Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica

Identificación, sensibilidad antifúngica y estudio de la capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Candida* aisladas de pacientes con Candidosis vulvovaginal, en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión 2019

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Tasha Kelly CORNEJO CHANDUVI

ASESORES

MSc. Vilma Ruth BÉJAR CASTILLO (Asesora)

Lic. Freddy Genrri VILLANUEVA COTRINA (Coasesor)

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cornejo T. Identificación, sensibilidad antifúngica y estudio de la capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Candida* aisladas de pacientes con Candidosis vulvovaginal, en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión 2019 [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Tasha Kelly Cornejo Chanduvi
DNI	70037675
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8941-3626
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Vilma Ruth Béjar Castillo
DNI	08864601
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2733-4492
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Freddy Villanueva Cotrina
DNI	10707207
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8578-274X
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.1.4.4 Enfermedades prevalentes
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Edificio: Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" País: Perú Departamento: Lima Provincia: Callao Distrito: Bellavista Jirón Santos Chocano 199 Latitud: -12.054308735990404 Longitud: -77.08748929894062
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2020
URL de disciplinas OCDE	Enfermedades infecciosas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.08

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

UNMSM Firmado digitalmente por FERNANDEZ GIUSTI VDA DE PELLA Alicia Jesus FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 04.10.2021 09:09:56 -05:00

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

UNMSM Firmado digitalmente por SANDOVAL VEGAS Miguel Hernan FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 01.10.2021 21:25:45 -05:00

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Dra. María Elena Muñoz Zambrano
Miembros: Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros
Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade
Asesor(a): Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 01 de octubre del 2021, siendo las 15:00 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado ***"IDENTIFICACIÓN, SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA Y ESTUDIO DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE CANDIDA AISLADAS DE PACIENTES CON CANDIDOSIS VULVOVAGINAL, EN EL INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN 2019"*,** para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Señorita:

TASHA KELLY CORNEJO CHANDUVI

Habiendo obtenido el calificativo de:

……**19……..**	……**DIECINUEVE**…….
(En números)	(En letras)

Que corresponde a la mención de: ..**SOBRESALIENTE**…
Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

…….	…….
Presidente	Miembro
Dra. María Elena Muñoz Zambrano	Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros
D.N.I: 06592866	D.N.I: 09219124
…….	……..
Miembro	Asesor(a) de Tesis
Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade	Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo
D.N.I: 16009552	D.N.I: 08864601

Datos de plataforma virtual institucional del acto de sustentación:
https: https://us02web.zoom.us/j/87189446466?pwd=OWVXbUxHdjUyY05WNUQzRDJHaVdkZz09
ID:
Grabación archivada en:

Identificación, sensibilidad antifúngica y estudio de la capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Candida* aisladas de pacientes con Candidosis vulvovaginal, en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión 2019

AUTOR:

CORNEJO CHANDUVI, TASHA KELLY

ASESORA:

MSc. Vilma Ruth Béjar Castillo

COASESOR:

Lic. Freddy Villanueva Cotrina

DEDICATORIA

A Dios por permitirme concluir mis proyectos y darme la fortaleza para enfrentar las adversidades.

A mis padres Roberto Cornejo Querevalu y Jacqueline Chanduvi Soto quienes me apoyaron en este largo pero satisfactorio proceso de aprendizaje.

A mis hermanos por estar siempre a mí lado.

A mis amigos por compartir conmigo experiencias y momentos inolvidables tanto dentro como fuera de las aulas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo la satisfacción de haber pertenecido a una de las mejores universidades del Perú, la "Universidad Nacional Mayor de San Marcos", y por ello me siento muy agradecida.

Agradecer también al Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por la oportunidad brindada de ejecutar en sus instalaciones mi tesis para obtener el grado de Licenciada Tecnólogo Médico, agradezco especialmente a la profesora Vilma Béjar asesora de este proyecto y al Lic. Freddy Villanueva mi coasesor, por haberme ayudado incondicionalmente, su participación fue imprescindible en la realización de esta investigación.

Un agradecimiento especial a los docentes que ayudaron en mi formación profesional y en especial a los que con sus consejos hicieron posible la realización de este proyecto, entre ellos el Mg. Segundo León y el Mg. Italo Saldaña.

Agradecer también a Gian Carlos Ramírez Ubillus, Tecnólogo médico, Mg. en Ciencias en Investigación Epidemiológica por su asesoría estadística, ya que su participación fue imprescindible para la conclusión del presente estudio.

Agradezco también a mis padres y hermanos por el apoyo brindado a lo largo de esta carrera, y a mis amigos que son como mi familia por sus consejos y ayuda.

ÍNDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN ..... - 2 -
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES ..... - 3 -
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN ..... - 6 -
1.3 OBJETIVOS ..... - 6 -
1.3.1 OBJETIVO GENERAL: ..... - 6 -
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: ..... - 7 -
1.4 BASES TEÓRICAS ..... - 7 -
1.4.1 BASE TEÓRICA ..... - 7 -
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS: ..... - 12 -
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS: ..... - 13 -
CAPITULO II: MÉTODOS ..... - 15 -
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO ..... - 16 -
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN ..... - 16 -
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN ..... - 16 -
2.1.3 POBLACIÓN ..... - 16 -
2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO ..... - 16 -
2.1.5 VARIABLES ..... - 17 -
2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS ..... - 18 -
2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS ..... - 18 -
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS ..... - 19 -
CAPITULO III: RESULTADOS ..... - 21 -
CAPITULO IV: DISCUSIÓN 36
4.1 Limitaciones y fortalezas 40
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44
ANEXOS 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cepas de *Candida* sp aisladas en pacientes con Candidosis vulvovaginal del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" durante el 2014-2017 (n=53). .....- 22 -

Tabla 2. Identificación de especies de *Candida* por morfología y color de la colonia con CHROMAgar *Candida* (HIMEDIA), agar almidón arroz (AAA), suero (Tubo Germinativo) y agar harina de maíz (AHM) y agar tabaco.....- 24 -

Tabla 3. Grado de producción de biopelículas en función de la especie de Candida. Según Tumbarello y col. 30

Tabla 4. Análisis bivariado entre la formación de biopelículas y la especie de *Candida* sp. (n=41)..... 33

Tabla 5. Análisis bivariado de la sensibilidad antifúngica a Fluconazol con la especie de *Candida* sp. y la formación de biopelículas (n=53). 35

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación de especies de *Candida* en CHROMAgar *Candida* (HIMEDIA). Se observan colonias cremas, lisas y de borde regular (a) identificadas como *C. parapsilosis*; (b) colonias verde manzana, lisas y de borde regular identificadas como *C. albicans* y (c) colonias cremas de centro color malva, lisas y de borde regular identificadas como *C. glabrata*..... 25

Figura 2. Diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* en agar tabaco. Se observan (a) colonias de color crema y de borde regular identificadas como *C. albicans*; (b) colonias de color marrón amarillentas y de borde irregular identificadas como *C. dubliniensis*..... 26

Figura 3. Formación de clamidoconidias en agar almidón arroz a 30°C por 48h... 27

Figura 4. Filamentación en suero positiva a 37°C por 2 horas. 28

Figura 5. Formación de blastoconidias, pseudohifas y clamidoconidias en agar harina de maiz a 37°C por 48h. (a). *C. glabrata:* Blastoconidias pequeñas y agrupadas, (b). *C. parapsilosis*: Pseudohifas 29

Figura 6. Sensibilidad antifúngica a fluconazol (25ug) y voriconazol (1ug) en Muller Hinton modificado a 37°C por 24h. El halo alrededor del disco de Fluconazol es de 31mm, considerado cómo sensible (S); y el halo alrededor del disco de Voriconazol es de 38 mm, considerado sensible (S)..... 32

RESUMEN

Objetivos: Identificar, determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* frente a antimicóticos azólicos y la capacidad formadora de biopelículas de cepas de *Candida* aisladas de flujo vulvovaginal. **Materiales y métodos:** Estudio transversal de 60 cepas de *Candida* aisladas en pacientes diagnosticadas con Candidosis vulvovaginal pertenecientes a la Micoteca del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ubicada en el Callao, Perú. La identificación se llevó a cabo utilizando CHROMagar Candida, filamentación en suero a 37°C (prueba del tubo germinativo), agar harina de maíz, agar almidón arroz, fermentación de carbohidratos (Zimograma) y agar tabaco. Para la determinación del perfil de sensibilidad se utilizó el método de Difusión en agar utilizando discos de papel cargados con antifúngicos (CLSI M44-A) y la capacidad formadora de biopelículas se midió por el método directo en microplacas de poliestireno de fondo plano (Tumbarello y col. 2007). **Resultados:** Se identificaron las siguientes especies: *Candida glabrata* (50.9%), *Candida albicans* (26.4%), *Candida parapsilosis* (7.6%), *Candida dublinensis* (1.9%), *Candida kéfir* (5.7%) y *Candida famata* (7.5%). El porcentaje de sensibilidad se encontró en 71.7% y 96.2% para Fluconazol y Voriconazol, respectivamente. Las cepas formadoras de biopelículas representaban el 64.2% del total de cepas evaluadas en este trabajo. **Conclusiones**: La especie identificada con mayor frecuencia fue *Candida glabrata*. Más de la mitad de la población fue sensible al Fluconazol y Voriconazol. Un porcentaje de 64.2%, que representa más de la mitad de la población estudiada, formó biopelículas mediante el método directo.

Palabras claves: Biopelículas, *Candida*, Vulvovaginitis.

ABSTRACT

Objective: To identify and determine the sensitivity profile in vitro against azole antifungals of the strains of Candida with capacity to form biofilms isolated from vulvovaginal flow. **Materials and methods:** Cross-sectional study of a population of 60 strains of Candida isolated from patients diagnosed with vulvovaginal candidosis. These strains belonged to the mycotheque of the Institute of Tropical Medicine Daniel Alcides Carrión of the National University of San Marcos located in Callao, Peru. The identification was carried out using CHROMagar Candida; germ tube test was developed by corn flour agar, rice starch agar, carbohydrate fermentation (Zimogram) and tobacco agar. The determination of the sensitivity profile using the Disc Diffusion method (CLSI) M44-A) and biofilm forming capacity was measured by the direct method in flat bottom polystyrene microplates (Tumbarello et al., 2007). **Results**: The following species were identified: *Candida glabrata* (50.9%), *Candida albicans* (26.4%), *Candida parapsilos*is (7.6%), *Candida dublinensis* (1.9%), *Candida kefir* (5.7%) and *Candida famata* (7.5%). The strains that produced biofilms represented 64.2% of the total strains evaluated in this work. In this study, the sensitivity percentage was found 71.7% and 96.2% for Fluconazole and Voriconazole, respectively. **Conclusions**: The most frequently identified species was *Candida glabrata.* More than half of the population was sensitive to Fluconazole and Voriconazole. A percentage of 64.2%, which represents more than half of the studied population formed biofilms using the direct method.

Keywords: Biofilms, *Candida*, Vulvovaginitis.

CAPITULO I:

INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

Las infecciones fúngicas ocasionadas por patógenos oportunistas representan en la actualidad un problema para la salud pública, debido al aumento de casos como producto de diversos factores, entre ellos podemos encontrar trastornos endocrinos, el envejecimiento de la población, enfermedades crónicas, el empleo frecuente de maniobras invasivas, tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, entre otros (1–3).

Estos patógenos oportunistas se hacen evidentes cuando el equilibrio en el que se encuentra nuestro organismo se rompe o altera frente a cualquier defecto inmunológico, esto resulta en un cambio del organismo comensal a uno patógeno (4).

Cualquier tejido es susceptible de ser afectado, lo que origina la aparición de diversos cuadros clínicos asociados a un desequilibrio inmunológico del individuo. Entre los principales responsables del aumento de las infecciones fúngicas encontramos a las levaduras, estas se encuentran presentes en la piel y mucosas como comensales (4); principalmente las especies del género *Candida* (5), las mismas que pueden llegar a ser una causa importante de morbilidad.

La distribución geográfica de la Candidosis es universal y más del 70% de los casos reportados son causados por C*andida albicans* (4). La mayoría de estas infecciones se originan a partir de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas (4,6).

Estas infecciones pueden ser mucocutáneas o invasivas. Las mucocutáneas afectan mucosas y piel, son las más frecuentes, por lo general de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves.

La Candidosis vulvovaginal es una infección mucocutánea, que consiste en la inflamación de vulva y vagina producida por las diferentes especies de *Candida* que colonizan dicha región anatómica.

Estudios anteriores destacan el incremento continuo del número de casos de Candidosis vulvovaginal en los últimos años (7), se estima que estas infecciones afectan entre el 70 y 75% de todas las mujeres en algún momento de su vida (8,9), y que del total de mujeres que han experimentado cuadros de vulvovaginitis, el 5-8% experimenta Candidosis vulvovaginal recurrente, es decir tienen tres o más episodios anuales (8).

En países que disponen de información documentada como Estados Unidos (EEUU) el motivo principal de consulta en ginecología son las infecciones vulvovaginales, afectando a mujeres de todas las edades. Los signos y síntomas que acompañan estas infecciones son la causa principal de las consultas con un especialista, anualmente la cifra excede las 10 millones de consultas(4).

Entre las infecciones que son motivo de consulta se encuentran las causadas por levaduras del género *Candida*, manifestándose comúnmente en estas pacientes una secreción vaginal anormal, caracterizada por presentar una consistencia espesa, color blanquecino y que por lo general no presenta mal olor. Otros síntomas relacionados son prurito, placas blancas, eritema vulvar, entre otros (7). No se conoce la real incidencia de la Candidosis vulvovaginal, ya sea por los escasos estudios de frecuencia, la automedicación (6) y/o el diagnóstico inadecuado (9).

En cuanto a Latinoamérica de los 22 países que la conforman, solo 50% cuenta con información disponible acerca de frecuencia de Candidosis vulvovaginal, siendo los 3 países con más publicaciones: México, Argentina y Brasil. Por otro lado, Perú es uno de los países latinoamericanos con menos publicaciones al respecto de infecciones producidas por *Candida* (4).

Existen más de 100 especies de *Candida* que son patógenas para los seres humanos (6), sin embargo en la etiología de las Candidosis vulvovaginales entre 85% y 95% se encuentra a C*andida albicans* (4,8), seguida por *Candida glabrata* y las de menor frecuencia (menos del 5%) C*andida krusei, Candida parapsilosis, Candida tropicalis y Candida africana* entre otras (4,10). Por muchos años se le restó importancia a la identificación de especies de *Candida* no *albicans*, debido a la poca frecuencia de aislamiento. Actualmente diversos estudios sobre Candidosis

vulvovaginal aseveran que existe un aumento progresivo en el aislamiento de especies de *Candida* no *albicans* en las que se ha observado una mayor resistencia a los agentes antifúngicos. Estas especies de *Candida* resistentes son las que frecuentemente se ven implicadas en cuadros de Candidosis vulvovaginal recurrente. (11–13).

Las levaduras del género *Candida,* presentan diversos factores de virulencia entre los que destacan la habilidad de sobrevivir como comensal, la adherencia a las células del hospedero, la secreción de enzimas degradativas, el cambio morfológico (14) y la formación de biopelículas.

Una biopelícula es una comunidad microbiana heterogénea y dinámica bien estructurada inmersa en una matriz extracelular de naturaleza predominantemente polisacárida (3). Los microorganismos que se desarrollan en biopelículas presentan un fenotipo único al compararlos con su contraparte libre, esta característica explicaría la mayor resistencia que presentan los microorganismos embebidos en la biopelícula frente a los agentes antimicrobianos (1,15). Esta comunidad puede estar formada por una sola especie bacteriana/fúngica, o puede ser polimicrobiana, siendo esta última situación la más común.

Se presume que aproximadamente el 65% de las infecciones humanas están relacionadas a microorganismos que se encuentran formando biopelículas (15,16).

Diversos autores han estudiado la capacidad formadora de biopelículas de las distintas especies de *Candida,* por lo general *Candida albicans* además de aislarse con mayor frecuencia, también es la que produce biopelículas con una frecuencia mayor en comparación con las demás especies (1,8), seguida de *Candida tropicalis, Candida parapsilosis* y C*andida. glabrata* (1). Las biopelículas se asocian a infecciones recidivantes, ya que actúan como un reservorio de microorganismos causantes de infecciones, dificultando su eliminación (15).

Últimos estudios indican que existen diversos mecanismos implicados en la resistencia que ofrecen las biopelículas frente a los fármacos antifúngicos. Se ha

demostrado en el caso de *Candida albicans* que la resistencia a antifúngicos aparece desde la fase inicial, cuando aún no se ha formado la matriz extracelular (1,17).

1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se ha demostrado la relación entre la capacidad formadora de biopelículas y los cuadros de Candidosis vulvovaginal recurrentes, esto se debe a que las cepas de *Candida* que forman biopelículas alteran la acción de los antifúngicos de primera elección y de los mecanismos de defensa del hospedero. Este aumento de la resistencia representa uno de los principales factores que provocarían la perpetuación de la infección en el hospedero, causando el resurgimiento y ocasionando daños colaterales en los tejidos circundantes. Además, es importante la identificación de las cepas de *Candida* pertenecientes al cepario del IMT, aisladas de las muestras de secreción vulvovaginal, debido a que existe una importante variación en las especies en cuanto a la frecuencia de producción de biopelículas, su actividad metabólica y su respuesta al tratamiento farmacológico.

Es por este motivo que en la presente investigación se buscó identificar las especies aisladas en secreción vulvovaginal, se determinó su capacidad de formación de biopelículas y su perfil de sensibilidad antifúngica frente a fluconazol y voriconazol.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la identificación, sensibilidad antifúngica y capacidad formadora de biopelículas en cepas de *Candida* aisladas de pacientes con Candidosis vulvovaginal del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar las especies de *Candida* aisladas de flujo vulvovaginal.

- Determinar el perfil de sensibilidad antifúngica de las especies de *Candida* tipificadas.

- Determinar la capacidad formadora de biopelículas según especies de *Candida* tipificadas.

1.4 BASES TEÓRICAS

1.4.1 BASE TEÓRICA

VULVOVAGINITIS:

Vulvovaginitis es un término que comprende a patologías de origen diverso que afectan el aparato urogenital de la mujer, caracterizada por el enrojecimiento, dolor, sensación de ardor y aumento en el volumen de vulva y vagina (4). Se estima que representa más de un tercio de las consultas ginecológicas y su frecuencia parece estar aumentando, a la vez que se identifican nuevos gérmenes responsables y aparecen nuevas resistencias a los tratamientos clásicos (18). Las patologías que afectan vulva y vagina no causadas por un agente infeccioso apenas representan el 15% de todos los casos, por lo que la mayoría son de origen infeccioso (4). Como principales agentes etiológicos encontramos a *Trichomona vaginalis* y *Candida albicans*.

Algunos estudios indican que *T. vaginalis* representa entre el 15 al 20% de las vulvovaginitis, la vaginosis bacteriana es la causante del 40 al 50% y las Candidosis vaginales suponen del 20 al 25% de estas infecciones (18,19).

Algunos estudios aseguran que el incremento de casos de infecciones vulvovaginales, se debe en gran medida a las infecciones ocasionadas por levaduras, dentro de las que podemos encontrar principalmente a las especies del género *Candida* (1).

CANDIDOSIS VULVOVAGINAL:

La Candidosis, Candidiasis o Moniliasis vulvovaginal es aquella infección micótica en la que se ven afectadas la vulva y la vagina, donde el agente etiológico responsable pertenece al género *Candida* (20), microorganismos que constituyen una causa importante de morbilidad. Las especies de este género son comensales frecuentes del ser humano y representan una causa importante de una gran diversidad de afecciones a nivel de la mucosa, la piel e incluso a nivel sistémico, las mismas que pueden ser de poca relevancia clínica hasta aquellas que pueden llegar a ser mortales (4). La colonización por *Candida* spp. es relativamente frecuente en mujeres atendidas por infecciones de transmisión sexual, presentando extensión a la zona ano-rectal. Existen períodos en la vida de una mujer en los cuales la probabilidad de contraer Candidosis vulvovaginal aumenta, especialmente relacionados con cambios hormonales como perimenarquia o embarazo, siendo rara su ocurrencia en la premenarquia y posmenopausia (21). Se estima que un 20 a 40% de las mujeres sanas asintomáticas está colonizada por *Candida* (6,22). Se consideran como factores predisponentes la diabetes, el embarazo, el uso de anticonceptivos orales, la obesidad, el empleo reciente de antibióticos y la utilización de corticoides (21).

Se desconoce la incidencia real de la Candidosis vulvovaginal por tratarse de una enfermedad no notificada, por la automedicación, por ser enmascarada por errores diagnósticos o estudios poco representativos de la población (22).

Se estima que existen más de 200 cepas de *Candida* con capacidad de colonizar la zona genital femenina, siendo aislada con mayor frecuencia *Candida albicans* (67-95%), seguida por *Candida glabrata* que por lo general es asociada a cuadros de recurrencia y a fracaso en el tratamiento farmacológico (23).

Entre los síntomas más frecuentes podemos encontrar el prurito vulvovaginal intenso, escozor acompañado de leucorrea blanquecina en forma de grumos o cuajada y no presenta mal olor. A su vez produce eritema, edema vulvar y dispareunia (19). Un tercio de las mujeres infectadas no presentan ni prurito, ni escozor en la zona y más de un 50% no presentan leucorrea (18).

El aumento de casos ocurrido en los últimos años se atribuye a varios factores, entre los que encontramos el uso de nuevos agentes antifúngicos con un espectro antimicótico más amplio y mayor potencia antifúngica, al aumento de pacientes inmunocomprometidas, pacientes sometidos a una o varias cirugías, a la aparición de nuevas especies con sensibilidad antifúngica disminuida y a la formación de biopelículas fúngicas (5,24).

RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA:

El desarrollo de resistencia del microorganismo se evidencia con la persistencia de la micosis, posterior a la aplicación del tratamiento adecuado. Esta puede ser resistencia intrínseca o primaria, la que ocurre cuando ninguna cepa es susceptible a la acción del fármaco, como es el caso de C*andida krusei* que es naturalmente resistente a fluconazol (15). Además, está la resistencia secundaria generada por el hongo inicialmente sensible al antifúngico y que adquiere resistencia luego de estar expuesto (1).

Se describen diversos mecanismos relacionados con la resistencia a fármacos antifúngicos, entre ellos encontramos la modificación de la enzima diana biológica, disminuyendo su afinidad con el fármaco, la presencia de barreras de permeabilidad que impiden al antibiótico alcanzar la dosis necesaria en el sitio de acción, la modificación de la acción del fármaco provocando su inactivación y por último,

alteraciones fisiológicas. De todos éstos, en el caso de los azoles sólo se conocen los dos primeros como potenciales causas de resistencia (15,25).

Estudios previos sobre la susceptibilidad de levaduras aisladas de pacientes que padecen de Candidosis vulvovaginal, han demostrado que en las especies de *Candidas* no *albicans* los antifúngicos de la familia de los azoles, los que son generalmente empleados en el tratamiento tópico y sistémico de infecciones provocadas por hongos, presentan una efectividad menor en comparación con la obtenida cuando se trata una infección provocada por *C. albicans* (25). La especiación de las levaduras causantes de vulvovaginitis, es una práctica no muy común en el laboratorio, a pesar de ser de gran importancia para la elección del tratamiento farmacológico adecuado, dada la variabilidad existente en el comportamiento de las diferentes especies de *Candida* frente a la acción de los fármacos. Es recomendable además de la identificación de la cepa aislada, determinar el perfil de sensibilidad con el objetivo de tener la certeza de prescribir un tratamiento adecuado y así descartar algún tipo de resistencia (26,27).

Se ha considerado a los azoles como el primer nivel de manejo en la infección por *Candida*, siendo el fluconazol el antimicótico de elección a lo largo de los años.

El fluconazol representaba el medicamento de elección en la mayoría de las infecciones provocadas por hongos (28). Su uso extendido ha originado el surgimiento de microorganismos resistentes, resultando en un aumento de los fracasos terapéuticos (27). Ante este aumento de resistencia a dicho fármaco han surgido alternativas terapéuticas con las que se pretende solucionar el problema latente que representan los microorganismos resistentes a los compuestos azólicos de primera y segunda generación, es así como surge una alternativa terapéutica, el voriconazol (26,27).

Además de la emergencia de cepas con susceptibilidad disminuida a los fármacos antifúngicos estas levaduras presentan otros factores de virulencia importantes para la práctica clínica como el surgimiento de cepas con capacidad formadora de biopelículas, ya que muchas de las micosis más recalcitrantes al tratamiento se asocian a la colonización y la formación de biopelículas esto se debe a que esta

forma de desarrollo confiere a los microorganismos una gran resistencia a los agentes antimicrobianos a los que son sensibles en su forma planctónica (1,3).

BIOPELÍCULAS:

Una biopelícula es aquella comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y englobada por una matriz extracelular autoproducida (1,29). La formación de una biopelícula es un proceso en el que están implicadas diferentes fases de desarrollo, siendo la primera el acondicionamiento, seguido de la adhesión a una superficie biótica o abiótica, la formación de la matriz exopolisacárida, la maduración y la dispersión (15). Además de las células microbianas y la matriz exopolisacárida, una biopelícula también está formada por agua, que representa hasta un 97% de la composición de estas biopelículas, y en menor proporción encontramos proteínas, ácidos nucleicos y productos diversos procedentes de la lisis celular (30).

Estas estructuras presentan características comunes entre ellas, tales como la presencia de una matriz extracelular, moléculas *quórum sensing*, además de estar conformada por células que presentan una mayor resistencia a los antifúngicos que su contraparte planctónica (1,14,31). La producción y desarrollo de biopelículas fúngicas se debe a diversos factores, como su entorno (el medio y la superficie), además de la especie implicada (1). La diferencia de la susceptibilidad frente a fármacos de las formas sésiles y las formas planctónicas de los microorganismos formadores de biopelículas se atribuye a las modificaciones en su capacidad de respuesta metabólica, y a la inducción de genes que se activan en el momento en el que el microorganismo entra en contacto con la superficie (1,15). Estudios anteriores sugieren que la actividad de los fármacos antimicrobianos sobre una biopelícula de *Candida* spp., en comparación con la actividad sobre la levadura en su forma libre o planctónica puede llegar a ser hasta 2000 veces menor (5).

1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS:

- **CANDIDOSIS O CANDIDIASIS:** Infección primaria o secundaria, causadas por levaduras del género *Candida* con manifestaciones clínicas variables. En las cuales el hongo puede causar una micosis superficial o profunda.

- **VULVOVAGINITIS:** Cualquier proceso inflamatorio de la vagina y la vulva que, fundamentalmente, se manifiesta por leucorrea, prurito y escozor.

- **BIOPELÍCULA:** Comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y englobados por una matriz extracelular autoproducida de naturaleza exopolisacárida.

- **SENSIBILIDAD:** Es el comportamiento que posee la levadura de responder o no frente a un agente antifúngico.

- **FORMA PLANCTÓNICA:** Levadura que se encuentra en libre flotación.

- **FORMA SÉSIL:** Levadura que se encuentra adherida a una superficie biótica o abiótica y que forma parte de la biopelícula.

- **DISPAREUNIA:** Se refiere a una entidad que englobara todos los procesos dolorosos que interfieren con el coito.

- **QUÓRUM SENSING:** Es un fenómeno que sirve para la comunicación entre las células y el ambiente químico y físico de su entorno.

- **ATCC:** American Type Culture Collection.

- **INFECCIONES RECIDIVANTES:** Infecciones persistentes, es decir que tienen tres o más episodios anuales.

- **CEPAS DE REFERENCIA (C REF):** Microorganismos definidos mínimamente a nivel de género y especie, clasificados, bien caracterizados y de procedencia conocida. Ejm: Cepas ATTC.

- **CEPAS DE TRABAJO (CT):** subcultivos obtenidos a partir de la reactivación de cepas de referencia, y empleado como control en el trabajo diario.

1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS:

Las cepas de *Candida* aisladas de pacientes con Candidosis vulvovaginal en su mayoría pertenecen a la especie *C. albicans* y presentan capacidad formadora de biopelículas, en más del 50% del total de cepas estudiadas, además expresan menor sensibilidad *in vitro* a fluconazol y a voriconazol con respecto a las cepas no formadoras.

CAPÍTULO II:

MÉTODOS

2.1 DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es de tipo descriptiva, es un estudio de frecuencia. (ICFES, 1989) (32) (Manterola y Otzen, 2014) (33).

2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Observacional y transversal.

2.1.3 POBLACIÓN

La población está constituida por 60 cepas aisladas de Candidosis vulvovaginal pertenecientes al cepario del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO

Se trabajó con todas las cepas para el análisis de los datos. Por lo tanto, al ser la muestra igual a la población, no existe un muestreo. El estudio se realizó entre el 2018 y el 2020. Posteriormente, se aplicaron los criterios de inclusión/exclusión.

2.1.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cepas aisladas de Candidosis Vulvovaginal pertenecientes al cepario del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cepas no viables, aquellas cepas que no presentaron crecimiento óptimo al ser reactivadas luego de la congelación.
- Cepas no identificadas fenotípicamente, aquellas cepas que no se han podido identificar mediante las características expresadas en las diferentes pruebas.
- Cultivos contaminados, aquellos cultivos en los que ha habido crecimiento de colonias no identificadas o de agentes ajenos al agente de interés.

2.1.5 VARIABLES

Variable independiente

- Especies de *Candida.*

Variable dependiente

- Sensibilidad antifúngica.
- Formación de biopelículas.

2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se trabajó con cepas aisladas, conservadas en el cepario del laboratorio de Micología del IMT DAC a -70°C. (M. Linares Sicilia y col, 2007).

2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

Los procedimientos para el procesamiento de las cepas, información sobre los medios de cultivo y el control de calidad realizado en estos, se pueden observar en los anexos 1, 2 y 3, respectivamente.

Para la descripción de los datos se utilizaron frecuencias absolutas y relativas. Para la determinación de las asociaciones se utilizó la prueba exacta de Fisher debido a que tanto las variables dependientes como la independiente fueron categóricas, y algunas categorías de estas variables presentaron frecuencias esperadas pequeñas. Los datos se ingresaron al programa Excel 2010 y luego fueron importados a STATA 16.0 para su análisis.

2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. No utilizó consentimientos informados ya que no se trabajó con sujetos humanos, por lo tanto, no implicó algún riesgo a la confidencialidad y/o respeto de seres humanos en la investigación. (Anexo 4)

CAPÍTULO III:

RESULTADOS

3.1 Descripción de los datos

Se inició el estudio con 60 cepas de *Candida* sp, de los cuales 7 no cumplieron con los criterios de selección (2 no se reactivaron, 4 no pudieron ser identificadas y 1 se contaminó). Por lo tanto, el análisis de las 53 cepas restantes se presenta a continuación:

Tabla 1. Características de las cepas de *Candida* sp aisladas en pacientes con Candidosis vulvovaginal del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" durante el 2014-2017 (n=53).

Características		**N (%)**
Especies de *Candida*		
	Candida glabrata	27 (50.9%)
	Candida albicans	14 (26.4%)
	Candida parapsilosis	4 (7.6%)
	Candida famata	4 (7.5%)
	Candida kefir	3 (5.7%)
	Candida dubliniensis	1 (1.9%)
Formación de biopelículas		
No	0	19 (35.9%)
Sí	1+	4 (7.5%)
	2+	10 (18.9%)
	3+	11 (20.7%)
	4+	9 (17.0%)
Sensibilidad Fluconazol		
	Sensible	38 (71.7%)
	Sensible dependiente de dosis	11 (20.8%)
	Resistente	4 (7.5%)
Sensibilidad Voriconazol		
	Sensible	51 (96.2%)
	Sensible dependiente de dosis	1 (1.9%)

	Resistente	1 (1.9%)

3.1.1 Identificación de cepas de *Candida* sp.

Para la identificación se utilizaron los métodos de CHROMAgar *Candida* (HIMEDIA), agar almidón arroz (AAA), filamentación en suero (Tubo Germinativo), agar harina de maíz (AHM) y agar tabaco. De esta forma, en la tabla 1 se puede observar que, de las 53 cepas aisladas de flujo vulvovaginal, la cepa que predominó fue *Candida glabrata* (50.9%) y la que presentó el menor porcentaje de aislamiento fue *Candida dubliniensis* (1.9%).

En la figura 1, se puede observar el aislamiento de diferentes colonias en CHROMAgar *Candida* (HIMEDIA); la figura 2 representa aislamiento y diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* en agar tabaco; la figura 3 demuestra la formación de clamidoconidias en AAA a 30°C por 48h en *Candida albicans*; la figura 4 representa la filamentación en suero a 37°C por 2 horas en *Candida albicans*; y la figura 5 evidencia la formación de blastoconidias, pseudohifas y clamidoconidias de diferentes cepas en agar harina de maíz a 37°C por 48h.

Tabla 2. Identificación de especies de *Candida* por morfología y color de la colonia con CHROMAgar *Candida* (HIMEDIA), agar almidón arroz (AAA), suero (Tubo Germinativo) y agar harina de maíz (AHM) y agar tabaco.

Especies	N° aislados (%)	Características de la colonia (CHROMAgar)	Formación de clamidoconidias (aaa) y tubo germinativo (suero)	Formación de blastoconidias y pseudohifas (AHM)	Colonias redondas y cremas (agar tabaco)	Colonias rugosas, marrón amarillentas (agar tabaco)
C. albicans	14 (26.4)	Verde manzana, redondas, lisas y brillantes (100%)	Sí	No	Sí	No
C. glabrata	27 (50.9)	Cremas (40.7%) Cremas con centro malva (55.6%), lisas y brillantes	No	Sí	No aplica	No aplica
C. parapsilosis	4 (7.6)	Cremas, lisas y brillantes (100%)	No	Sí	No aplica	No aplica
C. dubliniensis	1 (1.9)	Verde oscura, lisa y brillosa (100%)	Sí	No	No	Sí
C. kefir	3 (5.7)	Crema, lisa y brillante (100%)	No	Sí	No aplica	No aplica
C. famata	4 (7.5)	Crema y seca (50%)	No	Sí	No aplica	No aplica

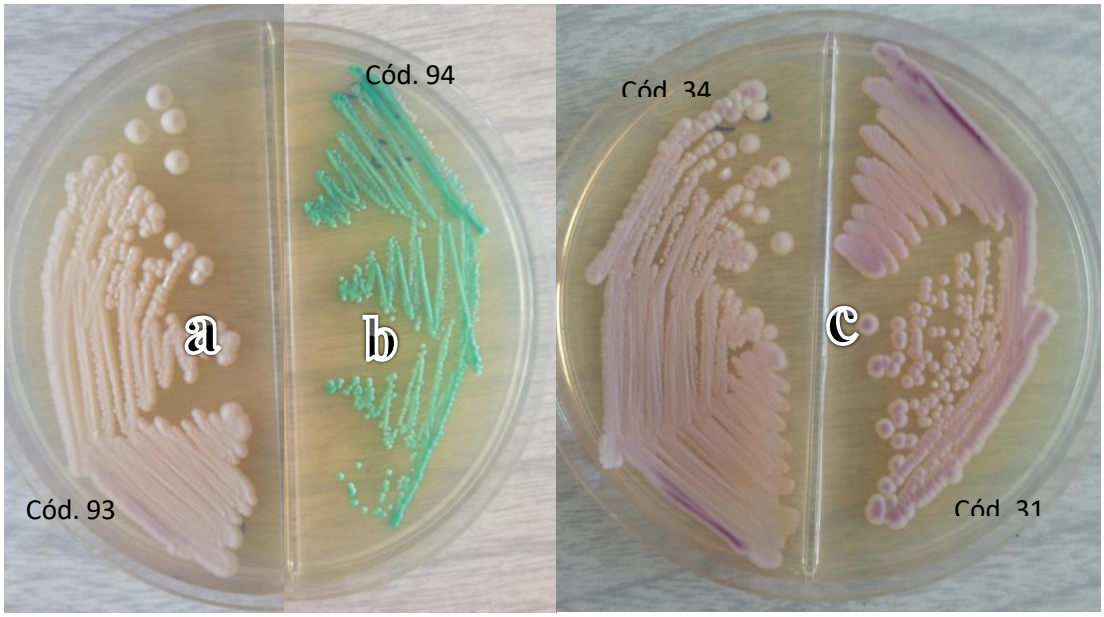

Figura 1. Identificación de especies de *Candida* en CHROMAgar *Candida* (HIMEDIA). Se observan colonias cremas, lisas y de borde regular (a) identificadas como *C. parapsilosis*; (b) colonias verde manzana, lisas y de borde regular identificadas como *C. albicans* y (c) colonias cremas de centro color malva, lisas y de borde regular identificadas como *C. glabrata*.

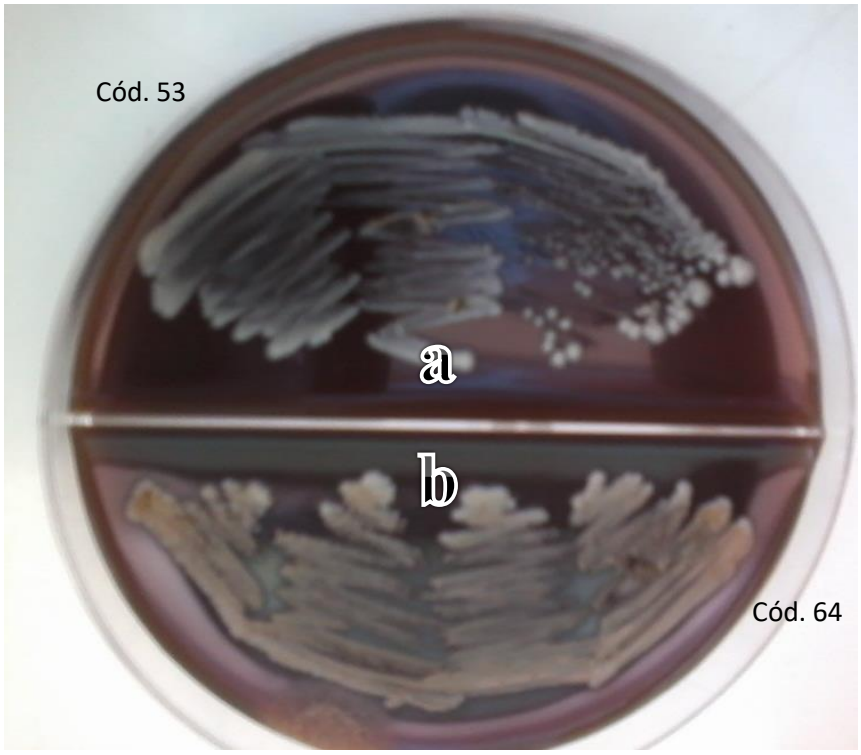

Figura 2. Diferenciación de *Candida dubliniensis* y *Candida albicans* en agar tabaco. Se observan (a) colonias de color crema y de borde regular identificadas como *C. albicans*; (b) colonias de color marrón amarillentas y de borde irregular identificadas como *C. dubliniensis.*

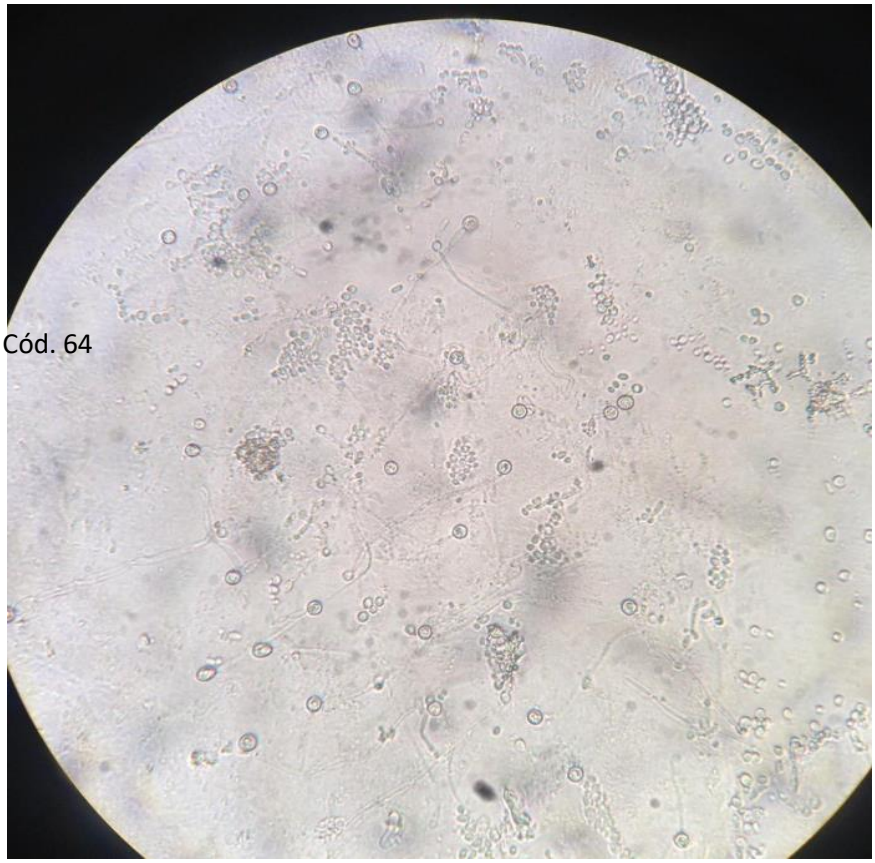

Figura 3. Formación de clamidoconidias en agar almidón arroz a 30°C por 48h.

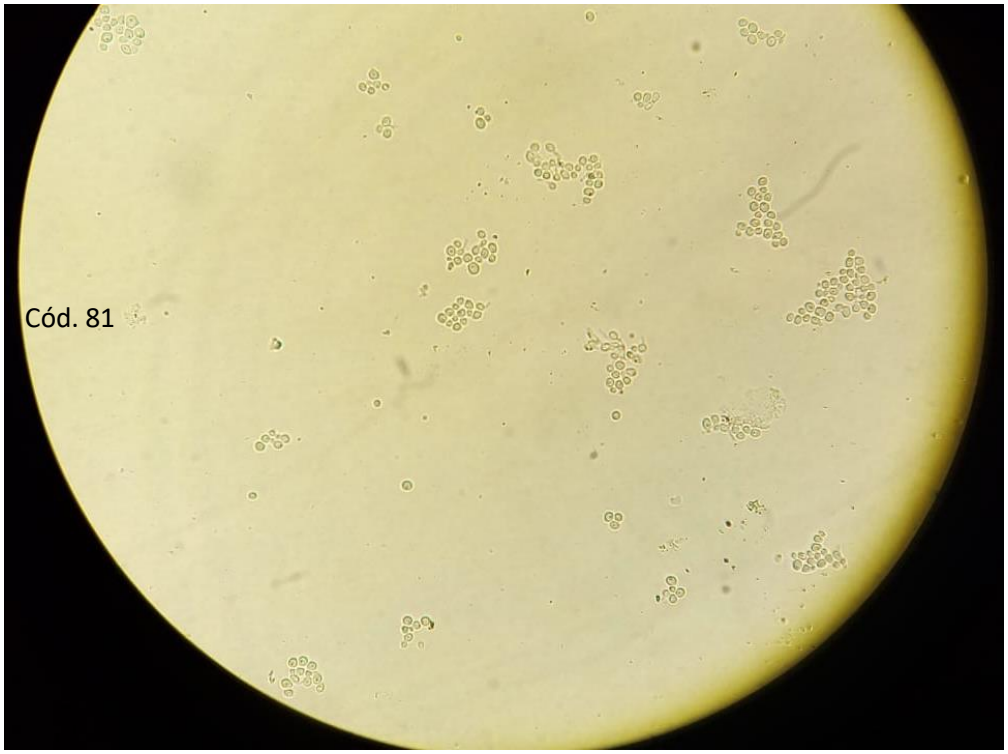

Figura 4. Filamentación en suero positiva a 37°C por 2 horas.

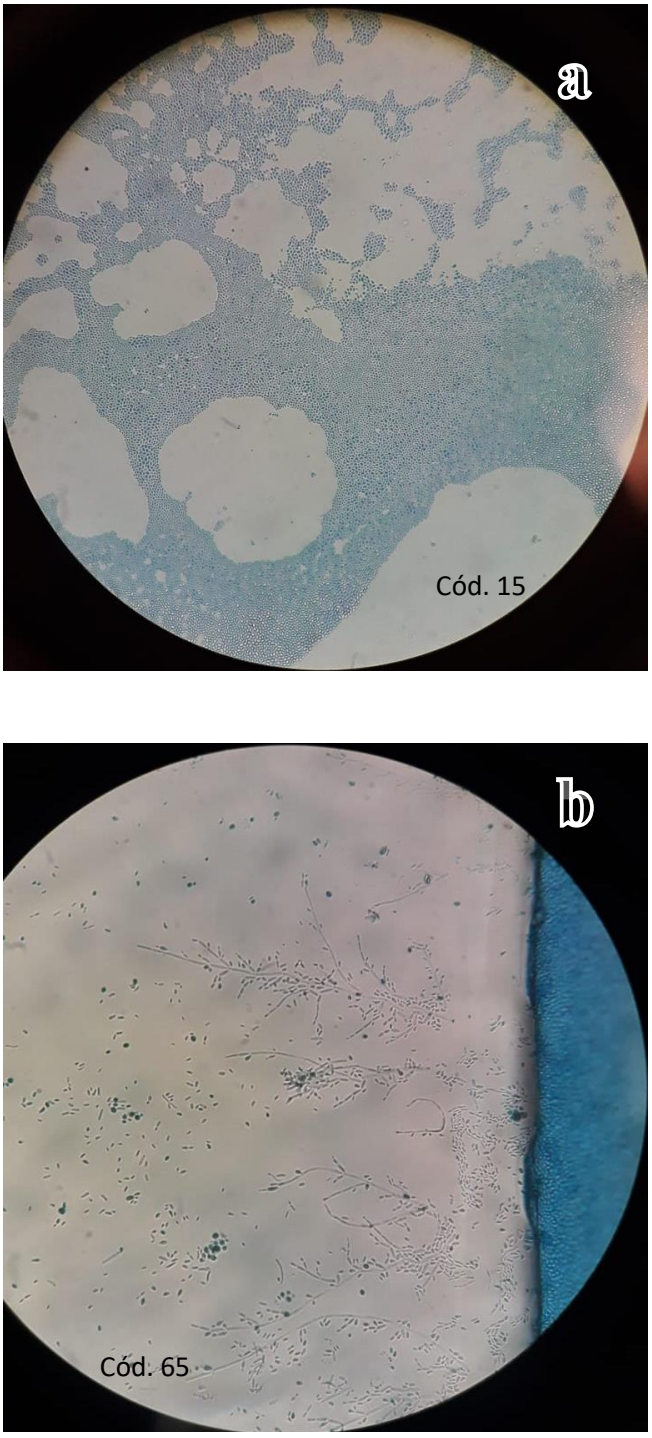

Figura 5. Formación de blastoconidias, pseudohifas y clamidoconidias en agar harina de maiz a 37°C por 48h. (a). *C. glabrata:* Blastoconidias pequeñas y agrupadas, (b). *C. parapsilosis*: Pseudohifas

3.1.2 Formación y grado de producción de biopelículas de las cepas de *Candida* spp.

Mediante la tabla 1, se puede observar que, de las 53 cepas aisladas, 34 (64.2%) formaron biopelículas, de los cuales, predominaron los que generaron 3 cruces de biopelículas, estos fueron 11 (20.7%).

Tabla 3. Grado de producción de biopelículas en función de la especie de Candida. Según Tumbarello y col.

Especie	N.º de cepas	Baja producción de biopelículas (1+) ⁎ (%)	Alta producción de biopelículas (2+, 3+ o 4+) ⁎ (%)	No formadora (%)
C. albicans	14	2 (14.3)	7 (50.0)	5 (35.7)
C. glabrata	27	1 (3.7)	18 (66.7)	8 (29.6)
C. parapsilosis	4	1 (25.0)	2 (50.0)	1 (25.0)
C. famata	4	0	1 (25.0)	3 (75.0)
C. kéfir	3	0	1 (33.3)	2 (66.7)
C. dubliniensis	1	0	1 (100)	0
Total	53	4 (7.6)	30 (56.6)	19 (35.8)

⁎La determinación de las cruces se puede observar en el **Anexo 1**.

3.1.3 Sensibilidad antifúngica de las cepas de *Candida* spp

Se evaluaron 2 antifúngicos, de los cuales, para el caso del Voriconazol, 51 cepas fueron sensibles (96.2%), 1 cepa fue sensible dependiente de la dosis (1.9%) y 1 cepa fue resistente (1.9%). Por otro lado, para el antifúngico Fluconazol, 38 cepas fueron sensibles (71.7%), 11 cepas fueron sensibles dependiente de la dosis (20.8%) y 4 cepas fueron resistentes (7.5%). Esto se puede observar también en la tabla 1.

La figura 6 demuestra la sensibilidad a ambos antifúngicos para la cepa 55, mediante el método de disco difusión.



Figura 6. Sensibilidad antifúngica a fluconazol (25ug) y voriconazol (1ug) en Muller Hinton modificado a 37°C por 24h. El halo alrededor del disco de Fluconazol es de 31mm, considerado cómo sensible (S); y el halo alrededor del disco de Voriconazol es de 38 mm, considerado sensible (S).

3.2 Análisis bivariado entre la formación de biopelículas y la especie de *Candida* sp.

Solamente se consideró para este análisis a *Candida albicans* y *Candida glabrata*, debido a que las demás especies no obtuvieron frecuencias considerables o aptas para evaluar asociaciones. Además, estas dos especies mencionadas son las más involucradas en infecciones de Candidosis vulvovaginal.

La tabla 4 demuestra que no existe diferencia estadísticamente significativa (p=0.734) entre la frecuencia de formación de biopelículas en *Candida glabrata* (70.4%) y *Candida albicans* (64.3%).

Tabla 4. Análisis bivariado entre la formación de biopelículas y la especie de *Candida* sp. (n=41).

Características	Formación de biopelículas		p†
	No (n=13) n (%)	Sí (n=28) n (%)	
Especie de *Candida* sp.			
C. albicans	5 (35.7)	9 (64.3)	0.734
C. glabrata	8 (29.6)	19 (70.4)	

†Prueba exacta de Fisher de 2 colas.

3.3 Análisis bivariado de la sensibilidad antifúngica con la especie de *Candida* sp. y la formación de biopelículas

De manera similar, solamente se consideró para este análisis a *Candida albicans* y *Candida glabrata*, debido a las especificaciones mencionadas anteriormente. Además, no se consideró al antifúngico Voriconazol debido a ausencia de observaciones en alguna de sus categorías cuando se le evaluó con las variables especie de *Candida* sp y formación de biopelículas. Adicionalmente, se juntaron las categorías de sensible y sensible-dependiente de la dosis en una sola, llamada "sensible", y se dejó como tal a la categoría de resistente. Esto debido a pocas observaciones en las primeras dos categorías mencionadas y porque se desea brindar un mayor énfasis en la categoría de resistencia.

La tabla 5 demuestra que no existe diferencia estadísticamente significativa (p=1.000) entre la frecuencia de resistencia antifúngica a fluconazol de las cepas que formaron (8.8%) y las que no formaron biopelículas (5.3%). Tampoco existió diferencia estadísticamente significativa (p=1.000) entre la frecuencia de resistencia antifúngica a fluconazol de cepas de *Candida glabrata* (11.1%) y *Candida albicans* (7.1%).

Tabla 5. Análisis bivariado de la sensibilidad antifúngica a Fluconazol con la especie de *Candida* sp. y la formación de biopelículas (n=53).

Características	Sensibilidad antifúngica a Fluconazol		p†
	Sensible‡ (n=49) n (%)	**Resistente (n=4) n (%)**	
Especie de *Candida* sp*			
C. albicans	13 (92.9)	1 (7.1)	1.000
C. glabrata	24 (88.9)	3 (11.1)	
Formación de biopelículas			
No	18 (94.7)	1 (5.3)	1.000
Sí	31 (91.2)	3 (8.8)	

†Prueba exacta de Fisher de 2 colas. *Para los sensibles se analizó con un menor tamaño de muestra (37) debido a que se realizó la evaluación solo con las dos especies más aisladas. ‡Incluye los sensibles y sensibles dependiente de la dosis.

CAPÍTULO IV:

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivos primordiales, la identificación de las especies de *Candida* aisladas en pacientes con diagnóstico de Candidosis vulvovaginal, determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* frente a antifúngicos y la capacidad formadora de biopelículas de estas cepas.

La información disponible en el Perú sobre la frecuencia de Candidosis vulvovaginal es escasa, a pesar del importante impacto que esta tiene en la población femenina de todas las edades, al tener un tratamiento que afecta la economía de la paciente, este puede ser un proceso incómodo que impide el desenvolvimiento normal en sus labores diarias y que además es un factor que contribuye a largo plazo con lesiones premalignas en el cuello uterino de la mujer (34).

La frecuencia y distribución de especies encontrados en este trabajo coinciden con otras investigaciones nacionales e internacionales, en que las dos principales especies aisladas en flujo vulvovaginal son *C. albicans* y *C. glabrata* (7,10,12,30,35). A diferencia de otras investigaciones, en este estudio se aisló con mayor frecuencia *C. glabrata*. Estos resultados se podrían explicar con la creciente incidencia de *C.* no-*albicans* como agentes etiológicos en infecciones humanas, entre estos principalmente *C. glabrata*, siendo la segunda especie, después de *C. albicans*, más aislada en pacientes afectadas de vaginitis (12).

Candida glabrata ha sido considerada en los últimos años como un patógeno oportunista emergente, debido a su creciente incidencia en muestras de diversas procedencias clínicas, como se muestra en el estudio de Gil (36), quienes observaron que *C. glabrata* fue la especie más frecuente aislada en muestras clínicas obtenidas de diferentes regiones anatómicas, seguida de *C. albicans* (4,7,28,36), entre ellas las provenientes de la región anatómica de interés en este estudio.

Diversos investigadores, entre ellos García (12), corroboraron la duplicación de la frecuencia de esta especie informada una década antes de la realización de su estudio en el año 2009, siendo la tercera en frecuencia después de *C. albicans* y *C. tropicalis* (12). Miró M. y col. en su estudio realizado en el 2016, encontraron que en las muestras aisladas de Candidosis vulvovaginal la segunda especie más frecuente fue *C. glabrata*, precedida por *C. albicans* (10), pudiéndose observar un aumento en menos de una década, desplazando a *C. tropicalis*, cómo ya habían aseverado sucedería algunos investigadores anteriormente, basándose en estudios epidemiológicos. Así queda claro su papel como patógeno oportunista emergente siendo un factor recurrente y persistente en Candidosis vulvovaginal (12,13).

En esta población, la capacidad formadora de biopelículas predominó con respecto a las no formadoras. Siendo las especies con mayor frecuencia de producción de biopelículas *C. glabrata* y *C. albicans*, en primer y segundo lugar respectivamente. Además se encontró que *C. glabrata* y *C. albicans* predominaron en la alta producción de biopelículas (2+, 3+ o 4+). En los diferentes estudios publicados sobre Candidosis vulvovaginal siempre es *C. albicans* la predominante, además de ser en comparación con las demás especies, la mayor productora de biopelículas, como lo indicó en su revisión Del Pozo (4). Sin embargo otros estudios como el de Tumbarello (37) muestran que existe una mayor frecuencia en la producción de biopeliculas de las especies de *C.* no *albicans* en comparación con las especies de *C. albicans* siendo la tercera después de *C. tropicalis* y *C. glabrata.* Otros de los resultados interesantes de su estudio fue que las especies con mayor biomasa fueron *C. tropicalis* y C. *parapsilosis*, en ese orden. Por su parte, Marcos-Zambrano (38), encontró que *C. albicans* fue la segunda con mayor actividad metabólica y producción de biopelículas en comparación con las otras especies en estudio. Por otro lado las biopelículas producidas por *C. glabrata,* mostraron una mayor actividad metabólica y su biomasa fue menor que la producida por *C. tropicalis, C. albicans* y *C. parapsilosis* respectivamente.

Más de la mitad de las cepas en estudio presentaron una alta capacidad de producción de biopelículas. Estos altos niveles de producción implican una mayor biomasa de biopelícula producida por la cepa de *Candida,* esta hace las veces de una barrera de diferente complejidad dependiendo de la especie, que podría llegar a ralentizar la difusión del fármaco al momento de tratar a la paciente como sugieren Gilbert (39), lo que podría conllevar a una eliminación parcial de la infección y a posibles infecciones recidivantes (40).

El presente trabajo, no encontró asociación entre las especies de *Candida* evaluadas y la formación de biopelículas. Esto es similar a lo reportado por Gil (36) y diferente a los resultados obtenidos por Gómez (30) donde el análisis de la capacidad de formación de biopelículas de *C. albicans* respecto de las *C.* no *albicans* si fue estadísticamente significativa en cuanto a la capacidad de formación.

El porcentaje de sensibilidad del género *Candida* frente a los agentes de origen azólicos se encuentra entre 80% y 90% (7,41). En este estudio los resultados obtenidos no se encuentran en los rangos anteriormente mencionados, a diferencia del estudio de Carlos y Rodríguez (7) donde la sensibilidad de las especies de *Candida* frente al Fluconazol fue 87% y la sensibilidad dosis dependiente (SDD) de las especies de *Candida* frente al fluconazol en un 13%. Por su parte el estudio de Gutiérrez y col. (27) encontraron un porcentaje de sensibilidad de 72.9% en los aislamientos de *Candida* spp. a fluconazol; 6.3% sensibles dependientes de dosis, y 20,8% resistentes. Para voriconazol, 89.6% fueron sensibles, 8,3% sensibles dependientes de la dosis y 2.1% resistentes. Esta variabilidad radica en la cantidad de *Candidas* no *albicans* aisladas en cada estudio. En el caso del presente trabajo se aislaron una mayor cantidad de *C.* no *albicans* como es el caso de *C. glabrata,* especie que presenta un comportamiento variable frente al fluconazol (13,25) y esto se puede notar en los reportes de la presente investigación sobre la frecuencia de los casos que fueron sensibles dependiente de dosis y resistentes frente a este antifúngico, las cuales fueron altos. En cuanto a la sensibilidad frente a voriconazol, se demostró *in vitro*, que es una alternativa al tratamiento bastante eficaz

frente a infecciones provocadas por *Candida* resistentes a fluconazol, como sugiere Gómez (13). Esto se puede notar por el alto porcentaje de sensibles reportados en la presente investigación.

El presente trabajo, no encontró asociación estadísticamente significativa entre el perfil de sensibilidad de las cepas que formaron biopelículas y las que no presentaron esta capacidad.

4.1 Limitaciones y fortalezas

- Una limitante de este estudio fue la cantidad de muestra, ya que no permitió evaluar asociaciones entre algunas categorías que hubieran sido de interés en el presente ámbito, por ejemplo, las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans* y *C. glabrata*, así como también la asociación entre la formación de biopelículas y el perfil de sensibilidad frente a Fluconazol y Voriconazol.

- Como principal fortaleza, se encuentra que a nuestro entender, este es el primer estudio realizado en el país empleando este método para la determinación de biopelículas de *Candida* en pacientes con Candidosis Vulvovaginal-

CAPÍTULO V:

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La especie *Candida glabrata* se aisló con mayor frecuencia (50.9%).

- El 64.1% de las cepas en estudio presentaban capacidad formadora de biopelículas, es decir este factor de virulencia predominó en esta población.

- En este estudio, la sensibilidad al Fluconazol de las cepas, que presentaron capacidad formadora de biopelículas, en su forma planctónica predominó representando el 71.7%. De igual manera, se pudo observar esto con el Voriconazol representando el 96.2%.

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con un mayor tamaño de muestra para una mejor precisión estadística de los resultados y para que se pueda evaluar también la relación que hay entre la producción de biopelículas y el perfil de sensibilidad frente a fluconazol y voriconazol.

- Realizar más estudios descriptivos de etiología y sensibilidad que permitan tener suficientes datos de referencia, así contrastar lo encontrado en la presente investigación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Del Pozo JL, Cantón E. Candidiasis asociada a biopelículas. Rev Iberoam Micol. 1 de julio de 2016;33(3):176-83.

2. Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance. J Fungi. marzo de 2017;3(1):8.

3. Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. Actividad de la micafungina contra las biopelículas de Candida. Rev Iberoam Micol. 31 de marzo de 2009;26(1):49-55.

4. Pineda-Murillo J, Cortés-Figueroa AÁ, Uribarren-Berrueta T del NJ, Castañón-Olivares LR. Candidosis vaginal. primera parte: revisión de la clínica, epidemiología y situación de México. Rev Médica Risaralda. enero de 2015;21(1):58-63.

5. Fernandez Rivero M. Estudio de la formación de la biopelícula de Candida spp. y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. :236.

6. Ciudad Reynaud A. Infecciones vaginales por Cándida: Diagnóstico y tratamiento. Rev Peru Ginecol Obstet. 20 de junio de 2015;53(3):159-66.

7. Carlos Ríos JE, Rodriguez Saavedra M. Determinación del perfil de sensibilidad in vitro frente a antifúngicos en Candida spp. aisladas de flujo vaginal. Repos Tesis - UNMSM [Internet]. 2006 [citado 2 de septiembre de 2021]; Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/5920

8. Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL, Noverr MC. Candida albicans forms biofilms on the vaginal mucosa. Microbiology. diciembre de 2010;156(Pt 12):3635-44.

9. Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. Colloids Surf B Biointerfaces. 1 de febrero de 2019;174:110-25.

10. Miró MS, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely PA, Gonzaga de Freitas Araújo M, Riera FO, et al. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. Rev Iberoam Micol. 1 de abril de 2017;34(2):65-71.

11. Perurena Lancha M, Pérez Muñoz Y, Fernández Andreu CM, Martínez Machín G, Illnait Zaragozí MT. Susceptibilidad antifúngica de aislados vaginales de Candida spp. Rev Cubana Med Trop. diciembre de 2016;68(3):248-54.

12. García-Figueroa RB, Araiza-Santibáñez J, Basurto-Kuba E, Bonifaz-Trujillo A. Candida glabrata: un oportunista emergente en vulvovaginitis. Cir Cir. 2009;77(6):455-60.

13. Gomez-Moyano E. Eficacia terapéutica del voriconazol en candidiasis vulvovaginal crónica por Candida glabrata. :3.

14. Calle-Rodríguez NDL, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por Candida albicans y hongos dermatofitos. CES Med. 2012;26(1):43-55.

15. Castrillon L, Ramos AP, Desgarennes MC. Biopelículas fúngicas. Dermatol Rev Mex. 1 de enero de 2013;57:350-61.

16. Pemán J, Cantón E. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de Candida. :5.

17. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. J Antimicrob Chemother. junio de 2002;49(6):973-80.

18. Fernández ML, Lombardía J. Vulvovaginitis y cervicitis en la práctica diaria. Med Fam SEMERGEN. 1 de enero de 2002;28(1):15-20.

19. Ibarrola M, Benito J, Azcona B, Zubeldía N. Patología infecciosa: vulvovaginitis, enfermedades de transmisión sexual, enfermedad inflamatoria pélvica, abscesos tubo-ováricos. An Sist Sanit Navar. 2009;32:29-38.

20. Duque C, Gómez B, Uribe O, Alarcón J, Soto F, Uran L, et al. Caracterización de la Candidiasis Vulvovaginal en Mujeres de la Ciudad de Medellín, Colombia. Nova. 15 de diciembre de 2009;7(12):157-60.

21. Núñez Solís WE. "DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL FLUCONAZOL Y NISTATINA MEDIANTE EL FUNGIGRAMA EN VAGINOSIS CRÓNICA CAUSADA POR CANDIDA ALBICANS EN MUJERES DE 18-35 AÑOS QUE ACUDEN A CEMOPLAF (CENTRO MÉDICO DE ORIENTACIÓN Y PLANIFICACIÓN FAMILIAR) LATACUNGA." 27 de febrero de 2015 [citado 2 de septiembre de 2021]; Disponible en: https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/8713

22. Tapia P C. Candidiasis vulvovaginal. Rev Chil Infectol. agosto de 2008;25(4):312-312.

23. Lara-Ávila L. Infección por Candida y vaginosis bacteriana y sus asociación con parto pretérmino y ruptura prematura de membrana. 2010 [Internet]. marzo de 2010;1(1). Disponible en: http://hospital.uas.edu.mx/revmeduas/pdf/v1/Numero%201/Infeccion%20por%20candida%20y%20vaginosis%20bacteriana.pdf

24. Zuluaga Rodríguez A, Bedout Gómez C de, Agudelo Restrepo CA, Hurtado Parra H, Arango Arteaga M, Restrepo Moreno Á, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de Candida aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007). Rev Iberoam Micol. 2010;125-9.

25. Gómez Quintero CH. Resistencia de levaduras del género Candida al fluconazol. Infectio. diciembre de 2010;14:s172-80.

26. García-Martos P, Domínguez I, Marín P, García-Agudo L, Mira J. Candidiasis vulvovaginal resistente a azoles. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 1 de agosto de 2000;18(7):367-8.

27. Gutierrez C, De Bedout C, Tobón AM, Cano LE, Arango M, Tabares AM, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de Candida spp., obtenidos de mucosa oral de pacientes con sida. Infectio. 2007;183-9.

28. Montenegro AP, Guzmán CIO, Sánchez JSA, Camarena Alejo G, Granillo JF. Riesgo de desarrollo de Candida no Albicans en pacientes en terapia intensiva con uso previo de fluconazol. Med Crítica. 15 de junio de 2017;31(2):55-9.

29. Durán EL, Mujica MT, Jewtuchowicz VM, Finquelievich JL, Pinoni MV, Iovannitti CA. Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de Candida albicans formadores de biopelículas. Rev Iberoam Micol. 2007;268-71.

30. Gómez MV. Candidiasis vulvovaginal : formación de biopelículas y su asociación con el uso de dispositivos intrauterino (DIU). 2017 [citado 2 de septiembre de 2021]; Disponible en: http://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1539

31. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. junio de 1999;37(6):1771-6.

32. Investigacion MD. Biblioteca Virtual de Investigación: Metodología de la Investigación Cuantitativa y Cualitativa [Internet]. Biblioteca Virtual de Investigación. 2016 [citado 2 de septiembre de 2021]. Disponible en: http://bibliotecainvestigacion.blogspot.com/2016/07/metodologia-de-la-investigacion_29.html

33. Manterola C, Otzen T. Estudios Observacionales: Los Diseños Utilizados con Mayor Frecuencia en Investigación Clínica. Int J Morphol. junio de 2014;32(2):634-45.

34. Barraza N, Ayala-Peralta F. Características clínicas de vulvovaginitis por cándida albicans en mujeres en edad reproductiva | Revista Peruana de Investigación Materno Perinatal. 2019. 1 de octubre de 2019;8(1):8-12.

35. Mintz JD, Martens MG. Prevalence of Non-Albicans Candida Infections in Women with Recurrent Vulvovaginal Symptomatology. Adv Infect Dis. 2 de diciembre de 2013;3(4):238-42.

36. Gil M, González L, Mendoza V, Ochoa M, Castrülo S, Sánchez J, et al. Capacidad de formación de biopelículas en especies del género Candida de procedencia clínica. Rev Médica Risaralda. diciembre de 2017;23(2):4-9.

37. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by Candida species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol. junio de 2007;45(6):1843-50.

38. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by Candida and non-Candida spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. Int J Med Microbiol IJMM. noviembre de 2014;304(8):1192-8.

39. Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. Adv Microb Physiol. 2002;46:202-56.

40. Sherry L, Kean R, McKloud E, O'Donnell LE, Metcalfe R, Jones BL, et al. Biofilms Formed by Isolates from Recurrent Vulvovaginal Candidiasis Patients Are Heterogeneous and Insensitive to Fluconazole. Antimicrob Agents Chemother. 24 de agosto de 2017;61(9):e01065-17.

41. Alvarado Pérez D. Determinación del perfil de sensibilidad in vitro frente a antifúngicos en levaduras aisladas de micosis invasivas. 2000 [citado 2 de septiembre de 2021]; Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/110569

ANEXOS

Anexo 1:

INSTRUMENTOS

1 PROTOCOLOS DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA

1.1 AISLADOS CLÍNICOS

Se tomaron 60 cepas de *Candida* spp. del cepario del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" aisladas de secreción vulvovaginal procedentes de pacientes diagnosticadas con vulvovaginitis candidósica durante el periodo de 2014-2017, estas cepas se encontraron almacenadas a -70°C en crioviales de Brain Heart Infusion con Glicerol 10%.

1.2 RECUPERACIÓN DE CEPAS

Para la recuperación de las cepas congeladas, se tomó una asada del caldo contenido en el criovial se sembró en Agar Dextrosa Sabouraud y se incubó a 37°C por 48 horas. Siguiendo la metodología previamente descrita por Rueda Gordillo y col (Rueda Gordillo y col 2016).

1.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Candida*

1.3.1 CHROMagar *Candida*®

Principio:

Se basa en la capacidad de hidrolizar sustratos cromogénicos en presencia de un indicador.

Procedimiento:

1. Sembrar por estría.
2. Incubar a 37°C durante 48h
3. Lectura

El medio CHROMagar *Candida,* es importante para identificar las especies del género *Candida* en función de los colores como:
C. albicans, C. tropicalis, C. krusei y C. glabrata.

Interpretación:

Especie	Características de la colonia	HiCrome Candida (colores)
C. albicans	Lisas, crece a 45°C	Verde Claro
C. tropicalis	Lisa	Verde azulado, Azul purpura
C. glabrata	Brillante y cremosa	Blanco, Crema
C. parapsilosis	Brillante	Rosado oscura, Blanco crema
C. krusei	Rugosa, seca	Morado difuso
C. rugosa	---------	Azul Claro
C. dubliniensis	Lisa, brillante, no crece a 45°C	Verde Claro

C. kefyr	Lisa, brillante	Café verdoso
C. haemulonii	Lisa, brillante	Café verdoso

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.

1.3.2 Tubo germinativo

Procedimiento:

1. Inocular una pequeña porción de la cepa de *Candida* spp. en estudio en 0.5mL de suero humano.
2. Incubar a 35-37°C por menos de 2h
3. Depositar unas gotas de la emulsión en una lámina portaobjetos y cubrir con el cubreobjetos.
4. Observar al microscopio con el objetivo de 40X.
5. Se observara la presencia de tubos germinativos que salen de las blastosporas.

Interpretación:

Aproximadamente el 95% de las muestras de *C. albicans* producen tubos germinativos, una propiedad compartida con *C. stellatoidea* y *C. dubliniensis*. Otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de Candida, aunque no está exenta de falsos negativos.

1.3.3 FILAMENTACIÓN Y FORMACIÓN DE CLAMICONIDIAS EN AGAR ALMIDÓN ARROZ (AAA)

Principio de la prueba:

Basada en el estudio micromorfológico de las levaduras, donde la producción de pseudohifas y clamiconidias es característica de *C. albicans.* (INS, 1997)

Procedimiento:

1. Sembrar por estría el cultivo de *Candida sp.* En láminas portaobjetos por AAA.
2. Cubrir con la láminilla y depositar la lámina en una placa Petri estéril.
3. Colocar un algodón húmedo estéril dentro de la placa Petri.
4. Incubar a 22-25°C por 24-48h.
5. Observación al microscopio.

Interpretación:

Presencia de estructuras circulares de pared gruesa, intercalares o terminales a una pseudohifa, producidas por *C. albicans.*

1.3.4 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Principio de la prueba:

Permite la identificación de especies de levaduras que poseen la capacidad de fermentar determinados azúcares. (Kurtzman y Fell, 1999; Rippon, 1982)

Procedimiento:

1. A partir de colonias aisladas del medio ASG, se prepara una suspensión en agua destilada estéril con una turbidez equivalente al patrón N°5 de la escala de McFarland.
2. A partir de la suspensión se inoculan 200-250 µl a cada uno de los tubos de fermentación con los diferentes hidratos de carbono.
3. La incubación se realiza a 32°C por un mínimo de 48 horas y un máximo de 15 días. La presencia de burbujas en la campana de Durham se considera como positivo.

Interpretación:

Esta prueba se utiliza como base para la identificación de levaduras en clínica, otorgando la capacidad de diferenciar otras especies distintas a *C. albicans*.

Tabla: Características de las especies de Candida para la fermentación de carbohidratos:

Carbohidrato / Especies de *Candida*	**Glucosa**	**Maltosa**	**Sacarosa**	**Lactosa**	**Galactosa**	**Trehalosa**
C. albicans	F	F	-/+	-	F	F
C. glabrata	F	-	-	-	-	F
C. parapsilosis	F	-	-	-	F	F
C. tropicalis	F	F	-/+	-	F	F
C. krusei	F	-	-	-	-	-
C. pseudotropicalis	F	-	F	-/+	-/+	-
C. famata	-/+	-/+	-/+	-	-	-/+
F: FERMENTACIÓN						

- :NEGATIVO -/+ :NEGATIVO O POSITIVO

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

1.4 ANTIBIOGRAMA POR DISCO DIFUSIÓN

Mueller Hinton agar (MHA) suplementada con 2% de glucosa y 0,5 μg/ml de azul de metileno (pH 7,2 - 7,4). Se puede incorporará los suplementos cuando se prepara el medio de AMH.

1. Preparación del inóculo

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias 1 mm^3 y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina estéril (ClNa 0,85%). Se agita bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de $1x10^{6}$ - $5x10^{6}$UFC/ml

2. Inoculación de las placas

1. Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.

2. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.

3. Sembrar la placa uniformemente.

4. Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.

5. Aplicar los discos.

3. Temperatura y tiempo de incubación

Incubar a 35 ºC durante 20-24 h para *Candida* spp.

4. Lectura

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

Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento.

La lectura es subjetiva y se requiere experiencia para dar medidas exactas.

La presencia de microcolonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo deben ser ignoradas. *C. glabrata* y *C. krusei*, pueden necesitar 48h de incubación.

Interpretación:

Puntos de corte M44-A				
antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)		
		R	S-DD	S
Fluconazol	25ug	≤14	15 - 18	≥19
Voriconazol	1ug	≤13	14 - 16	≥17
S: sensible; S-DD: sensible dependiente de la dosis; R: resistente.				

1.5 FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

1.5.1 Determinación de la capacidad formadora de biopelículas.

La capacidad formadora de biopelículas fue determinada siguiendo el protocolo bien establecido por Tumbarello y col. (37), se emplearon cepas ATCC de referencia en cada corrida.

Materiales:

- Caldo Sabouraud Glucosado
- Cepas control
- Incubadora
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Pocillos de microtitulación de poliestireno
- Buffer PBS 0.15M
- Espectrofotómetro

Procedimiento:

1. Para inducir la producción *in vitro* de biopeliculas de *Candida* aislada en Caldo Sabouraud Glucosado (SDB) conteniendo glucosa al 8%, se utilizaron cepas control para cada procedimiento. El aislamiento se realizó en tres ocasiones por cuadruplicado.
2. Los organismos se cultivaron durante 24 horas a 37 ° C en placas de agar dextrosa Sabouraud, y se usaron suspensiones lavadas con solución salina de cada aislado para preparar $3x10^7$ UFC / ml inóculo en SDB. Cada pocillo de microtitulación de poliestireno de las placas, fueron inoculados con 20uL de suspensión de células de levaduras y 180uL de SDB.
3. Luego de 24 horas de incubación se retiraron, las células planctónicas se lavó 2 veces con 200uL de PBS 0.15M los que fueron añadidos a cada pocillo.
4. El remanente de células adheridas a fondo de los pocillos se cuantificó por espectrofotometría a 405nm utilizando un lector de placas de microtitulación.

Cálculo:

$$\boldsymbol{log\%T = 2 - A}$$

Dónde: Logaritmo del porcentaje de Transmitancia

A: Absorbancia

Finalmente:

$$\%T + \%Tbloc = 100\%$$

Interpretación:

% Tbloc	Score
<10	0
10 a 20	1+
20 a 35	2+
35 a 50	3+
≥ 50	4+

0: No hubo formación de biopelículas de *Candida*

1+: baja formación de biopeliculas

2+, 3+,4+: alta formacion de biopelículas de *Candida*

Anexo 2:

2.1 MEDIOS DE CULTIVO

2.1.1 Agar dextrosa Sabouraud:

El agar dextrosa Sabouraud es un medio de cultivo ampliamente utilizado para el aislamiento, activación e identificación de hongos levaduriformes y filamentosos. El pH ácido y la concentración de azucares favorece el crecimientos de estos microorganismos por sobre el de las bacterias. A demás al añadirle cloranfenicol volvemos aún más selectivo este medio.

En este estudio se utilizó para subcultivar y verificar la viabilidad y pureza de las cepas de los aislados de *Candida* spp. extraídas de crioviales a -70°C.

Procedimiento

1. Se suspenden 50 g. de polvo de agar dextrosa Sabouraud en 1 L. de agua destilada. Calentar con agitación frecuente hasta alcanzar la ebullición.
2. Posteriormente se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 min.
3. Distribuir en placas de Petri estériles.

Control de Calidad Aspecto:

Medio sólido, color ámbar, transparente, un pH final a 25ºC: 7.0± 0.2

2.1.2 CHROMagar *Candida*

Contiene sustratos enzimáticos unidos a compuestos cromogénicos. Cuando las enzimas específicas presentes en el hongo degradan el sustrato producen un color característico. Las colonias deberán evaluarse dentro de 48 horas.

Preparación

Se prepara a partir de polvo deshidratado, el mismo que se disuelve en agua caliente, no se hierve ya que puede desnaturalizarse. No esterilizar por calor.

2.1.3 Agar Muller Hinton

1. **Solución madre de glucosa (40%)**

• Glucosa . . . . . 40 g

• Agua destilada . . . . . 100 ml

Calentar suavemente hasta completa disolución de la glucosa.

2. **Solución azul metileno (5 mg/ml)**

• Azul metileno . . . . . 0,1 g

• Agua destilada . . . . . 20 ml

3. **Solución madre de glucosa-azul de metileno (GAM)**

1. Añadir 200 µl de la solución de azul de metileno a 100 ml de la solución madre de glucosa para obtener una solución GAM con una concentración final de glucosa de 0,4 mg/ml y 10 µg/ml de azul de metileno.

2. Dispensar en viales en alícuotas de 3,5 o 1,5 ml.

3. Esterilizar en autoclave 25 min a 121 °C.

4. Guardar a temperatura ambiente.

4. Preparación de placas MHA suplementado con glucosa y azul de metileno

1. Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.

2. Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.

3. Ajustar su pH a 7.4 con solución de NaOH 0.1N.

4. Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121° C por 15 minutos.

5. Dejar enfriar el medio a 45 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9 cm de diámetro y 70 ml si son de 15 cm (altura de la capa de agar 4 mm, Medir la profundidad introduciendo un elemento fino y estéril, el cual tenga una marca en 3 y 5 mm de uno de sus extremos).

6. Dejar enfriar y guardar en nevera.

2.1.4 Agar Almidón Arroz

Favorece fructificación y evita el pleomorfismo de dermatofitos. Estimula la producción de clamidospóras de *Candida albicans.*

Preparación:

Arroz…….40g.

Agar-Agar……....18-20g.

Agua destilada……..1000mL.

1. Hervir el arroz 45 a 60 minutos.
2. Agregar el agar, hervir y completar el volumen.
3. Ajustar el pH A 5,6-6.5 Autoclavar a 110°C por 10 min.

2.1.5 Agar Harina de Maíz

Preparación:

Harina de maíz……..40g

Agar-Agar……..15g

Agua destilada……1000mL

1. Mezclar vigorosamente los componentes sólidos con agua destilada. Agregar 1% de tween 80.
2. Calentar con agitación frecuente y hacer hervir por 1 minuto hasta disolver completamente los ingredientes.
3. Filtrar con gasa.
4. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Ajustar el pH a $6.0^{+}_{-}0.2$.

2.1.6 Agar Tabaco

Cigarro…….50mg

Agua destilada…….1000mL

Agar-agar……..20mg

1. Hervir el contenido del cigarro con el agua destilada por 30min.
2. Filtrar con gaza.
3. Una vez filtrado se mezcla con el agar-agar y se completa con agua destilada para 1L.
4. Disolver el agar. Ajustar el pH a 5.4.
5. Autoclavar a 121°C por 15min.

Anexo 3:

3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:

- Se registró cada frasco de medio de cultivo con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco.

- Cada lote preparado de medio de cultivo se probó antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos cuyo comportamiento se conoce, tanto para reacciones positivas, como negativas. Para ello se utilizaron cepas control de la ATCC (American Type Culture Collection). Posteriormente se guardará registro de los resultados obtenidos.

- Se realizaron las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados ya sea la medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

Anexo 4: Constancia de aprobación Comité de Ética e Investigación del "Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión".

Código de Revisión: CIEI-IMT-20-2021

Comité Institucional de Ética en Investigación
IMT "DAC" UNMSM

Constancia de Aprobación
CIEI-2021-15

El Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos aprobó el 05 de octubre de 2021 el estudio "Identificación, sensibilidad antifúngica y estudio de la capacidad formadora de biopelículas de cepas de cándida aisladas de pacientes con candidiasis vulvovaginal, en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión 2019", a cargo de la Investigadora Cornejo Chanduví, Tasha Kelly

- Modalidad de revisión: Expedita
- La presente aprobación del CIEI – IMT "DAC" UNMSM es por un año, del 05 de octubre de 2021 al 04 de octubre de 2022

Lima, 05 de octubre de 2021

Dr. Arturo Rodríguez Flores
Presidente

Anexo 5:
Operacionalización de variables

Variable		Definición conceptual	Dimensión	Tipo de variable	Escala	Indicador	Instrumento
I	Especies de Candida aisladas de candidiasis vaginal	Levadura que coloniza frecuentemente la mucosa genital femenina.	Todas las especies de *Candida.*	Cualitativo.	Nominal	Tipificación fenotípica	Caracterización en medio cromogénico. Caracterización bioquímica. Evaluación micromorfologica.
D	Formación de biopelículas	Es la capacidad de algunas levaduras de adherirse a una superficie y generar una matriz extracelular.	Formación y no formación de biopelículas.	Cualitativo.	Nominal	Lectura de la cantidad de luz bloqueada Negativo: %Tbloc <10 Positivo: 1+ (%Tbloc, 10 a 20) 2+ (%Tbloc, 20 a 35) 3+ (%Tbloc, 35 a 50) 4+ (%Tbloc, ≥ 50)	Espectofotometría.

	Sensibilidad antifúngica	Capacidad de respuesta del hongo frente a agentes antifungicos.	Sensible, sensible dependiente de la dosis o resistente.	Cualitativo.	Nominal	Lectura del halo de inhibición: • Fluconazol R≤14mm S-DD 15-18mm • Voriconazol R≤13mm S-DD 14-16mm S≥17mm	Antibiograma por Difusión con Discos

Anexo 6: Imágenes adicionales

Cabina de Flujo Laminar:



Espectrofotómetro:

