

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Determinación del perfil de sensibilidad in vitro frente
a antifúngicos en *Candida spp.* aisladas de flujo vaginal**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Jhon Emerson Carlos Ríos

Magaly Rodriguez Saavedra

ASESORES

Víctor Crispín Pérez

Mirtha Roque Alcarraz

Lima - Perú

2006

DEDICATORIA

A Dios, ser supremo que está siempre conmigo, brindándome fortaleza espiritual y sabiduría para seguir por el camino correcto.

A mis padres David y Dominga por su apoyo y sacrificios brindados que hicieron posible el logro de mi desarrollo profesional.

A mis hermanas Miriam y Katherine, quienes son el motor en mi vida que me impulsan a seguir adelante.

A mis tíos Sofonías y Gilver por su apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de mi carrera universitaria.

A mis amigos Julio, Jannelle, Leo, Martha, y a todos mis compañeros por compartir gratos momentos en las aulas universitarias

Jhon Emerson Carlos Ríos

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi hijo por ser mi fuerza y templanza, a mis padres por su amor y apoyo.

A mis amigos, Julio y Jannelle por su valiosa y sincera amistad y a la vida, por lo aprendido y aprehendido.

A mis maestros de la facultad.

Magaly Rodríguez Saavedra

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en especial a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por permitirnos ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

Un agradecimiento muy especial a nuestro Asesor Mg. Víctor Crispín y a nuestra Co-Asesora Mg. Mirtha Roque, por su orientación y sus importantes consejos para la elaboración y culminación del presente trabajo.

A los distinguidos miembros del Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo Gamarra Ballena

Miembros: Q.F. José Irej Namijira

Q.F. María Elena Salazar Salvatierra

Q.F. Emma Acosta Malpica

Cuyas valiosas sugerencias han contribuido a dar realce a este trabajo

Muchas Gracias

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	7
SUMMARY	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. GENERALIDADES	11
2.1 Candidiasis Vulvovaginal	11
2.1.1 Definición	
2.1.2 Sintomatología	
2.1.3 Factores Predisponentes y de Riesgo	
2.1.4 Etiología y Epidemiología	
2.1.5 Diagnóstico	
2.1.6 Tratamiento	
2.2 Género <i>Candida</i>	14
2.2.1 <i>Candida albicans</i>	
2.2.2 <i>Candida glabrata</i>	
2.2.3 <i>Candida tropicalis</i>	
2.2.4 <i>Candida krusei</i>	
2.2.5 <i>Candida parapsilosis</i>	
2.2.6 Otras especies de <i>Candida</i>	
2.2.7 Sensibilidad y Resistencia del Género <i>Candida</i>	
2.3 Agentes Antifúngicos, Mecanismos de Acción y Mecanismos de Resistencia	20
2.3.1 Polienos	
2.3.2 Azoles	
2.3.3 Alilaminas	
2.3.4 Lipopéptidos	
2.3.5 Análogos de Nucleósidos	
2.4 Importancia del Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	24

III.	PARTE EXPERIMENTAL	28
	3.1 Materiales, Equipos, Medios de Cultivo y Reactivos	
	3.2 Metodología	
	3.3 Aislamiento e Identificación de las especies de <i>Candida</i>	
	3.4 Determinación del Perfil de Sensibilidad <i>in vitro</i>	
IV.	RESULTADOS	40
V.	DISCUSIÓN	56
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	RECOMENDACIONES	62
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
IX.	ANEXOS	69

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aislar, identificar y determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* frente a antifúngicos de especies del género *Candida* aisladas de flujo vaginal. Se aislaron 60 cepas de *Candida* de 300 pacientes con vulvovaginitis atendidos por consulta externa en el servicio de ginecología del Hospital “Dos de Mayo” de la ciudad de Lima – Perú. Los estudios de aislamiento, identificación y determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fueron realizados en el Instituto de Investigación de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Las especies aisladas fueron *Candida albicans* 45 (75%), *Candida glabrata* 7 (11,6%), *Candida tropicalis* 6 (10%), *Candida krusei* 1 (1,7%) y *Candida parapsilosis* 1 (1,7%). Dichas especies se identificaron según procedimientos estándares, se utilizó CHROMagar Candida® y se realizó la prueba del tubo germinal para la identificación presuntiva; la identificación definitiva se realizó mediante asimilación (Auxonograma) y fermentación de carbohidratos (Zimograma). Los valores de CMI obtenidos *in vitro* mediante la técnica de microdilución en caldo, estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M27-A2), oscilaron en el rango de 0.5 a 16 µg/mL para fluconazol, de 0.03 a 0.125 µg/mL para ketoconazol y de 0.03 a 0.25 µg/mL para la anfotericina B. Estos resultados indican que la especies de *Candida* estudiadas, son significativamente sensibles frente a los azoles (fluconazol y ketoconazol) y a la anfotericina B.

Palabras Clave: *Candidiasis vulvovaginal, Candida spp., Concentración Mínima Inhibitoria, CMI, resistencia antifúngica.*

SUMMARY

The aim of this work was to isolate, to identify and to determine *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from vaginal secretion. Sixty strains of *Candida* were isolated from 300 patients with vulvovaginitis attended the outpatient gynecology at National Hospital "Dos de Mayo" of Lima - Peru. Studies of isolation, characterization, and determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were realized in the Institute of Investigation of Biological Chemistry, Microbiology and Biotechnology "Marco Antonio Garrido Malo" of the faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). The isolated species were *Candida albicans* 45 (75%), *Candida glabrata* 7 (11,6%), *Candida tropicalis* 6 (10%), *Candida krusei* 1 (1,7%) y *Candida parapsilosis* 1 (1,7%). They were characterized according to standard procedures, CHROMagar Candida® and the germ tube test were used for the presumptive identification, the definitive identification was realized by means of assimilation (Auxonogram) and fermentation of carbohydrates (Zimogram). The MIC values *in vitro* obtained by the technique of microdilution in broth, standardized by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M27-A2), oscillated between 0,5 and 16 mg/mL for fluconazol, 0,03 to 0,125 mg/mL for ketoconazol and 0,03 to 0,25 mg/mL for anfotericina B. These results indicate that species of *Candida* studied, are significantly sensible against azoles (fluconazol and ketoconazol) and to anfotericina B.

Key words: *Vulvovaginal Candidiasis, Candida spp., Minimum Inhibitory Concentration, MIC, antifungal resistance.*

I. INTRODUCCION

Las infecciones vaginales son una de las causas más frecuentes de consulta en ginecología, la secreción vaginal anormal y otros síntomas relacionados, son manifestaciones comunes en estas pacientes^{1,2}.

En los últimos años ha ocurrido un aumento continuo en el número de infecciones vulvovaginales^{3,4}. Los grandes responsables del aumento de estas micosis son las levaduras, principalmente las especies del género *Candida*⁵; constituyendo una causa importante de morbilidad⁶.

Tradicionalmente se ha considerado que no es necesario aislar e identificar las especies de *Candida* en pacientes con candidiasis vulvovaginal (CVV), ya que *Candida albicans* constituía la etiología entre el 85% y 90% de los episodios⁷. Sin embargo, en la última década se ha informado un aumento progresivo en el aislamiento de especies de *Candida no-albicans* en pacientes con CVV sintomática y asintomática, las cuales representarían más del 30% de las levaduras aisladas. Entre estas especies destacan *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*, las cuales además, presentan menor sensibilidad *in vitro* al fluconazol y a otros compuestos azólicos que *Candida albicans* o exhiben resistencia intrínseca tal como *Candida Krusei*^{7,8}.

La frecuencia de candidiasis difiere en cada población^{8,9,10}, enriqueciendo la evidencia que la etiología de esta infección es variable y requiere la realización de estudios individuales para conocer las características de la población con la que se esté trabajando⁷.

La resistencia de las cepas del género *Candida* a los agentes antifúngicos fue por muchos años un problema de poca importancia, pero recientemente se ha reportado un incremento en la resistencia a estas drogas, especialmente entre las especies de *Candida no-albicans*, las cuales, a su vez aparecen con mayor frecuencia en pacientes con candidiasis vulvovaginal recurrente¹¹.

Se cree que el uso previo de imidazoles, especialmente el fluconazol, podría efectuar una selección de estas especies resistentes, e incluso podría

inducir la aparición de cepas mutantes de *Candidas albicans* resistentes a la terapia¹².

En síntesis, el aumento del número de infecciones fúngicas por especies de *Candida no-albicans*, así como la aparición de resistencias a los diversos antifúngicos, ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estudios de sensibilidad *in vitro* para auxiliar al clínico en el diagnóstico de candidiasis vaginal y en la definición de un mejor esquema terapéutico, que posibiliten la correlación de los datos obtenidos en el laboratorio con la evolución clínica de los pacientes con este tipo de infecciones¹³.

Los estudios de sensibilidad *in vitro* con agentes antifúngicos no se realizan de forma habitual en los laboratorios de micología médica, sin embargo, cada vez resulta más evidente que es necesario contar con técnicas estandarizadas que permitan orientar el tratamiento adecuado de las micosis, si se tiene en cuenta la creciente frecuencia de aparición de cepas resistentes; por esta razón el propósito en este trabajo fue conocer el comportamiento de los aislamientos clínicos de *Candida* frente a antifúngicos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En tal sentido, para el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aislar e identificar levaduras del género *Candida* de pacientes ambulatorios con vulvovaginitis que acudieron al servicio de ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo” entre Febrero y Octubre del 2004.
2. Determinar el perfil de sensibilidad *in vitro*, mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a la Anfotericina B, Ketoconazol y Fluconazol para las especies de *Candida* aisladas, mediante el método de microdilución en caldo.

II. GENERALIDADES

2.1 CANDIDIASIS VULVOVAGINAL

2.1.1 Definición: La candidiasis vulvovaginal (CCV) es una infección aguda o subaguda producida por una levadura (hongo) que afecta a la vagina; comúnmente es conocida como afta y es causada por especies del género *Candida*¹⁴.

Se clasifica en:

CVV	No complicadas	Complicadas
Frecuencia	Esporádica	Recurrente
Intensidad	Leve a moderada	Severa
Agente etiológico	<i>C. albicans</i>	<i>C. no-albicans</i>
Huésped	Normal, no gestantes	Anormal (diabetes, inmunosupresión)

2.1.2 Sintomatología: El cuadro clínico se caracteriza por una leucorrea blanca, espumosa, grumosa, de aspecto viscoso muy pruriginoso que recubre la pared de la vagina y el endocérnix (flujo blanquecino caseoso similar a queso blanco) o puede tener un aspecto normal; la mucosa de la zona se encuentra eritematosa¹⁶. Las mujeres suelen tener prurito vulvovaginal o irritación en la vagina y la vulva. La irritación suele ser muy molesta. La vulva puede enrojecer, inflamarse o agrietarse⁹; además puede presentar dispareunia y quemazón¹⁷.

2.1.3 Factores Predisponentes y de Riesgo¹⁸⁻²⁰:

- Daño en la integridad de la piel por maceración de sus tejidos, heridas, abrasión por quemaduras térmicas o químicas y por presencia de catéteres vasculares.
- Alteración de la barrera mucocutánea por diabetes, uso de agentes antimicrobianos, uso de drogas citotóxicas, corticoides.
- Desbalance nutricional u hormonal provocado por diabetes, anticonceptivos orales, gestación, malnutrición y uremia.

- Disminución del número de células fagocitarias como resultado de leucemia, granulomatosis, aplicación de radiaciones o quimioterapia contra el cáncer.
- Defectos intrínsecos en las funciones de las células fagocitarias como resultado de enfermedades granulomatosas crónicas y deficiencia de mieloperoxidasa.
- Alteración de la función fagocitaria causada por uremia, enfermedades virales y el uso de corticoides y agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y sulfamidas.

Entre los factores de riesgo:

- Relaciones sexuales: incrementa marcadamente la frecuencia de la candidiasis vulvovaginal. No se ha encontrado relación con el número de compañeros sexuales, pero sí se relaciona con el contacto oral-genital.
- Contracepción: se relaciona con dosis elevadas de estrógenos (anticonceptivos orales de primera generación). El intercurso sexual con el uso de diafragma y espermicidas en los 3 días precedentes se relaciona con un incremento marcado en la colonización por *Candida*. También se asocia con el uso de esponja contraceptiva vaginal y dispositivo intrauterino.
- Lavado y productos de higiene femenina: se ha establecido la asociación entre el lavado como factor predisponente para candidiasis recurrente.
- Antibióticos: Tanto antibióticos como formulaciones tópicas de yodo, metronidazol o clindamicina.

2.1.4 Etiología y Epidemiología:

La Candidiasis Vulvovaginal (CVV) es la segunda causa más común de infección vaginal. Afecta principalmente a mujeres entre 20 y 40 años, y entre el 50 al 72% de las mujeres la han presentado por lo menos un episodio en el transcurso de su vida^{16,17}.

Es causada generalmente por levaduras del género *Candida* las cuales forman parte de la flora comensal del intestino y vagina¹⁹, siendo el principal agente etiológico de la candidiasis vaginal *Candida albicans*¹⁷, ya que ésta causa entre

un 80%-85% de las infecciones, mientras que las especies de *C. no-albicans* causan entre el 5%-20% de los casos^{8,11}. La mayoría de las infecciones por *Candidas no-albicans* son debidas a *Candida glabrata* (5%-10% de casos) o *Candida tropicalis* (menor a 5% de los casos). *Candida krusei* es una causa inusual de vaginitis fúngica⁶. En las mujeres afectadas de vaginitis con flujo aumentado, *C. glabrata* corresponde a la especie cultivada con mayor frecuencia después de *C. albicans*, variando según las series desde un 0.6% a un 36% con una frecuencia media entre el 15% y 20%¹⁹.

La frecuencia de candidiasis difiere en cada población. En la población mexicana el 60% de pacientes tuvieron cultivos positivos para *C. albicans* y el 40% para *Candida spp*. En Turquía, el principal agente causal de vaginitis fue *Escherichia coli*, seguido de *Candida spp*. En Alemania, encontraron que en 32% de las pacientes con vaginitis era debida a *Candidas*, y en la India, 20% tenían *Candida*¹⁷. Al Norte de Santiago se estudió el flujo vaginal de 100 adolescentes las que fueron analizadas mediante Gram y cultivo detectándose 62% de vulvovaginitis, correspondiendo 31% a vaginosis bacteriana (VB), 24% a candidiasis, 2% a Trichomoniasis y 5% etiología mixta (VB asociado candidiasis)²². En el Perú en 1971 de 89 casos de vaginitis se encontraron que 37.6% de muestras tenían *Candida*, de las cuales un 20% fue debido a *Candida spp*, un 31% a *Candida spp* más bacterias y un 4% a *Candida spp* más *Trichomonas*⁶ y en el 2005 se logró identificar en muestras de flujo vaginal de gestantes que un 21% correspondía a *Candida spp*⁹.

Esta diversidad de resultados en los estudios epidemiológicos de la infección cérvico vaginal, enriquecen la evidencia que la etiología de esta infección es variable y requiere la realización de estudios individuales para conocer las características de la población con la que se esté trabajando¹⁷.

2.1.5 Diagnóstico: Tradicionalmente el diagnóstico clínico basado en la sintomatología y observación del flujo vaginal.

2.1.6 Tratamiento:

No Farmacológico: La candidiasis se trata lavando la vagina con agua y jabón, secándola con una toalla limpia todos los días.

Farmacológico: En los Estados Unidos el único azol aprobado para el tratamiento de la CVV 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).

2.2 GÉNERO CANDIDA^{23,24}

El género *Candida* pertenece a la familia *Cryptococcaceae* dentro del orden *Deuteromycota* (hongos imperfectos), compuesto por más de 200 especies diferentes y con hábitat natural ubicuo. Muchas de estas especies forman parte de nuestra flora normal de la piel, tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio; aproximadamente un 10% de éstas se relaciona con enfermedades infecciosas (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoides*, *C. stellatoidea*, *C. brumptii* entre otras. Debido a su amplia distribución, puede originar infecciones de distinta localización y gravedad, generalmente asociadas a factores predisponentes del huésped, por lo que se le considera como un microorganismo patógeno oportunista.

Candida es un hongo dimorfo que puede encontrarse en dos diferentes estados. Las esporas (blastosporas) constituyen el fenotipo para la extensión, diseminación y transmisión. Constituyen una forma resistente del hongo y estarían asociados con las colonizaciones asintomáticas. Por otro lado, los micelios son las formas germinativas: este fenotipo tiene capacidad invasora tisular y ocasiona la sintomatología propia de la infección²³.

En cuanto a la patogénesis, *Candida* sigue los siguientes pasos:

El primero de los cuales es la adhesión. La adhesión es crucial en la supervivencia de las esporas. En este sentido, la capacidad de adhesión de *C. albicans* es superior a la de otras especies y ello podría explicar la mayor frecuencia de esta especie en este tipo de infecciones. La adhesión tiene lugar por la unión a un receptor de membrana (iCb3 y fibronectina) por parte de una proteína transmembrana de la membrana micótica (análoga a la integrina). Esta proteína micótica es capaz de anclarse en el receptor epitelial. Existen factores que pueden actuar como promotores o facilitadores del proceso de adhesión. En este sentido, un ambiente hiperestrogénico incrementa la exposición de los complejos epiteliales glicoproteicos que actúan como receptores facilitando así la adherencia de los hongos a la superficie epitelial. De hecho la vulvovaginitis candidiásica es menos frecuente en situaciones de hipoestronismo (premenarquia, postmenopausia). Por otro lado, la gestación y la ingesta de anticonceptivos orales de alta dosis incrementan la proclividad a este tipo de infecciones. Otro factor que puede afectar la capacidad de adhesión de los hongos es la competencia con la flora vaginal, concretamente con los lactobacilos vaginales. Los lactobacilos inhiben la adhesión de esporas micóticas a la superficie epitelial mediante un proceso de co-agregación y competencia por los receptores. De esta forma, una reducción de la flora vaginal de lactobacilos condiciona un incremento del riesgo de infección micótica²⁴.

Una vez adheridas, las esporas son incapaces de penetrar en el epitelio vaginal y causar una vulvovaginitis. Para ello es necesaria la germinación de las esporas y el desarrollo de hifas y micelios. Generalmente, las especies de *Candida* que no se adhieren no son patógenas²⁵.

Una vez formados los micelios, *Candida* es capaz de penetrar e invadir el epitelio vaginal. Este proceso de penetración está directamente relacionado con la producción de una serie de proteasas capaces de destruir proteínas con función defensiva a nivel de la mucosa vaginal por parte de las hifas.

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

En este sentido, los estrógenos promueven también el desarrollo de micelio facilitando la penetración y consiguiente aparición de una infección clínica²⁴.

2.1.1 *Candida albicans*

Esta especie es considerada, junto a las otras especies del género, un comensal habitual de la boca, tracto gastrointestinal, vagina y piel donde es capaz de colonizar las distintas superficies, asistida por diversos factores de patogenicidad y la alteración de los mecanismos de defensa del huésped. Es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir el tratamiento antifúngico o de lesionar las células y tejidos que invade²⁸. Produce fosfolipasas, proteasas y factores killer²⁹.

Se cree que el 20% de la población es portadora de levaduras comensales que en presencia de factores predisponentes pueden originar una infección. Se la considera como el responsable del 70% de las infecciones en general. La distribución de la especie depende de la localización de las infecciones pudiendo ser aislada como el agente etiológico de las candidiasis intertriginosas en un 88% de los casos en manos, y en un 7% de las infecciones de este tipo en pies. La frecuencia de aislamiento en las manos es superior a la que caracteriza a hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis*. En las candidiasis semimucosas la frecuencia de aislamiento es de aproximadamente 86%, en los pliegues inguinales del 21%. Se estima también que entre 63-89% de las levaduras patógenas corresponden a *C. albicans* mientras que el 1-15% son otras especies

pertenecientes al mismo género. Es la especie más frecuente detectada en ginecología, entre 80 a 90% asociada con la candidiasis vulvovaginal (CVV).

Como levadura saprofita *Candida albicans*, se encuentra en diversas localizaciones cutáneo-mucosas en personas que no padecen infección y que pueden llegar hasta el 30% en boca y 42% en vagina de mujeres gestantes. Prefiere una localización digestiva y su presencia en la piel se considerada patológica.

2.2.2 *Candida glabrata*

Esta especie del género *Candida* parece tener una mayor afinidad por la mucosa genitourinaria, es aislada en un 5 a 15% de casos de CVV, siendo la especie cultivada con mayor frecuencia después de *Candida albicans*; se trata de un patógeno emergente en asociación con su marcada resistencia a algunos antifúngicos de tipo triazólico, debido a un incremento en la síntesis del ergosterol dependiente del citocromo P-450 y de una bomba de eflujo activa para el fluconazol. Las frecuencias de aislamiento más llamativas de *C. glabrata*, para las distintas patologías pueden oscilar entre el 0,4-2.2% de muestras dermatológicas y de 6-14% en candidiasis vulvovaginal. Se describen altas tasas de recurrencia para esta especie, en proporciones superiores a las atribuidas a las infecciones por *C. albicans*. En algunos estudios la presencia de esta levadura en vagina de portadoras asintomáticas es del 28%. Debido a su carácter haploide, se considera que *Candida glabrata* tiene mayores posibilidades de presentar mutaciones que otras especies diploides, como *Candida albicans*, lo que favorece la aparición de resistencia secundaria.

2.2.3 *Candida tropicalis*

Esta especie se considera un patógeno oportunista que produce infecciones exógenas a enfermos inmunodeprimidos o diabéticos en los que se ha producido una alteración de los mecanismos de defensa. Su importancia patológica se relaciona con infecciones en membranas mucosas y profundas en individuos inmunocomprometidos con un origen endógeno, a pesar de que se

aísala como un habitante normal de la piel y flora mucocutánea, es el mayor agente causal de septicemia y candidiasis diseminada con especial importancia en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes. También produce infección de la uña distal con relativa frecuencia, aunque en menor incidencia que *C. albicans*.

2.2.4 *Candida krusei*

Es considerada como la responsable de infecciones en mucosas y candidiasis profundas en pacientes debilitados o inmunocomprometidos, con una frecuencia emergente y en especial de fungemias, endoftalmitis, artritis y endocarditis. Otros problemas que puede causar están asociados a diarrea infantil, infecciones sistémicas, colonizaciones de tracto gastrointestinal, respiratorio y urinario de pacientes con granulocitopenia, aunque carece de los mecanismos de patogenicidad propios de otras especies del género *Candida*

2.2.5 *Candida parapsilosis*

Esta especie produce infección de la uña distal con mucha frecuencia (menos que *C. albicans* y *C. tropicalis*), aunque se ha identificado como responsable de endocarditis y endoftalmitis, y fungemia. Se aísla con mucha frecuencia de la piel, donde vive como comensal, por lo que es un conocido patógeno oportunista. Su presencia en portadores asintomáticos puede llegar al 12% (vaginal). Los valores de aislamiento descritos por la red de vigilancia epidemiológica de España sitúan a *C. parapsilosis* como el hongo patógeno aislado con mayor frecuencia en las micosis cutáneas y subcutáneas.

2.2.6 *Otras especies de Candida*

C. famata es aislada generalmente de muestras medioambientales y con poca frecuencia de muestras clínicas. A pesar de ello se la asocia con la piel y también se aísla en un número elevado en boca y aparato digestivo. Otras especies aisladas pertenecientes al género que tienen distinta importancia son *C. ciferri*, *C. incospicua*, *C. humicola*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. purutropicalis*, *C. rugosa* y *C. wiswanathii*. Todas ellas están presentes en nuestras dermatológicas, con aislamientos individuales inferiores al 0,6%.

2.2.7 Sensibilidad y Resistencia del Género *Candida*:

La resistencia a los antifúngicos puede dividirse en dos categorías: *in vitro* (primaria o secundaria) y clínica. La resistencia *in vitro* primaria, también llamada intrínseca o innata, es la que presenta el microorganismo de forma natural, por ejemplo *Candida krusei* frente a fluconazol. La resistencia *in vitro* secundaria es la que aparece cuando un microorganismo inicialmente sensible se hace resistente. Esta última forma de resistencia aparece con frecuencia en los pacientes infectados por el VIH, en tratamiento prolongado con fluconazol^{14,30}. La resistencia clínica es aquella que aparece cuando el fracaso del tratamiento antifúngico no se asocia con una disminución de la sensibilidad *in vitro*. Este tipo de resistencia puede deberse a varios factores, tanto relacionados con el paciente (estado inmunitario, presencia de catéteres intravasculares o prótesis infectadas) como con el antifúngico (farmacocinética, interacciones farmacológicas, etc.). Asimismo, habrá que tener en cuenta los factores relacionados con la propia virulencia del microorganismo que ocasiona la infección^{12,31}.

El 95% de las cepas de *Candida spp.* son sensibles a la anfotericina B (ANB) y esta cifra no se ha modificado a través de los años, por lo que su sensibilidad es bastante predecible.

Entre las especies que más fácilmente desarrollan resistencia secundaria a anfotericina B destaca *Candida parapsilosis*, seguida de *Candida tropicalis* y *Candida lusitaniae*. Por otra parte, las especies haploides, como *Candida guilliermondi* y *Candida glabrata* pueden expresar más fácilmente las mutaciones de resistencia.

El porcentaje de *Candida spp.* susceptible a los azoles es alto (80-90%), pero algunas cepas de *Candida krusei* poseen resistencia intrínseca al fluconazol (FCZ). Se ha observado que *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata* pueden ser de 4 a 32 veces menos sensible a fluconazol que *Candida albicans*. La sensibilidad a este grupo de drogas puede disminuir cuando ya se ha usado previamente alguna de ella. Puede haber resistencia cruzada especialmente

entre fluconazol (FCZ) e itraconazol (ITZ). En pacientes inmunocomprometidos o que han recibido azoles, o con infecciones severas, o que no responden al tratamiento se recomienda el estudio de sensibilidad a estas drogas. Los antifúngicos que deben ser testeados para uso sistémico son FCZ y ANB. No hay datos que avale el uso de ITZ en estas situaciones. El ITZ y el ketoconazol son útiles para infecciones de piel y mucosas. Los métodos de referencia son la macrodilución y microdilución en caldo. La microdilución se recomienda para testear varias cepas en paralelo.

La resistencia intrínseca a 5-fluorocitosina es excepcional y la resistencia primaria es muy variable, según la especie. Pero, sin lugar a dudas, la resistencia secundaria es el mayor inconveniente de este antifúngico cuando se utiliza como monoterapia. Su incidencia varía según el tipo de infección, llegando hasta el 50% en las infecciones mucocutáneas crónicas. Por lo tanto, la repercusión clínica es notable, constituyendo el único problema grave de resistencia a los fármacos antifúngicos, ya que cualquier especie sensible puede desarrollarla. Esta situación, unida a la sinergia observada entre la 5-fluorocitosina y la anfotericina B, o con los azoles, ha motivado que su uso actualmente sea siempre en combinación con otro antifúngico, y nunca sola.

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

2.3 AGENTES ANTIFÚNGICOS, MECANISMOS DE ACCIÓN Y MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Clasificación química de los antifúngicos^{24,32}.

Poliénicos:

- Nistatina; Nistatina liposomal

- Anfotericina B y sus formulaciones lipídicas

Azoles:

- Imidazoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol, etc.)
- Triazoles (fluconazol, itraconazol)
- Triazoles de segunda generación (voriconazol, ravuconazol, posaconazol)

Alilaminas:

- Terbinafina
- Naftifina

Lipopéptidos:

- Papulacandinas
- Equinocandinas
- Triterpenos glicosilados

Análogos de Nucleósido

- Tubercidina
- Flucitosina (5-fluorocitosina)

2.3.1 Polienos

Anfotericina B: Su mecanismo de acción se basa en la unión de la molécula al ergosterol de la membrana fúngica, alterando la permeabilidad de ésta, lo que permite una pérdida de K⁺, glúcidos y metabolitos, con la consiguiente muerte celular. La base de su toxicidad selectiva radica en la mayor afinidad del antibiótico por el ergosterol (el principal esteroide de la membrana fúngica) frente al colesterol (el principal esteroide de las células eucariotas de mamíferos).

Mecanismo de Resistencia.

Las especies de *Candida* más proclives a desarrollar resistencia a los polienos suelen hacerlo mediante alguno de estos mecanismos:

- a) Por mutación de los genes Po11 a Po15, aumentando la actividad catalasa y reduciendo el daño oxidativo sobre la membrana; o
- b) Por defectos en los genes ERG2 y EGR3, que modifican la composición de la membrana y disminuyen la presencia del ergosterol o lo sustituyen por otros esteroides metilados.

2.3.2 Azoles

Ketoconazol, Fluconazol e Itraconazol: Interfieren con la síntesis de ergosterol, al inhibir la C₁₄-alfa-desmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P-450 y que transforma lanosterol en ergosterol. Esta inhibición altera la fluidez de la membrana, aumentando la permeabilidad y produciendo una inhibición del crecimiento celular y de la replicación. Esta inhibición del citocromo P-450 es responsable de los efectos adversos que los azoles pueden causar en humanos.

Mecanismo de Resistencia

Alteración en la interacción droga-diana (14-alfa-demetilasa): Causado por mutaciones que alteran la unión a la droga (ejm. del gen ERG11 que es el que codifica su síntesis), pero no la unión a los sustratos endógenos. La diana activa por ejemplo puede catalizar la demetilación pero tiene una reducida afinidad a los azoles.

Alteración en la biosíntesis del esterol: Causado por lesiones en la $\Delta^{5(6)}$ -desaturasa; lo cual resulta en la acumulación de 14-alfa-metilfecosterol en vez de ergosterol.

Reducción en la concentración intracelular de la enzima blanco: Causado por cambios de lípidos y esteroides en la membrana, hay sobreexpresión de las bombas expulsoras de drogas específicas al exterior (CDR1, PDR5 y BEN^r). En consecuencia habrá pobre penetración de la droga a través de la membrana debido al bombeo activo del compuesto hacia el exterior.

Sobreexpresión de la diana: Causado por el incremento del número de copias de la enzima blanco; lo cual resulta en un aumento de la síntesis del ergosterol lo que contribuye a una resistencia cruzada entre el fluconazol e itraconazol.

2.3.3 Alilaminas

Terbinafina: Su mecanismo de acción se centra en la inhibición de la síntesis del ergosterol en etapas tempranas de su biosíntesis (Ghannoum y Rice 1999). Pero el nivel de la misma es distinto al de los antimicóticos azólicos, recayendo sobre la enzima escualeno–epoxidasa, que realiza la epoxidación del escualeno y no sobre la C-14-alfa-desmetilasa. Como consecuencia, se produce además de la reducción de la síntesis de ergosterol, acumulación de escualeno, resultando su acción fungicida (Carrillo 1994, Sánchez et al 1999). El alto nivel de escualeno puede aumentar la permeabilidad de la membrana llevando a la interrupción de la organización celular (Ghannoum y Rice 1999, Anfa 2002).

Mecanismo de Resistencia

A pesar de fracasos terapéuticos observados en pacientes tratados con terbinafina, la resistencia a las alilaminas en asociación con usos clínicos de terbinafina y naftifina no ha sido encontrado en hongos patógenos humanos. Sin embargo, con el uso creciente de este agente, la resistencia podría esperarse, toda vez que Vanden Bossche y Col., han reportado cepas de *Candida glabrata* que han llegado a ser resistentes a fluconazol y expresando resistencia cruzada a terbinafina²⁴.

2.3.4 Lipopéptidos

Equinocardinas: El blanco de las equinocardinas es el complejo de síntesis de la pared celular fúngica β -1,3-D-glucano sintetasa³³. La depleción de glucano de la pared fúngica consecuente lleva a un colapso osmótico, balonamiento y finalmente lisis de la célula fúngica³⁰. Están representados por caspofungina, micafungina y anidulafungina^{34, 35}.

Mecanismo de Resistencia

El conocimiento que tenemos sobre los mecanismos de resistencia se basa en los resultados obtenidos con mutantes de laboratorio, sobre todo de *Saccharomyces cerevisiae* (mutaciones de los genes GNS1, FKS1 y RHO1) y *C. albicans* (la mutación del CDR2p activa el sistema de achique ABC y elimina activamente la equinocandina del interior de la célula fúngica)^{33,35,36}.

2.3.5 Análogos de Nucleósidos

Flucitocina: un derivado fluorado de la citosina, se transforma en el organismo en 5-fluorouracilo (5-FU), un inhibidor no competitivo de la timidilato sintetasa y de la síntesis de DNA.

Mecanismo de Resistencia

La resistencia intrínseca o adquirida a la 5-fluorocitosina es el resultado de la ausencia o disfunción de una o más de las enzimas necesarias para su transformación intracelular, y puede deberse a dos mecanismos fundamentales:

- a) Ausencia o disfunción enzimática (generalmente causada por mutaciones de los genes FCY1 y FCY2); y
- b) Aumento de la síntesis de pirimidinas, debido a un defecto de la regulación de su biosíntesis. La resistencia secundaria a 5-fluorocitosina constituye uno de los problemas más graves de resistencia antifúngica en la actualidad; ya que cualquier especie sensible puede desarrollarla.

2.4 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) PARA LAS LEVADURAS (Sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos)

Hasta 1983 la comunidad científica no se interesó por la normalización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. El incremento de las infecciones fúngicas oportunistas durante las últimas décadas, junto con la aparición de resistencias a los diversos antifúngicos disponibles, hicieron necesario el

desarrollo de estándares para determinar la sensibilidad *in vitro* que posibiliten la correlación de los datos obtenidos en el laboratorio con la evolución clínica de los pacientes^{16,17}.

Así, una de las mayores dificultades para la evaluación de un caso de resistencia a los antifúngicos fue la falta de un método estandarizado de determinación de la sensibilidad *in vitro*. Hasta que en el año de 1997, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) publicó un método de referencia para levaduras, el documento M27-A, y en el año 2002 se publica el documento M27-2A en el cual se especifica el tamaño del inóculo y la forma de prepararlo, el medio de cultivo, la temperatura de incubación, los tiempos y forma de lectura para anfotericina B, fluconazol, ketoconazol, itraconazol y flucitosina. Asimismo, establece los puntos de corte para fluconazol, itraconazol y flucitosina en *Candida* spp., tras 24 horas de incubación³⁷, obteniéndose una reproducibilidad intra e interlaboratorio similar a la conseguida con los antibacterianos.

Con éste método se puede determinar "*in vitro*" la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), de los antifúngicos contra las especies de *Candida albicans* y de *Candida no-albicans* con fines de establecer una terapia clínica adecuada, en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal.

Según Espinel-Ingroff^{21,42}, para que un caso de resistencia sea correctamente evaluado se debe disponer de un método de sensibilidad *in vitro* fiable y estandarizado, de una descripción del fracaso terapéutico (incluyendo dosis, concentraciones séricas alcanzadas y posibles interacciones con otros fármacos) y de una evaluación de los factores específicos del paciente.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) no es un parámetro físico ni químico; por tanto, cualquier cambio en el tamaño del inóculo, el medio de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, o en los puntos de corte, pueden hacer variar los resultados de la CMI, y de ahí la importancia de la

estandarización de las pruebas de sensibilidad *in vitro*. Por otro lado, debido al gran número de factores que pueden influir en la evolución clínica de una infección fúngica, una CMI baja no predice necesariamente el éxito terapéutico; sin embargo, la resistencia *in vitro* es altamente indicativa de un fracaso terapéutico³⁶, por lo tanto estos datos serán muy útiles a la hora de orientar futuros tratamientos y para valorar epidemiológicamente las resistencias a los antifúngicos.

Los estudios de correlación *in vitro-in vivo* se pueden realizar utilizando el modelo animal o el humano. El modelo animal tiene la ventaja de partir de grupos homogéneos y, por tanto, puede ser controlado más fácilmente que los ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, tiene como inconveniente la dificultad para extrapolar las conclusiones obtenidas al modelo humano, debido, por ejemplo, a la diferente farmacología existente en ambos.

En los humanos se puede estudiar a partir de dos tipos de infecciones, las cutáneo-mucosas y las profundas. Las primeras tienen la ventaja de la mayor frecuencia con que se producen, de presentar habitualmente un cuadro clínico uniforme, lo que facilita su diagnóstico, y de que un fracaso en el tratamiento no es tan grave como en el caso de las infecciones fúngicas profundas. Todos estos factores han contribuido a que éste sea el modelo más utilizado en los estudios de correlación. Sin embargo, este modelo presenta como limitaciones la dificultad de extrapolar los resultados a las infecciones fúngicas profundas, entre otras causas por la diferente farmacocinética y biodisponibilidad de los fármacos en la piel y en los órganos profundos, y por los defectos en las defensas de los pacientes, que suelen ser distintos en ambos casos.

Finalmente, la evolución de los pacientes con infecciones fúngicas profundas es el modelo que más información proporciona. Sin embargo, presenta importantes limitaciones, como la dificultad en el diseño del estudio, la lentitud en la ejecución, la dificultad en el diagnóstico de estas infecciones, los factores dependientes del paciente (que pueden ser decisivos en la evolución clínica) y el

hecho de que muchos pacientes se traten con más de un antifúngico, de forma simultánea o sucesivamente³⁸.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES, EQUIPOS, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Materiales

- Pipetas volumétricas Pirex[®] de 1 mL, 5 mL.
- Potenciómetro Hanna H-221.
- Espejo para lectura de placas.
- Placas petri estériles.
- Sacabocados.
- Tubos de ensayo Pirex[®] de 16 x 150 mm.
- Micropipetas Wilson.
- Tips de 50 y 100 μ L.
- Viales de 5, 10 y 25 mL.
- Fiolas de 10, 50 y 100 mL.
- Guantes estériles.
- Filtros de 0,22 μ m de diámetro (Milipore).
- Frascos de vidrio con tapón de rosca de 100, 250 y 500 mL.
- Probetas de 250 mL y 500 mL.
- Asas de siembra.
- Jeringas estériles.
- Microplacas estériles de fondo en U x 96 pozos (Corning[®]).

Equipos

- Autoclave
- Balanza Analítica con una sensibilidad mínima de 0,01 mg Ohaus
- Balanza Analítica con sensibilidad mínima de 0,1 mg Denver Modelo XP-300
- Incubadora Memmert.
- Refrigeradora.

- Microscopio óptico compuesto.
- Cabina de siembra estéril.
- Mecheros Bunsen y de alcohol.
- Agitador Rotatorio Vortex.

Medios de Cultivo

- Medios de Cultivo (agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol, agar CHROMagar candida®).
- Buffer MOPS (Ácido morfolino propanosulfónico).
- RPMI-1640 con glutamina sin bicarbonato.

Reactivos

- DMSO (Dimetilsulfóxido).
- Agua destilada estéril.
- Ketoconazol.
- Fluconazol.
- Anfotericina B.

3.2 METODOLOGÍA

Realizamos una investigación considerando un diseño transversal, analítico ya que está orientado a averiguar cual es el efecto de los antifúngicos sobre las cepas aisladas, prospectivo por su desarrollo en el tiempo, experimental y aplicada porque sus resultados puede influir en la decisión de futuros tratamientos antifúngicos.

Entre Febrero y Octubre del 2004 se recolectaron muestras de flujo vaginal de 300 pacientes con vulvovaginitis atendidos por consulta externa en el Servicio de Ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo” ubicado en la ciudad de Lima-Perú. Del total de muestras recolectadas, 60 de ellas correspondieron al género *Candida*, las mismas que se utilizaron en el presente estudio.

Los Criterios de Inclusión y Exclusión para la toma de las muestras de flujo vaginal fueron las siguientes:

Criterios de inclusión:

Edad de las pacientes igual o mayor de 18 años.

Sintomatología de candidiasis vulvo-vaginal.

Exclusión:

Pacientes que se encuentren recibiendo tratamiento antifúngico.

Haber recibido tratamiento antifúngico 48 horas previo a su consulta ambulatoria.

Todas las muestras clínicas de flujo vaginal, fueron recolectadas previo consentimiento informado y declaración del participante (Anexo 1). Así como del médico tratante, durante la consulta externa. Las muestras fueron tomadas por el personal de la unidad asistencial de ginecología, el aislamiento, la caracterización a nivel de especie y la sensibilidad *in vitro* se realizó en el laboratorio de microbiología del Instituto de Investigación de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Las especies de levaduras se identificaron según los procedimientos estándares empleados en la micología médica, analizando las características fisiológicas, bioquímicas y micromorfológicas de cada cepa.

3.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE CÁNDIDA

3.3.1 Procedimiento de recolección y siembra de las muestras

Se tomaron las muestras de flujo (exudado) vaginal con hisopos estériles, a las pacientes con diagnóstico de vulvovaginitis que acudieron al consultorio externo de ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo” de la Ciudad de Lima y se sembró en la superficie de agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol contenidas en viales de 10 mL de capacidad y se mantuvieron entre 25 y 30°C, durante 3 a 5 días. Luego, las muestras se sembraron en placas de agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol y se incubaron entre 25 y 30°C por 48 h, observándose además la presencia de crecimiento o ausencia del mismo, hasta por 7 días.

3.3.2 Identificación presuntiva de las especies en agar cromogénico (CHROMagar Candida®)

Para la identificación de las especies de levaduras en agar cromogénico, se inoculó una asada de un cultivo fresco en agar Sabouraud en una placa de agar CHROMagar Candida® (Chiron Diagnostics S.A., Lima, Perú). Los cultivos fueron incubados a 37° C y examinados visualmente a las 48 y 72 h para evaluar la morfología y el color de las colonias. Las cepas fueron identificadas en este medio de acuerdo a instrucciones del fabricante y a las características de las colonias publicadas por Odss y Bernaerts³⁹ (tabla 1 y figura 2).

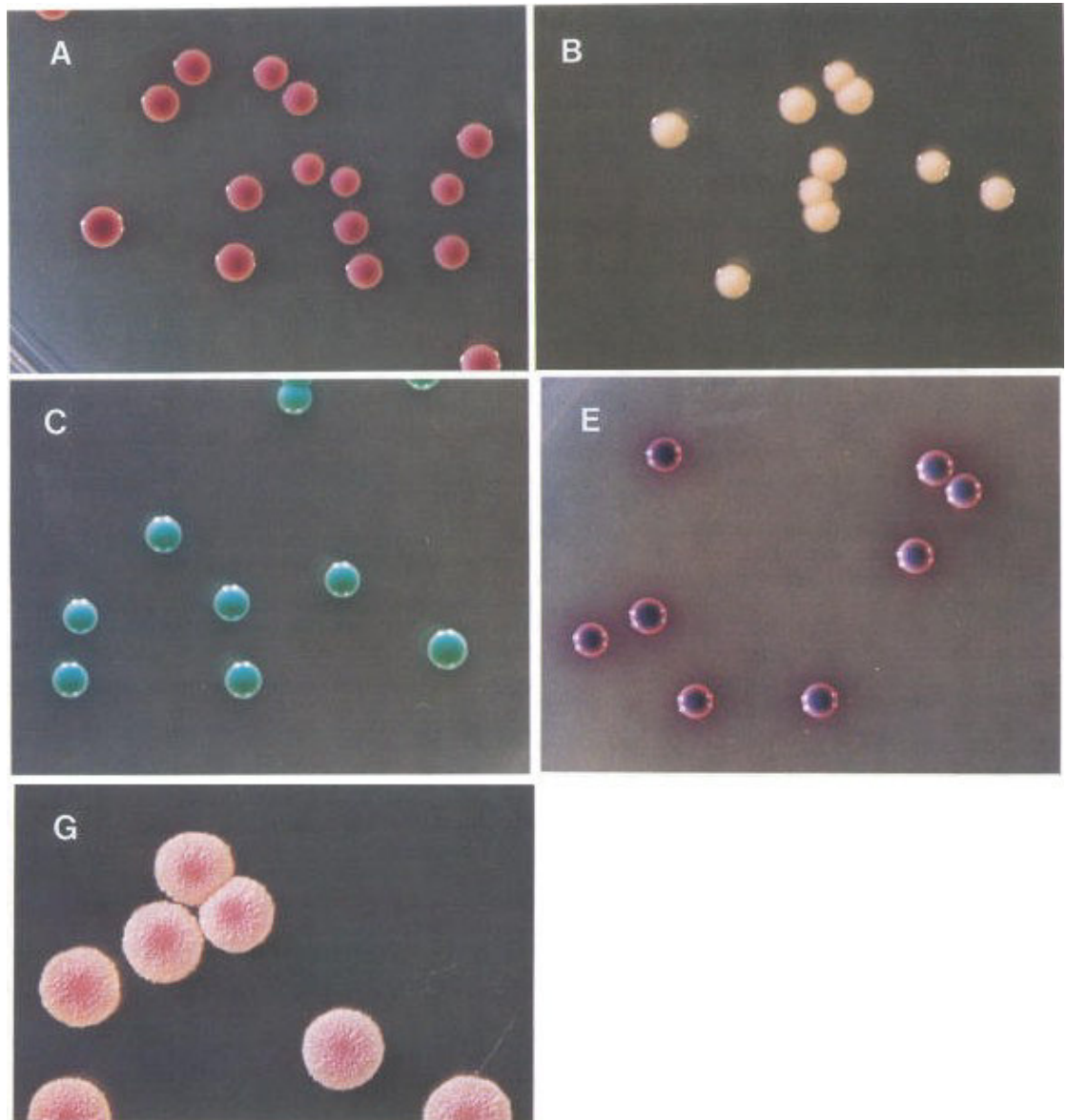
Luego se procedió a realizar una segunda prueba confirmativa para mayor certeza en la identificación, se realizó la prueba del tubo germinal el cual es característico para *C. albicans*. Sin embargo, se ha descrito que algunas especies de *Candida*, tales como *Candida tropicalis* y *parapsilosis*, producen estructuras similares a tubos germinativos¹⁹ y que alrededor del 5% de las cepas de *Candida albicans* no forman tubo germinativo²⁰.

Tabla N° 1: Diferenciación de las colonias de *Candida* en CHROMagar *Candida*®.

Especie	característica de la colonia	Color
<i>C. albicans</i>	Lisa, crece a 45°C	Verde esmeralda
<i>C. tropicalis</i>	Lisa	Azul oscuro con halo marrón
<i>C. krusei</i>	Rugosa	Rosa con halo blanco
<i>C. glabrata</i>	Brillante y cremosa	Violeta
<i>C. dubliniensis</i>	Lisa, no crece a 45°C	Verde esmeralda
Otras especies	-----	Blancas - amarillas

Fuente: ODDS F y BERNAERTS R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-1929.

Figura N° 1: Características cromogénicas de especies de *Candida* aisladas en CHROMagar Candida®.



(A) Colonias rosadas oscuras (bordes pálidos) de *Candida glabrata*, incubadas a 37°C durante 48 h. (B) Colonias claras de *Candida parapsilosis*, incubadas a 37°C durante 48 h. (C) Colonias verdes (bordes pálidos) de *Candida albicans*, incubadas a 37°C durante 48 h. (E) Colonias de *Candida tropicalis*, incubadas a 37°C durante 48 h, el halo púrpura en el agar que rodea las colonias azules grisáceas oscuras es observado sólo en esta especie. (G) Colonias de *Candida krusei*, incubadas a 37°C durante 48 h. Son colonias extendidas, grandes, ásperas y con bordes amplios.

Fuente: ODDS F y BERNAERTS R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-1929.

3.3.3 Prueba del tubo germinal

Las levaduras fueron cultivadas durante 24 a 48 horas en agar Sabouraud-glucosa, luego se realizó la prueba del tubo germinal, el cual consistió en hacer una suspensión de 2 a 3 colonias aisladas de la levadura con 0,5 mL suero humano y posteriormente incubar a 37 °C durante 2 a 3 horas.

tomar de 2 a 3 colonias aisladas de la levadura y hacer una suspensión con 0,5 ml de suero humano e incubar a 37 °C durante 2 a 3 horas.

Luego se tomó una gota de la suspensión suero-levadura, se colocó sobre la lámina porta-objeto y se examinó al microscopio a 40X para observar la presencia de tubos germinativos que salen de las blastosporas⁴⁰.

Posteriormente, para la identificación definitiva se procedió a realizar las pruebas de asimilación (Auxonograma) y fermentación (Zimograma) de carbohidratos de las diferentes levaduras aisladas⁴⁰.

3.3.4 Prueba de asimilación de carbohidratos para identificación de levaduras (Auxonograma)^{39,41}.

Las pruebas de asimilación de carbohidratos se usan ampliamente para la identificación definitiva de las levaduras de importancia clínica y de microorganismos levaduriformes.

El método de la placa de disco para la evaluación de la capacidad de las levaduras de utilizar los carbohidratos, se basa en el uso de una base nitrogenada sin carbohidratos, y la observación del crecimiento alrededor de discos de papel de filtro impregnados con carbohidratos después de un periodo apropiado de incubaciones. Se preparó la base nitrogenada según lo indicado por el fabricante (BBL & DIFCO), y los carbohidratos en solución al 1% se impregnaron en discos de papel (ver Anexo 4).

El crecimiento alrededor de un disco de carbohidratos indicó que el azúcar contenido en ese disco ha sido asimilado por la especie de levadura en estudio y se considera una prueba positiva. Por el contrario, si el crecimiento no estuviera suficientemente concentrado para permitir una lectura, se reincuba durante 24 horas y se lee nuevamente^{39,41}. La tabla 2 nos muestra las características de las especies de *Candida* para esta prueba.

3.3.5 Prueba de fermentación de carbohidratos para la identificación de levaduras (Zimograma) ^{39,41}.

Las pruebas de fermentación de carbohidratos son útiles como complemento de los resultados de las pruebas de asimilación de carbohidratos en la identificación definitiva de especies de levaduras recuperadas de muestras clínicas.

La fermentación de carbohidratos de las levaduras en medios de cultivos apropiados, que contengan una fuente única de carbohidratos es detectada por la producción de gas. La producción de ácido (utilización de carbohidratos) no es un indicador confiable de fermentación. Para obtener resultados exactos, puede ser necesario hacer crecer la levadura mediante 2 ó 3 pasajes a través de un caldo sin carbohidratos para extraer los hidratos de carbono asimilados durante el crecimiento en el medio de recuperación primaria.

La presencia de burbuja en el tubo invertido de Durham o una disminución en el nivel líquido indicó fermentación. El desarrollo de un color amarillo no es un indicador confiable y debe ser ignorado. La tabla N°2 nos muestra las características de las especies de *Candida* para esta prueba.

Luego de ser identificadas, las cepas fueron mantenidas en agar Sabouraud-glucosa, para la posterior determinación del perfil de sensibilidad *in vitro*.

Tabla N° 2: Características de especies de *Candida* para la asimilación y fermentación de carbohidratos.

Levadura	Asimilaciones								Fermentaciones					
	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Xilosa	Rafinosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Trehalosa
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	F	F	-/+	-	F	F
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	F	-	-	-	-	F
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	F	-	-	-	F	F
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+/-	-	+	+	-	+	F	F	-/+	-	F	F
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-

+: positivo
-: Negativo

F: Fermentación
-: Negativo
-/+ : Positivo o negativo

Fuente: KONEMAN E y Col. Diagnóstico microbiológico. 1999 Quinta Edición. Ed. Panamericana. Madrid. España.

3.4 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD “*in vitro*”

La técnica utilizada fue la de microdilución en caldo, estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M27-A2, Vol. 22 No. 15, 2002). Esta técnica cuantitativa, tiene como principio el probar la inhibición de crecimiento de un inóculo de levadura, a concentraciones definidas de una droga específica, para así poder determinar la menor concentración de la droga capaz de inhibir el crecimiento de la levadura, conocido como concentración mínima inhibitoria (CMI)⁴².

Se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ketoconazol, fluconazol y anfotericina B para las cepas de levadura identificadas a nivel de especie de las muestras clínicas recolectadas.

3.4.1 Diluciones de los agentes antifúngicos: La solución stock de fluconazol se preparó con agua destilada estéril a una concentración de 128 µg/mL y se utilizó el medio RPMI 1640 (con glutamina, sin bicarbonato) como diluyente. El ketoconazol y la anfotericina B se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) a

una concentración stock de 1600 µg/mL y se diluyeron en DMSO primero y luego en el medio RPMI 1640 (con glutamina, sin bicarbonato). En ambos casos las concentraciones obtenidas fueron el doble de las requeridas para llevar a cabo la prueba.

El rango de concentraciones finales (1X) fue de 0,125 a 64 µg/mL para el fluconazol y de 0,0313 a 16 µg/mL para el ketoconazol y la anfotericina B.

Se siguieron los siguientes esquemas (tablas 3 y 4) para las diluciones de las drogas según su solubilidad:

Tabla N° 3: Esquema para la preparación de la solución de antifúngico solubles en agua (Fluconazol) a ser usados en la prueba de sensibilidad, bajo el método de microdilución en caldo.

Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	+ Medio (mL)	Concentración Intermedia (µg/mL)	= Concentración Final (2X) a 1:5 (µg/mL)
1	5120	Stock	0.5	3.5	640	128
2	640	Paso 1	0.5	0.5	320	64
3	640	Paso 1	0.5	1.5	160	32
4	160	Paso 3	0.5	0.5	80	16
5	160	Paso 3	0.25	0.75	40	8
6	160	Paso 3	0.25	1.75	20	4
7	20	Paso 6	0.5	0.5	10	2
8	20	Paso 6	0.25	0.75	5	1
9	20	Paso 6	0.25	1.75	2.5	0.5
10	2.5	Paso 9	0.5	0.5	1.25	0.25

Fuente: NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard – Second Edition. NCCLS document M27-A2. USA, 2002.

Tabla N° 4: Esquema para la preparación de soluciones de antifúngicos insolubles en agua (Ketoconazol y Anfotericina B) a ser usados en la prueba de sensibilidad, bajo el método de microdilución en caldo.

Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	+ Solvente DMSO (mL)	Concentración Intermedia (µg/mL)	= Concentración Final (2X) a 1:50 (µg/mL)
1	1600	Stock	---	---	1600	32
2	1600	Stock	0.5	0.5	800	16
3	1600	Stock	0.5	1.5	400	8
4	1600	Stock	0.5	3.5	200	4
5	200	Paso 4	0.5	0.5	100	2
6	200	Paso 4	0.5	1.5	50	1
7	200	Paso 4	0.5	3.5	25	0.5
8	25	Paso 7	0.5	0.5	12.5	0.25
9	25	Paso 7	0.5	1.5	6.25	0.125
10	25	Paso 7	0.5	3.5	3.13	0.0625

Fuente: NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard – Second Edition. NCCLS document M27-A2. USA, 2002.

Preparación del Inóculo: Las cepas caracterizadas a nivel de especie fueron cultivadas en Agar Sabouraud-glucosa e incubadas a 30-35 °C durante 24 h. De cada cultivo se tomaron 5 colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro y se resuspendieron en tubos de ensayo con 5 mL de solución salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; 0,85% salina), hasta alcanzar una turbidez equivalente a la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland, que contiene de 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. De esta suspensión se diluyó primero a 1:50 y luego a 1:20 con RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato a pH 7, amortiguado con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS), y se obtuvo una densidad de entre 1×10^3 y 5×10^3 células/mL.

Microdilución: Cada pocillo de la placa de microdilución, conteniendo 100 µL del antifúngico a doble concentración de la final, fue inoculado con 100 µL de la suspensión del inóculo. Para cada cepa probada se incluyó un control de esterilidad (200 µL de medio) y un control de crecimiento (100 µL de RPMI 1640 y 100 µL de inóculo).

Incubación: Las placas de microdilución se incubaron a 35°C y la lectura se efectuó a las 48 ± 2 horas con la ayuda de un espejo de lectura.

Lectura de los resultados: Los pozos de microdilución fueron numerados con la ayuda de un espejo de lectura y el crecimiento en cada pozo es comparado con el crecimiento control del pozo N°11 (ver anexos 8 y 9). La determinación del punto final se realizó mediante la lectura visual mediante la siguiente escala de lectura:

- 0: Ópticamente claro o transparente
- 1: Ligeramente turbio
- 2: Prominente incremento en la turbidez; aproximadamente 50% de inhibición.
- 3: Ligera reducción en la turbidez
- 4: No reducción de turbidez (turbio)

La CMI para anfotericina B se define como la menor concentración de droga, en el cual el puntaje es 0 (ausencia completa de crecimiento), y para los azoles (ketoconazol y fluconazol) se describe como la mínima concentración en la cual se observa un puntaje de 2.

La susceptibilidad de las cepas frente a cada droga fue clasificada como sensible (S), sensible dosis dependiente (SDD) y resistente (R), según se observa en la tabla 5.

Tabla N° 5: Criterios de susceptibilidad de las levaduras frente a las drogas antifúngicas.

Agente Antifúngico	Susceptible (S) (µg/mL)	Susceptible Dosis Dependiente (SDD) (µg/mL)	Resistente (R) (µg/mL)
Fluconazol	≤8	16-32	≥ 64
Ketoconazol	≤0,125	0.25 a 0.5	≥ 1
Anfotericina B	≤1	/	> 1

Fuente: NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard – Second Edition. NCCLS document M27-A2. USA, 2002.

IV. RESULTADOS

De las 60 cepas de levaduras aisladas de flujo vaginal en pacientes que acudieron a la consulta externa del departamento de ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo”, a las cuales, luego de ser identificadas a nivel de especie, se les determinó el perfil de sensibilidad *in vitro* frente a distintos antifúngicos recomendados por la NCCLS, M27-A2, Vol. 22 No. 15, 2002 para este estudio.

Tabla N° 6: Identificación presuntiva de especies de *Candida* según características morfológicas y color de las colonias en agar cromogénico (CHROMagar *Candida*®)

Color	N° de cepas	Característica de la colonia	Posible especie
Verde esmeralda	45	Lisa, crece a 45°C	<i>C. albicans</i>
Violeta	6	Brillante y cremosa cremosa	<i>C. glabrata</i>
Rojizo púrpura	1		<i>C. glabrata</i>
Azul oscuro con halo marrón	6	Lisa	<i>C. tropicalis</i>
Rosadas	2	Rugosa	<i>C. krusei</i>

Tabla N° 7: Prueba del tubo germinal en las especies identificadas previamente con CHROMagar *Candida*®.

Especie presuntiva según CHROMagar <i>Candida</i>	n	Tubo Germinal	
		+	-
<i>C. albicans</i>	45	43	2
<i>C. glabrata</i>	7	0	7
<i>C. tropicalis</i>	6	1	5
<i>C. krusei</i>	2	0	2
TOTAL	60	44	16

Tabla N° 8: Asimilación (Auxonograma) y Fermentación (Zimograma) de carbohidratos de las especies identificadas presuntivamente mediante CHROMagar Candida® y la prueba de tubo germinal.

Especies presuntivas	Tubo germinal	n	Asimilación							Fermentación					Especies Confirmadas	
			Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Galactosa	Xilosa	Rafinosa	Trehalosa	Dextrosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa		Galactosa
<i>C. albicans</i>	+	43	+	+	+	-	+	+	-	+	F	F	-	-	F	<i>C. albicans</i>
<i>C. albicans</i>	-	2	+	+	+	-	+	+	-	+	F	F	-	-	F	
<i>C. glabrata</i>	-	7	+	-	-	-	-	-	-	+	F	-	-	-	-	<i>C. glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	+	1	+	+	+	-	+	+	-	+	F	F	+	-	F	<i>C. tropicalis</i>
<i>C. tropicalis</i>	-	5	+	+	+	-	+	+	-	+	F	F	+	-	F	
<i>C. krusei</i>	-	1	+	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	<i>C. krusei</i>
<i>C. krusei</i>	-	1	+	+	+	-	+	+	-	+	F	-	-	-	F	<i>C. parapsilosis</i>

+: Positivo -: Negativo n: número de especies F: fermentación

Tabla N° 9: Frecuencia de especies de *Candida* aisladas de flujo vaginal en el servicio de ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo”.

Especie	No. de aislamientos	Porcentaje
<i>C. albicans</i>	45	75,0 %
<i>C. glabrata</i>	7	11,6 %
<i>C. tropicalis</i>	6	10,0 %
<i>C. krusei</i>	1	1,7 %
<i>C. parapsilosis</i>	1	1,7 %
TOTAL	60	100 %

Tabla N° 10: Perfil de sensibilidad frente a fluconazol según especie de *Candida* y CMI en cepas aisladas de flujo vaginal en el Servicio de Ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo”.

Especie	n	Rango CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI₉₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>C. albicans</i>	45	0.5 – 16	2	8
<i>C. glabrata</i>	7	4 – 16	8	16
<i>C. tropicalis</i>	6	2 – 16	8	16
<i>C. krusei</i>	1	16	16	16
<i>C. parapsilosis</i>	1	16	16	16

En la tabla N° 10 se observa que todas las cepas en estudio *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* presentaron un límite superior de CMI de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CMI₉₀ de *C. albicans* fue 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es considerado como susceptible (S) en tanto que para las cepas *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. parapsilosis* presentaron una CMI₉₀ de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es considerado susceptible dosis dependiente (SDD).

Tabla N° 11: Perfil de sensibilidad frente a Ketoconazol según especie de *Candida* y CMI en cepas aisladas de flujo vaginal en el Servicio de Ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo”.

Especie	n	Rango CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI₉₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>C. albicans</i>	45	0.03 – 1	0.06	0.5
<i>C. glabrata</i>	7	0.06 – 0.5	0.25	0.5
<i>C. tropicalis</i>	6	0.06 – 0.125	0.125	0.125
<i>C. krusei</i>	1	0.125	0.125	0.125
<i>C. parapsilosis</i>	1	0.125	0.125	0.125

En la tabla N° 11, se observa que las cepas de *C. albicans* muestran el mayor rango de CMI frente al ketoconazol, con valores que fluctúan entre 0.03 – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguida de las cepas de *C. glabrata* y *C. tropicalis* con valores de entre 0.06 – 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.06 – 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente; en tanto que para las cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis* presentaron un valor CMI de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cabe resaltar que la CMI₉₀ para las cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* fueron de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual es considerado susceptible dosis dependiente (SDD) y para las cepas de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* fueron de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual es considerado susceptible (S).

Tabla N° 12: Perfil de sensibilidad frente a Anfotericina B según especie de *Candida* y CMI en cepas aisladas de flujo vaginal en el departamento de ginecología del Hospital Nacional “Dos de Mayo”.

Especie	n	Rango CMI (µg/mL)	CMI₅₀ (µg/mL)	CMI₉₀ (µg/mL)
<i>C. albicans</i>	45	0.03 – 0.5	0.06	0.125
<i>C. glabrata</i>	7	0.03 – 0.25	0.03	0.125
<i>C. tropicalis</i>	6	0.03 – 0.25	0.125	0.25
<i>C. krusei</i>	1	0.25	0.25	0.25
<i>C. parapsilosis</i>	1	0.25	0.25	0.25

En la tabla N° 12, se observa que las cepas de *C. albicans* muestran el mayor rango de CMI frente a la anfotericina B, con valores que fluctúan entre 0.03 – 0.5 µg/mL, seguidas de *C. glabrata* y *C. tropicalis* con valores de entre 0.03 – 0.25 µg/mL, en tanto que las cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis* presentaron un valor CMI de 0.25 µg/mL. Se observa además, que los valores CMI₉₀ para todas las especies de *Candida* oscilaron entre 0.125 – 0.25 µg/mL, el cual significa que todas las cepas fueron susceptibles (S) frente a esta droga.

Tabla N° 13: Distribución de especies de *Candida* según el patrón de sensibilidad frente a los antifúngicos.

Especie	n	Fluconazol			Ketoconazol			Anfotericina B	
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	R
<i>C. albicans</i>	45	43	2	0	34	8	3	45	0
<i>C. glabrata</i>	7	4	3	0	2	5	0	7	0
<i>C. tropicalis</i>	6	5	1	0	6	0	0	6	0
<i>C. krusei</i>	1	0	1	0	1	0	0	1	0
<i>C. parapsilosis</i>	1	0	1	0	1	0	0	1	0
TOTAL	60	52	8	0	44	13	3	60	0

S: Sensible

SDD: Sensible Dosis Dependiente

R: Resistente

Gráfico 1: Porcentaje de susceptibilidad del total de *Candida* aisladas frente a los antifúngicos.

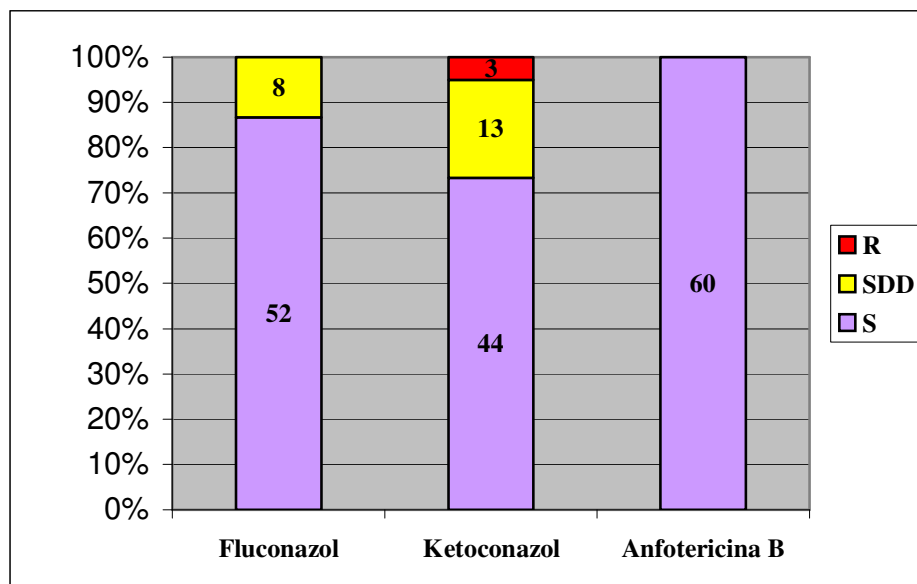


Figura N° 2: Aislamiento e identificación presuntiva de las especies de *Candida* en Chromagar Candida®.

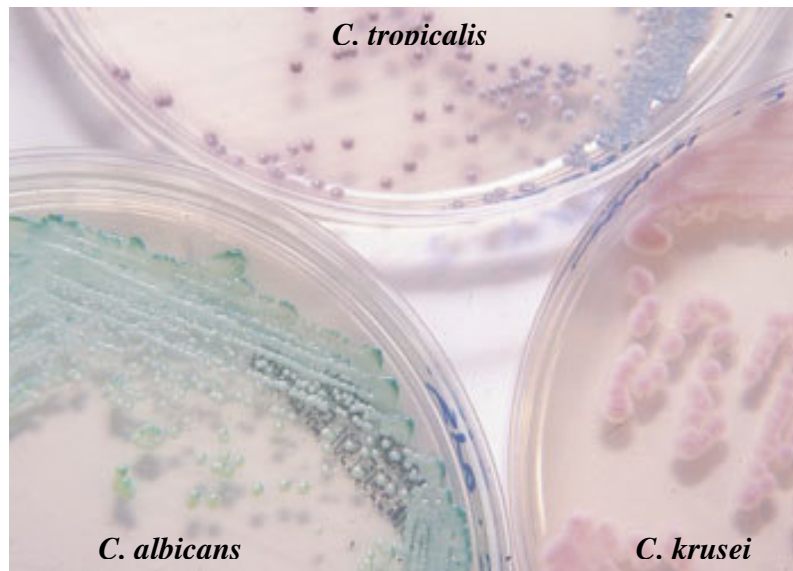


Figura N° 3: Aislamiento de colonias de *Candida albicans* en CHROMagar Candida®.



Figura N° 4: Prueba del Tubo Germinal en las especies de *Candida albicans*.

A) Tubo germinal de *Candida albicans* obtenido en suero humano a las 3 horas de incubación a 37 °C. B) Blastoconidio con pseudohifa. Microscopio de Luz, 100X.

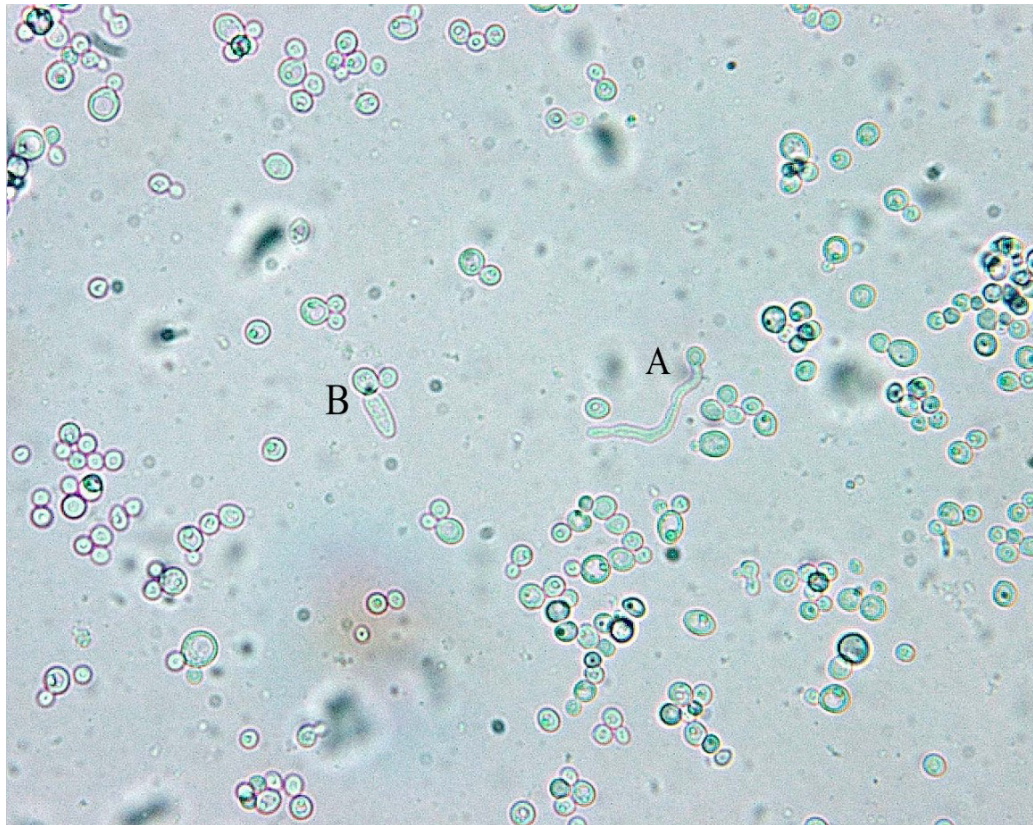


Foto tomada de MENDOZA, Mireya. *Importancia de la identificación de levaduras*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2005; 25(1):15-23.

Figura N° 5: Prueba de asimilación de carbohidratos para *Candida albicans*.

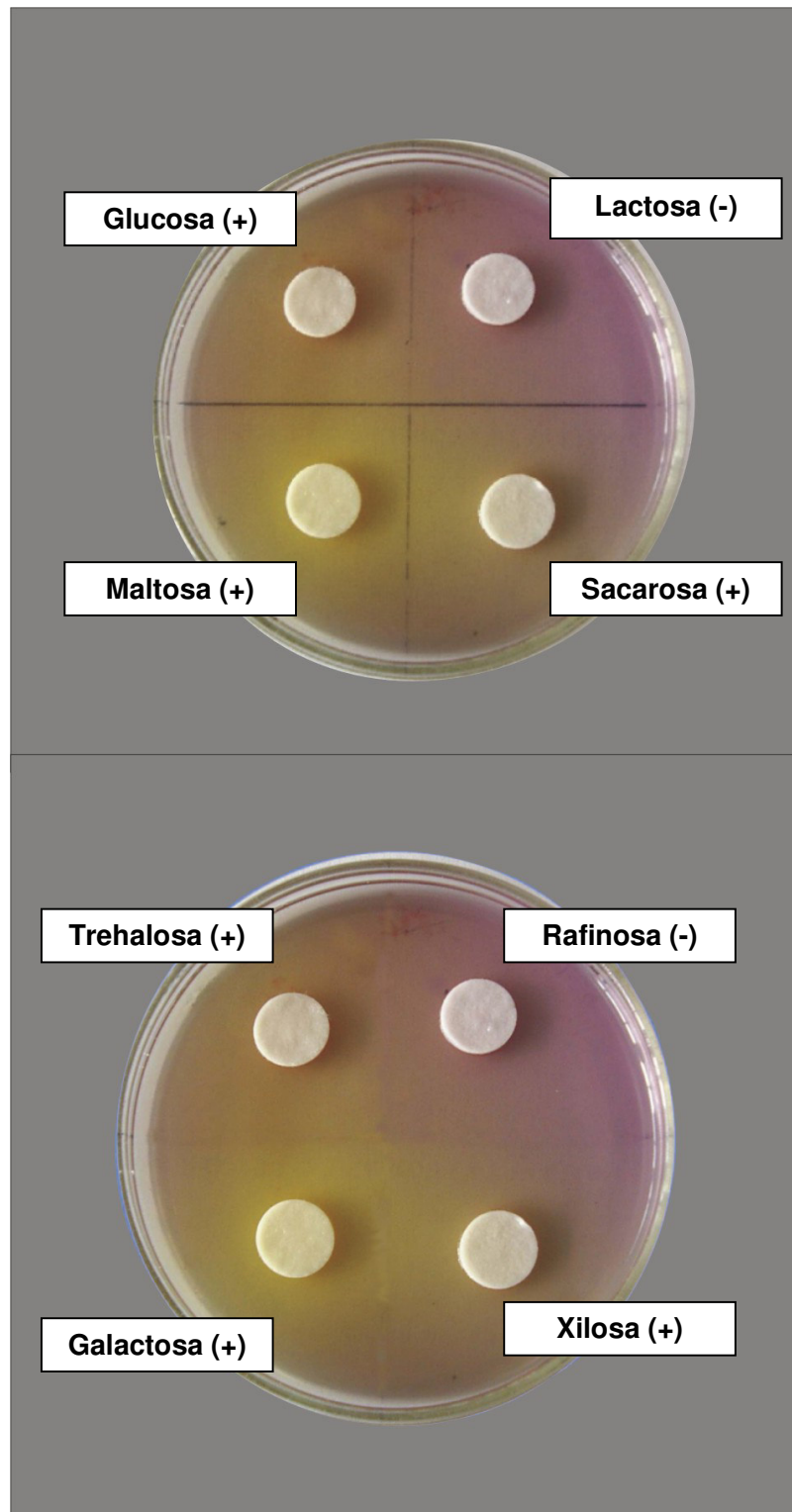


Figura N° 6: Prueba de asimilación de carbohidratos para *Candida glabrata*.



Figura N° 7: Prueba de asimilación de carbohidratos para *Candida parapsilosis*.



Figura N° 8: Prueba de asimilación de carbohidratos para *Candida tropicalis*.

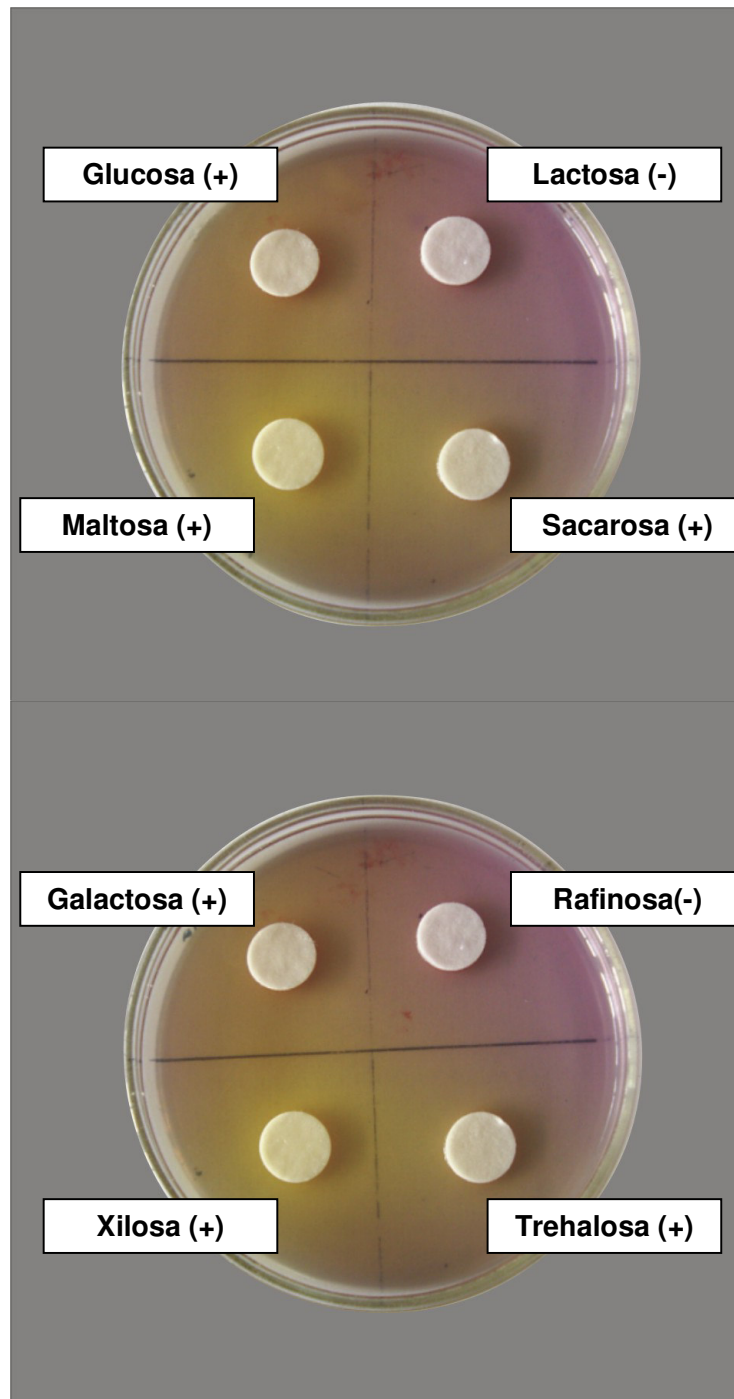


Figura N° 9: Prueba de asimilación de carbohidratos para *Candida krusei*.

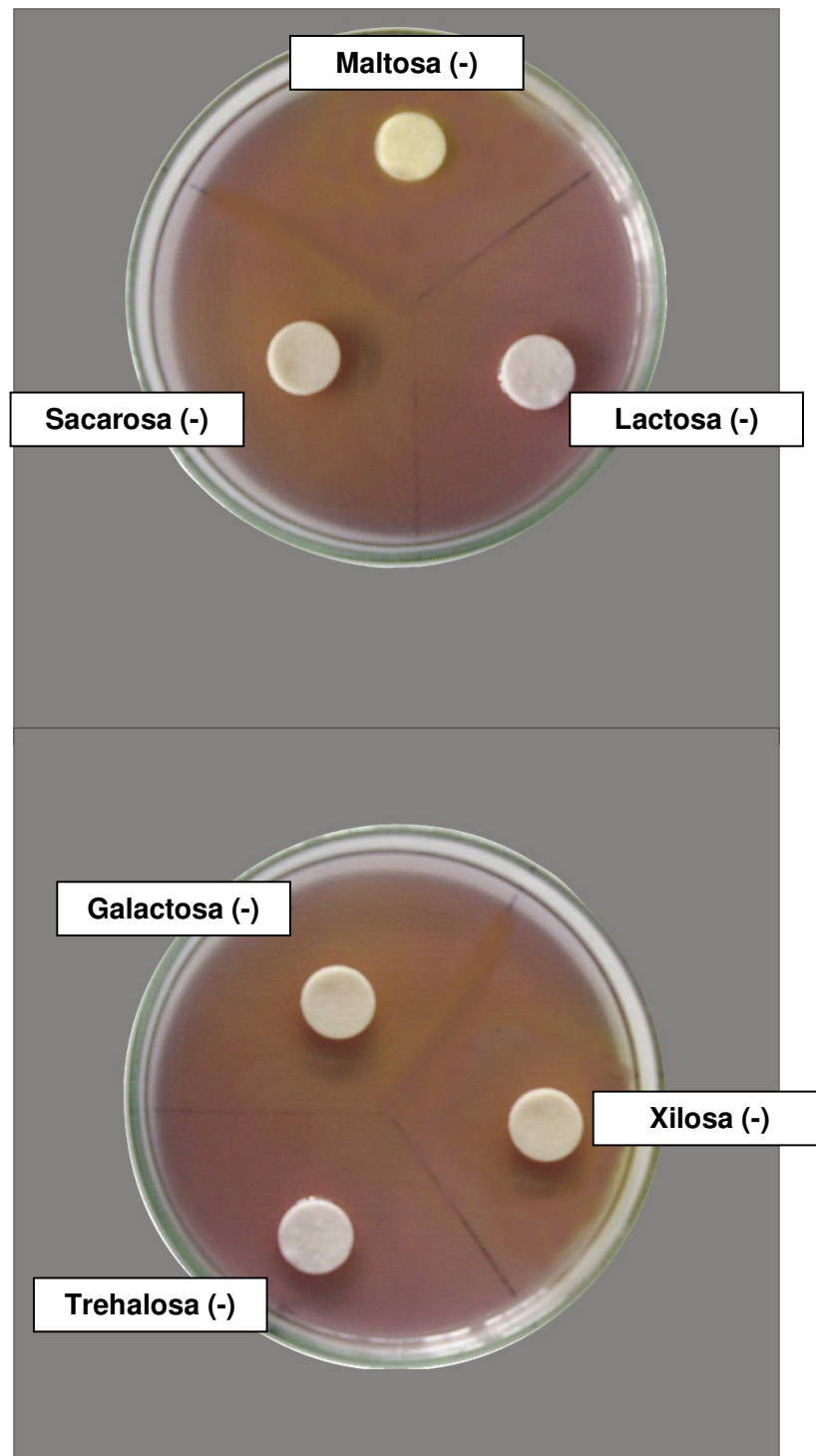
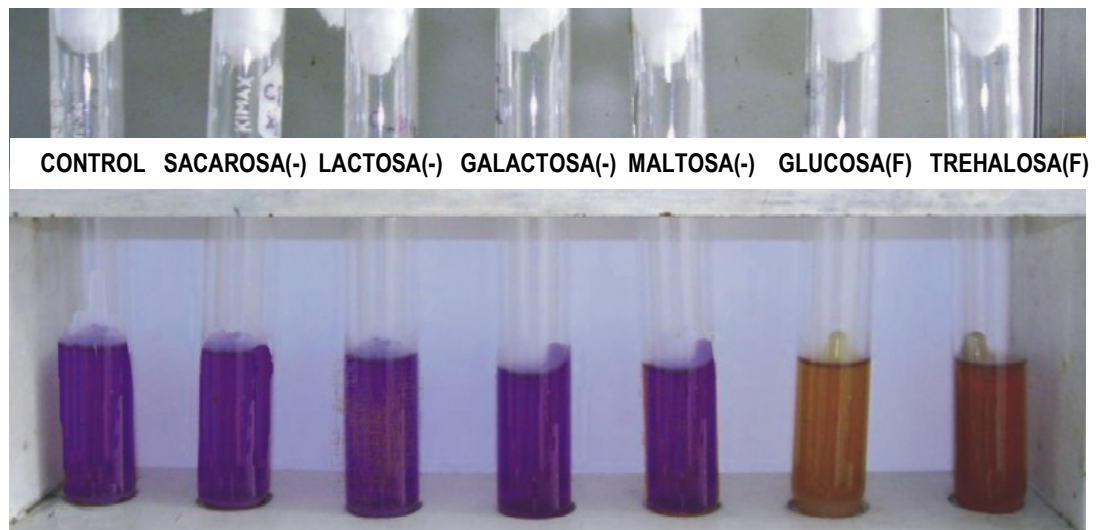


Figura N° 10: Prueba de fermentación de carbohidratos para *Candida albicans*.



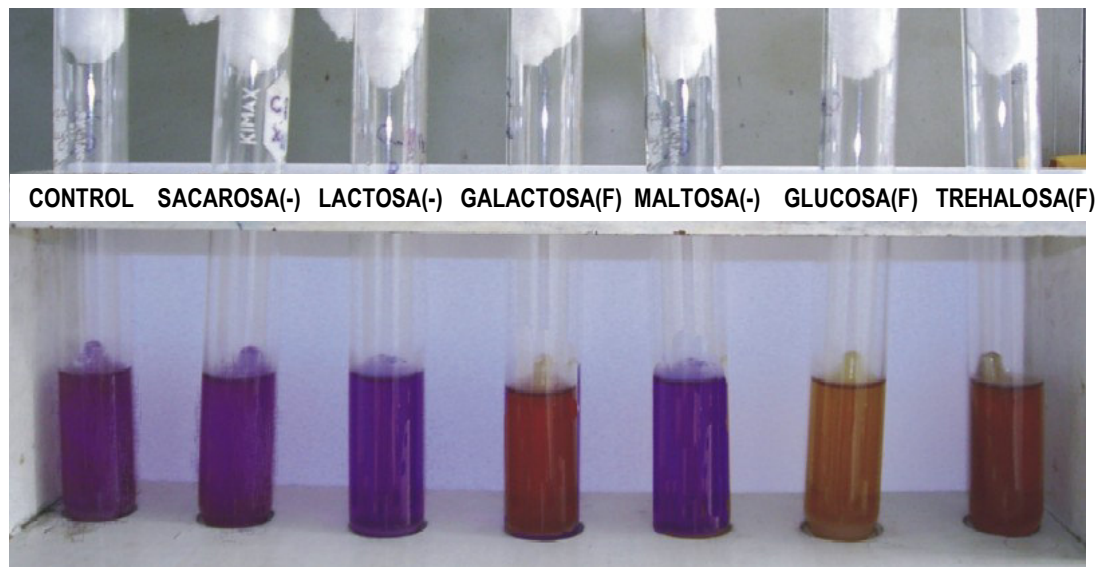
(-): No hay fermentación (F): Fermentación

Figura N°. 11: Prueba de fermentación de carbohidratos para *Candida glabrata*.



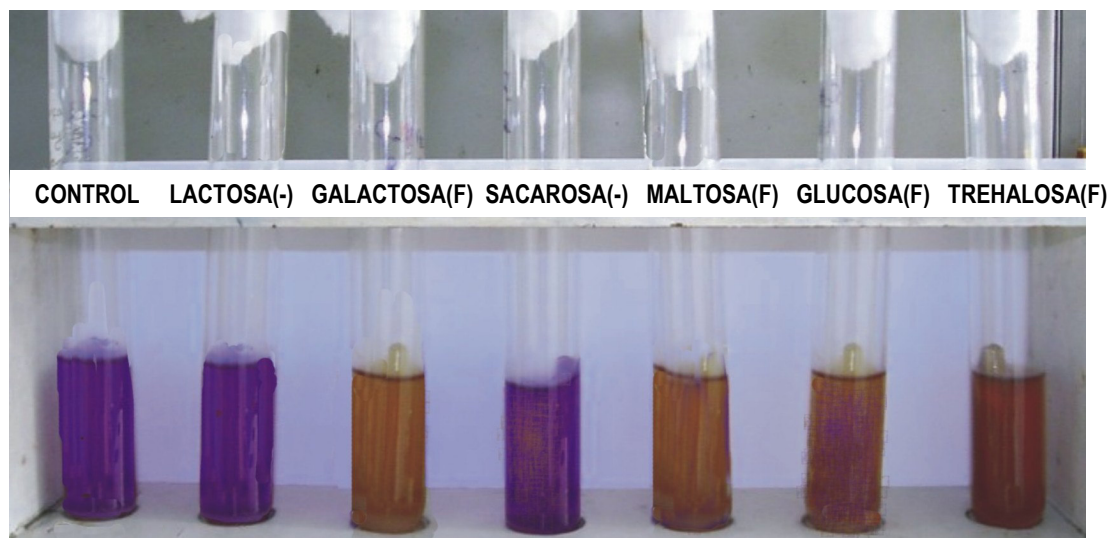
(-): No hay fermentación (F): Fermentación

Figura N° 12: Prueba de fermentación de carbohidratos para *Candida parapsilosis*.



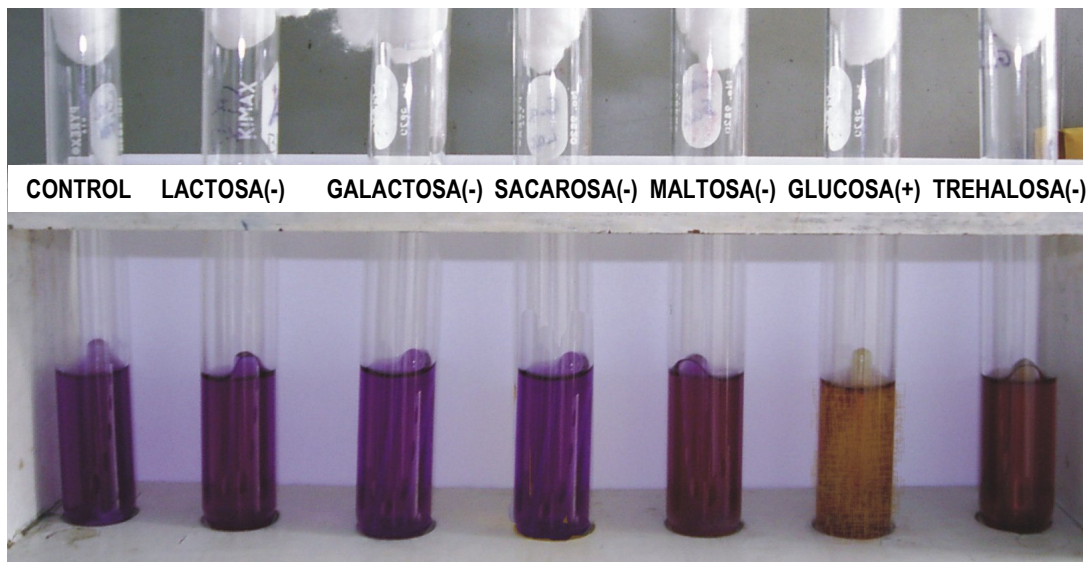
(-): No hay fermentación (F): Fermentación

Figura N° 13: Prueba de fermentación de carbohidratos para *Candida tropicalis*.



(-): No hay fermentación (F): Fermentación

Figura N°. 14: Prueba de fermentación de carbohidratos para *Candida krusei*.



(-): No hay fermentación (F): Fermentación

V. DISCUSIÓN

Las especies correspondientes presuntamente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, identificadas previamente con el agar cromogénico CHROMagar Candida®, fueron sencillas de determinar de acuerdo a las instrucciones y a las características publicadas por Odds y Bernaerts². Sin embargo, un aislamiento que produjo colonias de color rojizo púrpura de aspecto cremoso, fue considerada como una posible *Candida glabrata* debido a las similitudes morfológicas y cromogénicas. Torres y Col⁶ describen que la coloración de las colonias de *Candida glabrata* en CHROMagar Candida® pueden variar entre lila y púrpura.

Posteriormente, se confirmó mediante las pruebas definitivas (Auxonograma y Zimograma) que el agar cromogénico CHROMagar Candida® identificó correctamente al 100% de cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*, lo cual concuerda con las especificaciones del fabricante, quien garantiza una especificidad no menor al 99% para estas tres especies. Sin embargo, este medio no logró identificar a *Candida parapsilosis* como tal, sino como *Candida krusei*, debido a que para ambas especies se describen características de color similares (rosado pálido), causando cierta ambigüedad y confusión en la identificación por color. La diferencia radica en el aspecto rugoso de la colonia para las cepas de *Candida krusei* y un aspecto liso para las cepas de *Candida parapsilosis*, lo cual no fue distinguido durante su identificación en el laboratorio. Es importante señalar que diversos autores reportan diferentes porcentajes de especificidad, así Cecile y cols. en su estudio sobre identificación de especies de *Candida* de muestras clínicas reportaron un 92.2% de especificidad para *Candida albicans* y un 100% para *Candida tropicalis* a las 72 horas de lectura¹⁶; Venitia y cols. reportaron 97.6% para grupos de *Candida albicans* más *Candida dublinensis*, 72.7% para grupos de *Candida tropicalis* más *Candida kefyr* y un 75% para *Candida krusei*, en muestras clínicas, a las 72 horas de lectura¹⁷; Pfaller y cols. en un estudio de identificación de *Candida spp.*

de muestras clínicas obtuvieron un 94% de especificidad para *Candida glabrata*, 95% para *Candida albicans*, 95% para *Candida albicans* y un 100% para *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, a las 48 horas de lectura, los autores observaron algunas dificultades para la identificación de otras especies de *Candida*²⁶; Willinger y cols. obtuvieron una especificidad de 49.6% para *Candida albicans* a las 24 horas de lectura, un 98.6% a las 48 horas de lectura y un 100% a las 72 horas de lectura; Gatica y cols. utilizaron este medio (CHROMagar *Candida*®) para el diagnóstico diferencial de *Candida spp.* aislados de muestras vaginales obteniendo un 100% de especificidad para *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, 97.4% para *Candida albicans* y 86.9% para *Candida glabrata*¹⁹; Odds y Bernaerts lograron identificar correctamente con más del 99% de especificidad para cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* evaluados de muestras clínicas³⁹.

A pesar que la prueba del tubo germinal es ampliamente usado por su facilidad y bajo costo, el porcentaje de especificidad para identificar *Candida albicans* distinguiéndola de otras especies fue del 96% en este estudio. El 4% restante se debe a que no se observó desarrollo del tubo germinativo de 2 cepas de *Candida albicans*. Además, una cepa de *Candida tropicalis* desarrolló un falso tubo germinativo. La literatura reporta que algunas especies de *Candida non-albicans* como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea* y *Candida dublinensis* producen estructuras similares a tubos germinativos y que alrededor del 5% de las cepas de *Candida albicans* no forman tubo germinativo, por lo que esta prueba puede conducir a un resultado falso positivo y falso negativo. Estas dos ocurrencias han sido reportadas previamente por algunos estudios^{19, 20, 49, 50}.

De lo expuesto se comprueba que los estudios de identificación por medio del agar CHROMagar *Candida*® y prueba del tubo germinal son sólo presuntivas y que necesitan de otras pruebas específicas para la seguridad de la correcta identificación a nivel de especie del género *Candida*. Para tal fin se realizaron los estudios de Auxonograma y Zimograma para identificar a nivel de especie a las

cepas del género *Candida* ya que se basa en características fisiológicas propias de cada especie y los resultados interpretados en conjunto permiten tener una mayor seguridad en la identificación.

Haciendo uso de todos estos estudios se encontró que la especie más frecuente fue *Candida albicans* (75%), seguida de *Candida glabrata* (11.6%), *Candida tropicalis* (10%), *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* (1.7%). Estos datos son similares a los reportados por Gómez y cols., Yamamura y cols, Rodero y cols. y Pfaller y cols. quienes detectaron en diferentes países de Europa, Canadá y Sudamérica a *Candida albicans* con una frecuencia cercana o mayor a 50%, aunque describen a *Candida parapsilosis* en segundo lugar. Sin embargo nuestros resultados concuerdan a los relatados en estudios epidemiológicos en USA, donde *Candida glabrata* es la segunda especie prevalente en infecciones invasivas (Sanford, 1993; Gubbins, 1993) y según Gatica (Chile 2002) quien reportó un 77% de frecuencia de *Candida albicans*, 23% de *Candida glabrata*, 3% de *Candida tropicalis* y 1% de *Candida parapsilosis* de 104 muestras de flujo vaginal¹⁹. Difiere además del estudio realizado por Araj y cols. donde muestra a *Candida tropicalis* como la segunda especie más frecuente en el Líbano⁶. Otros estudios realizados sobre aislamiento de cepas de *Candida spp.* describen que *Candida albicans* es la especie predominante con un 70-80% de casos aislados y *Candida no albicans* con un 20-30%^{11,19, 51, 52}. Debemos destacar que en el Perú un estudio sobre la incidencia de vaginitis micótica realizado en 1998 refiere que *Candida albicans* se presentó en el 81.9% de los casos⁵³.

Estos cambios epidemiológicos tienen repercusiones clínicas ya que *Candida glabrata* es la especie que se aísla cada vez con mayor frecuencia de muestras clínicas como agente de candidosis vaginal⁶ y su emergencia se debe básicamente a que se ha demostrado que exhibe cierta resistencia a los azoles en caso de vaginitis, contribuyendo al fallo terapéutico. Sobel y Chain han sugerido que el gran uso de terapias antifúngicas con compuestos azólicos, el mayor uso de terapias de corta duración con antifúngicos orales o de uso tópico y la auto

prescripción de antimicóticos de uso tópico serían los factores responsables del aumento de la incidencia de *Candida glabrata* en Candidiasis Vulvovaginal (CVV) ya que actuarían por un mecanismo de selección. *Candida glabrata* ha sido también asociada a CVV crónica y recurrente en estudios que incluyeron un número importante de pacientes con CVV crónica por esta especie¹⁹.

El porcentaje de sensibilidad para las especies de *Candida* frente a los azoles está entre 80% y 90%⁵⁴. En nuestro estudio el porcentaje de sensibilidad para *C. albicans* fue de 96% y 76% para el Fluconazol y Ketoconazol respectivamente. Estos resultados concuerdan con otros estudios que señalan una sensibilidad al fluconazol del 99% para *Candida albicans*. Sin embargo en estudios de sensibilidad para candidiasis sistémica se ha reportado una sensibilidad de 80% para el ketoconazol⁵⁵. Respecto de las cepas SDD y resistentes de *Candida*, cabe señalar que la sensibilidad a este grupo de fármacos ha ido disminuyendo debido a la comercialización y el uso intensivo de azoles, especialmente del Fluconazol^{6,54}.

Adicionalmente, se ha reportado que algunas cepas como *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* poseen resistencia intrínseca al Fluconazol⁵⁴. El aumento de la resistencia a los azoles se ha encontrado fundamentalmente en pacientes infectados con VIH que desarrolla con frecuencia candidiasis orofaríngeas, pero también en pacientes no infectados con VIH y en pacientes no expuestos previamente a antifúngicos. La prevalencia de las infecciones debidas a organismos levaduriforme resistentes a los azoles se ha estimado entre 21-32% en pacientes sintomáticos¹³.

Por otro lado, en nuestro estudio el 100% de las cepas estudiadas mostraron sensibilidad a la anfotericina B, este resultado coincide con lo reportado por Galle y Gianinni quienes estudiaron muestras de flujo vaginal de 250 pacientes resultando que todas las cepas fueron sensibles a la anfotericina B⁵². Asimismo, en otros estudios realizados por Ferraza y col.⁵⁶, Torres-

Rodriguez y col. se describe que *C. albicans* y *C. glabrata* respectivamente presentan alta sensibilidad a la anfotericina B.

VI. CONCLUSIONES

- 1) La identificación de las especies de *Candida* con CHROMagar Candida[®] tuvo un acierto en el 98% de casos.
- 2) Se aislaron 60 cepas del género *Candida* de pacientes con vulvovaginitis, las cuales fueron identificadas como *Candida albicans* (75%), *Candida glabrata* (11,6%), *Candida tropicalis* (10%), *Candida krusei* (1,7%) y *Candida parapsilosis* (1,7%).
- 3) La sensibilidad (S) de las especies de *Candida* frente al Fluconazol fue 87%, Ketoconazol 73% y para Anfotericina B 100%.
- 4) Se observó Sensibilidad Dosis Dependiente (SDD) de las especies de *Candida* frente al Fluconazol en un 13% y al Ketoconazol en un 22%.
- 5) Se observó Resistencia (R) al Ketoconazol únicamente en el 7% de cepas de *Candida albicans*.

VII. RECOMENDACIONES

- Los cultivos e identificación de las cepas de *Candida*, así como la posterior realización de pruebas de susceptibilidad, deben ser tomados en cuenta para el establecimiento de una terapéutica adecuada, sobre todo cuando se presentan aislamientos de *C. no-albicans*.
- Se debe realizar estudios similares con un mayor número de cepas, con la finalidad de obtener diferencias estadísticamente significativas.
- Es recomendable obtener mayor información sobre el tratamiento previo de las pacientes y sobre el número de episodios de candidiasis sufridos, con la finalidad de establecer si existe o no relación con la posterior aparición de resistencia.
- Realizar trabajos similares en otros hospitales del Perú, teniendo en cuenta los diversos factores predisponentes tales como embarazo, uso de dispositivos uterinos, anemia, utilización de esteroides, uso de anticonceptivos orales, etc.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARTENS M. Diagnóstico de Enfermedades de Transmisión Sexual en el Consultorio. *Clin. Obst. Gin* 1989; 3: 649-667.
2. ODDS F y BERNAERTS R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1923-1929.
3. FEBRÉ N y Col. Microbiological characteristics of yeasts isolated from Urinary Tracts of Intensive Care Unit, Undergoing Urinary Centralization. *Journal of Clinic Microbiology* 1999; 37: 1584-1586.
4. ODDS F. Laboratory evaluation of antifungal agents a comparative study of five imidazole derivations of clinical importance. *Antimicrob. Chemoter.* 1980; 6: 749-761.
5. DEMBRY L y Col. DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol* 1994; 15: 48-53.
6. TORRES J, MORERA Y y LÓPEZ O. *Candida glabrata*: Un patógeno emergente. *Control Calidad SEIMC* 2001: 1-7.
7. GATICA J y Col. Utilidad del agar cromocandida para el diagnóstico diferencial de Candida spp aisladas de muestras vaginales. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002; 67(4): 300-304.
8. FLORES-PAZ R, RIVERA-SANCHEZ R, GARCÍA-JIMENEZ E y ARRIAGA-ALBA M. Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud pública de México* 2003; 45(5):694-697.
9. LÓPEZ F. Aislamiento de *Candida* en secreciones vaginales en niños utilizando diversos medios. Tesis de Pregrado Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima 1971.
10. CRISPÍN V y Col. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos del flujo vaginal de gestantes de zona periurbana y urbano marginal VII jornadas

de investigación en Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas "Dr. Tomas Olcese Robert" Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM Lima 25-27 octubre de 2005.

11. PANIZZO M y Col. "Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de *Candida* sp. y serotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y recurrente" Departamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" Caracas Octubre 1999 Jornadas Científicas del Instituto Nacional de Higiene.
12. JHONSON E y Col. In vitro Resistanse to Imidazole Antifungal in *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother* 1984; 13:547-558.
13. LINARES M, CHARRIEL G, SOLIS F y CASAL M. CHROMagar Cándida más fluconazol: Comparación con técnicas de microdilusión. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(9):493-497.
14. REIN M. Vulvovaginitis y cervicitis. IN MENDELL G, DOLIN R, BENETT J. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 4^a ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1997.
15. SINGH SH y Col. Vaginitis Due to *Candida krusei*: Epidemiology, Clinical Aspects, and Therapy. *Clin Infect Dis* 2002; 35(9):1066-70.
16. FIDEL PL, CUTRIGHT JL y STEELE C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2000; 68:651-57.
17. FIDEL PL. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 2002;40:359-75.
18. HUNTER H, RAYMOND K. Tratado de Candidiasis Vaginal. *Antib e Inf* 1992; 1:27-31.
19. GATICA M y Col. Utilidad del agar cromocandida para el diagnóstico diferencial de *candida spp* aisladas de muestras vaginales. *Rev. chil. obstet. ginecol* 2002; 7(4):300-304.

20. SALKIN I y Col. Evaluation of YeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 624-7.
21. ESPINEL-INGROFF A y Col. Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 1992;30:3138-45.
22. REDDING S y Col. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: Documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 240-242.
23. FERRER J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 71:S21-7
24. MAHMOUD A y LOUIS B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Review* 1999; 501-517.
25. GUZMAN A. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev. chil. infectol.*, 2004; 21(1):39-47.
26. QUINDÓS A y Col. Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 23-28.
27. SOBEL J. Patogénesis and Epidemiology of vulvovaginal Candidiasis *Ann. N.Y. Acad. Sciens.* 1996; 547-557.
28. GORKA B. Vulvovaginitis candidiasica. *Rev Iberoam Micol* 2002;19:22-24.
29. SOBEL J y CHAIM W. Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: retrospective review of boric acid therapy. *Clin Infect Dis*, 1997; 24: 649-652.
30. RUIZ J y HUAMANÍ M. Determinación de la Actividad Antifúngica in-vitro de 10 Plantas Medicinales Peruanas [Tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima, 2005.

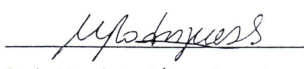

31. SANGLARD D y Col. *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; 47(8): 2404–2412.
32. VIUDES A y Col. Correlación entre las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y la evolución clínica de los pacientes con candidiasis y criptococosis. *Revista Española de Quimioterapia* 2002; 15(1).
33. GREGORI B. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm* 2005; 39(2):1.
34. MAERTENS J y BOOGAERTS M. Caspofungina in the treatment of candidosis and aspergillosis. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 94-101.
35. DIOMEDI A. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev. chil. Infectol* 2004; 21(2):89-101.
36. DOUGLAS C. Fungal beta (1,3)-D-glucan synthesis. *Med Mycol* 2001; 39: (suppl 1) 55-66.
37. VASQUEZ J y Col. Stable Phenotypic Resistanse of *Candida* Species to Amphotericin B Conferred by Preexposure to Subinhibitory Levels of Azoles. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(9): 2690-2695.
38. NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard – Second Edition. NCCLS document M27-A2. (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
39. ODDS F y ABBOTT A. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia* 1980;18(4):301–317.
40. MENDOZA M. Importancia de la identificación de levaduras. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* 2005; 25(1):15-23.
41. KONEMAN E y Col. Diagnóstico microbiológico. 1999 Quinta Edición. Ed. Panamericana. Madrid. España.

42. ESPINEL-INGROFF A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 929-944.
43. FREYDIÉRE A, GUINET R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:85-9.
44. FRASER V y Col. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin. Infec Dis* 1992; 15:415-421.
45. AL-HEDAITHY S y FOTEDAR R. Incidente of *Candida glabrata* in patient specimens. *Saudi J Biol Sci* 1999; 6(1):76-81.
46. SOBEL JD. Candida vulvovaginitis. *Sem. Sermatol.*, 1996; 15:17-28.
47. JOHNSON E y Col. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidiasis. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 103-114.
48. WILLIAMS D y LEWIS M. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases* 2000; 6(1):3-11.
49. YÜCESOY M, ESEN N y YULUG N. Use of chromogenic tube and methyl blue-sabouraud agar for the identification of *Candida albicans* strains. *Kobe J Med Sci.* 2001; 47(4):161-7
50. FERNANDEZ C, ECHEMENDIA Y, CARTAYA T y MENDOZA D. Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida* spp. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2001; 53(3):194-198.
51. GALLE L y GIANINNI M. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast. *Journal Bras Patol Med Lab* 2004; 40(4): 229-236.
52. ACURIO R y DEL CARPIO S. Incidencia de vaginitis micótica en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. Tesis para la obtención del grado de Especialista en Patología Clínica UNMSM. Lima - 1998.
53. Identificación y susceptibilidad Hasta donde llegar (FUNCEI-SIMPOSIO INTERNACIONAL INFECTOLOGÍA APLICADA EN EL CONO SUR 1999).

54. ALVARADO D. Determinación del perfil de sensibilidad *in vitro* frente a antifúngicos en levaduras aisladas de micosis invasivas. Tesis para optar el título de Tecnólogo Médico Facultad de Medicina-Universidad de Chile. 2000.
55. FERRAZZA M y Col. Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidíasis in two cities of the South of Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(2):58-63.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Hoja de consentimiento informado para la recolección de muestras (secreción vaginal) en el departamento de Ginecología del Hospital “Dos de Mayo”.

CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Investigadores:	Bach. Magaly Rodríguez Saavedra. Bach. Emerson Carlos Ríos.
Asesoría del Hospital Dos de Mayo:	Dra. Mery León Gamarra.
Declaración del Investigador: Estamos invitándole a participar en un estudio de investigación. El propósito de este formato de consentimiento es darle información que le permite decidir si usted quiere o no participar. Por favor lea el formato cuidadosamente. Ud. puede hacer preguntas acerca del propósito de la investigación, los beneficios de ella, sus derechos como participante o cualquier otra cosa acerca de la investigación que se describe en este formato y que necesite aclaración. Una vez que todas sus preguntas hayan sido contestadas Ud. Podrá decidir si desea participar o no. A este proceso se le llama consentimiento Informado. Le daremos una copia de este formato.	
PROPÓSITO Y BENEFICIOS La candidiasis vaginal es un enfermedad frecuente en el Perú. El aumento de la incidencia de la infección por <i>Candida</i> se debe entre otros factores predisponentes a la actividad sexual, presencia de dispositivos intrauterinos, antibioticoterapia por infecciones locales o a distancia, uso de drogas inmunosupresoras, embarazo, menstruación, el uso de ropa interior a base de fibras sintéticas y apretada y ciertas enfermedades de base como la diabetes mellitus Se ha reportado que existe resistencia de estos hongos a los antifúngicos, es por ello que nuestro propósito en evaluar a que fármacos son sensibles los hongos obtenidos de muestras de secreción vaginal. Esta investigación contribuirá a instaurar posteriormente un mejor esquema de tratamiento para las pacientes con esta enfermedad.	
PROCEDIMIENTOS El estudio consistirá en la obtención de muestra de secreción vaginal para su estudio posterior. No tendrá ningún costo adicional. La muestra será recolectada por el médico que la atiende. Los datos como: edad, diagnóstico, fármacos administrados estado de gestación, etc. Serán recogidos de su Historia Clínica.	
OTRA INFORMACIÓN: La información obtenida será confidencial, así mismo usted podrá rehusarse a participar o dejar el estudio e cualquier momento, sin que esto signifique un perjuicio en el trato que se le dará en el Servicio. Igualmente podemos asegurarle que sus derechos como paciente y como persona no se verá afectados en lo más mínimo.	
 Bach. Magaly Rodríguez Saavedra.	 Bach. Emerson Carlos Ríos

Anexo 2: Hoja de declaración de la participante en el presente estudio.

DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE	
<p>Este estudio me ha sido explicado. Voluntariamente he decidido participar en esta investigación. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tengo mas preguntas luego acerca de la investigación podré hacerlas luego al investigador cuyo nombre está al inicio del formato. Si tengo alguna duda acerca de mis derechos como sujeto en la investigación podré llamar al Comité de Ética del Hospital “Dos de Mayo” al Dr. Edwin Ramírez al teléfono número 328-0024.</p>	
<p>Recibiré una copia de este consentimiento.</p>	
<p>----- Nombre y Firma del Participante</p>	<p>----- Fecha</p>
<p>N° de Historia Clínica:</p>	

Anexo 3: Hoja de resultados del análisis microbiológico de secreción vaginal entregado al médico responsable del tratamiento.

RESULTADO DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE SECRECIÓN VAGINAL NUMERO:	
<p>HISTORIA CLÍNICA:</p>	
<p>NOMBRE DE LA PACIENTE:</p>	
<p>FECHA DE MUESTREO:</p>	
<p>MICROORGANISMOS BUSCADOS: Hongos del género <i>Candida</i></p>	
<p>FECHA DE LECTURA DE ANÁLISIS:</p>	
<p>RESULTADO:</p>	
<input type="checkbox"/>	<p>PRESENCIA DE HONGOS DIFERENTES A <i>Candida spp.</i></p>
<input type="checkbox"/>	<p>PRESENCIA DE HONGOS <i>Candida spp.</i></p>
<p>ANALISTAS:</p>	
<p>----- Bach. E. Carlos</p>	<p>----- Bach. M. Rodriguez</p>

Anexo 4: Prueba de asimilación de carbohidratos (Auxonograma).

Preparación del Agar Base Nitrogenada-Levadura: Se preparó una solución de agar al 2% (20 g de agar en 1 L de agua destilada) y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Luego se disolvió 6,7 de base nitrogenada-levadura (BBL & DIFCO) en 100 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 6,2 –6,4 agregando NaOH 1N. Se descartó 12 ml de la solución y luego se esterilizó por filtración a través de un filtro apropiado, Millipore o Nucleopore de 0,22 µm. Posteriormente, se agregó 88 ml de base nitrogenada-levadura y 100 ml del indicador púrpura de bromocresol (preparado como para la prueba de fermentación de carbohidratos) a un litro de agar al 2% y se vertió en placas petri estériles a razón de aproximadamente 20 ml por placa. Finalmente, se preparó los discos de papel de 10 mm de diámetro impregnados en solución de carbohidratos al 1%.

Procedimiento de Siembra: Con una pipeta estéril se vertió una suspensión de levadura (0,8-1,0 mL) en solución salina (0,85 – 0,90%), equivalente a un estándar de Mc Farland N° 4, sobre una placa de base nitrogenada – levadura. Se aspiró el exceso de suspensión utilizando la misma pipeta y se dejó secar la superficie del agar durante 5 minutos. Posteriormente, se colocó los discos de carbohidratos sobre el agar y se aseguró firmemente con pinzas esterilizadas a la llama. Finalmente, se incubó a 30°C durante 24 horas y se registró los resultados.

Anexo 5: Prueba de fermentación de carbohidratos (Zimograma).**Caldo de Fermentación de Levadura:**

Agua destilada.....	1 L
Peptona.....	10 g
NaCl.....	5g
Extracto de carne.....	3 g
NaOH 1N	1 ml

Indicador Púrpura de Bromocresol: – Se disolvió 0,04 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de agua destilada y se agregó una pequeña cantidad de NaOH 1N para alcalinizar la solución. Dicha solución se dejó reposar durante toda la noche, luego del cual, se agregó HCl 1N hasta alcanzar el pH neutro. Posteriormente, se agregó 100 ml de indicador a 1 L de caldo de fermentación.

Preparación de tubos de Wickerman

Se usó tubos de 18 x 15 mm conteniendo 9 ml de caldo con indicador y un tubo invertido de Durham. El medio de caldo con indicador se preparó agregando una parte de solución con indicador a 10 partes de caldo. Se esterilizó el medio de caldo con indicador en un autoclave a 121°C por 15 minutos. Se agregó 0,5 ml de la solución de carbohidratos (20% p/v) a los tubos de medio con indicador inmediatamente antes de usar.

Procedimiento de Siembra: Se agregó a cada tubo de fermentación 0.2 mL de suspensión salina de levadura equivalente al estándar N° 4 de Mc Farland. Luego, se cerró las tapas ligeramente y se incubó a 37°C durante 48 horas. Finalmente, antes de descartar las pruebas como negativas se dejó en la incubadora durante 6 a 10 días. Para esta prueba se utilizaron tubos de fermentación con glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, galactosa y trehalosa.

Anexo 6: Componentes del Bacto Yeast Nitrogen Base (Base Levadura Nitrogenada).

**BACTO YEAST NITROGEN BASE
(Base Levadura Nitrogenada)**

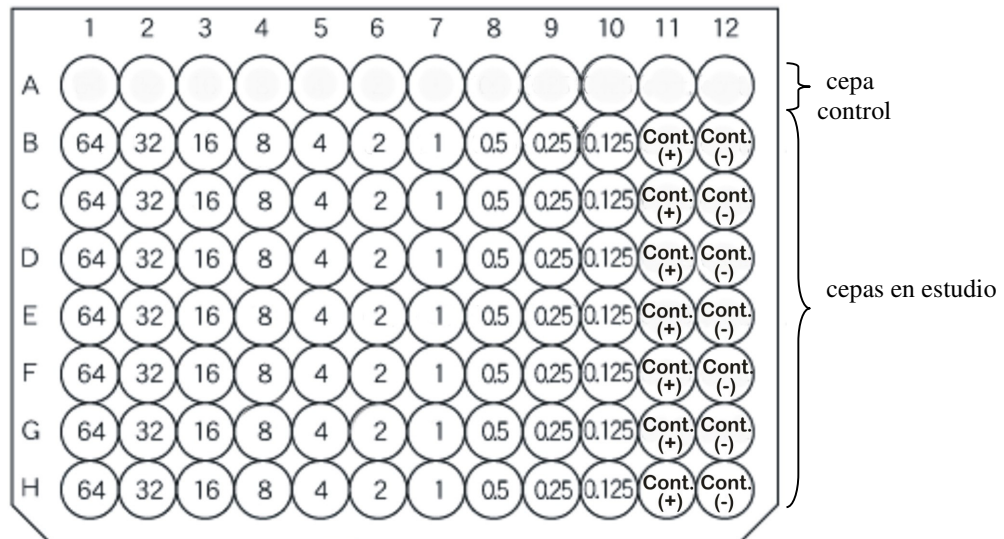
COMPONENTES	(Ingredientes por litro)
Fuente de Nitrógeno	
Sulfato de Amonio	5 g
Aminoácidos	
L-Histidina monoclorhidrato	10 mg
LD-Metionina	20 mg
LD-Triptófano	20 mg
Vitaminas	
Biotina	2 µg
Pantotenato de Calcio	400 µg
Ácido Fólico	2 µg
Inositol	2000 µg
Niacina	400 µg
Ácido p-Aminobenzoico	200 µg
Piridoxina Clorhidrato	400 µg
Riboflavina	200 µg
Tiamina Clorhidrato	400 µg
Compuestos Aditivos (oligoelementos)	
Ácido Bórico	500 µg
Sulfato de Cobre	40 µg
Ioduro de Potasio	100 µg
Cloruro Férrico	200 µg
Sulfato de Manganeso	400 µg
Molibdato de Sodio	200 µg
Sulfato de Zinc	400 µg
Sales	
Fosfato de Potasio monobásico	1 g
Sulfato de Magnesio	5 g
Cloruro de Sodio	0.1 g
Cloruro de Calcio	0.1 g

Anexo 7: Componentes del medio RPMI-1640 (con L-Glutamina y sin Bicarbonato de Sodio).

**MEDIO RPMI-1640
(con L-Glutamina y sin Bicarbonato de Sodio)**

COMPONENTES	g/L
L-Arginina (base libre)	0.2
L-Asparagina (anhidra)	0.05
L-Ácido aspártico	0.02
L-Cistina.2HCl	0.0652
L-Ácido glutámico	0.02
L-Glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina (base libre)	0.015
Hidroxi-L-Prolina	0.02
L-Isoleucina	0.05
L-leucina	0.05
L-Lisina.HCl	0.04
L-Metionina	0.015
L-Fenilalanina	0.015
L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03
L-Treonina	0.02
L-Triptófano	0.005
L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	0.02883
L-Valina	0.02
Biotina	0.0002
Cloruro de Colina	0.003
Ácido fólico	0.001
mio-Inositol	0.035
Niacinamida	0.001
D-Ácido pantoténico (hemicalcio)	0.00025
PABA	0.001
Piridoxina.HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Tiamina.HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Nitrato de Calcio.4H ₂ O	0.1
Sulfato de Magnesio (anhidro)	0.04884
Cloruro de potasio	0.4
Cloruro de sodio	6
Fosfato de sodio dibásico (anhidro)	0.8
D-Glucosa	2
Glutation reducida	0.001
Rojo de fenol.Na	0.0053

Anexo 8: Esquema de la incubación de las cepas frente a antifúngicos solubles en agua (fluconazol).



Col. (1) - Col. (10): Concentraciones de las diluciones de los antifúngicos

Cont (+) : Control positivo o de crecimiento (solvente + inóculo en RPMI 1640)

Cont. (-) : Control negativo (solvente + medio RPMI 1640)

Anexo 9: Esquema de la incubación de las cepas frente a antifúngicos insolubles en agua (Ketoconazol y Anfotericina B).



Col. (1) - Col. (10): Concentraciones de las diluciones de los antifúngicos

Cont (+) : Control positivo o de crecimiento (solvente + inóculo en RPMI 1640)

Cont. (-) : Control negativo (solvente + medio RPMI 1640)

Anexo 10:**a) Cabina de siembra.****b) Esterilización de la cabina de siembra con luz UV.**