agar suplementado (1) y suplementación de las placas de MHA (2).

Suplementación de las placas de MHA con glucosa y azul de metileno

1. Verter 1,5 ml de la solución de GAM sobre la superficie de la placa de MHA de 9-10 cm o 3,5 ml si es de 15 cm.
2. Repartir el líquido uniformemente por toda la superficie de la placa con ayuda de un asa de cristal o bolas de cristal.
3. Dejar a temperatura ambiente o en el refrigerador el tiempo necesario para que se absorba todo el líquido antes de proceder a la inoculación de la placa. El tiempo depende de la humedad de la placa, en general de 4 - 18 h.

Un consejo...

- Es mejor preparar las placas el día anterior al ensayo y dejarlas durante toda la noche en nevera con el fin de que haya una absorción completa.

15a.4.3. Preparación del inóculo

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina estéril (CINa 0,85%) como se ha descrito para el método M27-A3. Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml (Figura 15a.9).

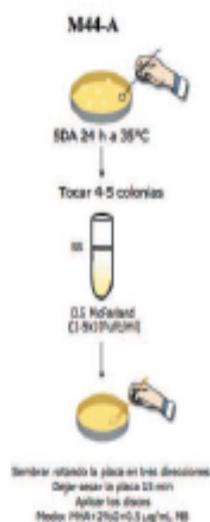


Figura 15a.9. Preparación inóculo levaduras (M44-A).

15a.4.4. Inoculación de las placas

1. Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
2. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
3. Sembrar la placa uniformemente.
4. Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.
5. Aplicar los discos.

15a.4.5. Temperatura y tiempo de incubación

Incubar a 35 °C durante 20-24 h para *Candida* spp. y 48 h para *Cryptococcus* spp.

15a.4.6. Lectura

Si no hay suficiente crecimiento a las 24 h reincubar y leer a las 48 h.

Medir el 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 deben ser ignoradas.

C. glabrata y *C. krusei*, pueden necesitar 48 h de incubación.

15a.4.7. Cepas Control de Calidad

En cada ensayo debe incluirse al menos una cepa control de calidad para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas:

- *C. parapsilosis* ATCC 22019
- *C. krusei* ATCC 6258
- *C. albicans* ATCC 90028
- *C. tropicalis* ATCC 750

En la Tabla 15a.7 se especifican los diámetros de los halos de inhibición para las cepas control de calidad.

15a.4.8. Puntos de corte para *Candida* spp.

En la Tabla 15a.8 se especifican los diámetros equivalentes a los puntos de corte.

Tabla 15a.7. Diámetro de las cepas control de calidad [3,14-16].

Antifúngico	Carga del disco	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750
Fluconazol	25 µg		22 - 33	28 - 39	26 - 37
Voriconazol	1 µg	16 - 25	28 - 37	31 - 42	*
Posaconazol	5 µg	23 - 31	25 - 36	24 - 34	23 - 33

*No se han establecido en esta cepa debido a la variabilidad encontrada.

Tabla 15a.8. Puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI para *Candida* spp. [1,3,11,15,23].

Antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)			CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
		R	S-DD	S	R	S-DD	S
Fluconazol	25 μg	≤ 14	15 - 18	≥ 19	≥ 4	16 - 32	≤ 8
Voriconazol	1 μg	≤ 13	14 - 16	≥ 17	≥ 4	2	≤ 1
Caspofungina	5 μg	$\leq 10^*$	-	≥ 11	$> 2^*$	-	≤ 2

S, sensible. S-DD, sensible dependiendo de la dosis. R, resistente. *No sensible.

Tabla 15a.9. Resumen documento M44-A.

Medio de cultivo	Mueller Hinton agar + 2% glucosa + 0,5 mg/ml azul de metileno
pH	7,2 – 7,4
Inóculo	0,5 McFarland (1-5 x 10 ⁸ UFC/ml)
Tiempo y temperatura de incubación	35 °C durante 20 a 24 h Algunos aislados de <i>C. glabrata</i> y <i>C. krusei</i> a menudo necesitan 48 h.
Carga del disco	Fluconazol 25 μg Voriconazol 1 μg Posaconazol 5 μg
Medida del halo de inhibición	Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento
Puntos de corte	Fluconazol: R ≤ 14 mm, S-DD 15 – 18 mm, S ≥ 19 mm. Voriconazol: R ≤ 13 mm, S-DD 14 – 16 mm, S ≥ 17 mm
Diámetro de inhibición de las cepas control de calidad	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 fluconazol: 22 - 23 mm voriconazol: 28 - 37 mm posaconazol: 25 - 36 mm caspofungina: 14 - 23 mm • <i>C. krusei</i> ATCC 6258 voriconazol: 16 - 25 mm posaconazol: 23 - 31 mm caspofungina: 18 - 26 mm • <i>C. albicans</i> ATCC 90028 fluconazol: 28 - 39 mm voriconazol: 31 - 42 mm posaconazol: 24 - 34 mm caspofungina: 18 - 27 mm • <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 fluconazol: 26 - 37 mm posaconazol: 23 - 33 mm caspofungina: 20 - 27 mm

ANEXO 14

HOJA DE REGISTRO

Nombre	Edad	N° de muestras	Exámen con KOH				Cepas aisladas	Sensibilidad a fluconazol		
			Esporas	Hifas	P	N		S	I	R
		M.C 1	-	-		x	-			
		M.C 2	-	-		x	-			
		M.C 3	-	-		x	-			
		M.C 4	Pocas esporas	Pocas pseudohifas	x		<i>C. glabrata o C. parapsilosis</i>			x
		M.C 5	Pocas levaduras	Algunas pseudohifas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1101704890	21	1	Escasas levaduras	Algunas pseudohifas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1120003122	32	2	Algunas levaduras	Algunas pseudohifas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1129141862	14	3	Pocas esporas	Pocas pseudohifas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1104581606	30	4	-	-		x	-			
1709546110	35	5	-	-		x	-			
101242189	23	6	Escasas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		
1101291313	19	7	-	-		x	-			
1105292771	30	8	-	-		x	-			

1104459779	30	9	-	-		x	-			
1105824166	16	10	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>			x
1150589420	18	11	-	-		x	-			
1105841502	25	12	-	-		x	-			
1170281451	28	13	-	-		x	-			
1103718928	34	14	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>			x
1104325160	25	15	-	-		x	-			
015124466	35	16	-	-		x	-			
1105864324	17	17	-	-		x	-			
1150825899	19	18	Algunas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		
1104278906	30	19	-	-		x	-			
1105239543	24	20	-	-		x	-			
1105802836	21	21	Escasas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>			x
1104882251	25	22	-	-		x	-			
1103922322	31	23	-	-		x	-			
1105196396	26	24	-	-		x	-			
1104132251	35	25	Algunas levaduras	Algunas pseudohifas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1104989924	25	26	-	-		x	-			
0928917738	25	27	-	-		x	-			
1105907491	21	28	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		

1103977599	22	29	Pocas levaduras	Numerosas hifas y micelio	x		<i>C. albicans</i>	x		
1170729431	22	30	-	-		x	-			
1104899545	24	31	-	-		x	-			
1105808422	16	32	-	-		x	-			
1900555788	18	33	-	-		x	-			
1104679806	25	34	-	-		x	-			
1104744691	26	35	-	-		x	-			
1103857643	23	36	-	-		x	-			
1103589170	38	37	-	-		x	-			
1105922800	24	38	-	-		x	-			
1105209451	14	39	Escasas levaduras	-	x		<i>C. krusei</i>			x
1150557666	19	40	Escasas levaduras	Escasos micelios	x		<i>C. albicans</i>	x		
1104687726	25	41	-	-		x	-			
1103570246	38	42	Pocas levaduras	Pocas hifas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1105233942	23	43	-	-		x	-			
1104629850	30	44	-	-		x	-			
1105638660	22	45	-	-		x	-			
1105809453	21	46	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		
1104684383	27	47	-	-		x	-			
1105800285	19	48	Pocas levaduras	-	x		<i>C- krusei</i>			x

1103984264	34	49	Pocas levaduras	Hifas con clamidiosporas	x		<i>C. albicans</i>	x		
1105809427	21	50	Pocas levaduras	-	x		<i>C- krusei</i>			x
1104858228	26	51	Pocas levaduras	-	x		<i>C- krusei</i>			x
1103871982	35	52	-	-		x	-			
1104617558	28	53	Pocas levaduras	-	x		<i>C- krusei</i>			x
1104202062	22	54	Algunas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>			x
1106081571	19	55	Pocas levaduras	-	x		<i>C- krusei</i>			x
1003963434	32	56	-	-		x	-			
1104834443	18	57	-	-		x	-			
1150357067	24	58	-	-		x	-			
1450015301	23	59	Pocas levaduras	-	x		<i>C- krusei</i>			x
1150708889	17	60	-	Pocas hifas y micelios	x		<i>C. albicans</i>			x
1104675325	19	61	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>			x
1105165862	26	62	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		
1038153162	23	63	Algunas levaduras	Pocas hifas	x		<i>C. albicans</i>			x
1105372625	16	64	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>			x
1165802426	20	65	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		
1105208019	20	66	Pocas levaduras	-	x		<i>C. albicans</i>	x		
1100201588	26	67	-	-		x	<i>C. krusei</i>			x

ANEXO 15

FORMATO DE ENTREGA DE RESULTADO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO
CENTRO DE DIAGNÓSTICO MÉDICO



Nombre del paciente:

Edad:

Tipo de muestra: Secreción vaginal

KOH:

Germen identificado:

ANTIFUNGIGRAMA

Fluconazol:

Loja, de del 2015

Firma:

ANEXO 16

FOTOS

IMÁGENES DE CRECIMIENTO EN AGAR SABOURAUD



Fig.1: Imagen de prueba piloto de secreción vaginal positiva con hongos donde se evidencia un claro crecimiento de colonias de *Candida* a las 24 horas de incubación.



Fig.2: Imágenes de crecimiento de colonias de *Candida* presente en las muestras de secreción vaginal de las mujeres embarazadas que participaron en el estudio

IMÁGENES DE CRECIMIENTO EN CROMO AGAR

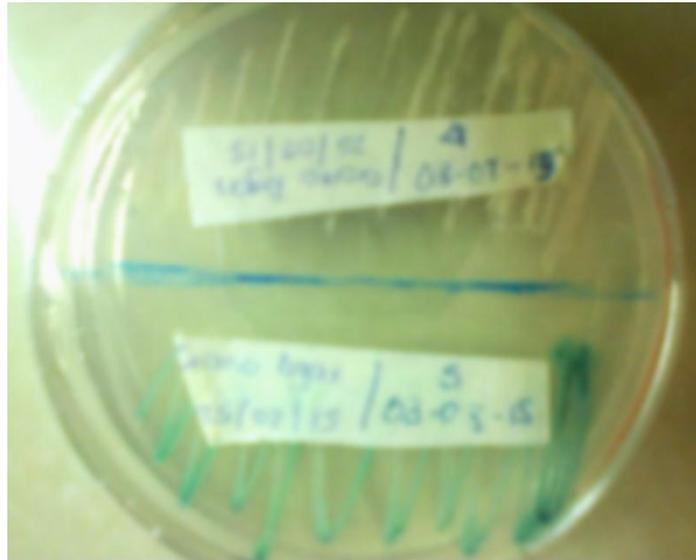


Fig.3: Muestras piloto utilizadas en el estudio donde se observa una colonia color beige que de acuerdo al cromo agar indica la presencia de *Candida parapsilosis* o *C. glabrata*; mientras que en el otro lado se observa una colonia color verde que indica crecimiento de *Candida albicans*.

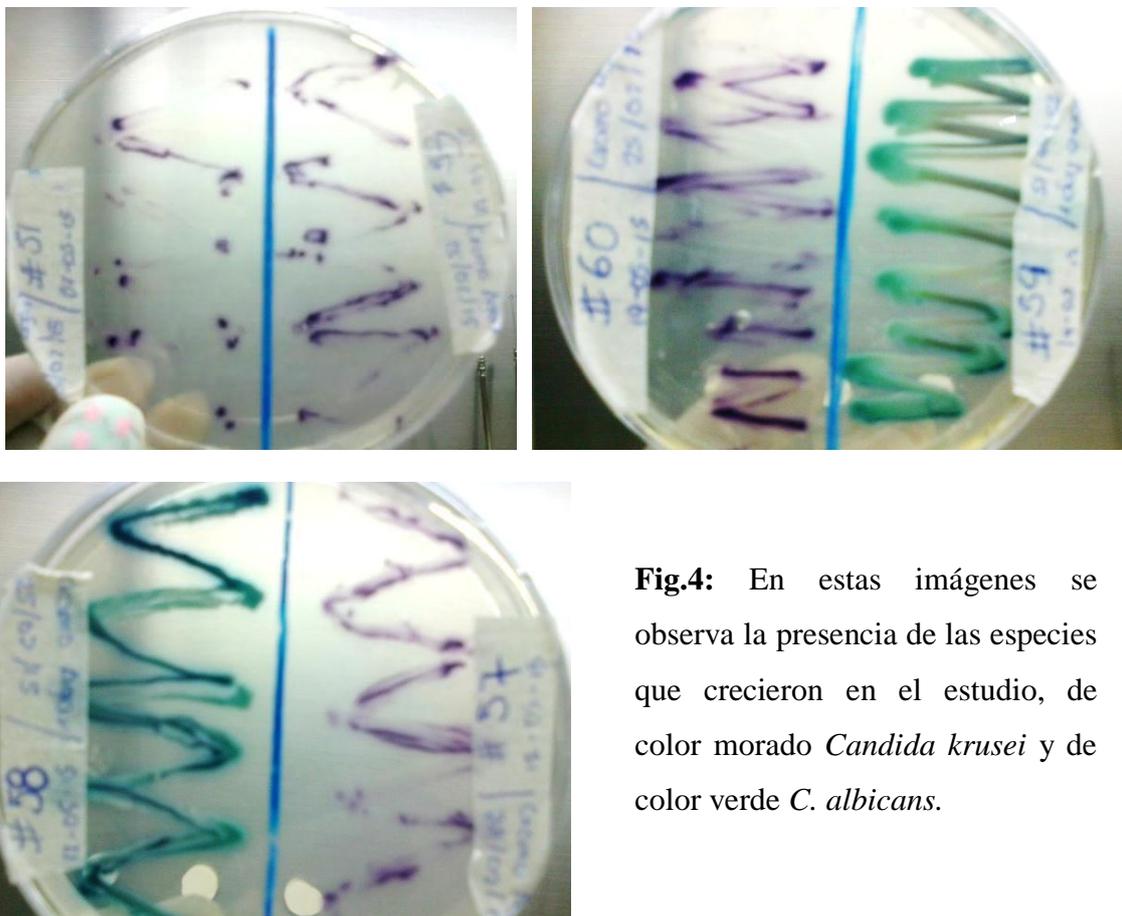


Fig.4: En estas imágenes se observa la presencia de las especies que crecieron en el estudio, de color morado *Candida krusei* y de color verde *C. albicans*.

IMÁGENES DE SENSIBILIDAD A FLUCONAZOL

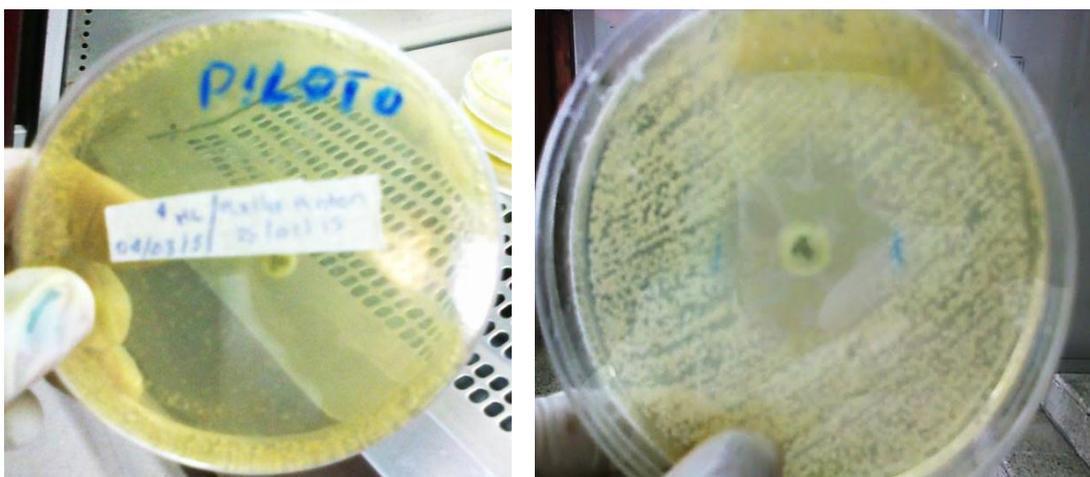


Fig.5: Estas imágenes representan la prueba piloto que se utilizó en el agar Mueller Hinton para determinar la susceptibilidad a fluconazol en el cual se observa un halo que al medirlo resultado sensible a este antimicótico.

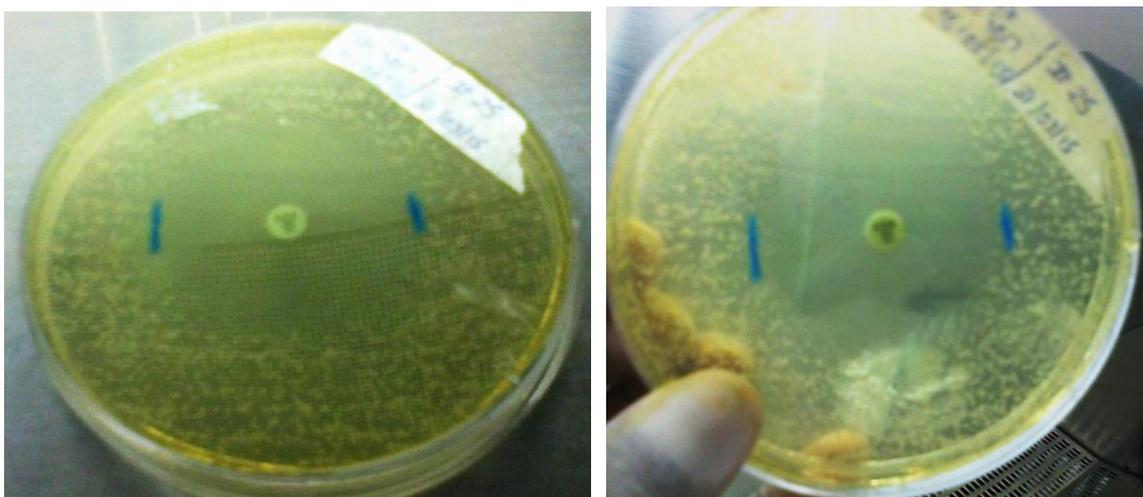


Fig.6: En estas imágenes se observa el crecimiento de las colonias con un halo incluso mayor a la de la prueba piloto el cual al medirlo indico ser sensible a fluconazol

IMÁGENES DE RESISTENCIA A FLUCONAZOL

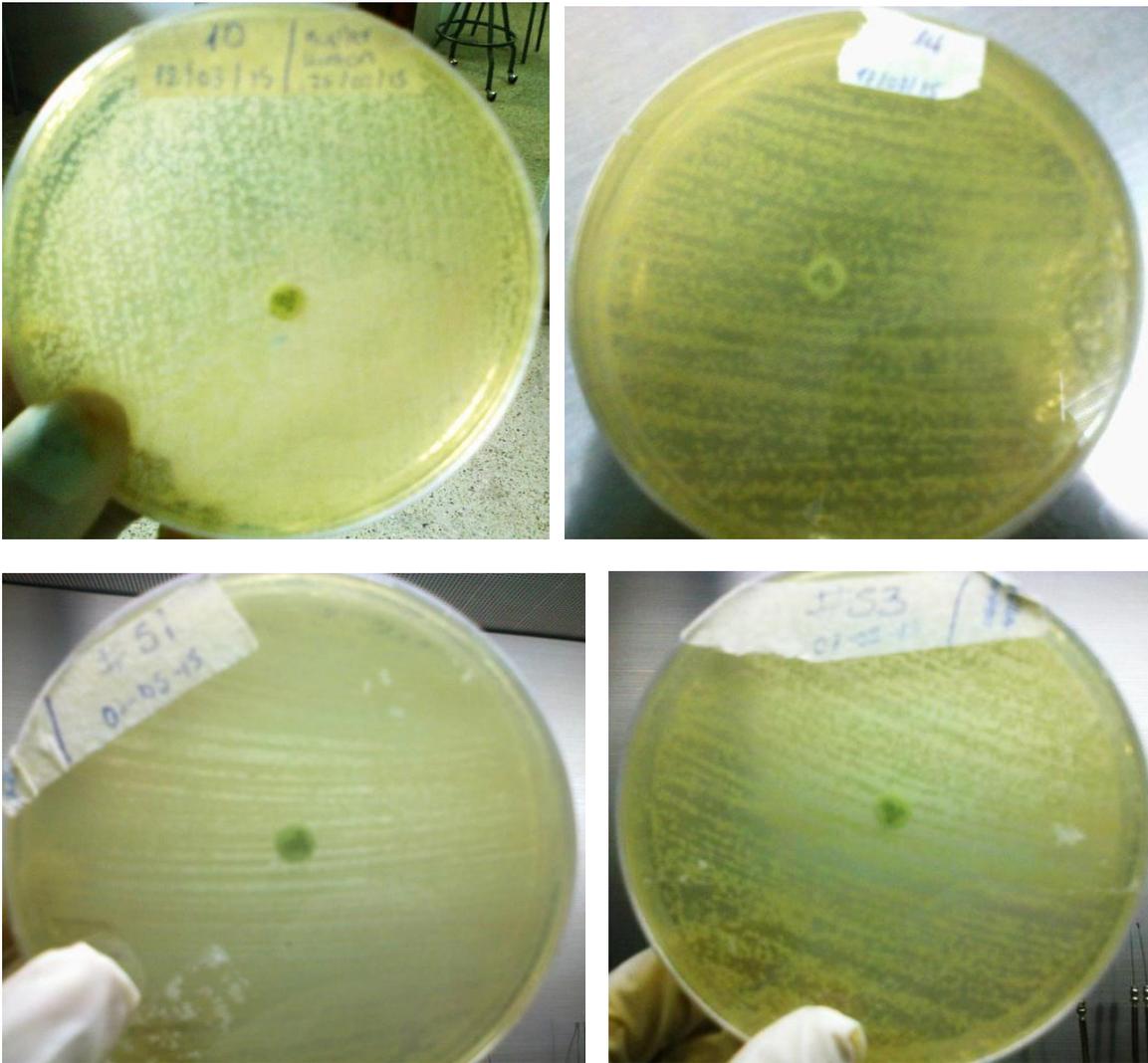


Fig.6: Imágenes de algunas muestras cuya presencia de *Candida* resultaron ser resistentes a fluconazol, determinada por la ausencia de un halo de sensibilidad.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CERTIFICACIÓN	iError! Marcador no definido.ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN.....	2
3. SUMMARY	3
4. INTRODUCCIÓN	4
5. REVISIÓN LITERARIA	6
5.1. <i>Candida</i>	6
5.1.1. Generalidades.....	6
5.1.2. Taxonomía del género <i>Candida</i>	6
5.2. Morfología	6
5.3. Especies	7
5.4. Patogenicidad.....	7
5.5. Identificación en laboratorio	8
5.6. CANDIDIASIS	15
5.6.1. Superficiales.....	15
5.6.2. Profundas	15
5.6.3. Vulvovaginitis.....	16
5.7. FLUCONAZOL.....	18
5.7.1. Desarrollo de resistencia a fluconazol	19
5.7.2. Antifungigrama	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1. TIPO DE ESTUDIO	26
6.2. ÁREA DE ESTUDIO	26
6.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	26
6.3.1. Universo.....	26
6.3.2. Muestra	26
6.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	26

6.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	27
6.6. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	27
6.6.1. FASE PREANALÍTICA	27
6.6.2. FASE ANALÍTICA	27
6.6.3. FASE POST- ANALÍTICA	28
6.7. ANÁLISIS Y TABULACIÓN DE DATOS.....	28
7. RESULTADOS.....	29
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIONES	36
10. RECOMEDACIONES	37
11. BIBLIOGRAFÍA.....	38
12. ANEXOS	43
ÍNDICE GENERAL.....	73
ÍNDICE DE TABLAS	75
ÍNDICE DE ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA N°1: Presencia de <i>Candida spp.</i> en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N° 1. Marzo-Junio de 2015.....	29
TABLA N° 230 Especies de <i>Candida</i> aisladas en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas del Centro de Salud N°1. Marzo-Junio de 2015.....	30
TABLA N°3: Susceptibilidad a fluconazol de especies de <i>Candida</i> aisladas en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N°1. Marzo-Junio de 2015.	31
TABLA N°4: Relación entre la resistencia a fluconazol de las especies de <i>Candida</i> aisladas con la recurrencia de vulvovaginitis (VVR) en muestras de secreción vaginal de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N°1. Marzo-Junio de 2015. ...	32
TABLA N°5: Relación entre la resistencia a fluconazol de las especies de <i>Candida</i> aisladas con la edad de mujeres embarazadas que acudieron al Centro de Salud N° 1. Marzo-Junio de 2015	33

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: Oficio aprobado por el Director del Centro de Salud N°1 de La Ciudad de Loja.....	43
ANEXO 2: Oficio aprobado por la Directora del Área de la Salud Humana de la UNL...	44
ANEXO 3: Consentimiento informado	45
ANEXO 4: Encuesta.....	46
ANEXO 5: Condiciones del paciente, recolección y toma de muestra de secreción vaginal.....	47
ANEXO 6: Protocolo de transporte de muestra de secreción vaginal.....	48
ANEXO 7: Protocolo para preparación de Agar Sabouraud.....	49
ANEXO 8: Protocolo para preparación de Cromo Agar.....	51
ANEXO 9: Protocolo para preparación de Agar Mueller Hinton	53
ANEXO 10: Protocolo para examen con KOH.....	54
ANEXO 11: Protocolo para cultivo en Agar Sabouraud.....	55
ANEXO 12: Protocolo para cultivo en Cromo Agar.....	56
ANEXO 13: Protocolo para antifungigrama en disco	57
ANEXO 14: Hoja de registro	64
ANEXO 15: Formato de entrega de resultado.....	68
ANEXO 16: Fotos	69