

126
2es



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

"ACTIVIDAD "IN VITRO" DE KETOCONAZOLE Y NITRATO DE
MICONAZOL EN LEVADURAS DEL GENERO Candida
AISLADAS DE EXUDADOS VAGINALES".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

P R E S E N T A :

Mónica Araceli Quintana Pérez



MÉXICO, D.F.

1995

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"ACTIVIDAD "IN VITRO" DE KETOCONAZOLE Y NITRATO DE MICONAZOL
EN LEVADURAS DEL GENERO Candida AISLADAS DE EXUDADOS VAGINALES."
realizado por

Mónica Araceli Quintana Pérez.

con número de cuenta 8753590-3 , pasante de la carrera de Biólogo

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Q.B.P. HECTOR SHIBAYAMA HERNANDEZ

Propietario Q.B.P. CUDBERTO ULFRANO CONTRERAS PEREZ.

Propietario BIOL. MARIA CRISTINA JULIA PEREZ REYES.

Suplente BIOL. ROSARIO VAZQUEZ BRAVO.

Suplente M. EN C. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RIOS.

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de la Facultad de Biología

DIRECCION GENERAL
DE BIOLOGIA

[Handwritten signatures and initials]

AGRADECIMIENTOS

A CATA

A mi familia

A Sansonsito

A mi honorable Jurado

A Angel

A todas las personas que me han apoyado y me han brindado su cariño y su amistad....

Al personal de Laboratorio Clínico de la clínica de Especialidades Churubusco del I.S.S.S.T.E. especialmente al Q. B . P. Héctor Shibayama Hernández por su apoyo y ayuda brindados.

Al personal del Laboratorio de Micología del I.N.D.R.E (Paty, Cudberto y Rubén) por la ayuda y apoyo brindados.

A los Laboratorios CILAG.

**“ACTIVIDAD “IN VITRO” DE KETOCONAZOLE Y
NITRATO DE MICONAZOL EN LEVADURAS DEL
GENERO Candida AISLADAS DE EXUDADOS
VAGINALES”**

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Antecedentes	8
Objetivos	18
Material y Métodos	19
Resultados	31
Discusión	61
Conclusiones	68
Apéndice	70
Bibliografía	78

INTRODUCCIÓN.

Los organismos incluidos bajo la denominación general de "hongos" son tan diversos que es difícil caracterizarlos con precisión. Todos los hongos son heterótrofos y se nutren por absorción. El talo varía desde una mixamiba amiboide o de un plasmodio carente de pared celular rígida, hasta un micelio bien desarrollado. Los talos pueden estar dentro de la superficie del hospedero o del sustrato. La pared celular del talo cuando esta presente, está constituida por quitina y ocasionalmente celulosa. Rara vez se encuentran quitina y celulosa juntas(12).

En la actualidad los hongos son considerados un reino separado. Existen alrededor de 100,000 especies, las que en general, presentan distribución cosmopolita, pero hay especies con distribución restringida o endémica (14). Los hongos pueden vivir como saprófitos y utilizan, como sustratos plantas y animales en descomposición, así como sus detritos. Muchos hongos son patógenos de plantas, mientras que en menor número son agentes causales de enfermedades en animales, incluyendo al hombre (21).

La mayoría de los hongos parásitos de tejidos causan alteraciones en la fisiología del hospedero. esta anomalía llega a originar enfermedad caracterizada por cambios detectables en funciones y/o morfología (21).

El estudio de las enfermedades del hombre ocasionadas por hongos (micosis), puede clasificarse en base a su fisiopatología (4):

1. **Micosis exclusivamente tegumentarias.**
2. **Micosis inicialmente tegumentarias.**
3. **Micosis secundariamente tegumentarias.**

Las infecciones por levaduras del género Candida, se incluyen en las micosis exclusiva y secundariamente tegumentarias. La especie C. albicans, es la de mayor importancia y su frecuencia es similar en países industrializados como en países subdesarrollados (30).

El género Candida se encuentra situado taxonómicamente en la División: Eumycota, Subdivisión; Deuteromycotina, Clase; Blastomycetes, Orden; Cryptococcales y Familia; Cryptococcaceae (14).

ASPECTOS GENERALES DEL GENERO Candida

Las levaduras del género Candida constituyen una población universal y constante, que forma parte de la flora normal del hombre y de los animales. Algunas especies son saprófitas estrictas en el hombre, mientras que otras son facultativas porque con frecuencia son aisladas de otras fuentes (30).

C. albicans la especie más frecuente e importante se encuentra en la mucosa gastrointestinal, faríngea, oral ,vaginal y rara vez coloniza la piel.

En su nicho ecológico, las levaduras mantienen una población en equilibrio y son incapaces de producir infección en el individuo sano y normal. Es necesario que se presenten alteraciones en los mecanismos de defensa mediados por células ,en la fisiología o en la flora normal para que pueda ocurrir colonización, infección y desarrollo de la enfermedad (5,15,19).

La severidad del cuadro clínico dependerá del grado de alteración del huésped, más que de la capacidad patógena de las levaduras. Las manifestaciones clínicas en su conjunto se denominan candidiasis y se encuentran entre las enfermedades infecciosas oportunistas más comunes.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El género Candida incluye hasta ahora, 196 especies que presentan características fisiológicas comunes con otras especies en las Subdivisiones; Basidiomycotina y Ascomycotina.

Las especies patógenas más importantes son: Candida albicans Berkhout, C. tropicalis Berkhout y C. glabrata Anderson, en las cuales no se ha encontrado mecanismos de reproducción sexual, sin embargo, existen afinidades filogenéticas con los ascomycetes. Las levaduras incluidas en este género no forman carotenos ni melanina, las células presentan forma variable (cilíndrica ,elíptica, globosa, triangular) y su pared tiene dos capas. La hidrólisis de sus componentes celulares no revela filosa, ni almidón. Pueden estar presentes hifas y pseudomicelio, no se encuentran balistosporas ni artroconidios y en la gemación no se forman fialides, los conidios son holoblásticos.

El genero Candida convencionalmente se ha considerado diferente del género Torulopsis por la formación de pseudomicelio, sin embargo esta característica no siempre es confiable y algunas especies del género Torulopsis han sido transferidas al género Candida al demostrar la formación de pseudomicelio (18).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE C. albicans.

C. albicans desarrolla fácilmente en los medios micológicos (Agar Sabouraud Glucosa, Agar Micosel, Agar Papa Dextrosa) incubados entre 28 y 37 °C: Forma colonias blancas o cremas de aspecto húmedo y consistencia blanda.

Su imagen microscópica revela células unicelulares hialinas de forma esférica u oval ,que se reproducen por gemación y que aproximadamente miden de 5 a 20 μ M. Los cultivos viejos pueden exhibir además hifas hialinas y pseudomicelio. Estas características varían con los medios de cultivo usados.

En Agar Biggy la levadura forma colonias lisas, hemisféricas o circulares de color que varía de café a negro con un ligero borde micelial. Sus características de afinidad los colorantes delatan que son grampositivos y no ácido-resistentes. Las características morfológicas sólo permiten diferenciar a C. albicans de las otras especies del género. Cuando se cultiva la levadura en suero humano a 37°C durante 2-3 horas emite una prolongación del citoplasma conocido como tubo germinativo (30).

En medios con Harina de Maíz forma clamidosporas de pared gruesa con diámetros entre 6 y 12 µm (1). En estos medios C. albicans y las otras especies del género forman micelio, característica diferencial de otras especies de levaduras. En medios con papa-zanahoria y en el medio de Gorodkova no forman ascosporas, lo que les permite separarlas de las levaduras ascosporadas saprófitas.

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE C. albicans.

Las características fisiológicas incluyen la exploración del metabolismo oxidativo y fermentativo. En reacciones de asimilación utiliza la glucosa, maltosa, sacarosa, xilosa, trealosa y galactosa, mientras que no utiliza la lactosa, melobiosa, celobiosa, ramnosa, rafinosa, inositol y dulcitol (31).

En reacciones de fermentación forma ácido y gas de glucosa, maltosa, galactosa y trealosa, y no los forma en sacarosa y lactosa. C. albicans no hidroliza la urea, característica que la diferencia de las especies del género Cryptococcus (31).

VULVOVAGINITIS CANDIDIASICA.

La vulvovaginitis causada por especies de Candida es un problema importante de salud pública. Las infecciones son frecuentes y las recaídas constituyen el mayor problema (9,20,25). Las levaduras pueden aislarse de la mucosa vaginal en un 8% de las mujeres sanas y alrededor del 25 % de las mujeres con vaginitis. La mayoría de los estudios señalan un porcentaje de candidiasis del 8% en mujeres sanas y un 30% en las mujeres embarazadas y en las que ingieren anticonceptivos (20).

Los factores predisponentes más importantes son la diabetes mellitus, el uso de antimicrobianos, corticoides, anticonceptivos higiene deficiente, jeans y el embarazo (9,10,20).

CUADRO CLÍNICO

Los síntomas más comunes son prurito, ardor, y eritema de la mucosa vaginal. Lesiones satélites con frecuencia ocurren en el perineo. El flujo es denso y de color blanco o amarillo. Un dato importante es el número escaso de leucocitos en el exudado (5).

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la enfermedad implica la identificación exacta del agente causal. El número y cantidad de muestra no parece afectar el diagnóstico (25). El examen microscópico con KOH al 20% o frotis coloreados por Gram y Schiff (4) revelan con cierta frecuencia levaduras, hifas y pseudomicelio hialino.

En algunos casos sólo se observan levaduras y blastoconidios, donde el tamaño y morfología son de importancia para algunas especies. Las muestras son sembradas en agar micosel y agar Biggy. Los aislamientos son identificados en base a la morfología del micelio, disposición de blastoconidios y pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos (4,31). C. albicans es el agente etiológico en el 90% de los casos, C. glabrata en el 5%, y las otras especies en el 5% restante (33).

TRATAMIENTO

El tratamiento depende en gran medida de un diagnóstico confiable, la reversión de los factores predisponentes y la selección de una terapia específica efectiva. La elección de un esquema tópico o sistémico aún es controversial, sin embargo la combinación de los dos esquemas debe utilizarse en forma apropiada en los casos de candidiasis crónica o recurrente (5,9).

El uso de antimicóticos en cremas es preferible a los óvulos, debido a una mejor aceptación por los pacientes y porque las cremas pueden actuar en sus parejas. El tratamiento sistémico por tiempos prolongados puede llegar a ser molesto y presentar los efectos colaterales indeseables (13). Los fármacos más utilizados comprenden la nistatina en dosis de 100,000 a 200,000 unidades diarias de 1 a 2 semanas. El clotrimazol en presentación de 100 mg o el miconazol a 50 mg durante 7 días. El ketoconazol en comprimidos de 200 mg ha sido utilizado ampliamente por vía oral en combinación con el tratamiento tópico.

En el caso de parejas se recomienda también el tratamiento para el hombre, sin embargo los resultados aparentemente no tienen relación con una disminución en el porcentaje de recaídas (5).

En México los antimicóticos más utilizados han sido la nistatina, miconazol y ketoconazol. La mayoría de las publicaciones señalan buena respuesta al tratamiento (38), sin embargo, se ha demostrado desarrollo de resistencia a varios imidazoles (23,17). El fluconazol ha tenido las mayores implicaciones, siguiendo el ketoconazol y por último el itraconazol (23).

ANTECEDENTES.

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD CON ANTIMICOTICOS.

A) ASPECTOS GENERALES.

Las pruebas de susceptibilidad con antimicóticos se realizan por las mismas razones que con los agentes microbianos. Los resultados permiten elegir los fármacos más activos en el tratamiento de las micosis humanas, también es posible relacionar los fracasos terapéuticos y los problemas causados con la resistencia primaria y secundaria (34).

Tres son los principales grupos de antimicóticos: los polienos, las alilaminas y el grupo de los imidazoles (22). La anfotericina B y la nistatina son los polienos más utilizados. La primera se usa principalmente en las micosis sistémicas y de riesgo mortal. La nistatina se restringe al tratamiento de las infecciones en piel y mucosas por levaduras del género Candida.

Del grupo de las alilaminas, la terbinafina es el compuesto más conocido, cuyo uso se reduce al tratamiento de las dermatofitosis. El grupo de los imidazoles representan el campo más fértil de desarrollo de nuevos antimicóticos. Existen más de 10 compuestos, siendo los más utilizados el ketoconazol, miconazol, itraconazol y fluconazol (30). Los dos primeros existen en presentaciones tópicas y orales, mientras que el itraconazol sólo en presentación oral y el fluconazol también en formas parenterales.

El miconazol y el ketoconazol son los imidazoles que con más frecuencia se han utilizado en el tratamiento de las micosis superficiales. El costo, la presentación tópica de los dos imidazoles, la buena respuesta terapéutica, así como la inclusión en el cuadro básico de medicamentos en nuestro país, justifica las pruebas de susceptibilidad con estos dos imidazoles.

La solubilidad de los imidazoles en agua es baja, lo que implica el uso de otros solventes como el dimetil-sulfóxido, ácido clorhídrico 0.2N, metanol, dietilformamida o polietilenglicoles. La estabilidad en general es buena y hace posible el uso de pruebas de difusión con discos, sin embargo las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) están sujetas a una variación importante. Los factores más importantes son el tamaño del inóculo, método de prueba, fase de desarrollo del inóculo, así como velocidad de crecimiento y tiempo de incubación (29,34).

B) ANTIMICOTICOS.

B.1 KETOCONAZOL

Espectro de acción.- Su espectro de acción incluye la mayoría de los hongos patógenos, las bacterias gramnegativas y los protozoarios de los géneros Leishmania y Plasmodium spp.

MECANISMO DE ACCIÓN.

El mecanismo de acción es similar al miconazol, bloquea la incorporación del acetato a la molécula de ergosterol, principal componente de la membrana citoplásmica, y la membrana de los organelos.

En consecuencia se acumulan esteroides metilados en el carbón 14 (lanosterol): existen alteraciones en la permeabilidad y en el metabolismo condicionado a la acumulación de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno), que es letal para los hongos (22).

RESISTENCIA ADQUIRIDA.

Es rara, pero cepas resistentes de C. albicans han sido aisladas de pacientes tratados con candidiasis mucocutánea, y pacientes de SIDA con candidiasis orofaríngea y esofágica.

FARMACOCINETICA.

El ketoconazol se absorbe rápidamente en el tracto digestivo. En el lapso de 1-2 horas se obtienen concentraciones séricas entre 3.1 y 6.2 µg/mL. El 99% del fármaco se une a proteínas, la mayor parte es eliminado sin cambio en las heces, la excreción urinaria es menor y la mayor parte ocurre en forma de compuestos inactivos. En líquido cefalorraquídeo las concentraciones son muy bajas 1 a 20 en relación al plasma.

PRESENTACIÓN.

Se encuentra disponible en tabletas, cremas y shampoo.

REACCIONES ADVERSAS

El ketoconazol es generalmente bien tolerado y la mayoría de los pacientes que lo han tomado por tiempo prolongado no han presentado efectos colaterales (30). Aproximadamente el 11% de los pacientes revela síntomas transitorios como dolor de cabeza, náusea, diarrea, nerviosismo y prurito.

En años recientes se han encontrado alteraciones hepáticas. A la fecha se han registrado 3 casos fatales en 1,300,000 pacientes. Existen también alteraciones en la síntesis de andrógenos en pacientes que reciben más de 400 mg diarios observándose ginecomastia y disminución del libido.

B.2 MICONAZOL.

ESPECTRO DE ACCIÓN.

Tiene un amplio espectro de actividad en contra de especies de Aspergillus; Candida; Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis , Petrillidium boydii y el grupo de los dermatofitos.

MECANISMO DE ACCIÓN.

Al igual que otros imidazoles interfiere con la síntesis de ergosterol conduciendo a alteraciones en las funciones celulares asociadas con la membrana celular. A estas concentraciones interactúa con los lípidos de la membrana causando daño directo por la salida de los constituyentes celulares (28).

RESISTENCIA.

Es rara, pero algunas especies de C. albicans resistentes al ketoconazol han presentado reacciones cruzadas al miconazol.

FARMACOCINETICA.

El miconazol no se absorbe bien después de la administración oral. Dosis parenterales de 1000 mg producen concentraciones séricas hasta de 7.5 µg/mL, pero rápidamente disminuyen con una vida media inicial de 20-30 minutos y una vida media de eliminación de 20 horas. La droga se une fuertemente a las proteínas. Las concentraciones en LCR son muy pobres, pero tiene buena penetración en líquido peritoneal, humor vítreo y acuoso. Menos del 1% de la dosis parenteral es eliminado sin cambios en la orina, el 40% de una dosis parenteral es eliminado sin cambios en la orina y el 40% de una dosis oral es eliminado en las heces también sin cambio.

PRESENTACIÓN

Se encuentra disponible en tabletas, óvulos, cremas y formas parenterales.

REACCIONES ADVERSAS.

La aplicación tópica puede causar irritación local. Las formas orales pueden causar alteraciones gastrointestinales. En las formas parenterales los síntomas más frecuentes incluyen náusea, vómito, fiebre, erupciones, somnolencia, diarrea y anorexia. La flebitis se ha registrado en un 3 % de los pacientes que reciben la droga a través de venas periféricas.

C) PRUEBAS DE LABORATORIO.

MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO. (34)

Este método permite valorar cuantitativamente "in vitro" la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un determinado antimicótico para un microorganismo específico.

La prueba también permite determinar la concentración mínima fungicida (MFC). Este recurso se emplea principalmente para probar levaduras, pero puede adaptarse a pruebas con hongos filamentosos. En el caso del Ketoconazol se ha demostrado que pierde actividad contra las levaduras en ausencia de oxígeno. El Miconazol es fungistático para casi todos los aislamientos de especies de Candida en concentraciones de 0.5 a 8 µg/mL y fungicida en concentraciones mayores. El ketoconazol tiene una actividad similar al miconazol, pero pueden existir diferencias según el microorganismo ensayado, el medio y el sistema de prueba utilizado (7).

MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR.

Este método tiene un costo aceptable cuando la carga de trabajo es elevada tiene la ventaja de enfrentar varias cepas a una misma concentración del antimicótico. El tamaño del inóculo es fundamental en los derivados del imidazol. Las pruebas de dilución en agar pueden no detectar resistencia a los imidazoles en aislamientos de C. albicans. Estas pruebas deben incluir testigos antes y después de la prueba sin contener el antimicótico de prueba. Deben obtenerse crecimiento franco en ambos testigos para que los resultados sean válidos. El crecimiento incipiente y las colonias pequeñas deben considerarse negativas.

En pruebas con levaduras y hongos filamentosos de crecimiento rápido pueden emplearse los replicadores mecánicos de Steers (2) con toda su capacidad. La relación entre los resultados de dilución en agar y caldo en los imidazoles es poco clara. Esto refleja problemas de tamaño del inóculo y selección de medios de cultivo.

Los inóculos pequeños pueden dar resultados no confiables. Los medios ricos pueden dar resultados falsos de resistencia. Ambos problemas demuestran la necesidad de estandarizar las pruebas de susceptibilidad con los antimicóticos (31).

PRUEBAS DE DIFUSIÓN CON DISCOS.

La aplicación de este método con antimicóticos es limitada y las pruebas no se han estandarizado. La solubilidad variable de los imidazoles y su estabilidad parcial limitan su uso en estos compuestos. Existe un sistema comercial que emplea tabletas en lugar de discos: en un estudio comparativo el miconazol mostró un 90 % de correlación con los resultados obtenidos en dilución en caldo. Recientemente el fluconazol utilizado en discos de 25 mg ha revelado datos confiables en aislamientos de levaduras del género Candida (17).

D) CEPAS DE REFERENCIA.

Deben incluirse microorganismos de control apropiados de susceptibilidad o resistencia en todas las pruebas "in vitro", con el propósito de tener resultados reproducibles y comparables con otros laboratorios. Los cultivos procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC), de los Estados Unidos de Norte América, han sido propuestas cepas de referencia (24). En México varias instituciones médicas y académicas tienen algunas cepas. El CENACUMI (Centro Nacional de Cultivos Microbianos) ha publicado en 1994 un catálogo cuyo objetivo es coordinar la información sobre las colecciones de cultivos que existen en nuestro país (6).

Las siguientes cepas han sido utilizadas como cepas de referencia en las pruebas de susceptibilidad con antimicóticos:

<u>Sacharomyces crevisiae</u>	ATCC	36375
<u>S. cerevisiae</u>	ATCC	9763
<u>S. crevisiae</u>	ATCC	2601
<u>Candida albicans</u>	ATCC	10231
<u>C. glabrata</u>	ATCC	10238
<u>C. tropicalis</u>	ATCC	13803
<u>C. pseudotropicalis</u>	ATCC	28838

E) PREPARACIÓN DE INOCULOS.

Uno de los pasos fundamentales en las pruebas de susceptibilidad con antimicóticos es la preparación de inóculos. Varios métodos han sido utilizados, incluyendo la cuenta de células, la escala de Mc Farland, el método de Wickerham y el uso del espectrofotómetro. De los métodos anteriores el menos variable es el espectrofotómetro recomendando este método para estandarizar los inóculos en las pruebas de susceptibilidad con levaduras (34).

F) CONCENTRACIÓN Y DILUCIÓN DE LOS ANTIMICOTICOS.

En el caso de los imidazoles se han utilizado varios solventes y concentraciones diferentes (37), las soluciones stock pueden prepararse en soluciones al 10% (34), 4% (11) y 1% (26).

El intervalo de concentraciones de prueba ha sido variable, recomendando la Sociedad Norteamericana de Microbiología las concentraciones de 0.63 a 160 µg/mL (33).

G) MEDIOS DE CULTIVO.

La selección del medio depende del antimicótico a probar (35). Los medios apropiados para el grupo de los imidazoles comprenden la base nitrogenada de levadura (YNB, 0392 DIFCO) suplementada con glucosa al 1% y asparagina al 0.15%, el agar caseína extracto de levadura-glucosa, el yeast morphology agar (YMA, 0393 DIFCO) con buffer; RPMI 1640 SIGMA glutamina 6504.; HR CM 875 OXOID.

Deben utilizarse buffers a pH 7. El ácido 3N morfilino-propano-sulfónico (MOPS) 0.165 Molar ha exhibido los resultados más confiables. El fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0.165 Molar también ha mostrado resultados aceptables (19). El Miconazol y el Ketoconazol son antagonizados por medios ricos como el Agar Sabouraud Glucosa y el caldo de infusión cerebro corazón.

H) RESISTENCIA

Existe la posibilidad de que ciertas cepas de Candida sean más virulentas o más resistentes a los antimicóticos actuales, lo que explicaría algunos fracasos en el tratamiento.

En nuestro país desafortunadamente la mayoría de los laboratorios no incluyen las pruebas "in vitro" para determinar la sensibilidad a los antimicóticos.

Por lo general los clínicos recurren a la información registrada por otros países (28,33) sin embargo un número significativo de pacientes, no ha tenido la respuesta esperada a los imidazoles que son los antimicóticos más utilizados.

Debido a esto, el problema de la vulvovaginitis crónica o recurrente parece aumentar en los últimos años, por lo que sería de gran interés realizar pruebas "in vitro" con los fármacos más usados en el tratamiento de la enfermedad.

Se desconoce también si el problema de la automedicación, el abandono del tratamiento y el uso inadecuado de la terapia, condiciona la aparición de cepas resistentes de Candida.

OBJETIVOS.

- 1. Conocer la frecuencia e importancia de la vaginitis candidiásica en la población ginecológica de la Clínica de Especialidades Churubusco del I.S.S.S.T.E.**
- 2. Valorar el uso de una laminilla siliconada como soporte de un inóculo constante en las pruebas de susceptibilidad con antimicóticos.**
- 3. Determinar la actividad "in vitro" del ketoconazol y miconazol por el método de dilución en agar con el replicador de Steers.**
- 4. Evaluar la actividad del ketoconazol y miconazol a diferentes pHs, así como diferentes medios de cultivo.**
- 5. Comparar la actividad "in vitro" del ketoconazol y miconazol por el método de dilución en agar y dilución en caldo.**

MATERIAL Y MÉTODOS.

Fueron estudiados 403 pacientes del sexo femenino con diagnóstico presuntivo de vulvovaginitis que asistieron al laboratorio de análisis clínicos de la clínica de especialidades Churubusco del I.S.S.S.T.E. durante el período de marzo a junio de 1993.

Las edades de las pacientes fluctuaron entre los 9 y 72 años. A todos los pacientes les fue tomado una muestra de exudado vaginal con hisópo de algodón y suspendida en tubos con solución salina fisiológica estéril. Las pruebas de laboratorio realizadas comprendieron el diagnóstico bacteriológico, micológico y búsqueda de Trichomonas.

Los datos concernientes al estudio bacteriológico y búsqueda de Trichomonas no son de interés para este trabajo y sólo abordaremos el estudio micológico. Las muestras fueron observadas al microscopio con KOH al 20% y sembradas por estría cruzada en placas de agar Biggy y agar micosel, e incubadas a 28 °C.

Los cultivos con desarrollo presuntivo de levaduras fueron revisados en preparaciones en fresco con lugol y una vez demostrada su presencia, las colonias aisladas fueron transferidas a tubos con Agar Sabouraud Glucosa para su identificación realizando las siguientes pruebas por duplicado (1,4).

1) Formación de tubo germinativo

La prueba fue realizada inoculando cada una de las cepas en 0.5 mL de suero humano homogeneizando la suspensión en un rotor mecánico e incubando por dos horas a 37°C. La prolongación del citoplasma adoptando el aspecto de un tubo fue indicador de una prueba positiva, mientras que la presencia de células esféricas solas o con blastoconidio fue considerada como una prueba negativa.

2) Formación de micelio y/o clamidosporas

El medio utilizado fue el agar harina de maíz tween 80 azul de tripano. Las placas con este de medio se dividieron en cuatro partes y en cada región fue sembrado un cultivo con dos estrías paralelas separadas una distancia aproximada de un centímetro. Posteriormente fue colocado un cubre objetos ejerciendo pequeña presión sobre el agar, lo que reduce la tensión de oxígeno favoreciendo la formación de clamidosporas. Las placas se incubaron a 28°C durante cuatro días .

Las observaciones se realizaron a partir de las 48 horas, la tapa fue retirada y el cubre objeto de cada cepa fue observado con el objetivo 16x. La presencia de hifas septadas ramificadas revela la formación de micelio y la presencia de células esféricas de pared gruesa intercalares laterales o terminales de clamidoconidios .

3) Pruebas bioquímicas

3.1 METABOLISMO OXIDATIVO

El medio base utilizado fue el yeast nitrógeno base (difco,0392-15-9).

Fueron pesados 6.7 g por 100 mL de agua y suplementado con asparagina al 0.15%. El medio base fue diluido 1 a 10, esterilizado por filtración, y distribuido en cantidades de 4.5 mL en tubos de 10 x 130 mM.

Los azúcares estudiados correspondieron al patrón bioquímico descrito para este género (31). Los azúcares fueron preparados en soluciones al 20 % ,esterilizados por filtración y adicionados en cantidades de 0.5 mL a los tubos con el medio base para dar una concentración final del 1%.

Los cultivos fueron sembrados en los tubos con los diferentes azúcares. Los testigos utilizados contenían sólo el medio base sin el azúcar. Las pruebas positivas correspondieron a la presencia de crecimiento en los tubos con los diferentes azúcares, mientras que los testigos y en las pruebas negativas no hubo desarrollo .

3.2 METABOLISMO FERMENTATIVO

La prueba fue realizada por el método de Durham (1) . El medio base caldo rojo de fenol fue distribuido en tubos de ensaye de 130x 10 mM en cantidad de 4.5 mL y esterilizado a 121°C durante 15 minutos.

Los carbohidratos estudiados fueron: glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y trealosa. Cada uno de los azúcares fue agregado en cantidad de 0.05 mL. a los tubos con el medio base para dar una concentración final al 1%.

Los tubos sembrados y los testigos fueron incubados a 28°C y las lecturas fueron realizadas a partir de las 48 horas. Las pruebas positivas correspondieron al viraje del indicador del medio de un color rojo a amarillo y la producción de gas se observó en el tubo invertido.

4) Antimicóticos

Los resultados del análisis de las sales enviados por el laboratorio fueron los siguientes:

4.1 Ketoconazol.

Lote 93072128. Polvo casi blanco o ligeramente beige con rango de fusión entre 149 y 151°C . Espectro de absorción U.V. e I.R. similar al estándar, 0.0% de pérdida al secado, < 0.1% de ceniza sulfatadas y < 20 p.p.m. de metales pesados.

Miconazol.

Lote 9305368. Polvo de color blanco con rango de fusión de 180.76°C. Espectro de absorción U.V.e I.R similar al estándar. Reacciones positivas a nitrato y cloro, menos de 0.1% de pérdida al secado, menos de 0.15 de cenizas sulfatadas , 96% de transmitancia, solución incolora en metanol y diclorometano en relación 1 a 1.

Referente a los solventes utilizados, el Ketoconazol fue soluble en metanol, ácido clorhídrico (HCL) 0.2 N y dimetil-sulfóxido (DMSO). El mejor solvente fue el (HCl) 0.2 N (11). Con metanol la sal no se precipita con el agua en relación 1 a 9, mientras que con dimetil-sulfóxido la sal se precipita con el agua en proporción mayor de 1 a 1 .

Respecto al nitrato de miconazol no es soluble en HCl 0.2N. Es soluble en dimetil-sulfóxido, pero se precipita al agregarle agua en relación 1 a 1.5. Soluble en metanol con precipitación de la sal al adicionarle agua en cantidades mayores a la relación 1 a 1, este último fue el mejor solvente.

4.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y DE TRABAJO

Las sales de ketoconazol y miconazol fueron pesadas en cantidades de 100 mg y disueltas en 10 mL de HCl 0.2 N y 10 mL de metanol respectivamente, para tener soluciones stock a una concentración de 10,000 µg/mL.

Las soluciones fueron esterilizadas por filtración, distribuidas en alícuotas de 1 mL en tubos de ensayo de 120x10mm y conservadas a -70 °C. Las soluciones de trabajo fueron preparadas con agua destilada estéril, diluyendo 1 a 10 las soluciones stock, para tener una concentración de 1,000 µg/mL(18). Estas soluciones fueron distribuidas en tubos de 120x10 mM en cantidades de 5 mL y conservadas también a -70°C. En estas condiciones el nitrato de miconazol se conserva en buen estado durante una semana, después tiende a precipitarse.

4.3 CEPAS DE REFERENCIA (24).

Candida albicans ATCC 10231

Candida glabrata ATCC 10238

4.4 MEDIOS DE CULTIVO

yeast morphology agar	(YMA)	Difco 0393
Agar Sabouraud Glucosa 4%	(ASG)	Merck 5438
yeast nitrogen base	(YNB)	Difco 0392

4.5 BUFFER (20).

KH_2PO_4 0.165M Fosfato monobásico de potasio pH 6.5

4.6 PREPARACIÓN DE INÓCULOS (34,35).

Los inóculos fueron preparados sembrando los cultivos por estría cruzada en Agar Sabouraud Glucosa a pH 7, e incubados a 37°C durante 48 horas. Después fueron seleccionadas 5 colonias al azar entre 1 y 3 mM, y suspendidas en solución salina estéril. Las suspensiones fueron ajustadas a la transmitancia exhibida por el tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland a una longitud de onda de 530nm, en un espectrofotómetro Spectronic 20 D, utilizando como testigo solución salina fisiológica.

4.7 DILUCIÓN DE LOS ANTIMICÓTICOS Y PREPARACIÓN DE PLACAS

Las concentraciones utilizadas de los antimicóticos fueron las sugeridas por Shadomy y Pfaeller (34). Las placas con YMA a pH 6.5 fueron preparadas, diluyendo las soluciones de trabajo con el medio de cultivo para dar un intervalo de concentraciones de 1.25 a 160 µg/mL.

Tres testigos fueron utilizados: el medio YMA sólo (T-1); el YMA+Acido clorhídrico(HCL) 0.2N (T-2) y el YMA+metanol (CH₃-OH) al 10% (T-3). El medio para los testigos T-2 y T-3 fue preparado en cantidad de 100 mL., utilizando 98 mL de agar y 2mL de los solventes señalados, que fue la cantidad máxima de solvente utilizado para dar la concentración de 160 µg/mL.

El medio de cultivo fue preparado en buffer ajustado a pH 6.5 y esterilizado de acuerdo a los datos del cuadro 1. Se dejó enfriar aproximadamente a 45 ° C y en estas condiciones a cada matraz le fue agregado las diferentes cantidades de las soluciones de trabajo ketoconazol o miconazol para dar las concentraciones entre 1.25 y 160 µg/mL. El medio fue distribuido en cajas de petri de 100x150 mL en cantidades de 20 mL, sujetas a prueba de esterilidad y utilizadas en la prueba 48 horas después de su preparación.

Cuadro I
Concentraciones de Ketoconazol y Miconazol
utilizadas en Yeast Morphology Agar (YMA)

Solución de trabajo Ketoconazol o Miconazol (1000 µg/mL)	Medio de cultivo (YMA) en buffer. Dilución		Concentración Final en µg/mL
0.2	159.8	1:800	1.25
0.3	119.7	1:400	2.5
0.7	139.3	1:200	5.0
1.2	118.8	1:100	10.0
2.5	127.4	1:50	20.0
5	120.0	1:25	40.0
10	115.0	1:12.5	80.0
20	105.0	1:6.25	160.0

4.8 REALIZACIÓN DE LA PRUEBA CON EL REPLICADOR DE STEERS

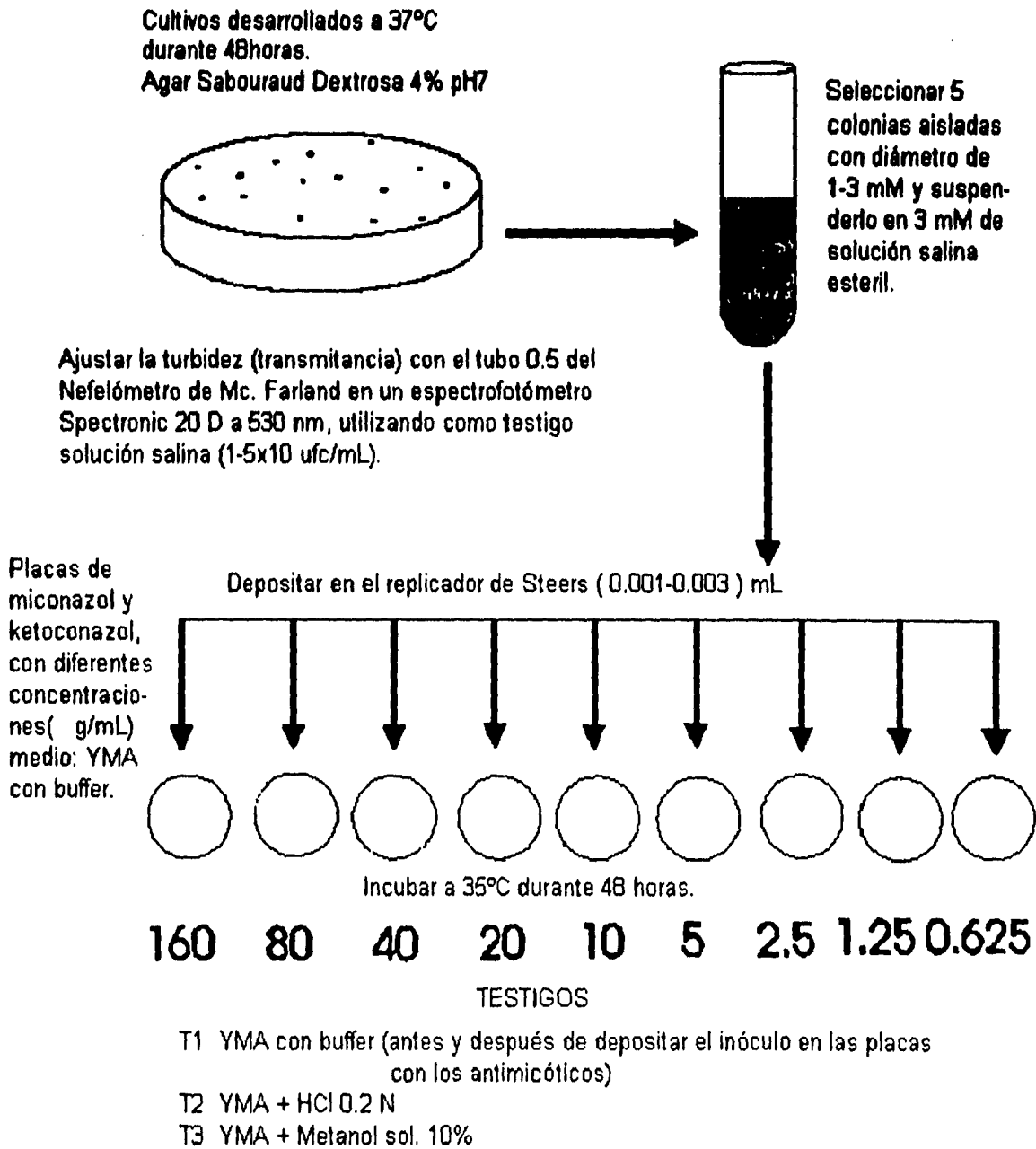
El replicador de Steers consta de varias placas de acero inoxidable que tienen 36 pozos cada una de ellas. Los inóculos de los 84 aislamientos (C. albicans , 72 C. glabrata 12) y las 2 cepas de referencia fueron agitados y colocados ,por separado en cada uno de los pozos.

Una placa completa fue colocada en la parte central del replicador y en la parte superior de este existe un dispositivo con 36 puntas que se ajustan para succionar el inóculo y depositarlo en la placa de petri con el medio, el cual se encuentra en la parte izquierda del replicador y es desplazada hacia el lado derecho quedando en la parte central .

Al depositar los inóculos, primero se utiliza una placa de testigo T-1, después un testigo T-2 en el caso del ketoconazol y un testigo T-3 con el miconazol. Después de los testigos se colocaron las placas con las diferentes concentraciones (1.25-160 µg/mL) para que al último, se vuelvan a utilizar los testigos T-1, T-2 ó T-3 según sea ketoconazol o miconazol. El esquema de la figura 1, refiere el procedimiento seguido. Las placas fueron incubadas a 35°C y las lecturas fueron realizadas a las 24 horas. Las placas de testigos antes y después deberán revelar crecimiento en los 32 inóculos depositados para que la prueba tenga validez. La presencia de crecimiento a una concentración de 1.25 µg/mL y posteriormente su falta de desarrollo a la siguiente concentración 2.5 µg/mL, corresponderá al MIC de esa cepa problema, que es la concentración mínima del antimicótico para inhibir el crecimiento de la cepa bajo esas condiciones.

FIGURA 1

Determinación de la actividad "in vitro" del ketoconazol y miconazol



4.9 INFLUENCIA DEL PH

El procedimiento anterior fue realizado de igual manera disminuyendo el pH del medio YMA a 4.4. En esta prueba fueron utilizados 9 aislamientos de Candida glabrata y 51 aislamientos de Candida albicans, 60 cepas en total. Las placas fueron incubadas a 35 °C y las lecturas realizadas a las 24 horas.

4.10 INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO

La prueba fue realizada también en Agar Sabouraud Glucosa a pH 5.6, variando con este ensayo las concentraciones de los dos antimicóticos a 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 µg/mL. El número de aislamientos fue de 84 y no se utilizó buffer en la preparación del medio. Las placas fueron incubadas a 35 °C y las lecturas fueron efectuadas a las 24 horas.

4.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD "IN VITRO" UTILIZANDO UNA LAMINILLA SILICONADA EN YNB A PH 7.0

4.11.1 Obtención de laminillas siliconadas

Se siguió el método original descrito por Higashi et al (15), con modificaciones por Shibayama et al (36). Porta objetos de vidrio de 27x75 mM fueron cortados longitudinalmente en tres partes, se lavaron con detergente y se dejaron en mezcla crómica 12 horas. Se lavaron al chorro del agua, se enjuagaron en agua destilada y se secaron al horno a 37 °C. Las laminillas se colocaron verticalmente en un vaso de precipitado y se sumergieron 15 minutos en una solución al 2% de dimetil-silicona en tetracloruro de carbono. Se decantó la solución, se escurrieron las laminillas y se llevaron al horno a 300 °C durante una hora para estabilizar el silicón.

Por medio de pinzas metálicas se retira una laminilla y se sumerge en agua; si esta bien siliconada, debe ser totalmente repelente. El medio de cultivo YNB (6.7 µg/por 100 mL) fue preparado en buffer suplementado con glucosa al 1% y asparagina al 0.15%. Esterilizado por filtración y diluído 1 a 10 en agua destilada estéril (10x). En condiciones estériles fue distribuido en tubos de 12x125 mM en cantidad de 1 mL.

4.11.2 Determinación de la concentración del inóculo en la laminilla siliconada.

La suspensión (inóculo) de la cepa C. albicans ATCC 10231 fue utilizada para esta determinación. En esta suspensión en condiciones estériles fueron introducidas laminillas siliconadas a diferente profundidad 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 cm. Estas laminillas fueron colocadas en tubos con una solución estéril de tween 80 al 1% y posteriormente de cada tubo, se realizaron diluciones 1:100, 1:1,000 y 1:10,000.

De cada dilución fue tomado 0.1 mL y depositado en placas de petri, agregándoles 20 mL de Agar Sabouraud Glucosa a temperatura de 45°C, homogeneizando el medio e incubadas las cajas a 37°C durante 24 horas para cuenta en placa. De estas diferentes laminillas, la sumergida en 1 cm. correspondió a una concentración de 100,000 ufc/mL y fue la utilizada en este ensayo. Las concentraciones utilizadas en miconazol estuvieron en el rango de 1.25 a 160 µg/mL y del ketoconazol entre 5 y 160 µg/mL. Los testigos utilizados sólo contenían el medio YNB 10x.

La prueba fue realizada sumergiendo 1 cm una laminilla siliconada en cada inóculo de los diferentes aislamientos y posteriormente transferida a los tubos que contenían 1 mL del medio YNB 10x. Los tubos fueron incubados a 35° C y las lecturas fueron realizadas a las 24 horas, considerando una prueba positiva cuando había crecimiento en el tubo y una prueba negativa cuando había ausencia de él. En esta prueba fueron incluidos 46 aislamientos de C. albicans y 12 de C. glabrata.

RESULTADOS.

1. Examen Microscópico

De los 403 muestras estudiadas, 84 de ellas revelaron levaduras, para un 20.84% global. En 72 muestras hubo presencia de pseudomicelio y micelio septado hialino, mientras que en 12 muestras sólo se observaron levaduras y blastoconidios. En estas muestras no hubo presencia de Trichomonas, Escherichia coli, Klebsiella, spp. y Proteus spp. fueron las bacterias gram negativas asociadas con más frecuencia.

2. Cultivo

El cultivo fue positivo en 86 muestras. En 2 de ellas no fue posible aislar las levaduras en cultivo puro, y estas fueron descartadas. De los 84 aislamientos restantes, 72 de ellos formaron tubo germinativo y clamidoconidios, correspondiendo estas cepas, a la especie Candida albicans (85.71%). 12 cepas no presentaron estas características y las pruebas bioquímicas positivas en asimilación y fermentación para glucosa y trealosa, ubicaron a estos cultivos en la especie Candida glabrata para un 14.28%.

3. Actividad " in vitro" del ketoconazol y miconazol

3.1 YMA , pH 6.5

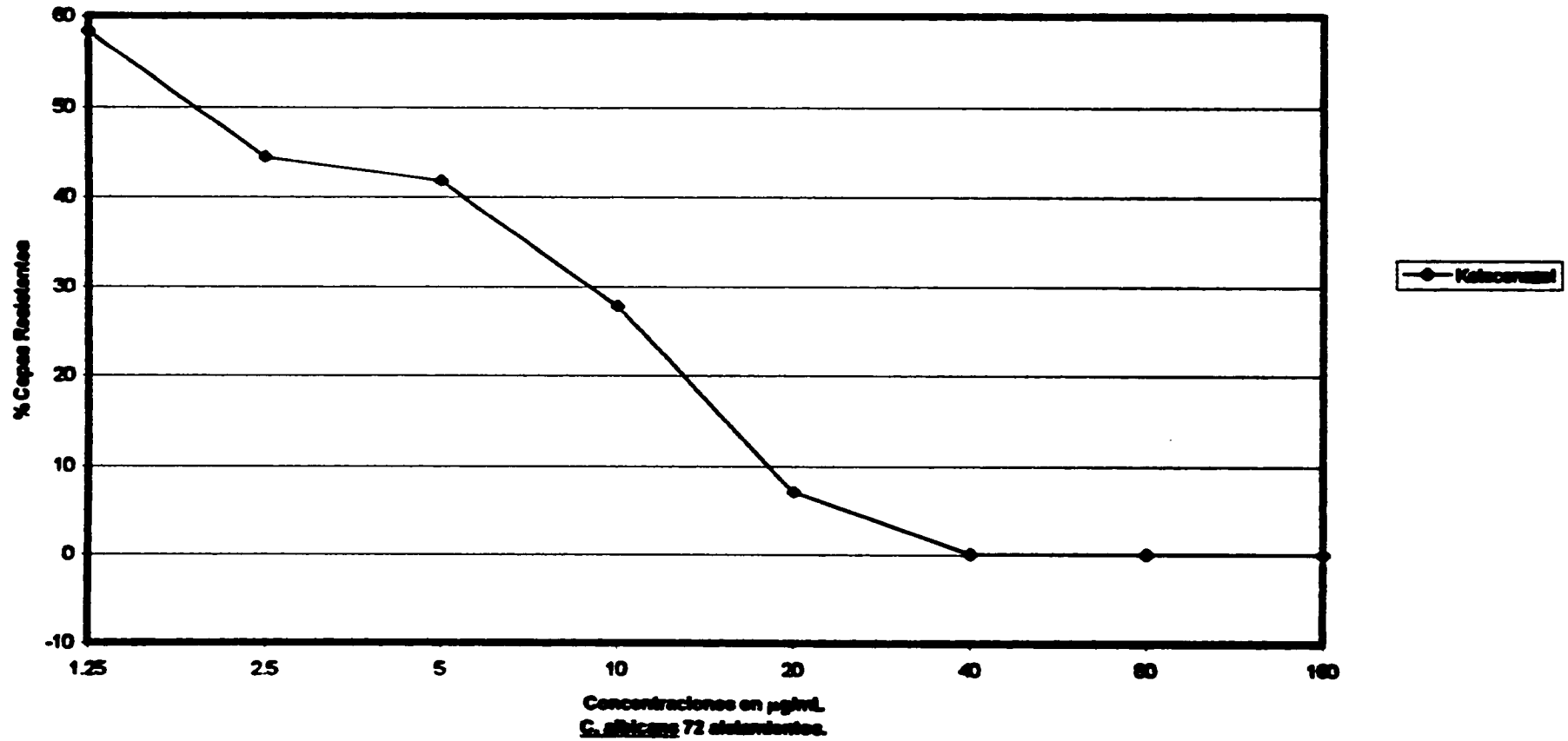
Las gráficas 1,2 y 3 presentan los porcentajes de resistencia al ketoconazol y miconazol, de los 72 aislamientos de C. albicans, y de los 12 aislamientos de C. glabrata. Referente a C. albicans un 58.3% de cepas es resistente a la concentración de 1.25 µg/mL de ketoconazol.

Esta resistencia va disminuyendo al aumentar la concentración y al tener 20 µg/mL existe un porcentaje bajo de resistencia de 6.45%, mientras que a 40 µg/mL todos los aislamientos son sensibles. El valor predictivo de MIC 50 (concentración que inhibe al 50% de las cepas) quedaría por arriba de 1.25 µg/mL, mientras que el MIC 90 (concentración que inhibe el 90% de las cepas) estaría entre los valores de 10 y 20 µg/mL.

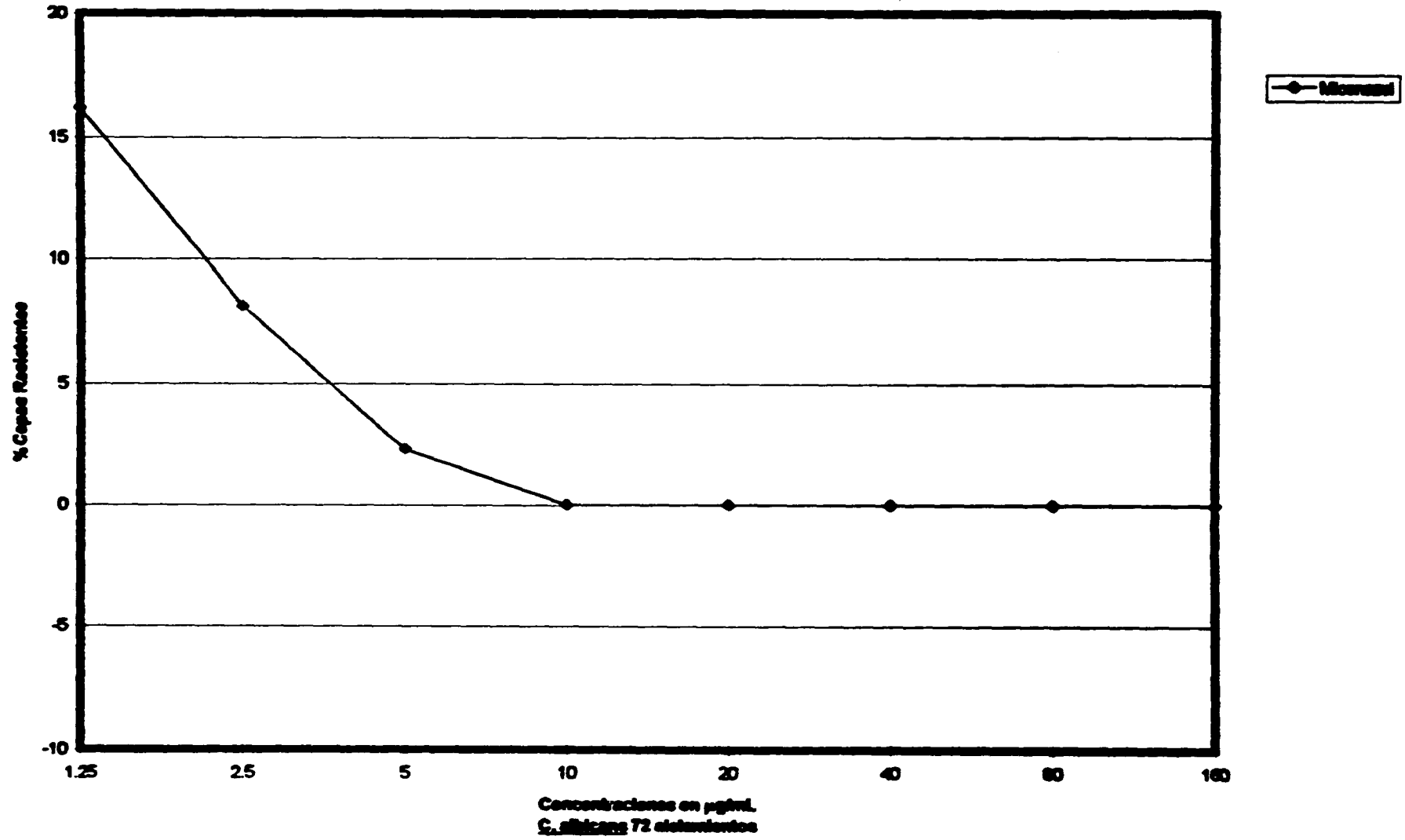
En relación al miconazol, este antimicótico exhibe mayor actividad sobre los cultivos. A la concentración de 1.25 µg/mL, un 16.2% es resistente, en consecuencia el MIC 50 de los 72 cultivos estaría muy por abajo de esta concentración. A 2.5 µg/mL existe un 8.13% de resistencia, mientras que a 10 µg/mL ninguna cepa es resistente. El valor predictivo del MIC 90 quedaría entre los valores 1.25 y 2.5 µg/mL.

Respecto a C. glabrata los 12 aislamientos fueron sensibles a la concentración de 1.25 µg/mL de ambos antimicóticos. Los MIC 50 y MIC 90 para las dos sales son menores a 1.25 µg/mL.

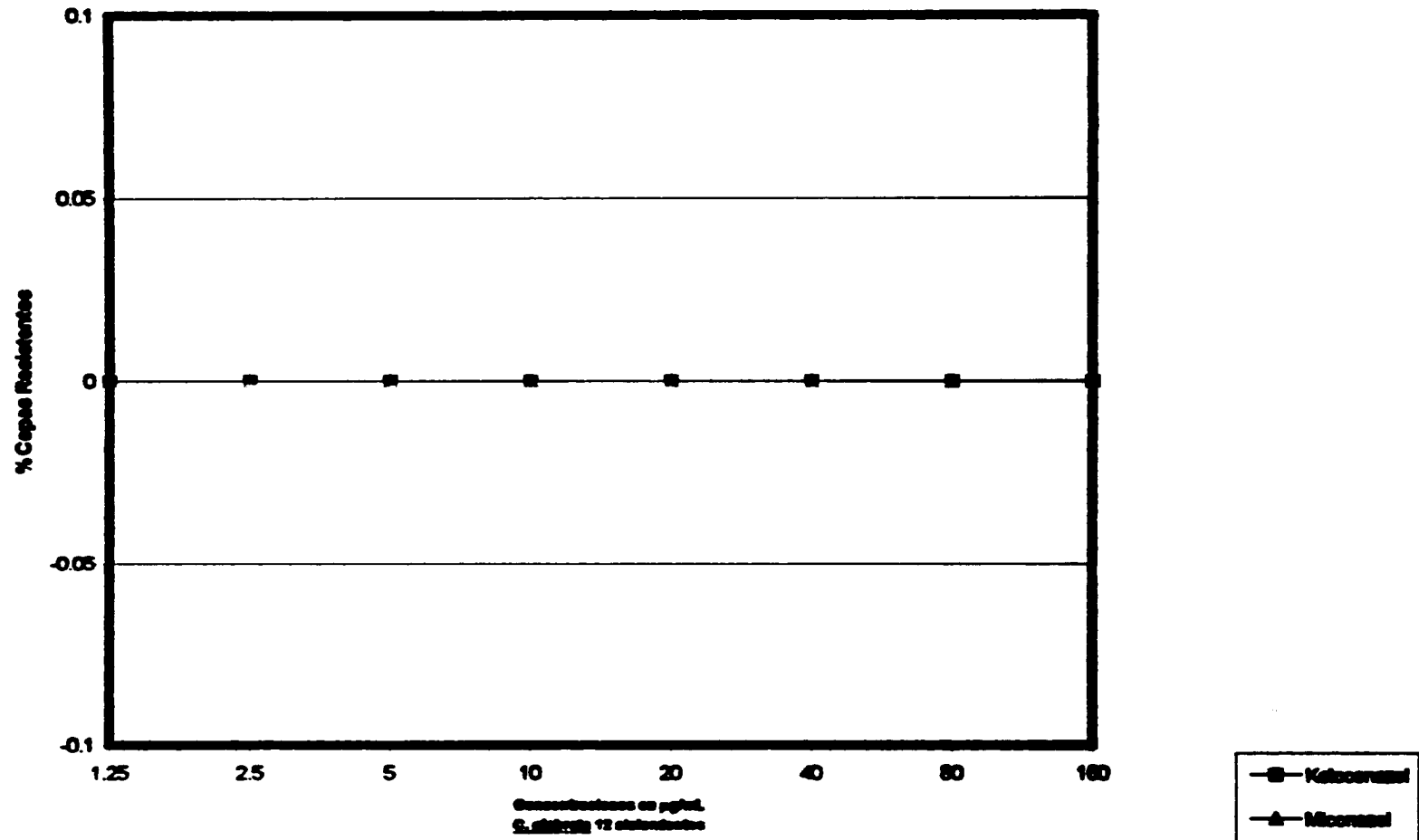
GRAFICA 1
Comportamiento de Candida albicans al ketoconazol en YMA pH 6.5



GRAFICA 2
Comportamiento de Candida albicans al miconazol en YMA pH6.5



GRAFICA 3
Comportamiento de Candida glabrata al miconazol y ketoconazol en YMA pH 6.5



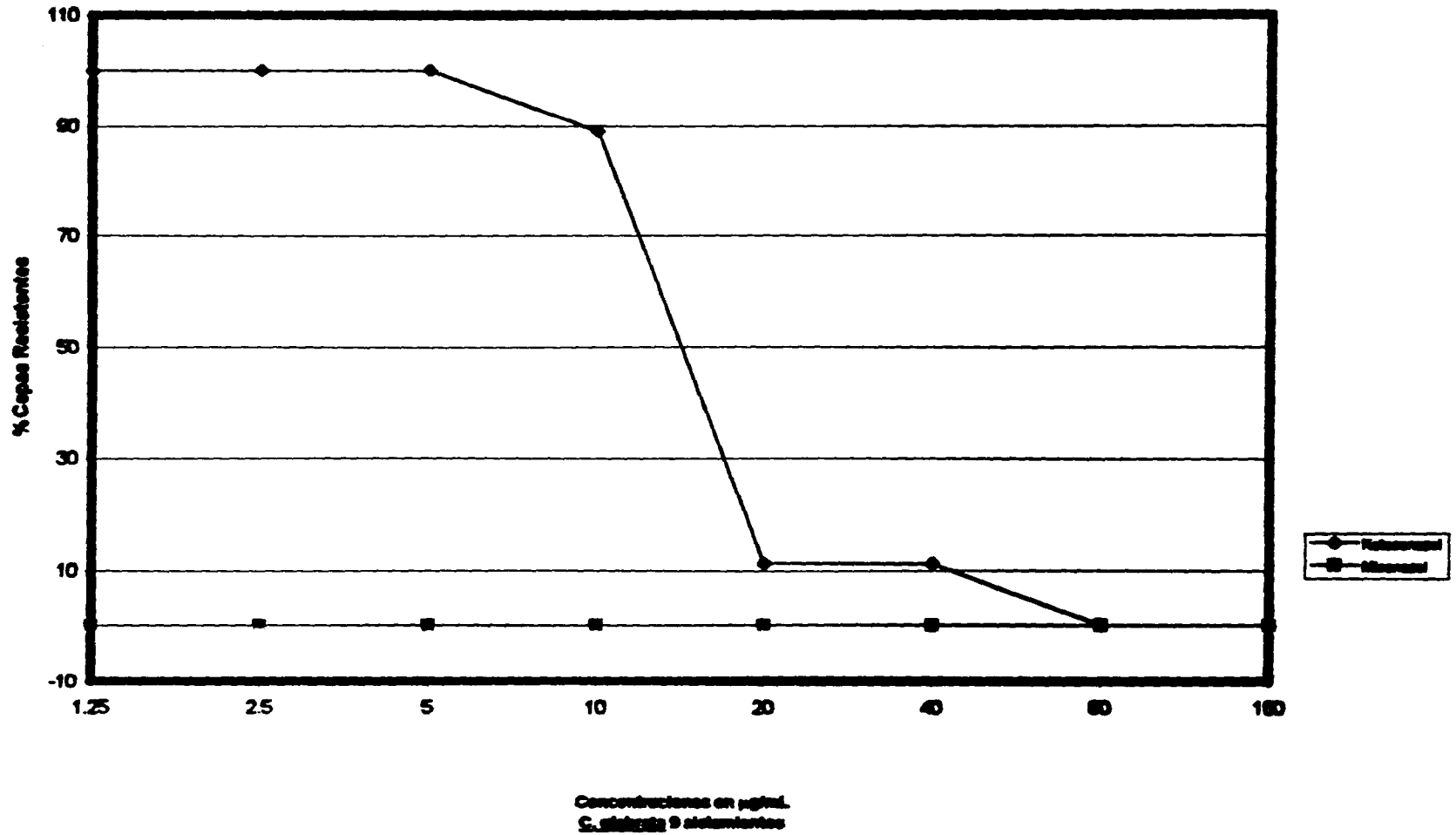
3.2 Influencia del pH, YMA pH 4.4

El comportamiento de ambas especies se ilustra en las gráficas 4, 5, y 6. Existen cambios importantes en los dos antimicóticos. Los cultivos de C. glabrata todos son resistentes a las concentraciones de 1.25, 2.5 y 5 µg/mL, mientras que a 10 µg/mL. Un 88.88% son también resistentes. A los valores de 20 y 40 µg/mL decrece mucho la resistencia hasta un 11.11% para que a la concentración de 80 µg/mL no existen ya cepas resistentes. Con estos datos, los valores predictivos de MIC50 y MIC90, estarían el primero entre 10 - 20 µg/mL y el segundo entre 40 y 80 µg/mL.

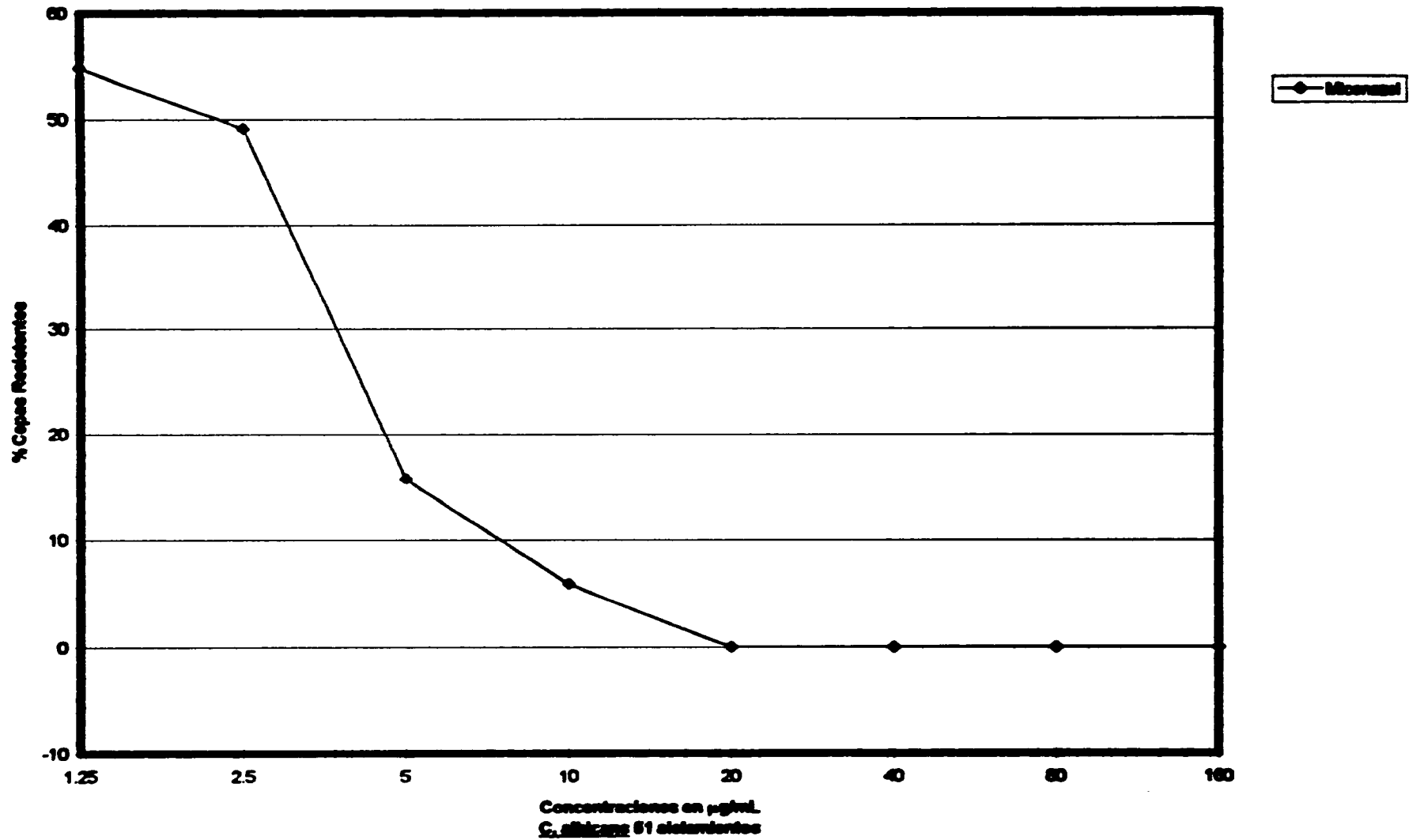
En C. albicans las variaciones con ketoconazol son también importantes. A la concentración de 1.25 µg/mL se observa 47.05% de resistencia, la que va disminuyendo conforme aumenta la concentración del antimicótico, sin embargo a la concentración de 80 µg/mL todavía se presenta un 9.8% de resistencia, mientras que a 160 µg/mL ya no hay cepas resistentes. Con estos valores el MIC 50 quedaría por abajo de 1.25 µg/mL, mientras el MIC90 estaría muy cercano a 80 µg/mL.

Situación similar ocurre en el miconazol donde un 54.9% es resistente a la concentración de 1.25 µg/mL, esta resistencia va disminuyendo, y a la concentración de 20 µg/mL no hay cepas resistentes. Los valores predictivos de MIC 50 y MIC90 estarían el primero muy cercano a 2.5 µg/mL, y el segundo entre 5 y 10 µg/mL.

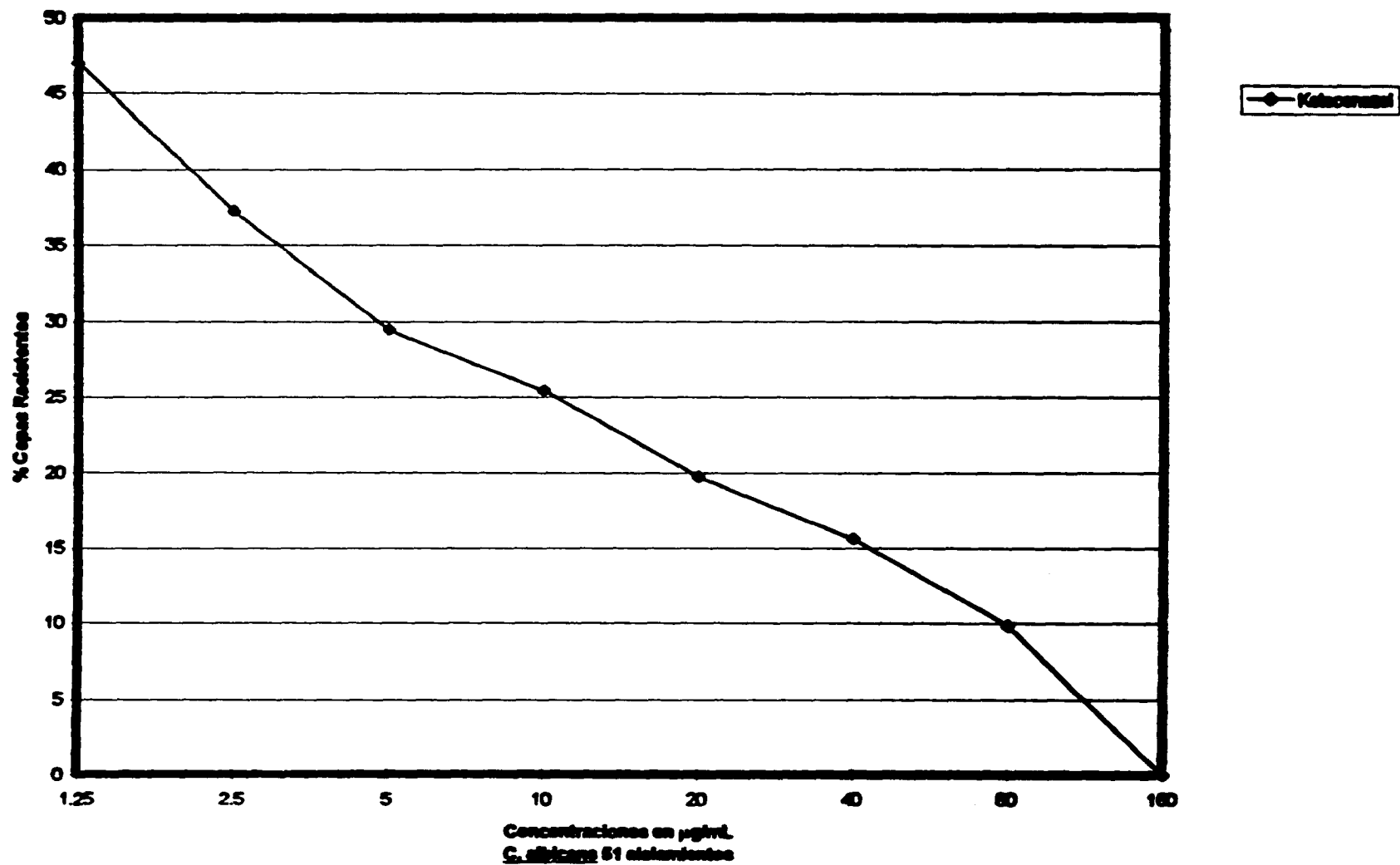
GRAFICA 4
Comportamiento de Candida glabrata al ketoconazol y miconazol en YMA pH 4.4



GRAFICA 5
Comportamiento de Candida albicans al miconazol en YMA pH 4.4



GRAFICA 6
Comportamiento de Candida albicans al ketoconazol en YMA pH 4.4



3.3 Influencia del medio de cultivo, Agar Sabouraud Glucosa

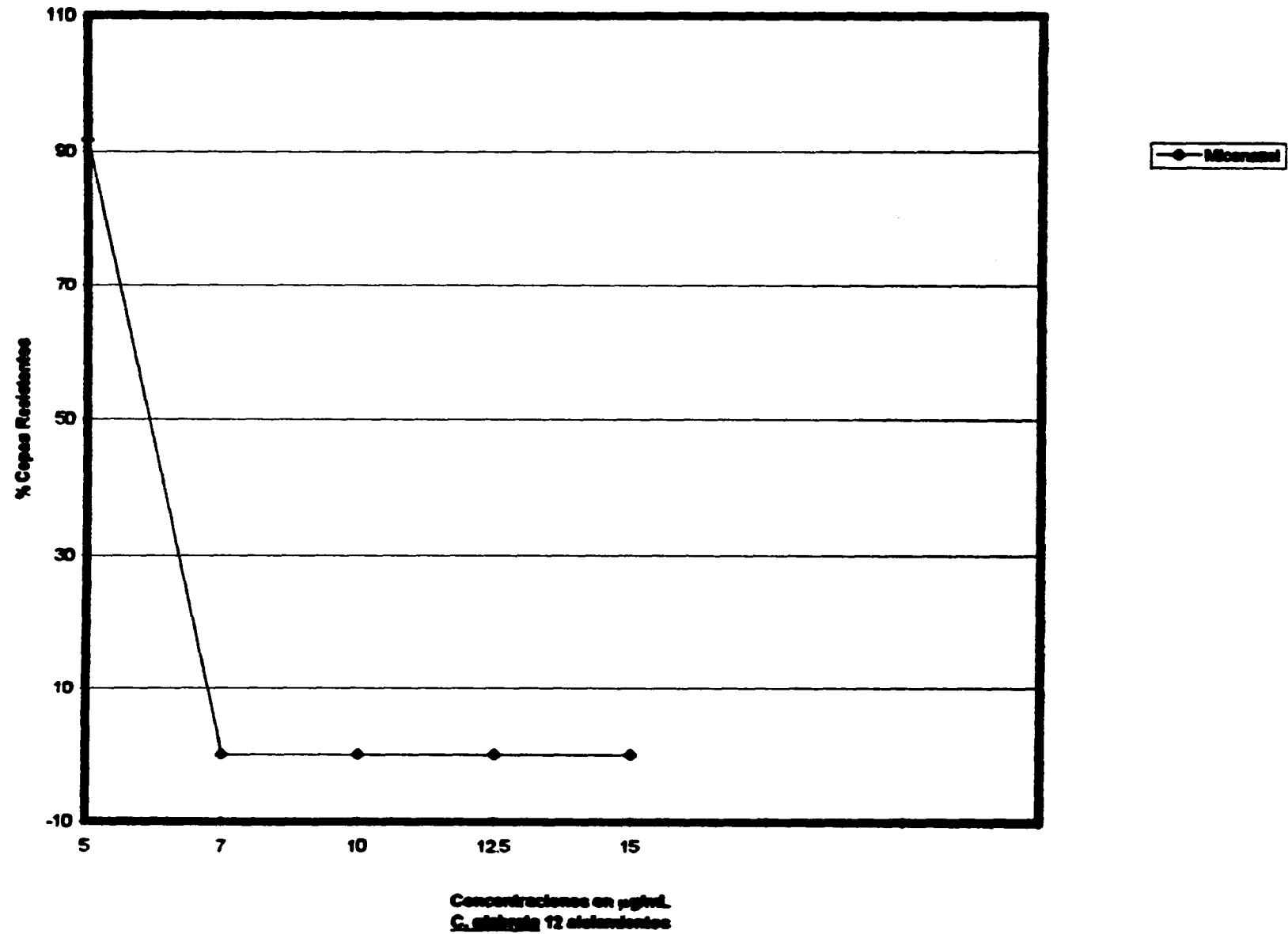
Las gráficas 7, 8, 9 y 10 refieren los datos encontrados. En relación al miconazol, los aislamientos de C. glabrata presentan una resistencia del 91.6% a 5 µg/mL, mientras que a 7.5, 10, 12.5 y 15 µg/mL no hay cepas resistentes. Los valores predictivos de MIC50 y MIC90, estarían ambos valores en el intervalo de 5 -7.5 µg/mL.

En ketoconazol acontece una situación diferente debido a que a la concentración de 15 µg/mL todavía existe un 83.3% de cepas resistentes, con lo que los valores de MIC50 y MIC90 quedarían muy por arriba de esta concentración.

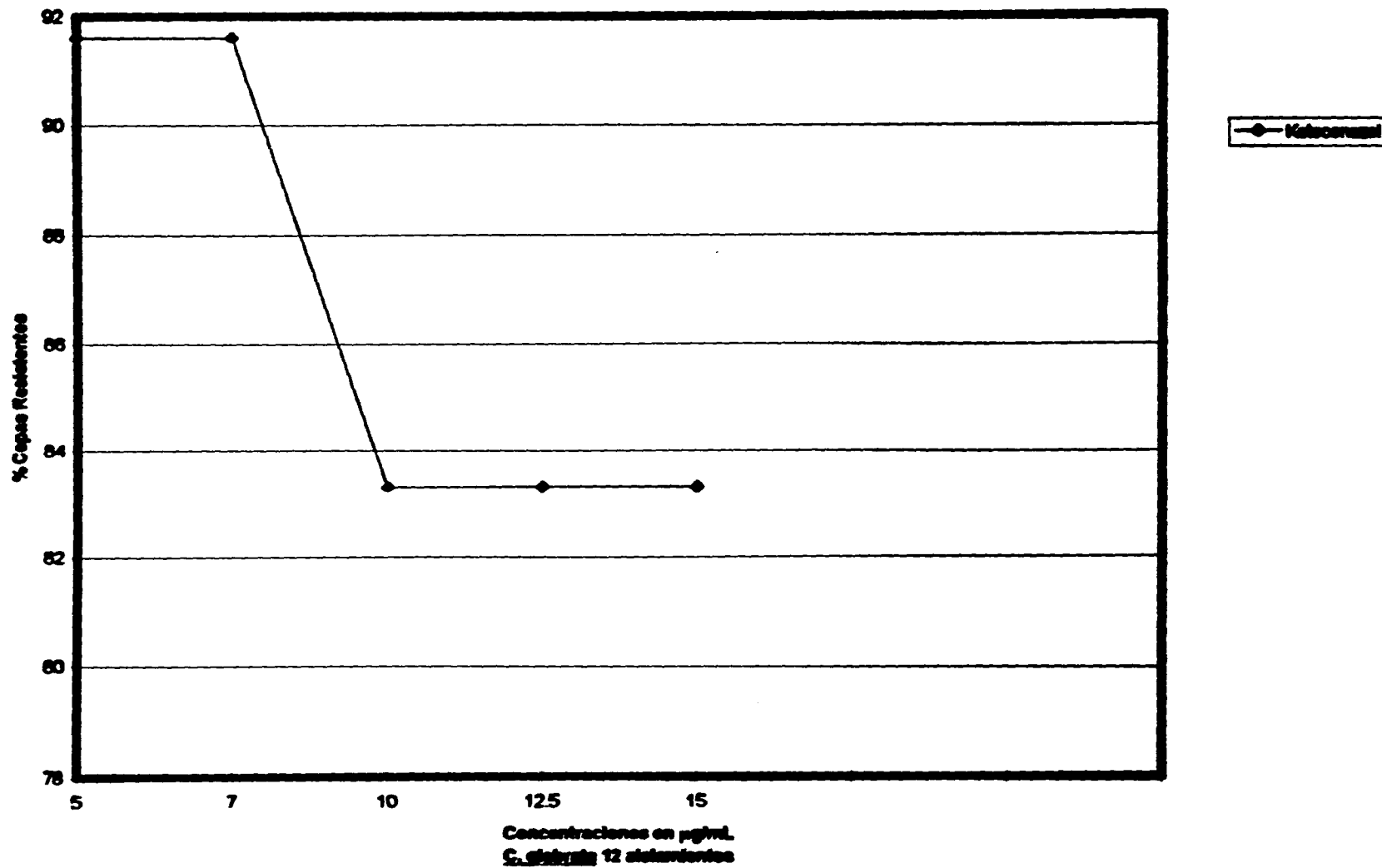
En el caso de los aislamientos de C. albicans frente al miconazol, a la concentración de 5 µg/mL existe un 11.2% de resistencia y a las concentraciones de 7.5, 10, 12.5 y 15 µg/mL ya no hay desarrollo de ninguna cepa. Los valores de MIC50 y MIC90 estarían por abajo de 5 µg/mL los dos.

Respecto al ketoconazol el porcentaje de resistencia es alto a 5 µg/mL (85.48%) y disminuye a 45.16% a la concentración de 15 µg/mL. El MIC50 estaría entre 12.5 y 15 µg/mL, mientras que el MIC90 quedaría por arriba de 15 µg/mL.

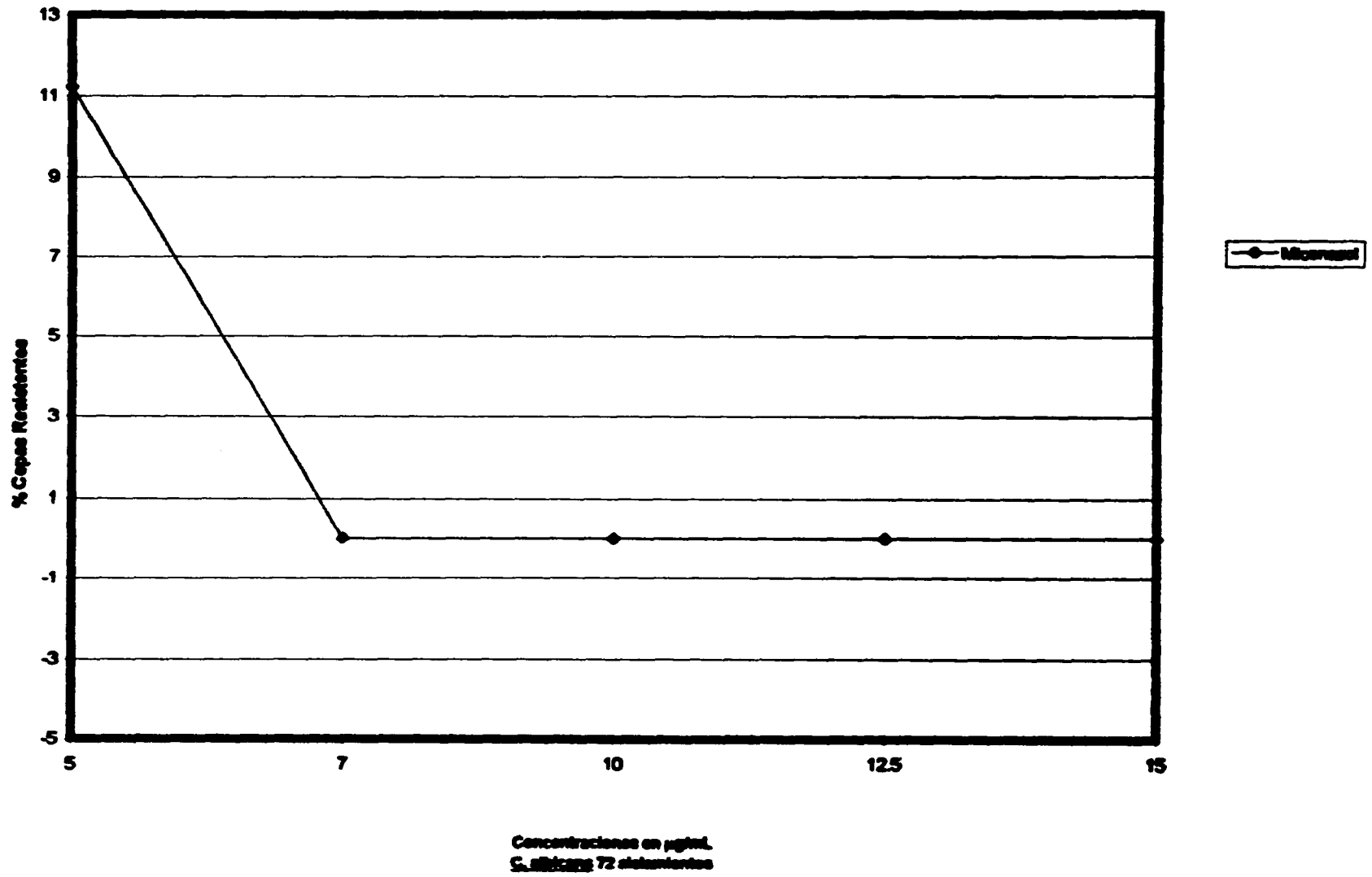
GRAFICA 7
Comportamiento de Candida glabrata al miconazol en (ASG) pH 5.6



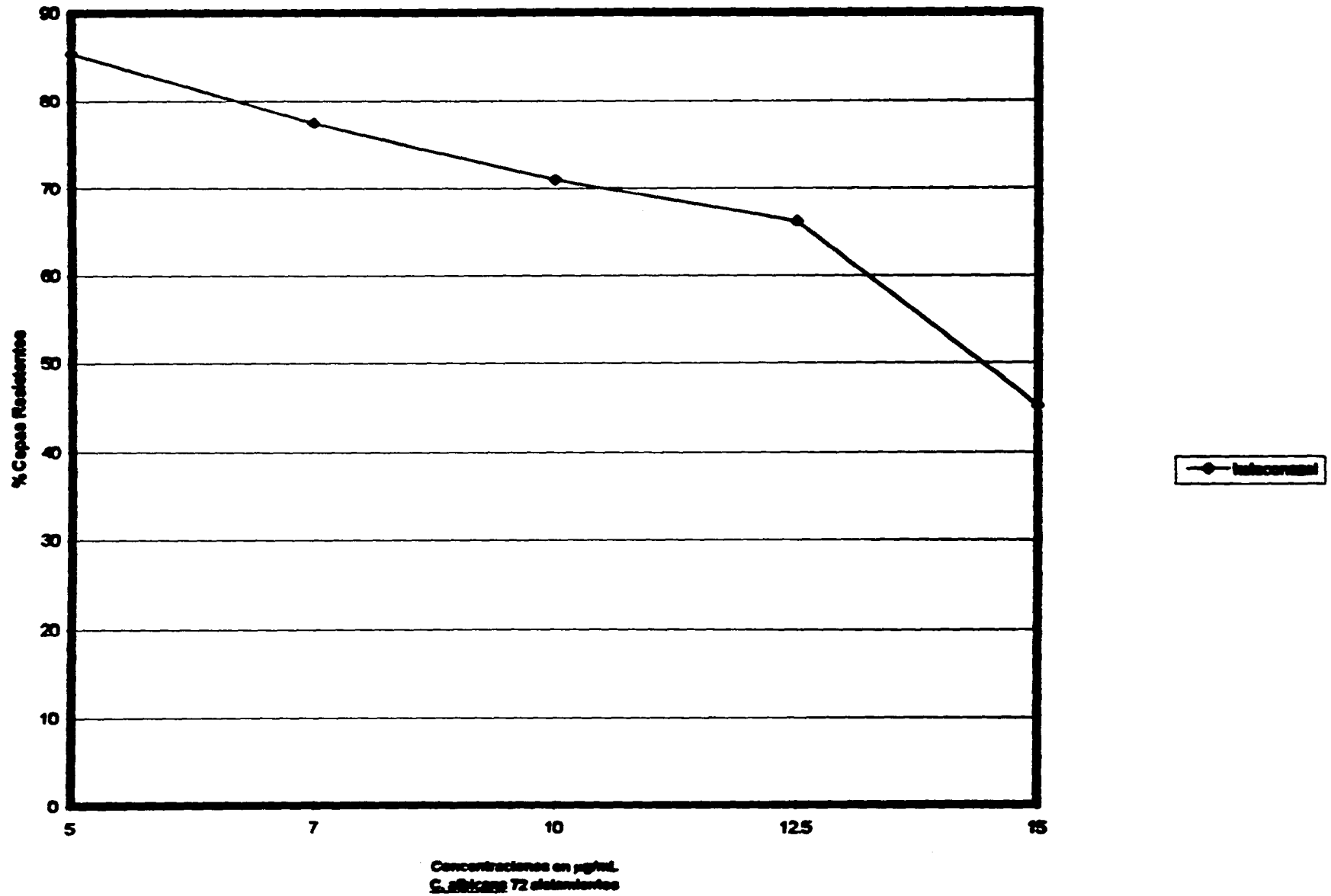
GRAFICA 8
Comportamiento de Candida glabrata al ketoconazol en (ASG) pH 5.6



GRAFICA 9
Comportamiento de Candida albicans al miconazol en (ASG) pH 5.6



GRAFICA 10
Comportamiento de Candida albicans al ketoconazol en (ASG) pH 5.6

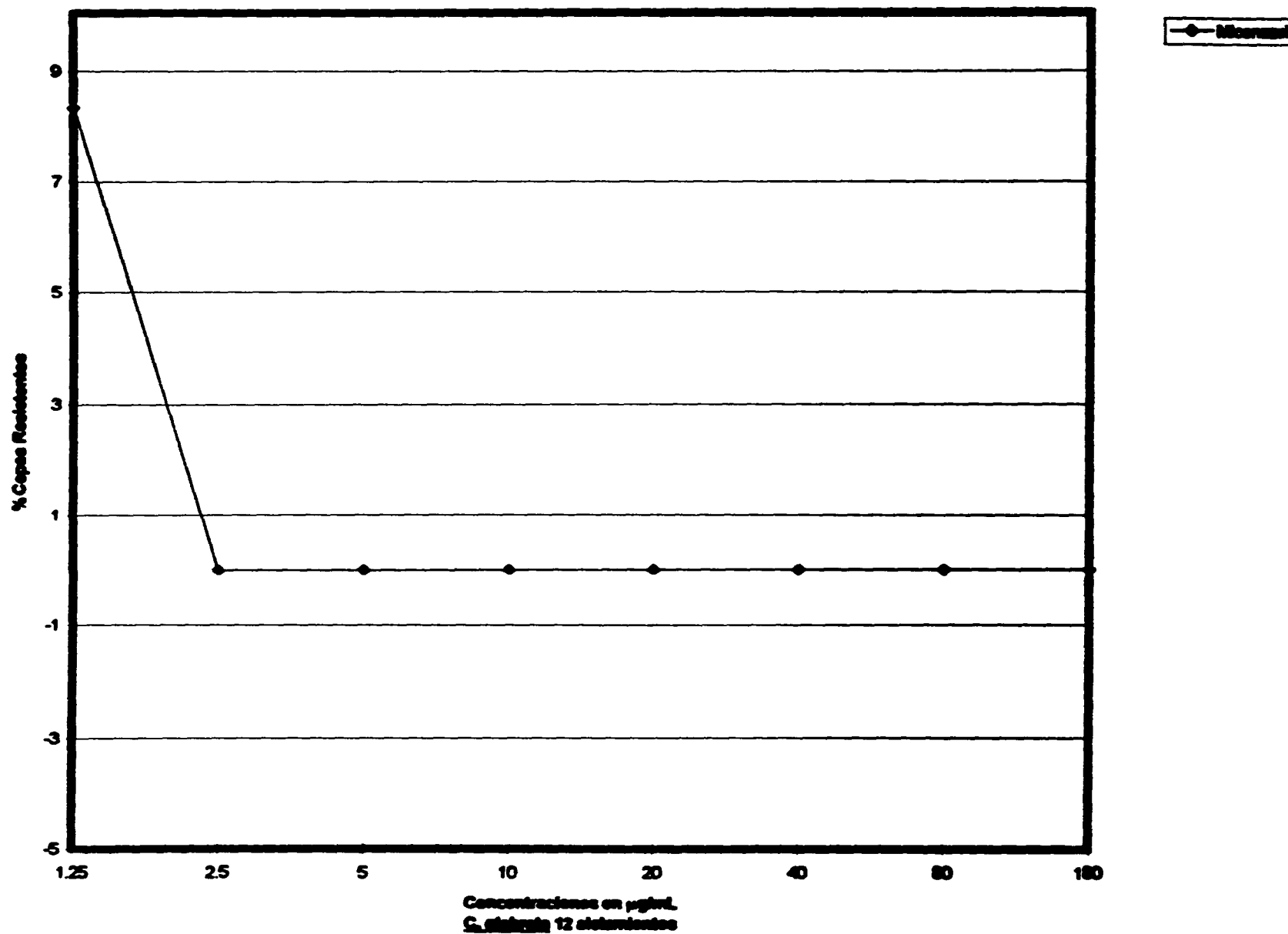


3.4 Uso de laminillas siliconadas. YNB pH 7.0

Las gráficas 11,12,13 y 14 refieren los resultados encontrados. Las dos especies presentan baja resistencia al miconazol a la concentración de 1.25 µg/mL (C. glabrata 8.3% C. albicans 2.17%). Al ketoconazol ambos grupos de cepas también presentan baja resistencia a 5 µg/mL (C. glabrata 8.3%, C. albicans 4.34%). El MIC 50 y MIC 90 para C. glabrata en miconazol estarían por abajo de 1.25 µg/mL, mientras que en el ketoconazol ambos valores estarían por abajo de 5 µg/mL.

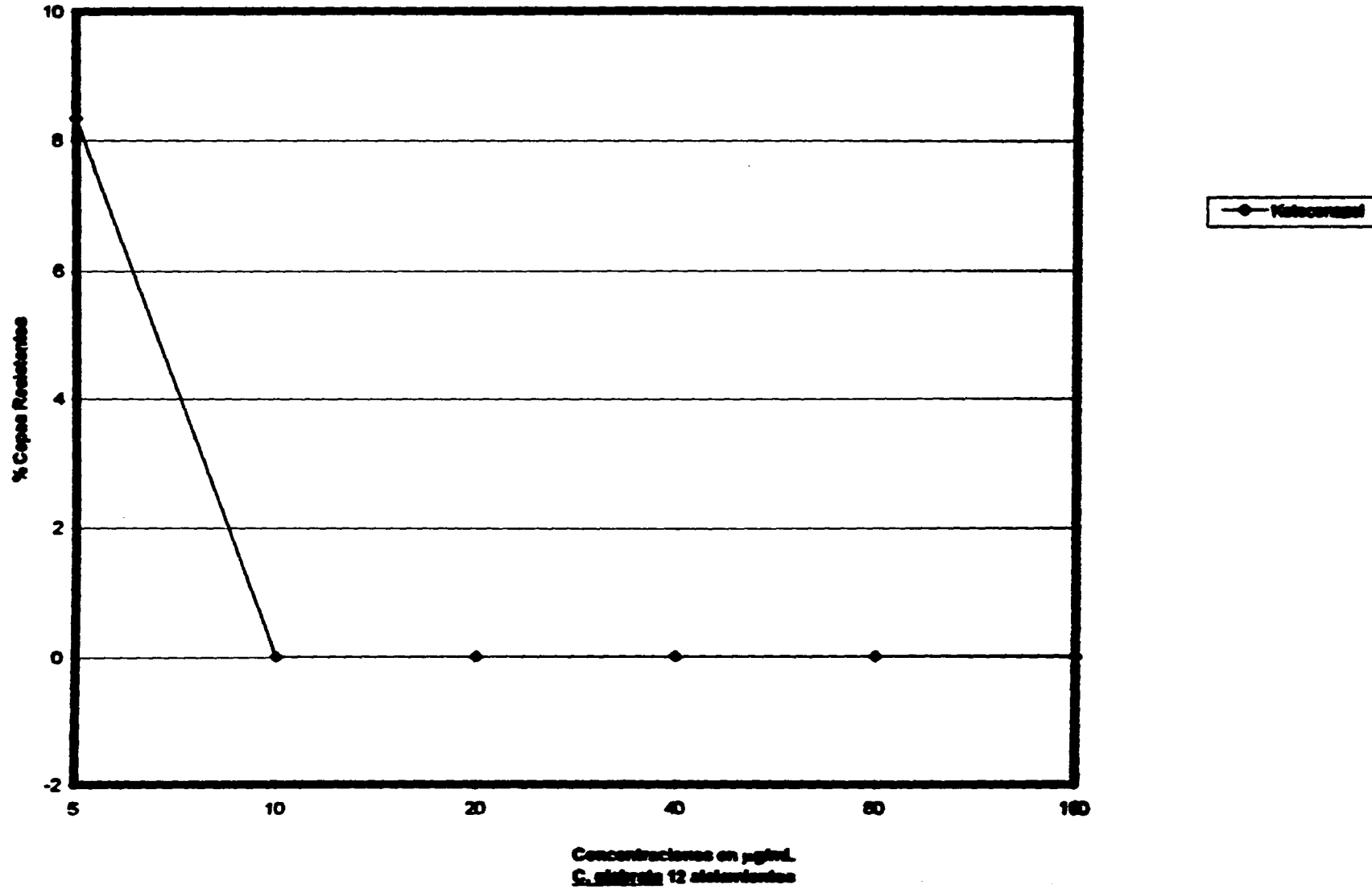
GRAFICA 11

Comportamiento de Candida glabrata al miconazol en YNB con laminilla siliconada pH 7.0

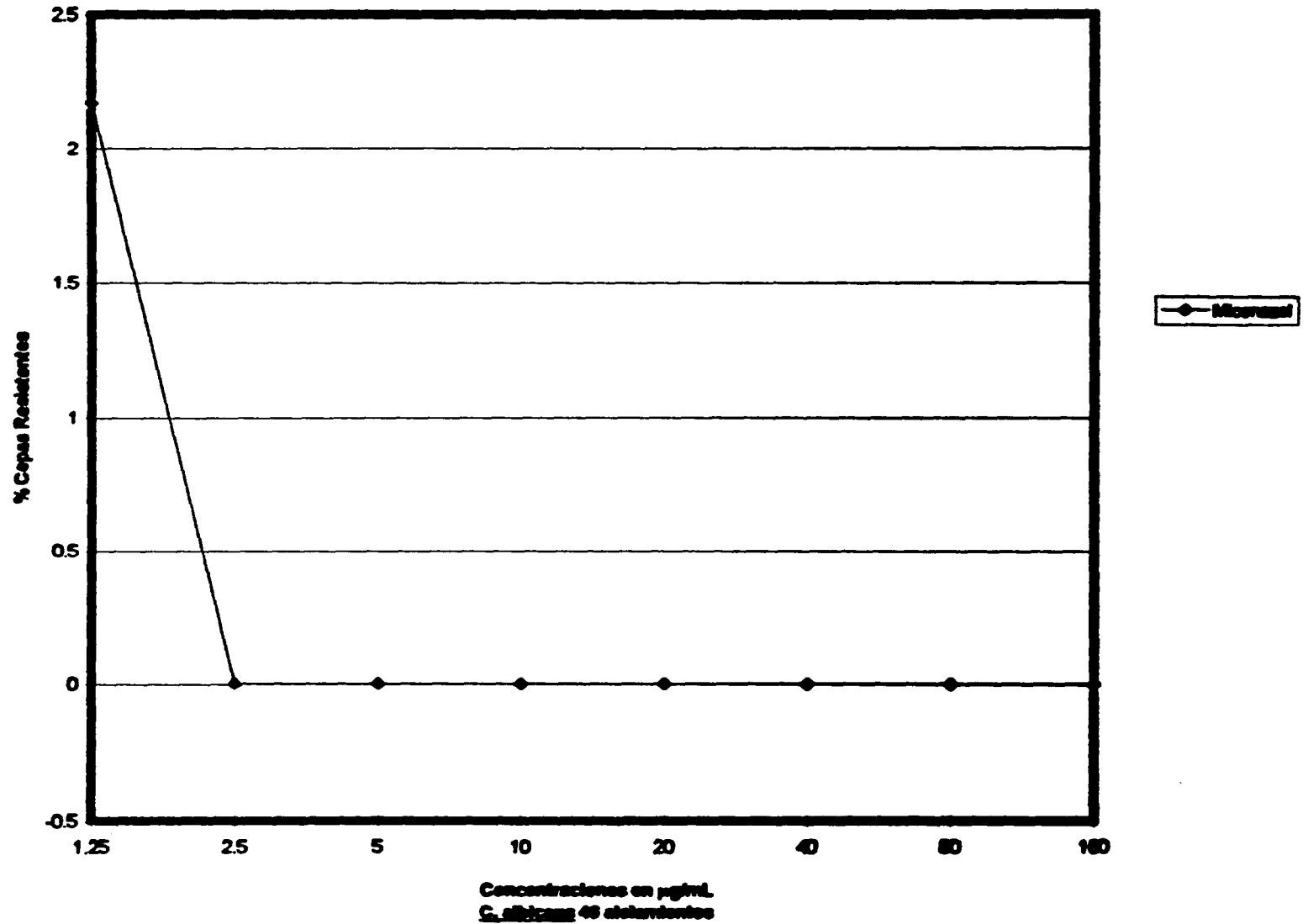


GRAFICA 12

Comportamiento de Candida glabrata al ketoconazol en YNB con laminilla siliconada pH 7.0

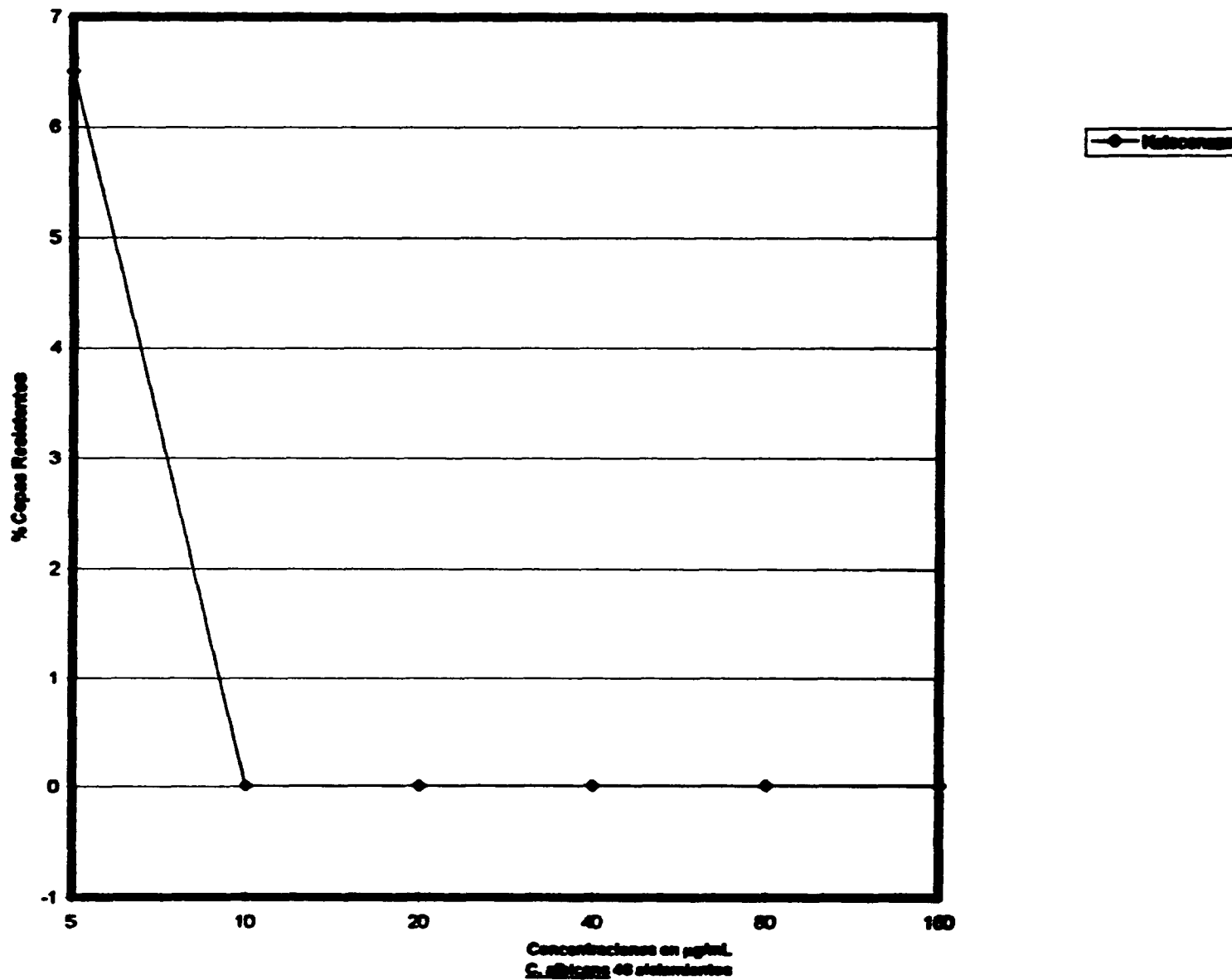


GRAFICA 13
Comportamiento de Candida albicans al miconazol en YNB con laminilla siliconada pH 7.0



GRAFICA 14

Comportamiento de Candida albicans al ketoconazol en YNB con laminilla siliconada pH 7.0



Por último el cuadro II resume los valores predictivos del MIC50 y MIC90 encontrados en los diferentes medios de cultivo, así como los MIC obtenidos en las cepas de referencia ATCC de C. albicans y C. glabrata.

Cuadro II
Comportamiento de *C. albicans* y *C. glabrata* al ketoconazol y miconazol en diferentes medios de cultivo.

Medio de Cultivo	<i>C. albicans</i>				<i>C. glabrata</i>				Cepas de Referencia
	Ketoconazol (µg/mL)		Miconazol (µg/mL)		Ketoconazol (µg/mL)		Miconazol (µg/mL)		
	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90	
Yeast morphology agar pH 6.5 <i>Candida glabrata</i> 12 aislamientos <i>C. albicans</i> 72 aislamientos	1.25 - 2.5	10 - 20	< 1.25	1.25 - 2.5	< 1.25	< 1.25	< 1.25	< 1.25	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 ketoconazol MIC 40 µg/mL miconazol 5 µg/mL <i>C. glabrata</i> ATCC 10238 ketoconazol MIC < 1.25 µg/mL miconazol < 1.25 µg/mL
Yeast morphology agar pH 4.4 <i>Candida glabrata</i> 9 aislamientos <i>C. albicans</i> 51 aislamientos	< 1.25	40-80	1.25 - 2.5	5-10µg/mL	10-20	40-80	< 1.25	< 1.25	<i>C. albicans</i> ketoconazol MIC > 40 µg/mL miconazol 5 µg/mL <i>C. glabrata</i> ketoconazol MIC > 40 µg/mL miconazol 5 µg/mL
Agar Sabouraud Glucosa pH 5.6 <i>Candida glabrata</i> 12 aislamientos <i>C. albicans</i> 72 aislamientos	12.5-15	> 15	< 5	< 5	> 15	> 15	< 5	< 5	<i>C. albicans</i> ketoconazol MIC > 15 µg/mL miconazol < 5µg/mL <i>C. glabrata</i> ketoconazol MIC > 15 µg/mL miconazol MIC 10 µg/mL
Yeast Nitrogen base pH 7.0 laminilla siliconada <i>Candida glabrata</i> 12 cepas <i>C. albicans</i> 46 cepas	< 5	< 5	< 1.25	< 1.25	< 5	< 5	< 1.25	< 1.25	<i>C. albicans</i> ketoconazol MIC 5 µg/mL miconazol 1.25 µg/mL <i>C. glabrata</i> ketoconazol MIC < 5 µg/mL miconazol MIC < 1.25µg/mL

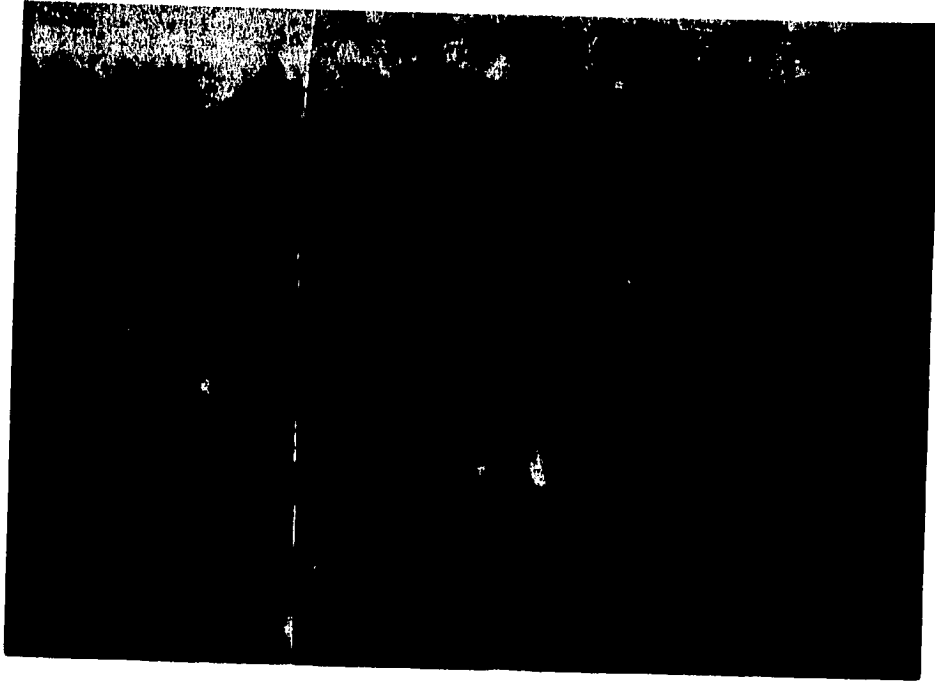


Fig. 1. Levaduras con Blastoconidios, pseudomicelio e hifas de C. albicans en exudado vaginal. Schiff, 320x.

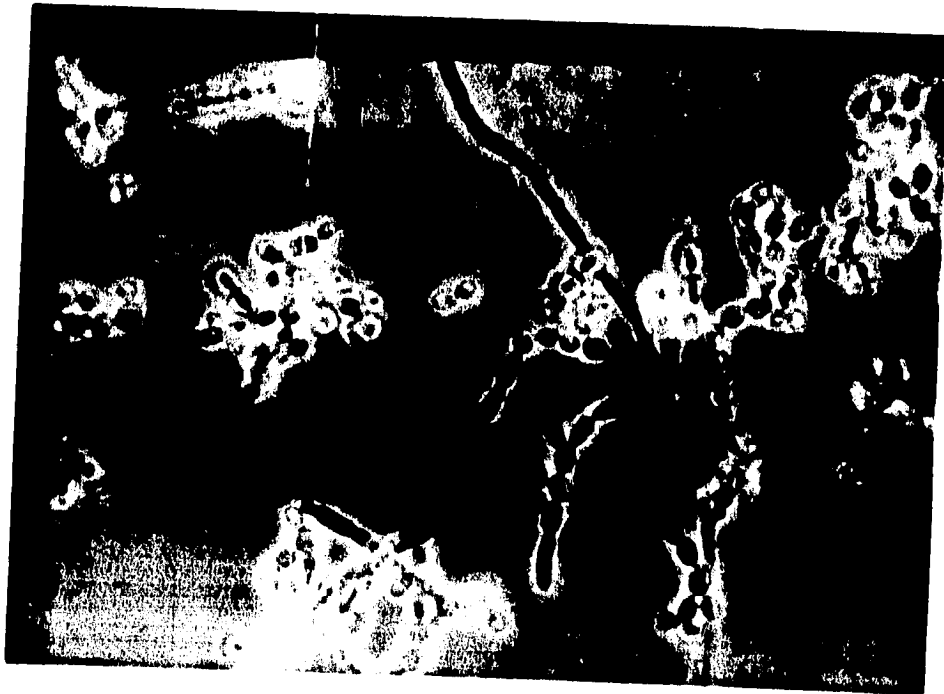


Fig. 2. Pseudo micelio e hifas en el género Candida. Contraste de fase (CF), 320x.

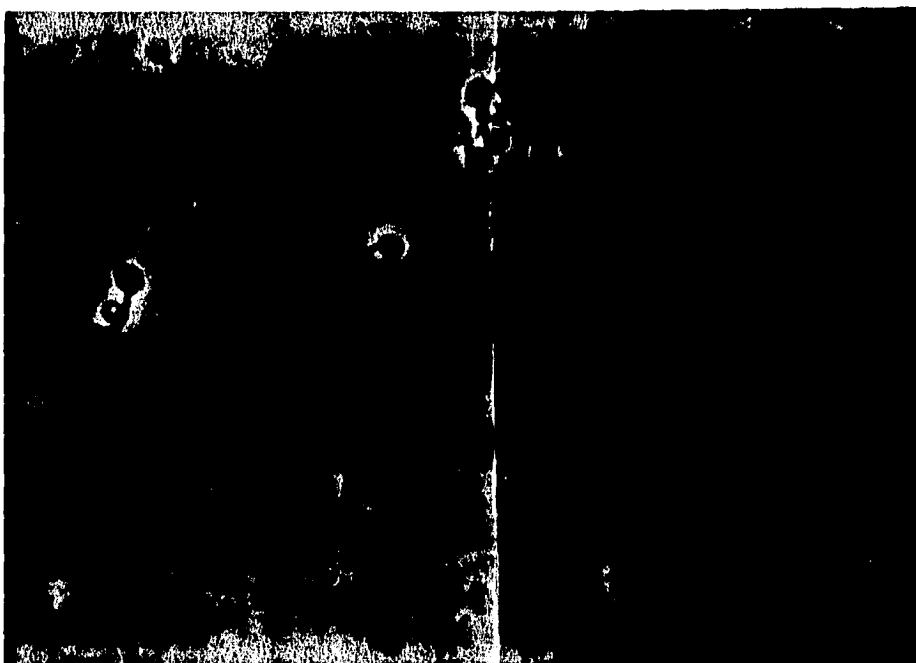


Fig. 3 C. albicans. Formación de tubo germinativo en suero humano. (CF), 320x.

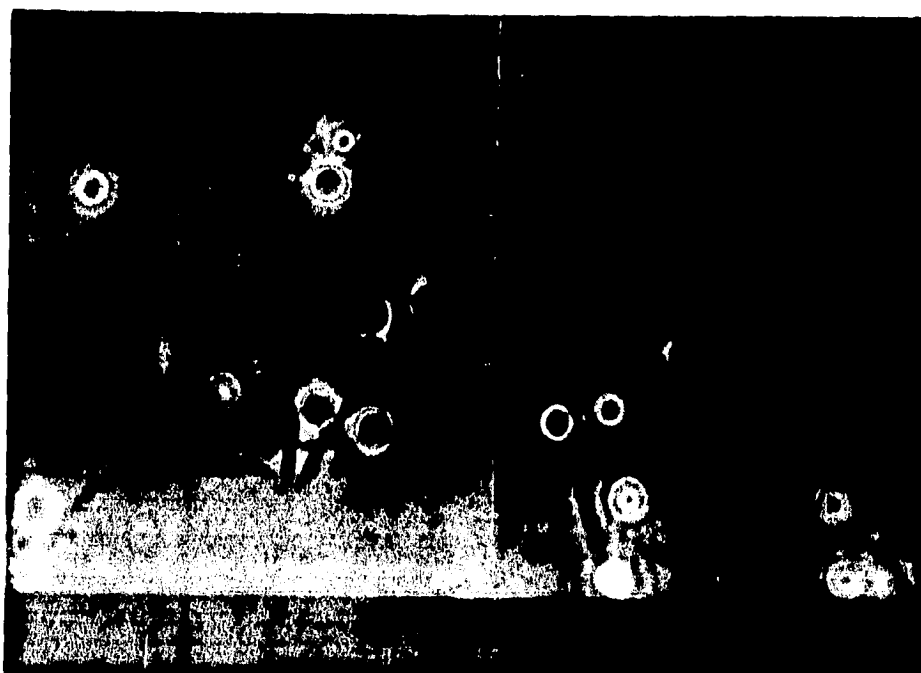


Fig. 4 C. albicans. Producción de clamidosporas en harina de maíz. (CF), 320x.

COMPORTAMIENTO DE *C. albicans* AL KETOCONAZOL. YEAST MORPHOLOGY AGAR, pH 6.5. REPLICADOR DE STEERS.

La primera placa corresponde a los testigos sin droga, mientras que la segunda incluye treinta dos cepas problema. La presencia de botón blanco en las cepas problema es indicador de resistencia, mientras que su ausencia se relaciona con susceptibilidad.

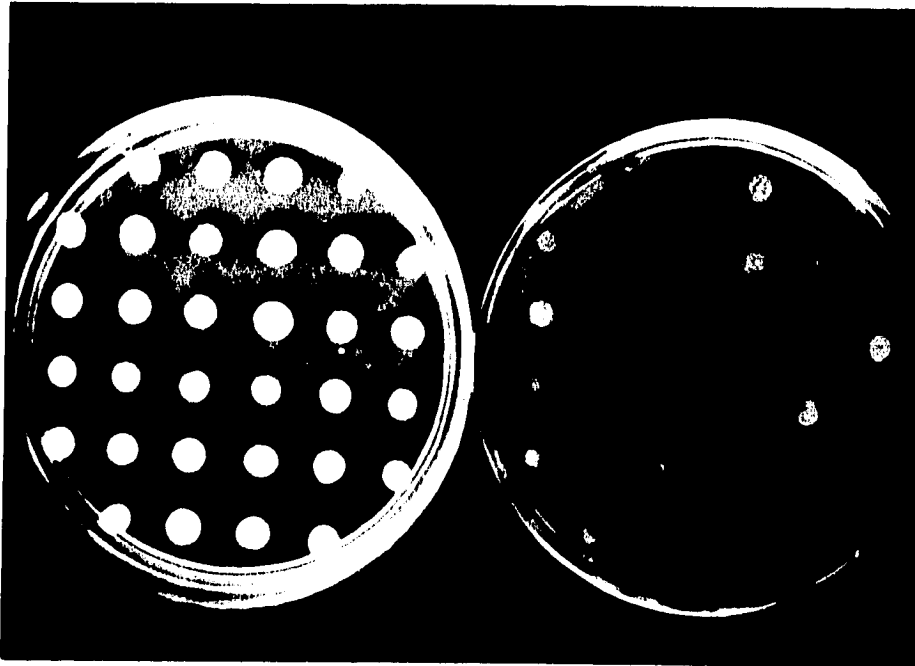


Fig. 5. Diecisiete cepas resistentes a 10 µg/mL.

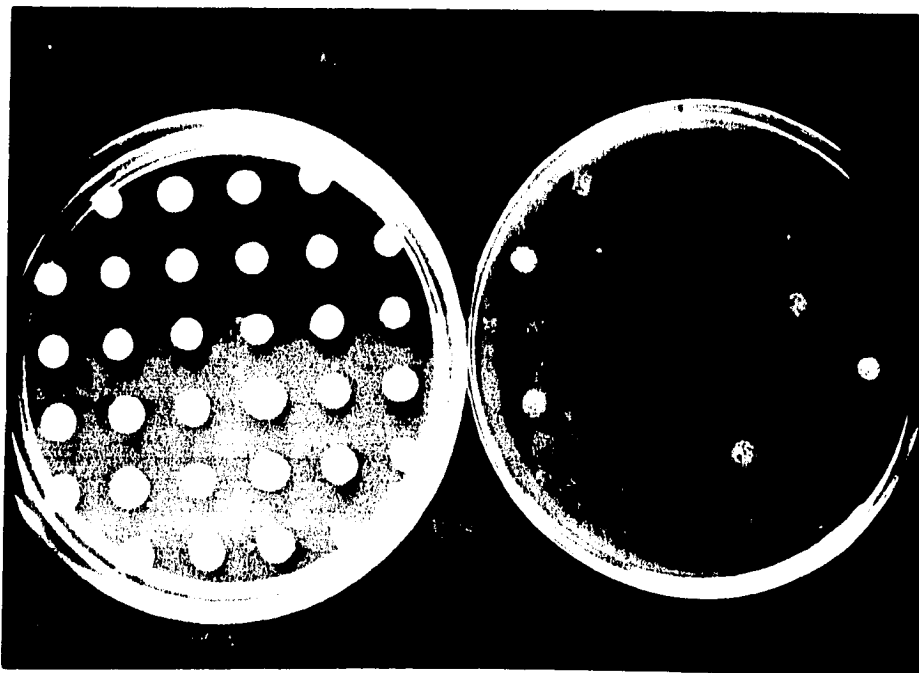


Fig. 6. Nueve cepas resistentes a 20 µg/mL.

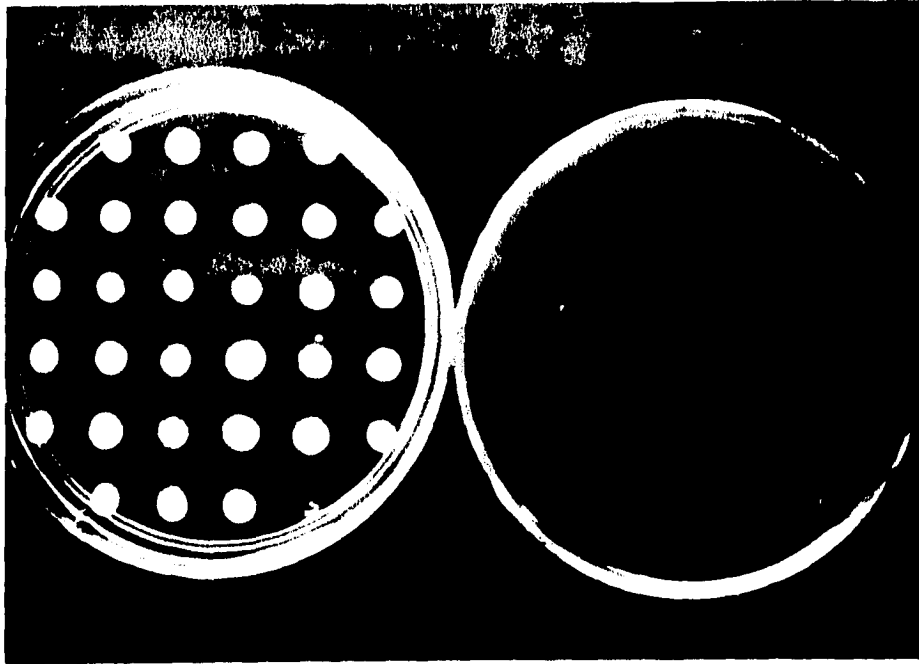


Fig. 7. Ninguna cepa resistente a 40 $\mu\text{g/mL}$.

COMPORTAMIENTO DE *C. albicans* AL MICONAZOL. YEAST MORPHOLOGY AGAR (YMA), pH 6.5. REPLICADOR DE STEERS.

La primer placa corresponde a los testigos sin droga mientras que la segunda incluye treinta y dos cepas problema. La presencia de botón blanco en las cepas problema es indicador de resistencia, mientras que su ausencia se relaciona con susceptibilidad.

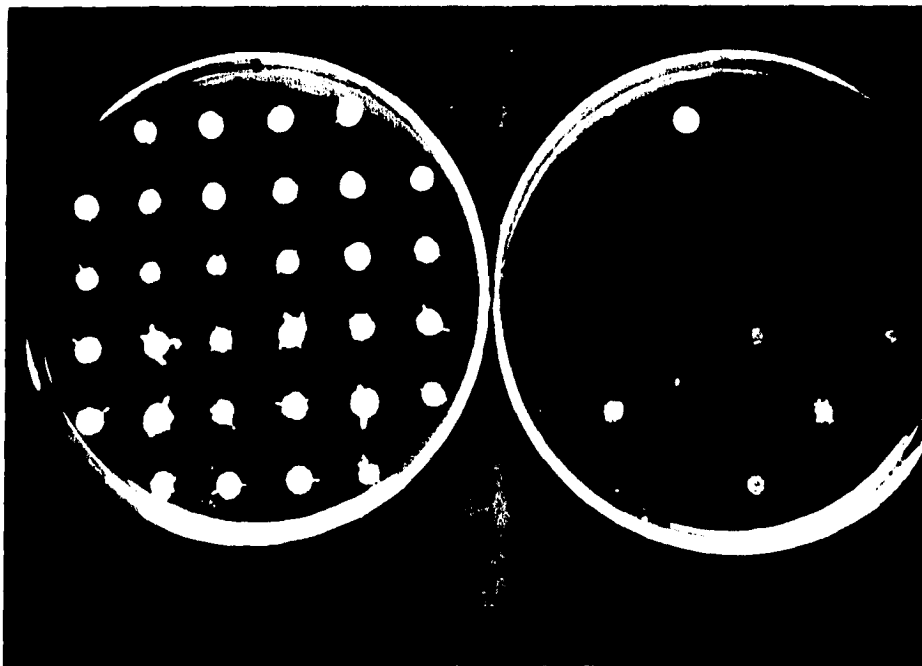


Fig. 8. Siete cepas resistentes a 1.25 $\mu\text{g/mL}$.

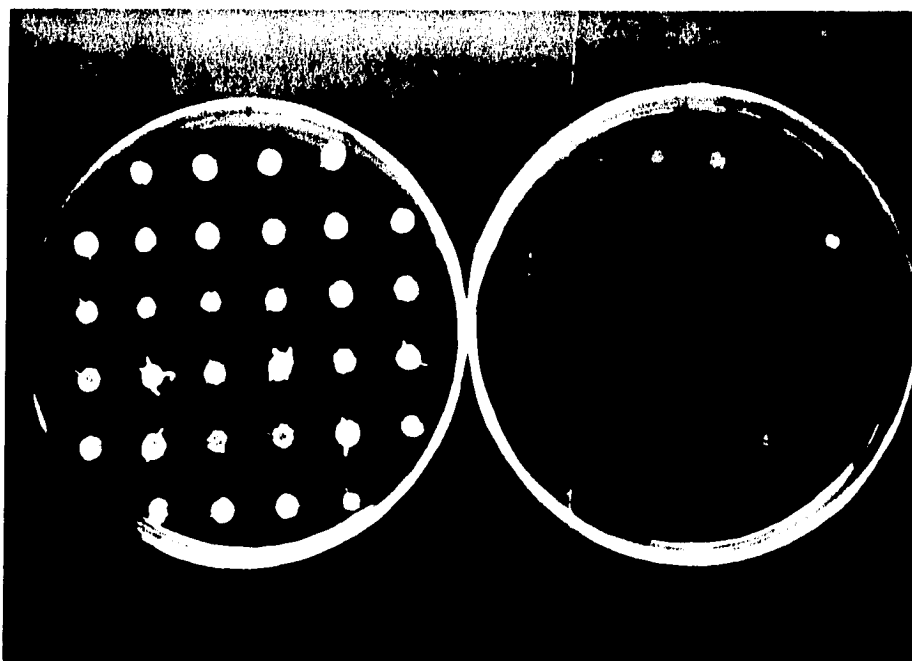


Fig. 9. Seis cepas resistentes a 2.5 µg/mL.

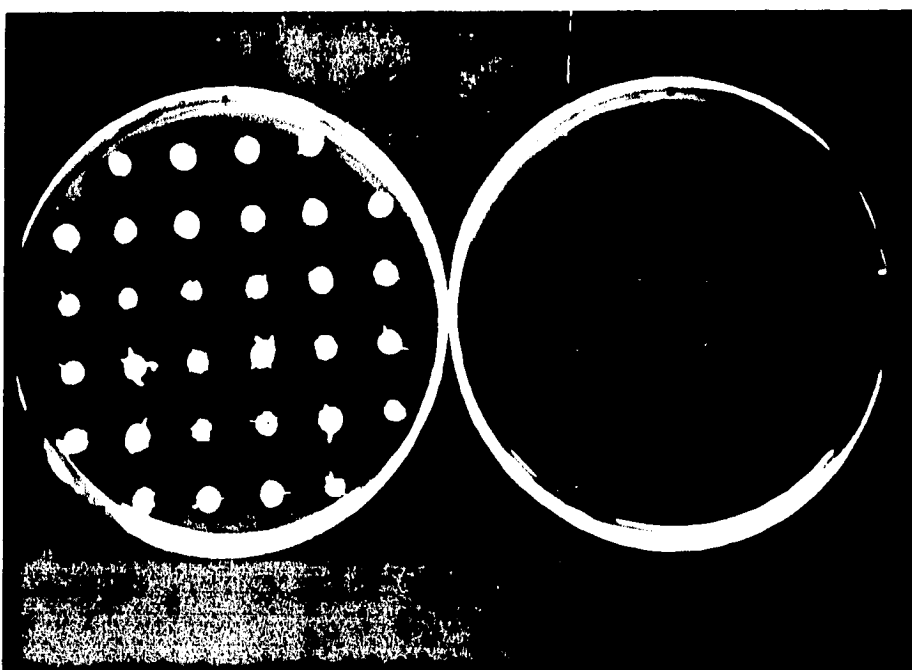


Fig. 10. Ninguna cepa resistente a 5 µg/mL.

COMPORTAMIENTO DE *C. albicans* AL KETOCONAZOL. AGAR SABOURAUD GLUCOSA, pH 5.6. REPLICADOR DE STEERS.

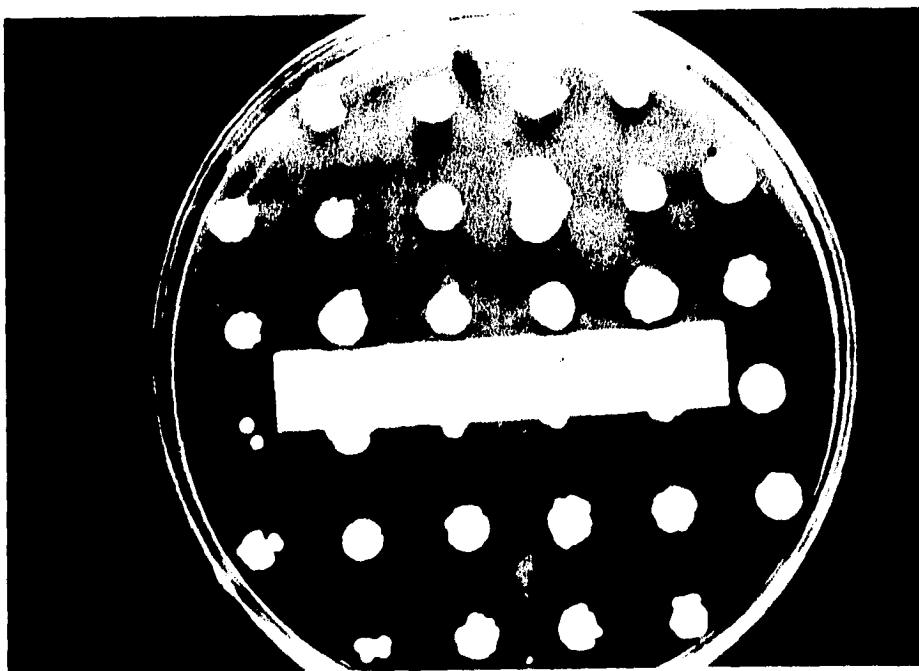


Fig. 11. Corresponde a la placa testigo que incluye treinta y dos cepas en el medio sin droga. Las figuras 12 y 13 exhiben concentraciones de 5 y 15 μg del fármaco. La presencia de botón blanco en las placas problema es indicador de resistencia, mientras que su ausencia se relaciona con sensibilidad.

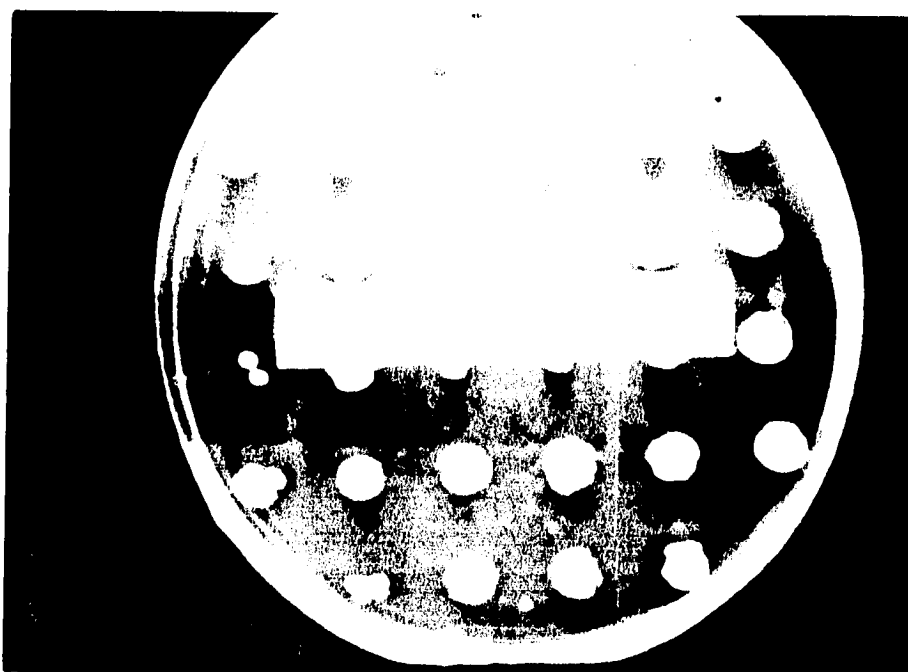


Fig. 12. Cinco cepas sensibles a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Fig. 13. Ocho cepas sensibles a 15 µg/mL.

COMPORTAMIENTO DE *C. albicans* AL MICONAZOL. AGAR SABOURAUD GLUCOSA, pH 6.5. REPLICADOR DE STEERS.



La figura 14 muestra la placa que incluye treinta y dos cepas problema. Las figuras 15 y 16, revelan concentraciones de 5 y 10 µg/mL. La presencia de botón blanco en las placas problema es indicador de resistencia, mientras que su ausencia se relaciona con sensibilidad.

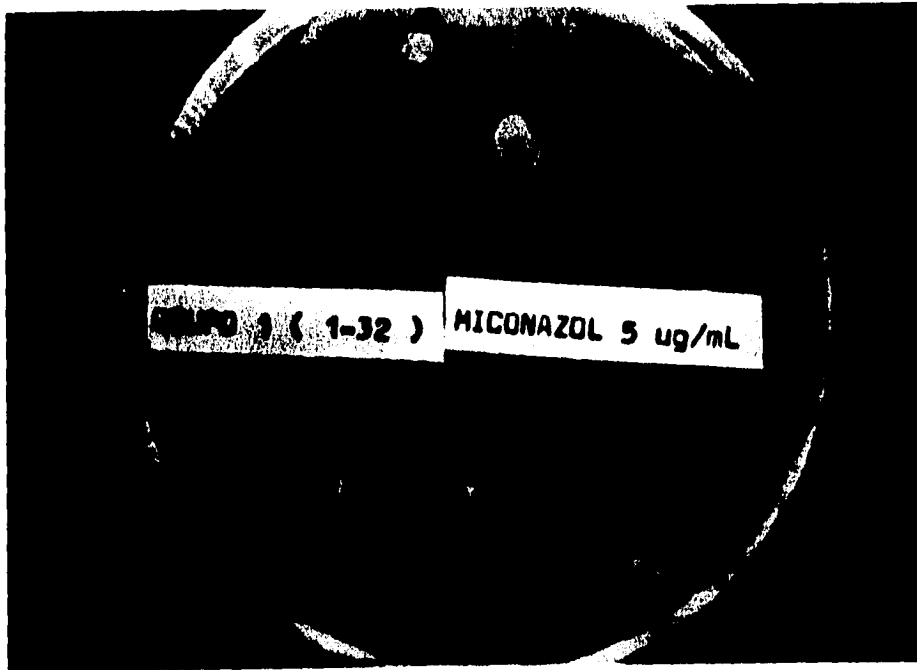


Fig. 15. Trece cepas resistentes a la concentración de 5 μ g/mL.

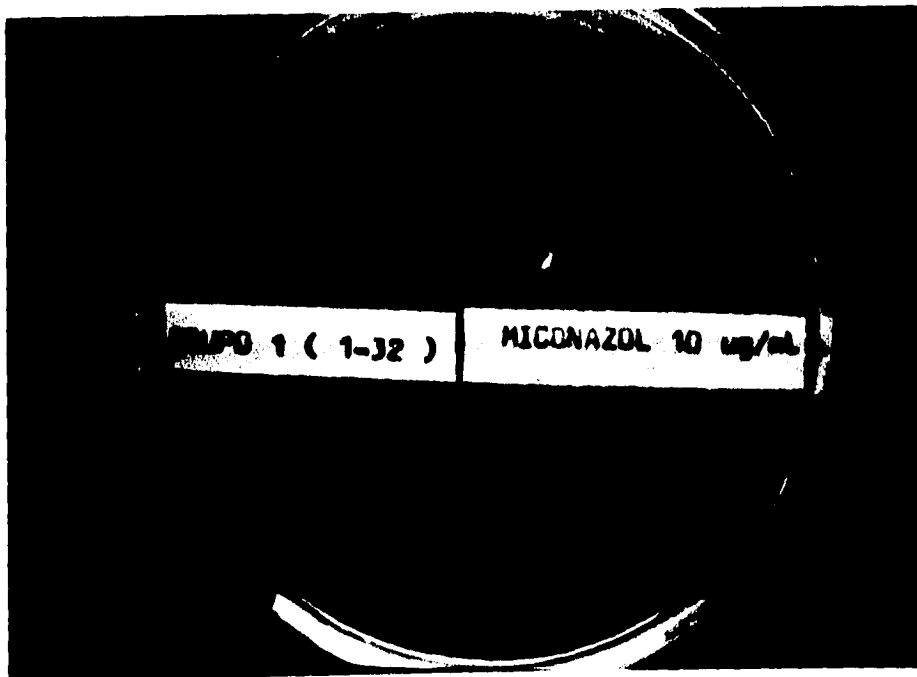


Fig. 16. Ninguna cepa resistente a 10 μ g/mL del fármaco.

COMPORTAMIENTO DE *C. albicans* AL KETOCONAZOL Y MICONAZOL. YEAST NITROGEN BASE (YNB), pH 7 LAMINILLA SILICONADA.

La presencia de turbidez o crecimiento en el fondo (botón blanco) es indicador de resistencia, mientras que su ausencia se relaciona con sensibilidad.

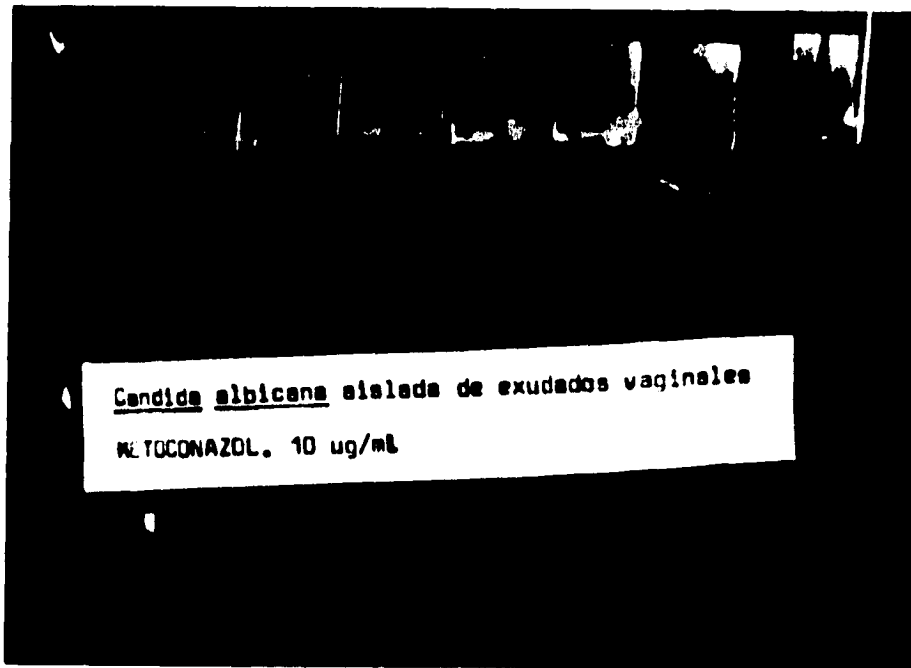


Fig. 17. Siete cepas resistentes a 10 µg/mL de ketoconazol. Una cepa sensible, primer tubo de izquierda a derecha.

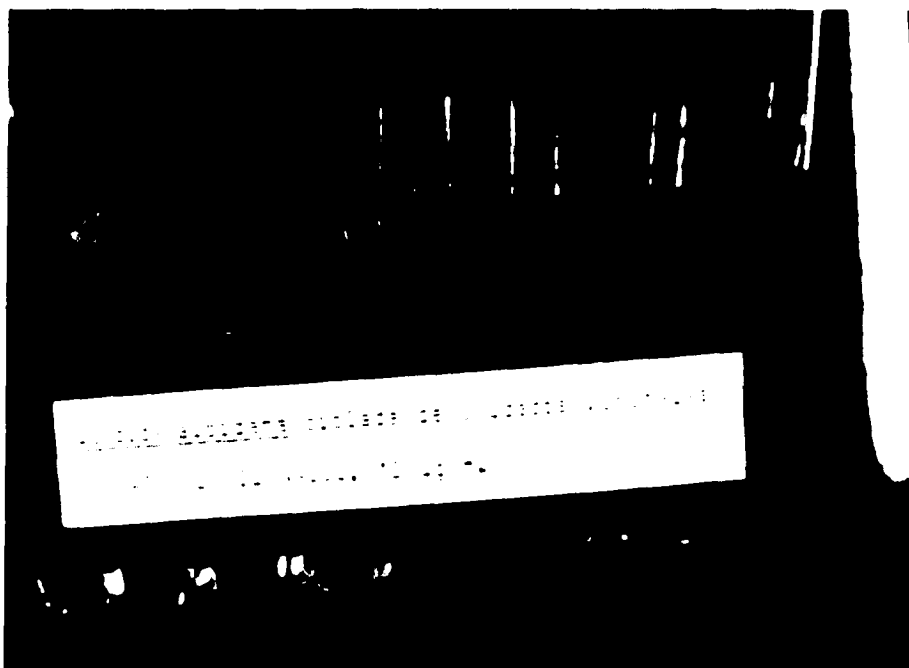


Fig. 18. Dos cepas resistentes a 10 µg/mL de miconazol (tubos 4 y 5). Seis cepas sensibles.

DISCUSIÓN.

El resultado global de un 20.84 % de vaginitis ocasionada por levaduras del género Candida coincide con los datos descritos por otros autores , que señalan alrededor del 25% en este tipo de pacientes (20).

Conviene destacar también el valor de los recursos de laboratorio en el diagnóstico de la vaginitis: El examen microscópico directo revela claramente los elementos parasitarios de estas levaduras y el cultivo complementa la observación microscópica, permitiendo además la identificación del agente causal. La observación con hidróxido de potasio al 20% tiene la ventaja de proporcionar resultados inmediatos, sin embargo tiene el inconveniente de formar abundantes artificios que pueden semejar elementos parasitarios levaduriformes. La coloración de las muestras evitan este problema. El Gram y de preferencia el Schiff revelan con claridad las levaduras, hifas y pseudomicelio en las muestras clínicas. Un examen microscópico positivo se relaciona con colonización del área afectada y apoya el diagnóstico de vulvovaginitis candidiásiaca cuando existe un cuadro sugestivo (9).

Es indispensable que sólo se examinen muestras recién obtenidas. No obstante que el número de muestras no parece afectar el diagnóstico, es conveniente que se utilicen varias muestras para cultivo.

Las levaduras del género Candida prácticamente crecen en cualquier medio de cultivo. Varios medios se recomiendan para el aislamiento directo (Agar Sabouraud, Agar Micosel, Agar Biggy). Las levaduras desarrollan a temperatura ambiente, pero el intervalo entre 28 y 37°C favorecen un mayor crecimiento (31).

Se ha sugerido que el número de levaduras presentes en las muestras clínicas es importante para confirmar el diagnóstico de candidiasis. Casi siempre existe relación entre el examen microscópico y un cultivo positivo. Los dos recursos de laboratorio aportan información útil en el manejo de la vulvovaginitis.

Referente a la etiología las especies encontradas; C. albicans (85.71%) y C. glabrata (14.28%) son las de mayor importancia (20), y el hecho de no haber aislado otras especies coincide con la baja frecuencia de estas reportada por otros autores (33).

La identificación de los cultivos no implica mayores dificultades, ya que es muy clara la morfología que despliegan los cultivos y además, la formación de tubo germinativo y clamidosporas son características constantes en C. albicans, mientras que la asimilación y fermentación de glucosa y trealosa lo son en C. glabrata.

Respecto a los antimicóticos utilizados conviene señalar que si bien existen varios solventes, la mayoría de las soluciones con el agua tienden a precipitarse.

En el caso del miconazol (16) se ha descrito buena estabilidad en agua destilada, sin embargo el metanol al 10% utilizado como mejor solvente, sólo permite conservar las soluciones de trabajo a -70°C ó -20°C durante una semana. En este estudio los tres medios de cultivo utilizados; YMA, YNB y ASG no exhibieron alteraciones al agregarles las soluciones de trabajo de los dos antimicóticos.

Referente a la actividad "in vitro" exhibida por los dos imidazoles, el miconazol presenta mejor actividad que el ketoconazol. Existe mayor susceptibilidad en los aislamientos de C. glabrata que en C. albicans. Los valores de MIC 50, y MIC 90 al ketoconazol y miconazol en medio sólido (YMA, pH 6.5) están por abajo de 1.25 µg /mL. En el caso de miconazol coinciden estos valores con los encontrados en medio líquido (YNB), excepto en el ketoconazol, donde los valores de MIC50 y MIC 90 aumentan 2 diluciones para estar entre 2.5 y 5 µg /mL.

Este aumento en la concentración mínima inhibitoria (MIC) en el ketoconazol esta en relación con la disminución de la actividad de la sal cuando se utilizan medios líquidos (34). Estos valores están por abajo de los descritos por Dixon et al. (7) que señalan con miconazol una dosis media de inhibición de 19.7 µg/mL, para C. albicans y 9.19 µg/mL para C. glabrata.

El número de aislamientos en estos estudios es determinante, así como el método y factores reconocidos que afectan las pruebas de susceptibilidad. Gordon et al (11) encontraron un intervalo de MIC para C glabrata de 0.039 a 0.625 µg/mL con ketoconazol, mientras que con miconazol el intervalo se extendía de 0.039 a 1.25 µg/mL. En C. albicans los MIC encontrados fluctuaron entre 0.002 y 20 µg /mL para ketoconazol y son más altos para miconazol (0.004 - 40 µg/mL).

Nuestros resultados en C. glabrata son muy similares, pero en C. albicans, encontramos mejor actividad con el miconazol, mientras que las mayores variaciones ocurren con ketoconazol, donde el MIC 90 encontrado en 72 aislamientos estuvo entre 10 y 20 µg/mL.

En un estudio con el mayor número de aislamientos de C. glabrata (28) encontraron un intervalo de MIC 50 y 90 entre 0.025 y 0.10 µg/mL para miconazol y 0.20 a 0.78 µg/mL para ketoconazol. En C. albicans el MIC 50 y el MIC90 tuvieron el mismo valor de 0.025 µg/mL, sin embargo como ya señalamos, la falta de un método estándar en las pruebas de susceptibilidad origina grandes variaciones en los MIC obtenidos en los diferentes estudios para C. albicans y C. glabrata.

Existen diferencias marcadas al utilizar medio de cultivo con y sin buffer, así como también variaciones en el pH. La disminución del pH origina incrementos importantes en los MIC de casi todos los aislamientos de C. albicans y C. glabrata. Los cambios del pH afectan más la actividad del ketoconazol que la del miconazol, los datos son concluyentes y confirman el uso indispensable de un buffer en las pruebas de susceptibilidad. El buffer de fosfato monopotásico no es la solución recomendada en la actualidad, sin embargo es el que mayor capacidad reguladora tiene y además es una sal común y de fácil disponibilidad en los laboratorios.

Es conveniente señalar que al utilizar este buffer con el medio YMA, ocurre precipitación del medio a pH 7.0 y 7.4, sin embargo, al disminuir el pH a 6.5 se evita este problema ya que este valor del pH se ajusta muy bien al intervalo recomendado para las pruebas de susceptibilidad (20).

El uso del replicador de Steers tiene grandes ventajas cuando se tiene una carga de trabajo elevada, sin embargo uno de los factores que probablemente más interfiera en la prueba es que los inóculos en las placas de acero permanecen en condiciones estacionarias mientras se realiza la prueba.

El uso de testigos antes y al terminar la prueba garantiza su validez, sin embargo la prueba requiere un tiempo considerable en su ejecución y no es conveniente incluir más de una placa por día. Los resultados obtenidos por este método confirman las variaciones importantes que ocurren durante el tiempo de incubación (2).

Es conveniente señalar que los aislamientos de C. glabrata requieren mayor tiempo de desarrollo y es necesario que la lectura se realice a las 48 horas. El uso de cepas de referencia en las pruebas de susceptibilidad es fundamental debido a que es probable la reproducibilidad de resultados en los diferentes laboratorios. En los últimos años la mayoría de los laboratorios han destacado su importancia, pero desafortunadamente su uso no se ha generalizado. Los valores de referencia disponibles de MIC no incluyen las cepas utilizadas en este trabajo.

Los MIC encontrados para C. glabrata ATCC 10238 coinciden con los registrados en la literatura para miconazol y ketoconazol (34). En este estudio los MIC 50 y 90 están por abajo de 1.25 µg/mL en los dos imidazoles, mientras que los valores en la literatura para ketoconazol están entre 1 y 64 µg/mL, y para miconazol entre 0.5 y 10 µg/mL.

Un dato importante es que los MIC en medio líquido y sólido fueron semejantes en miconazol, mientras que en ketoconazol inesperadamente fueron más altos. Estos valores pudieran tener relación con el tamaño del inóculo (3) que fue mas alto en medio líquido y también que los azoles tienden a presentar alteraciones mientras más diluidas estén las sales (8).

En relación a la comparación del medio de cultivo, las variaciones encontradas confirman que el Agar Sabouraud Glucosa no es un medio adecuado para realizar pruebas de susceptibilidad con antimicóticos, este hecho ya citado por algunos autores (34) parece afectar mas las pruebas con ketoconazol que con miconazol, y las variaciones tanto en C. albicans como en C. glabrata originan cambios importantes en los MIC.

Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad demuestran una mejor actividad del miconazol ya que, los aislamientos estudiados de C. albicans y C. glabrata no presentan MICs elevados y aparentemente no existen cepas resistentes aunque en la literatura existan ya registros de resistencia (29).

En México prácticamente no se dispone de estudios al respecto y los datos existentes (32) señalan una media de MICs muy baja tanto para miconazol como ketoconazol. Los resultados encontrados en Ketoconazol señalan una menor actividad en los aislamientos de C. albicans.

Los valores encontrados sugieren que no se trata de resistencia adquirida, sino más bien son valores relacionados a una resistencia natural de especie, ya que algunas cepas aisladas antes del uso de los imidazoles presentan MIC también elevados.

No obstante conviene señalar que el MIC90 para medio sólido para los 72 aislamientos de C. albicans fluctúa entre 10 y 20 µg/mL. y en medio líquido fue menor de 5 µg/mL. Estos valores no distan mucho de la concentración sérica, promedio del ketoconazol que es de 4 -6 µg/mL (37) por lo que estos resultados descartarían la aparición de resistencia adquirida en nuestros aislamientos.

CONCLUSIONES.

Por último consideramos destacar las siguientes conclusiones:

- 1. Las pruebas de susceptibilidad son necesarias para evaluar la actividad "in vitro" de los antimicóticos. En este estudio las pruebas en agar y medio líquido demuestran una mayor actividad del miconazol sobre el ketoconazol.**
- 2. El pH de los medios de cultivo interfiere con la actividad "in vitro" de los antimicóticos: El intervalo de 4.4 a 5.6 origina una disminución en la actividad del miconazol y ketoconazol, mientras que el intervalo de entre 6.5 y 7.0 exhibe los mejores resultados.**
- 3. Los medios de cultivo complejos como el Agar Sabouraud Glucosa interfieren en la actividad de los imidazoles. Los medios de cultivo sintéticos son los más adecuados para estas pruebas. Los medios con agar revelan resultados reproducibles, mientras que los medios líquidos disminuyen la actividad del ketoconazol pero no del miconazol.**
- 4. El uso de una laminilla siliconada como soporte de un inóculo constante en medios líquidos aporta gran utilidad. Facilita la interpretación de resultados y permite hacer estudios de los cambios morfológicos que originan los antimicóticos en las levaduras.**

5. En este estudio los aislamientos de Candida glabrata fueron más susceptibles al miconazol y ketoconazol que los de C. albicans no se encontró ninguna cepa resistente al miconazol o ketoconazol en 72 aislamientos de C. albicans y 12 de C. glabrata. La concentración mínima inhibitoria promedio (MIC 50 y MIC 90) para ambas especies en los dos antimicóticos fue menor de 1.25 µg/mL. Esta concentración queda por abajo de las concentraciones en suero que alcanzan ambos antimicóticos (2 - 6 µg/mL).

APÉNDICE.

Agar Sabouraud Glucosa

Glucosa	40.0 g
Peptona	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 L
pH final	5.6

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Hidratar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar, agitando frecuentemente hasta la disolución completa del agar. Distribuir en tubos de ensaye, siete mL del medio, esterilizar a 118°C (no más de 15 lbs. de presión) durante 15 minutos.

Agar Harina de Maíz Tween 80 Azul de Tripano.

Harina de Maíz	20.0 g
Tween 80	5.0 mL
Azul tripano en sol. al 0.5%	0.5 mL
Agar	10.0 g
Agua destilada	500.0 mL

Colocar la harina de maíz en un matraz Erlenmeyer y agregar lentamente el agua destilada con agitación constante.

Llevar a baño María a 65 °C durante una hora: Filtrar, adicionar el agar, el tween 80 y el azul de tripano. Disolver el agar por calentamiento y esterilizar el medio a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar el medio aproximadamente a 45 °C y en condiciones estériles, distribuir en cajas de petri en cantidades de 25 mL.

Agar Biggy

Citrato de amonio y bismuto	5.0 g
Sulfito de sodio	3.0 g
Dextrosa	10.0 g
Glicina	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	16.0 g
Agua destilada	1.0 L

Disolver los componentes en el agua destilada y calentar hasta llegar a ebullición, no más de un minuto. Dejar enfriar el medio (45 a 50°C) y distribuir en cajas de petri en cantidad de 20 mL. No esterilizar en autoclave.

Yeast Nitrogen Base.

Sulfato de amonio	5.0 g
Fosfato Monopotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Cloruro de sodio	0.1 g
Cloruro de calcio	0.1 g
DL-metionina	20.0 mg
DL-tryptofano	20.0 mg
L-Clorhidrato de histidina	10.0 mg
Yoduro de potasio	0.1 mg
Inositol	2,000.0 µg
Ácido bórico	500.0 µg
Sulfato de zinc	400.0 µg
Sulfato de manganeso	400.0 µg
Clorhidrato de tiamina	400.0 µg
Clorhidrato de piroxydina	400.0 µg
Niacina	400.0 µg
Pantotenato de calcio	400.0 µg
Ácido p-aminobenzoico	200.0 µg
Riboflavina	200.0 µg
Cloruro férrico	200.0 µg
Molibdato de sodio	200.0 µg

Sulfato de cobre	40.0 µg
Ácido fólico	2.0 µg
Biotina	2.0 µg
Agua destilada	1 L

Esterilizar por filtración y distribuir en tubos de 14x15 mM en cantidades de 4.5 mL.

Agar Gorodkova

Glucosa	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 L

Disolver por calentamiento, envasar 5.7 mL en tubos de 16x 150 mM y esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

Agar Micosel

Peptona	10.0 g
Glucosa	10.0 g
Agar	15.5 g
Ciclohexamida	0.4 g
Cloranfenicol	0.05 g
Agua destilada	1L
pH final	6.9

Los componentes del medio ya sea por reactivos individuales o por mezclas comerciales (Difco, Bioxon, Merck), deben disolverse completamente en agua destilada, calentando la solución. Distribuir el medio en los recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

KOH al 20%

Hidróxido de potasio	20.0 g
Agua destilada	100.0 mL

Tinción de Gram

Solución A, cristal violeta de Hucker:

Cristal violeta (90% de pureza)	2.0 g
Alcohol etílico, 95%	20.0 mL

Solución B.

Oxalato de Amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 g

Mezclar las soluciones A y B Guardar en un frasco durante 24 horas y filtrar a través de papel filtro.

Solución de lugol de Gram.

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 mL

Colocar el yoduro de potasio en un mortero, agregar el yodo y realizar la molienda por espacio de 5-10 segundos. Agregar un mL. de agua y proseguir triturando, después añadir 5 mL más de agua destilada y continuar la molienda por último agregar 10 mL de agua destilada. Colocar el reactivo en un frasco. Enjuagar el mortero y el pistilo con agua destilada hasta finalizar el volumen total de los 300 mL.

Colorante de contraste o solución patrón

Safranina	2.5 g
Alcohol etílico, 95%	100.0 mL

Disolver el colorante en un mortero, dejar 24 horas en reposo y filtrar. Para su uso adicionar 10 mL de solución patrón a 90 mL de agua destilada, mezclar y guardar en un frasco gotero.

Procedimiento de Coloración.

- 1. Secar la muestra al aire y fijarla por calor, pasándola ligeramente por la flama de un mechero 3 ó 4 veces.**
- 2. Colorear la laminilla con la solución de cristal violeta oxalato de amonio durante un minuto, lavar brevemente con agua de la llave por no más de 5 minutos.**
- 3. Aplicar la solución de lugol de gram durante un minuto, después lavar con agua de la llave.**
- 4. Decolorar con alcohol etílico al 95 %, hasta observarse un color azul uniforme sobre la superficie del portaobjeto. Aproximadamente 30 segundos.**
- 5. Lavar, secar el exceso de agua aplicar el colorante de contraste de safranina, por un minuto.**
- 6. Lavar y secar al aire, observar al microscopio con objetivo de inmersión.**

Técnica del ácido peryódico de Schiff (PAS)

Reactivo de Coleman-Feulgen.

Disolver un gramo de fucsina básica en 200 mL de agua destilada caliente y llevar a punto de ebullición. Enfriar y agregar 2 g de metabisulfito de potasio y 10 mL. de ácido clorhídrico normal. Tapar el recipiente y dejar decolorar 24 horas. Agregar 0.5 g de carbón activado, agitar un minuto y filtrar. Repetir las filtraciones hasta que la solución no presente color. Guardar en el refrigerador.

Solución de ácido clorhídrico Normal.

Ácido clorhídrico 37 %, densidad 1.19	8.35 mL
Agua destilada	91.65 mL

Solución de verde luz al 0.2 %

Cristales de verde luz	0.2 g
Agua destilada	100.0 mL
Ácido acético glacial	0.2 mL

Procedimiento

1. Fijar los frotis (exudado e improntas) al calor. En caso de cultivo en laminilla o porta objetos, agregar metanol como fijador con un tiempo de exposición de uno a dos minutos y escurrir la laminilla.
2. Cubrir con ácido peryódico durante cinco minutos (oxidante).
3. Lavar en agua de la llave.
4. Agregar solución de Coleman-Feulgen por 15 minutos.
5. Lavar al chorro del agua de la llave, hasta desarrollo de un color rosa, si la laminilla presenta un color intenso, decolorar ligeramente con una solución de cloro al 5%.
6. Pasar a la solución de verde luz durante unos pocos segundos.
7. Lavar con agua de la llave y dejar secar para su observación microscópica.
8. Si se quiere tener una preparación permanente, después de lavar con agua, hacer pases seguidos en alcohol de 70, 85 96 y absoluto.
9. Hacer un pase en xilol y montar con resina sintética o nalgeno.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Añorve, H.N. 1986. Incidencia de la Candidiasis tegumentaria en los padecimientos dermatológicos. Tesis, Tec. laboratorista clínico.(C.E.C.yT.) I.P.N. México D.F.
2. Brass C, Shainhouse Z. J, Stevens A.D. 1979. Variability of agar dilution-replicator method of yeast susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother. 15: 763-768 pp.
3. British Society for Antimicrobiol chemotherapy working party. 1991 Laboratory monitoring of antifungal chemotherapy. The lancet. 337: 1577- 1580 pp.
4. Contreras P.C, H. H Shibayama, P.A. Collazo. 1994. Manual de técnicas de laboratorio, Volumen II: Micología, Parasitología e Inmunología. Secretaría de Salud, México: mic 12,82,85-6 pp.
5. Crislip A.M y E.J Edwards. 1989. Candidiasis. Infectious Disease Clinics of North America 3: 103-113 pp.
6. Del Río E.C. 1994. Catálogo de Colecciones de Cultivos Microbianos .Centro Nacional de Cultivos Microbianos (CENACUMI) Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiología. S. S. A. México.
7. Dixon D, Shadomy S, Shadomy H J, Espinel-Ingroff A, Kerkering MT. 1978. Comparison of the in vitro antifungal activities of miconazole and a new imidazole, R41, 400. The journal of Infectious Diseases. 138: 225-248 pp.
8. Drutz, D.J. 1987. In vitro antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. Reviews of Infectious Diseases. 9: 392-397 pp.
9. Friedrich ,G. E.1985 Vaginitis. American Journal of Obstetrics and Gynecology .152: 247-251 pp.
10. Galask, P. R.1988 Vaginal colonization by bacteria and yeast. Am. J. Obstet. Gynecol. 152: 993-995 pp.
11. Gordon A. M, Lapa W E, Passero G .P.1988. Improved method for azole antifungal susceptibility testing J. Clin. Microbiol. 26:1874-1877 pp.
12. Hanlin, T. R, Ulloa, M. 1978. Atlas de Micología Básica. Concepto. México. XIII pp.
13. Henry C . J.1984. Ketoconazole. Dermatologic Clinics. 2: 121-128 pp.
14. Herrera T, M. Ulloa. 1990. El Reino de los hongos Micología básica aplicada. Fondo de Cultura Económica. México .24 pp.

15. Higaschi K, Tsukuma, Naito M. 1962. Silicone coated slide culture method for tubercle bacilli. Am. Rev. of Resp. Dis. 85: 392-397 pp.
16. Hoeprich, D. P, C. A. Huston .1978. Stability of four antifungal antimicrobics in vitro. Journal of Infectious Diseases. 137: 87-90 pp.
17. Holt R.J, A. Azmi. 1978. Miconazole-Resistant Candida. The Lancet. 7: 50-51 pp.
18. Kwon-Chung, K.J, J.E. Bennett. 1992. Medical Micology. Lea & Febiger. USA. 280-336 pp.
19. Mac kerrow ,D. S ,M.J.Merry ,D.P. Hoeprich .1987. Effect of buffers on testing Candida species susceptibility to Flucytosine. J. Clin. Microbiol. 25: 885-888 pp.
20. Mc kay, M.1988. Cutaneous manifestations of candidiasis. Am. J. Obstet. Gynecol. 158: 991-993 pp.
21. Moore-Landecker, E. 1990. Fundamentals of Fungi. Prentice Hall Inc. USA. 1-21 pp.
22. Negroni R. 1986. Proceeding of the VI International Conference on the Mycoses. Panamerican Health Organization. Scientific Publication (479) 149-155 pp.
23. Odds F.C. 1993. Resistance of yeast to azole derivative antifungals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 31: 463-471 pp.
24. Pfaller A. M, Bale M, Buschelman M, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex H.J., Rinaldi G.M. 1994. Selection of Candidate Quality Control Isolates and Tentative Quality Control Ranges for In Vitro Susceptibility Testing of Yeast Isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards Proposed Standard Methods. Journal of Clinical Microbiology. 32 (7): 1650-1653 pp.
25. Poirier, S,P. Auger ,J. Joly , M. Steben .1990. Interest of biotyping Candida albicans in chronic vulvovaginitis. Mycoses 33: 24-28 pp.
26. Raja Babu K. K .1982. In vitro susceptibility of Basidiobolus haptosporus and other zygomycetes to ketoconazole. Mycosen. 25: 439-441 pp.
27. Ramirez M.L, G.E. García, M.A. Pérez, J.I. Santos. 1993. Susceptibilidad "in vitro" de cepas de Candida aisladas de muestras clínicas a fluconazol y anfotericina B. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Año 13 vol. 13 No 6: 393 pp.
28. Redondo-Lopez, V, Lynch, M, Schmitt C, Cook R, Sobel, D.J. 1990. Torulopsis glabrata vaginitis: Clinical aspects and susceptibility to antifungal agents. Obstetrics and Gynecology. 76: 651-655 pp.
29. Rex H.J, A. Pfaeller, A.M Rinaldi, G.M Polak, A.N Galgiani. 1993. Antifungal susceptibility testing. Clin. Microbiol. Rev. 6: 3667-3681 pp.

30. Richardson D.M, W.D. Warnock. 1993 Fungal Infectious Diagnosis and Management. Blacwell Scientific Publications.U.K. 32-36 pp.
31. Rippon, J. W.1990. Tratado de Micología Médica. Interamericana. México. 574-628 pp.
32. Rodríguez, A. M. Pizaña, A, Welsh, O. 1993. Susceptibilidad de cepas de Candida albicans de patologías diversas a anfotericina B, ketoconazol, miconazol e itraconazol. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 13: 394.
33. Robertson, H. W. 1988. Mycology of vulvovaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 158: 989-991 pp.
34. Shadomy S, Pfaeller M A. 1991 Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and quantitation in body fluidsIn: Balons A (ed). Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press., 1173-1183 pp.
35. Shawar, R, Paetznick V, Witte Z, Garsney E L, Anaissie E, Larocco M.1992. Collaborative investigation of broth microdilution and semisolid agar dilution for in vitro susceptibility testing of Candida albicans. J Clin. Microbiol. 30: 1976-1981 pp.
36. Shibayama, H. H, Contreras, P. C, Collazo, P. A, Alvarado, A. F.1994. Microcultivo de dermatofitos en laminillas siliconadas. Bol. Med. Hosp. Infant. 51 (6) 403-406 pp.
37. Van Cutsen, J, Borgers, M, De Brabander, M. 1981. The activity of ketoconazole on clinical isolates of Candida albicans in a mycelium promoting medium. Mycosen. 24: 596-602 pp.
38. Welsh L.O. 1982. Ketoconazol en Micosis Superficiales y Profundas dos años de evaluación Clínica. Rev Arg. de Micología 5 (2) 14-18 pp.