



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Determinación de la sensibilidad a antifúngicos de *Candida albicans*,
obtenidas a partir de muestras clínicas vaginales.

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Presenta:

Norma Angélica Aguilar Dávila

Asesor:

Dr. Enrique Salas Téllez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de la sensibilidad a antifúngicos de Candida albicans, obtenidas a partir de muestras clínicas vaginales.

Que presenta la pasante: **Norma Angélica Aguilar Dávila**

Con número de cuenta: **310002426** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de septiembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez</u>	
VOCAL	<u>Dr. Enrique Salas Téllez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado principalmente a mis padres que con su afecto y su cariño han sido los detonantes de mi felicidad. Gracias por apoyarme en cada momento de mi vida, principalmente por la motivación que me han brindado para terminar mi carrera profesional, obsequiándome la mejor de las herencias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme a lo largo de mi carrera, por darme fuerza cuando más lo necesité y principalmente por permitirme llegar a cumplir uno de mis mayores logros.

A mi papá por motivarme a seguir adelante con cada uno de sus consejos, gracias por apoyar mis necesidades escolares e involucrarte en mis pendientes cuando más lo necesitaba, por confiar en mí siempre, pero sobre todo por cuidarme y quererme siempre.

A mi mamá por estar siempre conmigo, por brindarme su apoyo incondicional desde que emprendí mi propósito de terminar mi carrera profesional, agradezco tu paciencia que me tuviste en aquellos mis días difíciles, así como también la emoción que juntas compartíamos cuando me iba bien en mis materias, especialmente agradezco todo lo que hiciste para llegar juntas hasta aquí.

A mis hermanas Alma y May que como hermanas mayores siempre me han apoyado desde pequeña, aún recuerdo cuando me guiaban en mis tareas de la primaria. Agradezco el apoyo que le brindaron a mis papás para atenderme cuando más las necesitamos, así mismo, ofrezco una disculpa si en algún momento de estrés las hice sentir mal. Gracias por su comprensión, por enseñarme, por soportarme, por quererme y sobre todo por regalarme unos sobrinos maravillosos.

A mis sobrinos les agradezco tanto la alegría que me hacen sentir en mis días complicados, cada uno de ustedes tiene una chispita diferente, pero todas tan espléndidas que me hacen quererlos a todos por igual. A Charly que por ser el sobrino mayor me ha enseñado de lo que más se me complica, por esos tips para ser mejor y sobre todo por compartir noches de vela con tareas. A Joce por motivarme cuando más lo necesité, por esos momentos de desestrés en las fiestas, por compartir espejo antes de ir a la escuela y por cuidarme siempre. A Michelle por encontrar siempre las aventuras más locas para divertirnos juntas, porque gracias a que has crecido ahora entiendes cuando solo llegaba a casa y tú me decías que era aburrida por dormir mucho, por esos abrazos inesperados que me regalas algunos días. A Giovi † por darme fortaleza cuando más lo necesite y por cuidar a la familia desde tu hermoso paraíso. A Omar el más pequeño de la familia, gracias por hacerme reír con tu inocencia, por el interés que le pones a mi carrera, aunque la confundas con enfermería, medicina o cualquiera del área de la salud.

Al Dr. Enrique Salas por darme la oportunidad de ser mi asesor para trabajar y experimentar en su equipo de trabajo, por brindarme las herramientas necesarias, por la confianza y apoyo constante.

A la Dra. Alma Nuñez por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartirme de su conocimiento, de sus experiencias y sobre todo enseñarme cosas nuevas, para ser mejor cada día.

Al Dr. Tonatiuh Cruz, a las maestras Leticia Cubillo y Sandra Martínez por guiarme en mi trabajo, por su entrega en mi aprendizaje y por compartir su sabiduría.

A mis amigas Jessica, Diana, Carmen y Brenda por siempre estar al pendiente de nuestras vidas, por motivarme a seguir adelante y por darme momentos de alegría.

A mis amigos Juan y Dani por compartir horas de clases, risas, tareas, fiestas, y sobre todo por los trayectos de la Universidad a casa, gracias amigos por cuidarme siempre y escucharme cuando lo necesitaba.

A mis VELAS, Greg y Dani por motivarme a seguir adelante cuando más lo necesité, por compartir momentos de alegría, desesperación, estrés, entusiasmo y satisfacción entre clases, horas libres, calificaciones aprobadas y no aprobadas, horas de comida, de fiestas y tareas. Gracias por apartarme un lugar en clase, por compartirme de su lunch, por escucharme y enseñarme. Agradezco que sean las personas con las que compartí mi mayor tiempo de universidad.

A mi jefa Patricia Ramírez y supervisora Monserrat Mosqueda por otorgarme horas y días de permiso necesarios para terminar y tramitar mi tesis, gracias por comprenderme, apoyarme y por ser excelentes personas

INDICE GENERAL

I.	Índice de figuras.....	I
II.	Índice de tablas	III
III.	Índice de gráficas	IV
1.	Introducción	1
2.	Marco teórico	3
2.1.	Candidiasis	3
2.1.1.	Definición.....	3
2.1.2.	Generalidades de <i>Candida albicans</i>	3
2.1.3.	Antecedentes históricos	4
2.1.4.	Etiología	6
2.1.5.	Patogenia	8
2.1.6.	Factores de virulencia	9
2.1.7.	Signos y síntomas	11
2.1.8.	Mecanismo de defensa	12
2.1.9.	Epidemiología.....	14
2.2.	Antifúngicos	15
2.2.1.	Polienos	15
2.2.1.1.	Mecanismo de acción.....	16
2.2.1.2.	Espectro de actividad	16
2.2.2.	5-Fluorocitosina.....	16
2.2.2.1.	Mecanismo de acción.....	16
2.2.2.2.	Espectro de actividad	17
2.2.3.	Azoles	17

2.2.3.1. Mecanismo de acción.....	17
2.2.3.2. Espectro de actividad	17
3. Justificación	19
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.1.2. Objetivos específicos	20
5. Hipótesis	21
6. Diagrama de trabajo	22
7. Materiales y métodos	23
7.1. Identificación de las muestras.....	23
7.1.2. Conservación de las muestras.....	24
7.1.3. Adaptación de las cepas al Agar Mueller Hinton modificado (AMHm)	25
7.1.4. Preparación y ajuste del inóculo	25
7.2. Prueba de sensibilidad.....	25
7.2.1. Siembra de los aislamientos de <i>Candida albicans</i> en AMHm.....	25
7.2.2. Colocación de los discos e incubación	26
7.2.3. Interpretación de resultados	29
8. Resultados	30
9. Discusión	41
10. Conclusiones.....	47
11. Referencias	48
12. Anexo.....	52

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
5FC	5-Fluorocitosina
AB	Anfotericina B
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMHm	Agar Mueller Hinton modificado
ARN	Ácido Ribonucleico
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTR	Clotrimazol
CVV	Candidiasis Vulvovaginal
ECM	Elementos de la Matriz Extracelular
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
IL-6	Interleucina 6
ISSEMyM	Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios
KET	Ketoconazol
L	Litro
M44-A2	Método para la prueba de susceptibilidad a la difusión en discos antifúngicos de levaduras
MCZ	Miconazol
mL	mililitro
NY	Nistatina
PAMP	Patrón Molecular Asociado al Patógeno

PAS	Periodic Acid-Schiff
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
SS-AM	Solución Stock de Azul de Metileno
SSF	Solución Salina Fisiológica
TLR	Toll-like receptors
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UFC	Unidad Formadora de Colonia
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
YM	Yeast Mold

1. INDICE DE FIGURAS

Figura 1 y 2. Colonia de <i>Candida albicans</i> en medio cromogénico. Blastoconidias y pseudohifas (PAS 100X)	4
Figura 3. Patogenia de infección por <i>Candida albicans</i>	10
Figura 4. Invasión por <i>Candida albicans</i>	11
Figura 5. Respuesta inmune innata local en el tracto genital femenino.....	13
Figura 6. Mecanismo de acción de los antimicóticos.....	18
Figura 7. Aislamientos de <i>Candida albicans</i> en medio Litmus Milk	23
Figura 8. Aislamientos de <i>Candida albicans</i> en medio SDA.....	24
Figura 9. Posición de los discos (BIO-RAD) NY, 5FC y AB en AMHm.....	26
Figura 10. Posición de los discos (BIO-RAD) CTR y MCZ en AMHm	26
Figura 11. Posición del disco (BIO-RAD) KET en AMHm.....	26
Figura 12. Ejemplo de las colonias desarrolladas dentro de la zona de inhibición	27
Figura 13. Ejemplo de diámetro de inhibición.....	28
Figura 14. Tinción GRAM de <i>Candida albicans</i>	30
Figura 15. Halos de inhibición de los antimicóticos 5FC, NY y AB	35
Figura 16. Diámetro de inhibición de 15 mm del antimicótico NY.....	35
Figura 17. Diámetro de inhibición de 17 mm del antimicótico AB.....	36
Figura 18. Halos de inhibición de los antimicóticos MCZ y CTR	36
Figura 19. Diámetro de inhibición de 33 mm del antimicótico CTR	37
Figura 20. Diámetro de inhibición de 36 mm del antimicótico MCZ.....	37

Figura 21. Halo de inhibición del antimicótico KET.....	38
Figura 22. Diámetro de inhibición de 48 mm del antimicótico KET.....	38

II. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores predisponentes a candidiasis	7
Tabla 2. Diámetro de inhibición de cada una de las cepas frente a los antimicóticos.....	31
Tabla 3. Promedio de los halos de inhibición de cada antimicótico.....	32
Tabla 4. Interpretación de resultados correspondiente a la categorización clínica.....	32

III. INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de sensibilidad y resistencia del antimicótico 5-FC.....	39
Gráfica 2. Número de cepas sensibles de cada antimicótico	40
Gráfica 3. Porcentaje de sensibilidad y resistencia de las cepas frente a todos los antimicóticos probados.....	40
Gráfica 4. Porcentaje de cepas sensibles y resistentes del antimicótico 5-FC....	42
Gráfica 5. Comparación del porcentaje de sensibilidad y resistencia del antimicótico 5-FC en pacientes cubanas con respecto a los aislamientos de la UIM	43

1.INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la candidiasis se ha convertido en un problema de salud pública debido a las tasas de mortalidad y morbilidad asociadas; sobre todo en enfermos inmunosuprimidos o enfermedades subyacentes (Pfaller, 2007). Al igual que otras enfermedades, en la candidiasis es esencial realizar un diagnóstico lo más certero y temprano posible que permita establecer un tratamiento antifúngico precoz para limitar al máximo sus consecuencias.

Desde el año 2001 se ha aprobado un número importante de antifúngicos por las entidades reguladoras del uso de medicamentos en humanos. A pesar de sus diferentes indicaciones, hay una dificultad importante para evaluar su eficacia clínica y su seguridad basada en los resultados de ensayos clínicos comparativos. (Kim, 2007)

Los polienos como Anfotericina B y Nistatina, son moléculas macrólidas con cadenas insaturadas que, probablemente, tienen el mayor espectro de actividad antifúngica de todos los fármacos disponibles. Anfotericina B se licenció en 1957 como fármaco de uso clínico a pesar de su toxicidad y escasa solubilidad, y se convirtió en aquellos años en el primero y casi único tratamiento eficaz de las infecciones fúngicas sistémicas. Nistatina, en su formulación convencional, produce unos efectos tóxicos tan graves que no puede emplearse en infusión parental y solo se emplea en forma de ungüentos o soluciones en infecciones superficiales.(Ruiz, 2009).

Ambos polienos se unen a los esteroides (ergosterol, colesterol), que forman parte de la membrana fúngica. La unión con los esteroides de membrana genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas carbonadas. (Ruiz, 2009)

Fluorocitosina o 5-fluorocitosina es el único antifúngico disponible perteneciente a la clase de las pirimidinas, aunque su limitada actividad fue reduciendo su uso en la práctica clínica y en la actualidad apenas se utiliza. Dicho fármaco fungistático

penetra en el interior de la célula fúngica tras contactar con una enzima de membrana llamada citosina permeasa. (Ruiz, 2009)

Los azoles constituyeron uno de los principales avances terapéuticos de la micología. Su amplio espectro de actividad y sus reducidos adversos modificaron el panorama de los antifúngicos, en unos años en los que solo existía anfotericina B convencional y fluorocitosina. Los azoles se dividen en 2 familias que se distinguen por las moléculas de nitrógeno que contiene el anillo azólico: Imidazoles (2 moléculas) y triazoles (3 moléculas).

En dicha investigación se utilizó la familia de los Imidazoles (ketoconazol, Miconazol y Clotrimazol) los cuales tienen la capacidad de unirse con el grupo hemo, que forma parte de muchas enzimas. En esta capacidad reside su actividad antifúngica, ya que varias de las enzimas que participan en la síntesis del ergosterol, presentan un grupo hemo. (Ruiz, 2009)

El mecanismo de acción de los antifúngicos es de suma importancia, siendo que la sensibilidad a los antifúngicos de los aislamientos clínicos en cada hospital, en la candidiasis, así como en otras infecciones graves, los tratamientos empíricos iniciales efectivos son fundamentales para la resolución de la infección. (Guzzetti, 2017)

Asimismo, los antifúngicos presentan con frecuencia efectos secundarios y colaterales, por lo que su margen terapéutico es estrecho lo que ha limitado su utilización

2.MARCO TEORICO

2.1 Candidiasis

2.1.1 Definición

Micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, especialmente *Candida albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica. (Arenas, 2011)

El género *Candida* abarca alrededor de 150 especies, la mayoría de las cuales no afectan al hombre. *C. albicans* es una levadura dimorfa responsable del 70 al 80% de las candidiasis. (Vilata, 2006)

La infección vaginal por especies de *Candida*, conocida como candidiasis vulvovaginal (CVV), constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica.

2.1.2 Generalidades de *Candida albicans*

Candida albicans es una levadura diforma, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio. (INSHT, 2012)

El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del hospedero. En forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el hospedero, mientras que, en forma de hongo

filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas. (INSHT, 2012)

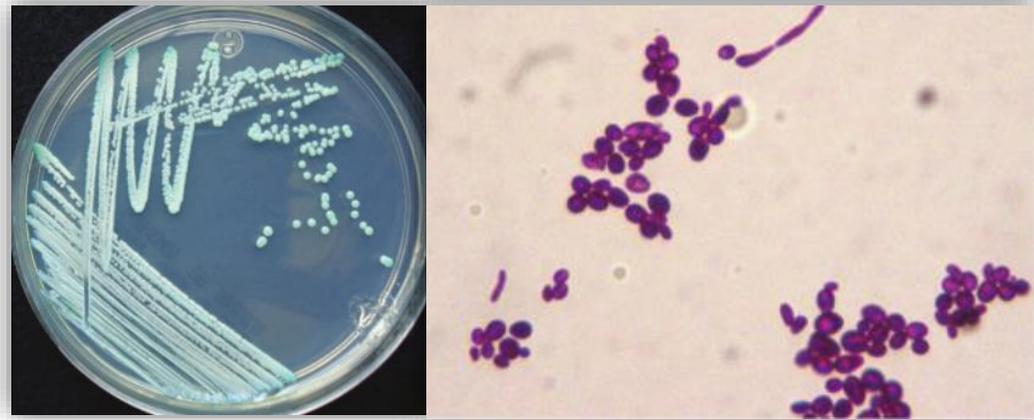


Figura 1 y 2. Colonia de *Candida albicans* en medio cromogénico. Blastoconidios y pseudohifas (PAS, 100X) (Bonifaz, 2012)

2.1.3 Antecedentes históricos

Hipócrates (460 a 337 a.C.) describió placas blanquecinas en la boca de pacientes debilitados y en recién nacidos. Galeno (130 a 200 d.C.) las observó en niños enfermizos. En el siglo XVIII era muy frecuente en Europa, y se identificó en recién nacidos. En 1835, S. Verón en su “Memoire sur le muguet” postuló la transmisión intrauterina y describió el primer paciente con candidosis (candidiasis) esofágica. En 1837, J. Parrot y A. Trousseau reconocieron la forma oral y, en 1839, Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck realizó el descubrimiento del organismo causal al aislar un hongo en un paciente con aftas. En 1841, F. T. Berg demostró el origen fúngico de las lesiones bucales y reprodujo el padecimiento en niños sanos. En 1842, David Gruby describió este hongo, lo presentó ante la Academie de Sciences, de París como “le vrai muguet des enfants” (el verdadero muguet de los niños); asimismo, postuló la transmisión intrauterina y comunicó la primera candidosis, en 1847, el mismo autor clasificó al microorganismo como *Sporotrichum*, más tarde, se

confundió con *Monilia candida*, aislada de vegetales en descomposición. En 1844, J. H. Bennett, en Edimburgo, aisló el hongo conocido hoy como *Candida albicans* en el esputo de un paciente tuberculoso. En 1846, F.T. Berg, en Estocolmo, reconoció las enfermedades debilitantes como el principal factor predisponente. En 1849, J. S. Wilkinson describió la localización vaginal. (Arenas, 2011)

En 1853, Charles Phillippe Robin, en París, denominó al hongo *Oidium albicans* y señaló la enfermedad sistémica, también en pacientes debilitados. En 1861, Zenker, en Alemania, observó un sujeto con infección cerebral por diseminación hematogena. En 1875, D. Haussmann notó el vínculo entre candidosis vaginal de la madre, y bucal del recién nacido. En 1877, P. Grawitz describió el carácter dimórfico de esta levadura. En 1870 y 1877, J. Parrot caracterizó en lactantes las modalidades intestinal y pulmonar, respectivamente. En 1877, Granitz describió la morfología de *C. albicans*. En 1890, Wilhelm Zopf aceptó como agente del algodoncillo un hongo del género *Monilia*, que se había aislado con anterioridad a partir de vegetales y que hoy se sabe no pertenece al género de *Candida*. Lo denominó *Monilia albicans* e inició una gran confusión terminológica en la literatura médica, esto debido en parte a que Castellani aceptó el mismo término. (Arenas, 2011)

En la literatura alemana, en 1890, Christian Georg Schmorl informó la afección mucocutánea; en 1904, E. Dubendorfer, la inguinal y, en 1907, Jacobi, la cutánea. En 1909, J. G. Forbes, en Londres, estudió a una niña de tres y medio con afección de lengua y uñas, que tal vez corresponde al primer caso mucocutáneo crónico. (Arenas, 2011)

Durante la primera mitad del siglo XX se identificaron prácticamente todas las demás localizaciones.

En 1923, Christie Marie Berkhout, 70 años después de los estudios de Robin, transfirió las especies del género *Candida* y dio fin a muchos errores de nomenclatura; 14 años después, D. S. Martin especificó las levaduras pertenecientes a este género. En 1954, en el VIII Congreso de Botánica, se aceptó oficialmente el género *Candida*. En 1958, K. Benirshke y S. I. Raphael comunicaron por vez primera la candidosis congénita. Es interesante señalar que tan sólo N. J.

W. Kreger-van Rij en el libro “The yeasts” (1984), un tratado de levaduras, lista por lo menos 100 sinónimos para *C. albicans* (Arenas, 2011).

2.1.4 Etiología

C. albicans causa casi el 80-90% de los casos de candidiasis vaginal; otras especies de *Candida* son las causas de los casos restantes. Las levaduras pueden estar presentes en la vagina en cantidades pequeñas y no producir síntomas. Sin embargo, si las condiciones de la vagina cambian de modo que favorecen el desarrollo de las levaduras por sobre el resto de la flora vaginal normal puede producirse una candidiasis. (Forbes, 2009)

Se ha sugerido que la ropa apretada y aislante predispone a la candidiasis vulvovaginal al elevar la temperatura y la humedad de la vagina. Existen estudios prospectivos que han encontrado una mayor prevalencia de portadoras de *Candida* y con una mayor de microorganismos en las mujeres que vestían ropa ajustada en comparación con las que usaban ropa más holgada. La disfunción de las células fagocíticas o de la inmunidad celular (p.ej., tras un trasplante o quimioterapia) también predisponen a la candidiasis vulvovaginal. Algunos autores creen que las mujeres infectadas por el VIH sufren candidiasis vaginales con mayor frecuencia que las mujeres VIH-negativas. (Mandell, Bennett y Dolin, 2006)

La contribución del mecanismo de transmisión sexual no está clara. La incidencia de la candidiasis vaginal aumenta con el inicio de la actividad sexual, pero la incidencia también es mayor entre las mujeres que emplean anticonceptivos orales, la esponja anticonceptiva o el dispositivo intrauterino, factores todos ellos que coinciden con la actividad sexual. El hecho de poseer un número elevado de parejas sexuales no se asocia con una mayor incidencia de infección por *Candida*. (Mandell, Bennett y Dolin, 2006)

Las causas del crecimiento desequilibrado de *Candida* se debe sobre todo a dos factores; primero, al alto consumo de azúcares de la dieta actual (puesto que estos organismos proliferan metabolizando glucosa) y segundo, al abuso de

medicamentos como los antibióticos orales (Aikin, 2012). En la tabla 1 se observan diversos factores que desarrollan una candidiasis.

Tabla1. Factores que disponen a candidiasis (Arenas, 2011)

<p style="text-align: center;">Estados fisiológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Infancia y vejez ✓ Embarazo 	<p style="text-align: center;">Enfermedades debilitantes</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Neoplasias ✓ Infecciones ✓ Inanición ✓ Infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ✓ Enfermedades relacionadas con VIH
<p style="text-align: center;">Factores locales</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Humedad ✓ Exposición ocupacional ✓ Oclusión cutánea ✓ Prótesis ✓ Heridas y quemaduras ✓ Hemostasis 	<p style="text-align: center;">Medicamentos y otros tratamientos</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hormonas sexuales (anticonceptivos) ✓ Antibióticos de amplio espectro ✓ Glucocorticoides ✓ Inmunosupresores ✓ Citotóxicos ✓ Radioterapia
<p style="text-align: center;">Endocrinopatías y enfermedades metabólicas</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Diabetes ✓ Obesidad ✓ Hiperuricemia ✓ Síndrome de Cushing ✓ Insuficiencia tiroidea ✓ Acrodermatitis enteropática ✓ Deficiencia de hierro ✓ Poliendocrinopatía 	<p style="text-align: center;">Intervenciones quirúrgicas y otras medidas</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Intervención quirúrgica ✓ Hiperalimentación parental ✓ Cateterismo ✓ Traqueostomía ✓ Consumo de drogas por vía intravenosa (heroína)

2.1.5 Patogenia

Candida habitualmente coloniza sistema digestivo y tracto genital femenino, sistema respiratorio, piel y también tracto urinario en los pacientes portadores de cateterismo vesical permanente. Por esto la mayoría de las infecciones son de origen endógeno. Además, se describe la vía de transmisión de humano a humano (por ejemplo, en el recién nacido a través del canal de parto y en balanitis en el varón como resultado del contacto con una pareja con vulvovaginitis). Otra puerta de entrada corresponde a la inoculación directa, observada en procedimientos neuroquirúrgicos. (Nogales, 2005)

Existen factores que facilitan el crecimiento de estas colonias predisponiendo la infección como son excesiva humedad, disminución de la flora bacteriana y alteración de la función fagocitaria y linfocitaria. (Nogales, 2005)

En las formas invasivas de candidiasis se producen un quiebre de la indemnidad de las barreras locales por distintas situaciones como instrumentación, cirugía y/o quimioterapia. Se plantea que la principal causa de infección diseminada por *Candida* es la iatrogenia. (Nogales, 2005)

Existen factores predisponentes de candidiasis dependientes del huésped o de factores exógenos:

-Inmunosupresión: especialmente cuadros que inducen a la granulocitopenia, leucemia o linfoma con tratamiento citotóxico, trasplante de órgano con inmunosupresores, terapia corticoide y SIDA. (Nogales, 2005)

-Presencia de factor local favorecedor de la fungemia: abuso de drogas, endocarditis por *Candida*, catéter central, instrumentación o cirugía de mucosas colonizadas. (Nogales, 2005)

-Sobrecrecimiento de hongos: terapia antibiótica de amplio espectro, SIDA, neonatos prematuros, candidiasis mucocutánea crónica. (Nogales, 2005)

2.1.6 Factores de virulencia

C. albicans presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos destaca el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, ya que favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador. (Ausina y Moreno, 2005)

El proceso de infección comienza con la adherencia del microorganismo comensal a las células de la mucosa o queratinocitos, que interactúan en la relación de la pared fúngica de polisacáridos (mananos) con un receptor en la célula epitelial. Se han reconocido como adhesinas putativas los mananos, las manoproteínas y la quitina. (Arenas, 2011)

Aunque in vivo la situación es más compleja que en estudios experimentales, se han postulado los siguientes mecanismos de virulencia: capacidad de adhesión; producción de enzimas proteolíticas, en especial proteasas y fosfolipasas, las cuales facilitan la penetración y la degeneración de queratina y colágeno; transformación morfológica de levadura en hifa, lo que también favorece la penetración y permite evadir el sistema de defensa, pues la hifa libera mayor cantidad de fosfolipasas y es más resistente a la fagocitosis; efectos inmunorreguladores de determinantes fúngicos que contribuyen a disminuir la actividad de las defensas del huésped; cambios fenotípicos, que permiten al hongo adaptarse a condiciones diferentes o cambiantes. (Arenas, 2011)

La pared celular de *C. albicans* está constituida por β - (1,3)-D-glucano (50 a 70%), manano (20%), quitina (10 a 20%), proteínas (3 a 6%) y lípidos (1 a 5%). Estudios con microscopía electrónica indican diferencias en la organización y la composición de la pared celular en las dos diferentes formas morfogénicas de esta levadura. La adhesión depende de condiciones ambientales, pero también es influida por factores del huésped, como: hidrofobicidad; mimetismo de las proteínas de superficie que pueden afectar la unión a neutrófilos y, por tanto, la fagocitosis; el tipo de medio para su crecimiento y condiciones de este, así como las alteraciones hormonales e inmunitarias. Se ha propuesto al tigmotropismo como un mecanismo que permite la invasión de las invaginaciones de los tejidos, pues in vitro, los

filamentos siguen la superficie de las membranas, mientras que el quimiotropismo explicaría la invasión por las hifas, tanto en endotelios como epitelios. (Arenas, 2011).

En la figura 3 se muestran los mecanismos propuestos para la unión e invasión por *C. albicans*. Los receptores de superficie de glucomanano en la levadura pueden unirse a la fibronectina que cubre las células epiteliales o a los elementos de la matriz extracelular (ECM) cuando se pierde la superficie epitelial o cuando *Candida* ha invadido más allá de ésta. (Kenneth, 2010).

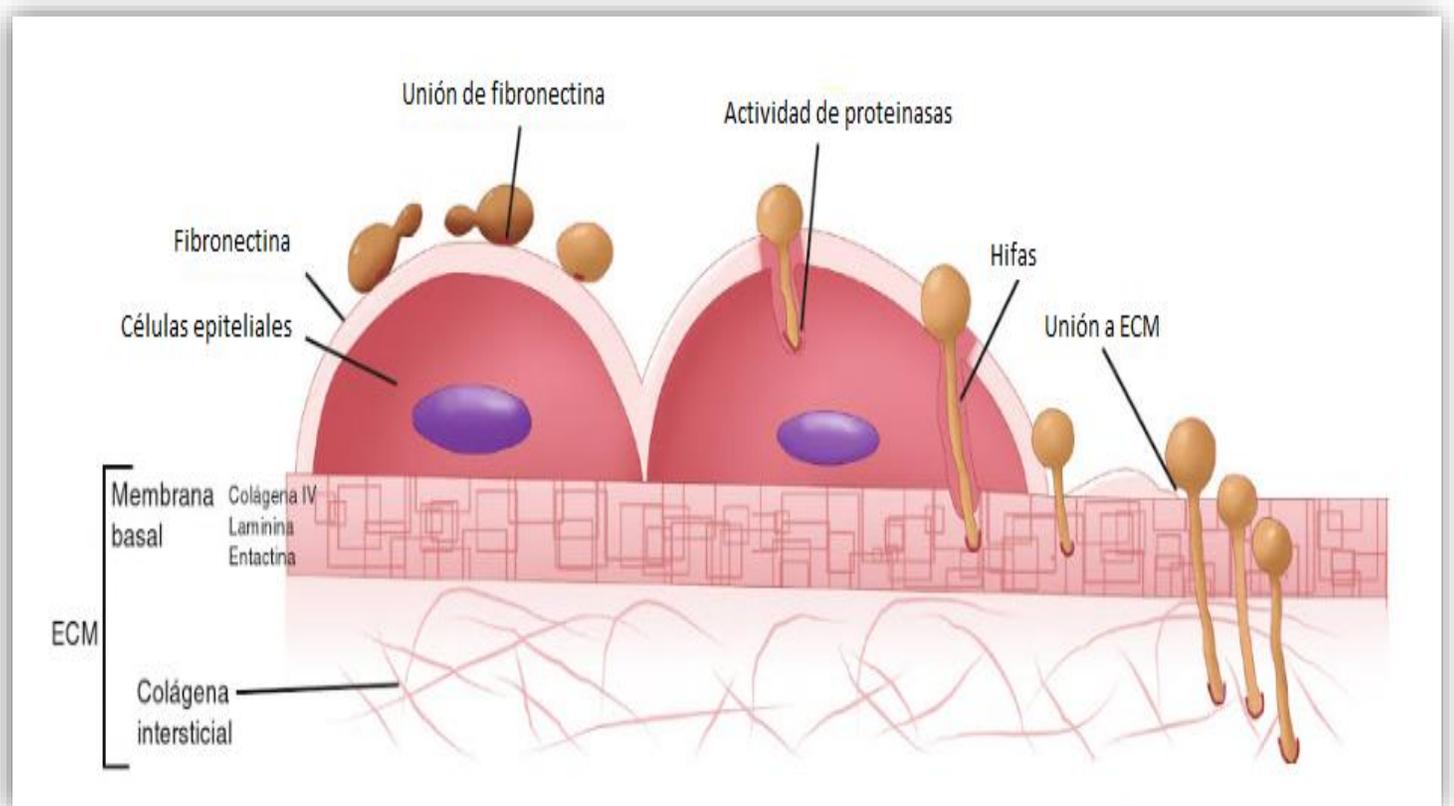


Figura 3. Patogenia de las infecciones por *Candida albicans*. (Kenneth, 2010)

La figura 4 muestra dos características de la capacidad de invasión. Se observan blastoconidias y micelios. Los micelios se diseminan sobre la superficie e invaden la cutícula celular (A). Así mismo se observa que las cepas de *C. albicans* que producen proteasas provocan depresiones en forma de cavidades en la superficie celular (B). Esta acción participa en la capacidad de invasión de la célula. (Kenneth, 2010).

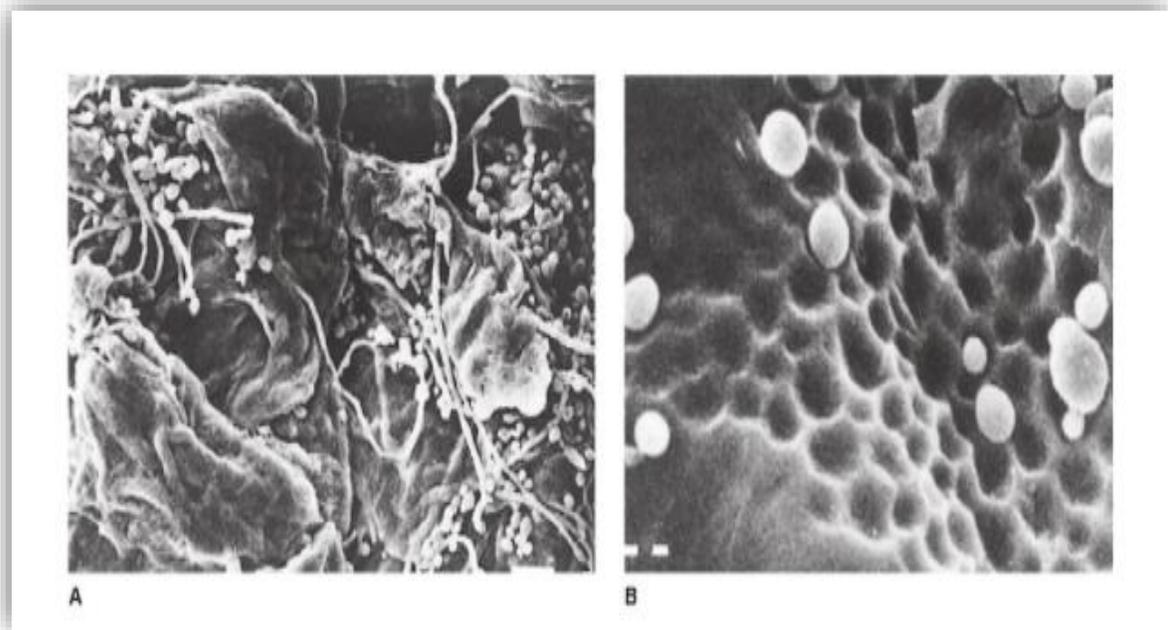


Figura 4. Invasión por *Candida albicans*. (Kenneth, 2010)

2.1.7 Signos y síntomas

Los síntomas de CVV incluyen:

- Prurito vulvar con secreción vaginal que se parece a queso fresco.
- Eritema y edema de los labios y la piel vulvar; pueden aparecer lesiones periféricas papulopostulosas bien delimitadas (lesiones satélite).
- La vagina puede estar eritematosa, con secreción adhesiva y blanquecina.
- El cérvix puede ser normal.

- Los síntomas se exacerbaban típicamente en la semana previa a la menstruación con cierto alivio en cuanto se inicia el sangrado menstrual. (Mendell, 2006)

2.1.8 Mecanismo de defensa

Los mecanismos de defensa son diversos y complejos. La primera defensa es la inmunidad innata que se relaciona con integridad de los epitelios, factores humorales inespecíficos y sistema inmunitario humoral o celular. Se le atribuye a la piel una actividad inflamatoria-inmunitaria, además de su función de barrera, donde intervienen las células de Langerhans y los queratinocitos como células presentadoras de antígenos que afectan la fagocitosis o la producción de citocinas o ambas. Hay también una función de las proteínas ligadas a hierro, como transferrina y lactoferrina. La segunda línea de defensa después de la penetración fúngica está dada por la fagocitosis y la actividad candidicida de polimorfonucleares, la cual involucra mieloperoxidasa, superóxidos o proteínas catiónicas. Tales infecciones muestran vínculo sobre todo con neutropenia e inactividad de polimorfonucleares. Los neutrófilos constituyen el principal mecanismo de defensa en candidiasis diseminada e invasiva; participan de manera importante en el reclutamiento de polimorfonucleares, el TNF- α , la IL-6 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Arenas, 2011).

Candida, en la piel, al encontrar pérdida de la barrera epidérmica se adhiere a las células epiteliales e invade la capa córnea por medio de un proceso de lisis tisular epitelial mediante enzimas queratolíticas, proteolíticas y fosfolipasas, lo que produce una reacción inflamatoria local. El polisacárido manosa de la pared de *C. albicans*, patrón molecular asociado al patógeno (PAMP) de ésta, es reconocido por los receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4, lo cual activa este sistema de emisión de señales y la respuesta inmunitaria innata de piel y mucosas. Esto lleva a la activación de la vía alterna del complemento, con generación de productos, como C5a, que inducen la quimiotaxis de neutrófilos, la opsonización y la fagocitosis de las levaduras circulantes o alojadas en los tejidos. (Arenas, 2011)

En la figura 5 se muestra el esquema del tracto genital femenino que ilustra la ubicación de las diferentes poblaciones celulares. En condiciones de homeostasis el microambiente local se encuentra finalmente regulado con concentraciones aumentadas de citocinas antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos (PAM) de expresión constitutiva; *Candida albicans* se encuentra en su estado comensal. La ruptura de este estado de equilibrio debido a la presencia de factores predisponentes o defectos genéticos favorecen la morfologénesis fúngica, la expresión de factores de virulencia y el establecimiento de la infección. La liberación de alarminas, PAM, sustancias quimiotácticas y citocinas genera un microambiente inflamatorio con infiltrado celular que, en su conjunto, determinan la aparición de los síntomas de la enfermedad. (Miró, 2017).

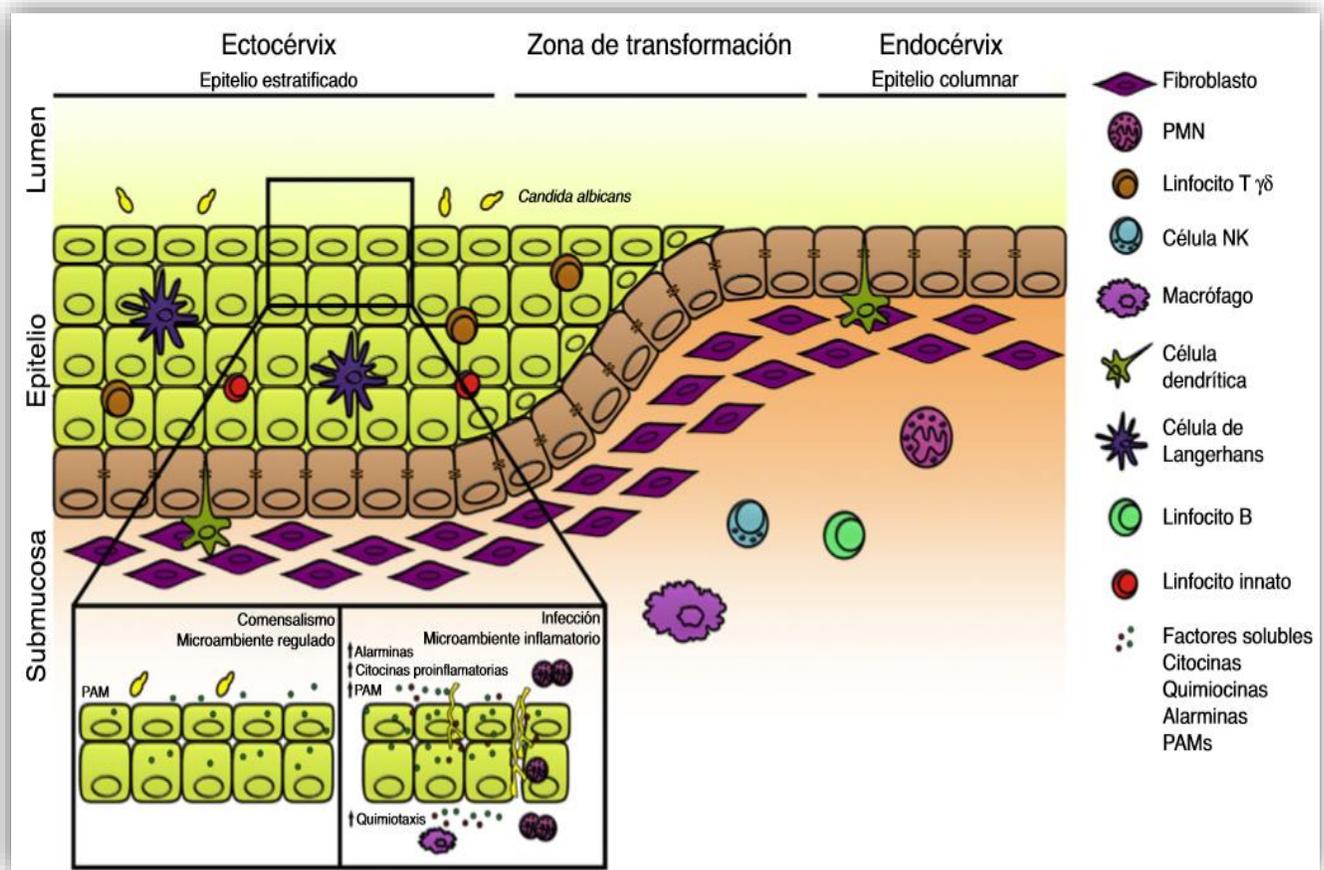


Figura 5. Respuesta inmune innata local en el tracto genital femenino. (Miró, 2017)

2.1.9 Epidemiología

Es cosmopolita. Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuentes en seres humanos. La incidencia ha aumentado durante los últimos 30 años. Entre las micosis, abarca 7.45% y constituye 25% de las micosis superficiales. Afecta a individuos de cualquier edad, grupo étnico o sexo. No tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el estado socioeconómico; sin embargo, se han encontrado algunas diferencias regionales, por ejemplo, la candidiasis interdigital de los pies es más frecuente en lugares tropicales, y la onicomicosis sin paroniquia, en lugares más fríos. Se encuentra en 4 a 18% de los recién nacidos; se han comunicado las modalidades congénitas en prematuros de menos de 1500 g al nacer; la forma bucal predomina en menores de 10 años y en mayores de 60, en especial mujeres. (Arenas, 2011).

En México en el 2017 existió una incidencia de 192.54 de candidiasis urogenital por cada 100,000 habitantes, la mayoría de los casos reportados se presenta en edades de 20 a 24 años. (Dirección general de epidemiología, 2017).

En México hasta la semana 40 del año 2018 se presentan 13,685 casos de candidiasis vulvovaginal en mujeres, comparando 685 casos de candidiasis urogenital en pacientes masculinos. (Dirección general de epidemiología, 2018).

C. albicans, la especie más importante, forma parte de la flora normal de las vías gastrointestinales, las mucosas bucales (31 a 55%) y vaginal (13% de las mujeres), así como de la piel periorificial de individuos sanos (25 a 50%). *Candida* vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano, y coexiste como comensal, pero cuando este equilibrio se pierde, se torna patógena y causa afección mucocutánea. (Arenas, 2011)

La onicomicosis y los intertrigos (afección de pliegues cutáneos) predominan en mujeres. La vulvovaginitis explica 20 a 30% de la enfermedad ginecológicas; 50% de los casos se observa entre los 20 y 30 años de edad; afecta a 13 a 21% de quienes usan anticonceptivos hormonales y a 15 a 47% de las embarazadas, con

predominio durante el tercer trimestre. No obstante, en la mayoría no se encuentran factores predisponentes. (Arenas, 2011)

De las formas cutaneomucosas, 35% afecta uñas, 30% piel y 20% mucosas. Las formas profundas y sistémicas son poco frecuentes. Se presentan en 80 a 90% de los enfermos con sida y predominan en boca y esófago. En 1 a 16% de los pacientes que tienen catéteres colocados, aparece fungemia relacionada con los mismos. (Arenas, 2011)

Epidemiológicamente, la candidiasis es un padecimiento cosmopolita, sin tener una predilección en cuanto a edad o sexo: ataca por igual a todas las edades y a los dos sexos, siempre y cuando se presenten los factores de oportunismo. La fuente de infección es el hombre mismo, aunque los animales también lo pueden tener como habitante normal; igualmente puede ser a partir de fómites. (Romero, 2007)

2.2 Antifúngicos

Los antifúngicos también llamados antimicóticos, son una serie de medicamentos que tienen diversas acciones frente a los hongos productores de micosis superficiales, subcutáneas o profundas, tanto patógenos primarios como oportunistas. A este tipo de fármacos se les puede dividir de acuerdo con diferentes características: mecanismos de acción, composición química, espectro de acción, tipo de micosis con la que actúan, etc. (Bonifaz, 2012)

2.2.1 Polienos

Los polienos son moléculas macrólidas con cadenas insaturadas que, probablemente, tienen el mayor espectro de actividad antifúngica de todos los fármacos disponibles comportándose como fungistáticos o fungicidas dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección. Existen varios cientos de compuestos de esta clase, cuyas características son: una escasa biodisponibilidad digestiva, lo que conlleva que no existan presentaciones orales de estos fármacos; una baja solubilidad en agua que crea problemas para obtener formulaciones intravenosas, y su toxicidad, lo que obligó a

detener desarrollo farmacológico de casi todas estas moléculas, a excepción de anfotericina B y nistatina. (Ruíz, 2009)

2.2.1.1 Mecanismo de acción:

En la figura 6 se muestra el esquema donde los polienos se unen a los esteroides, aunque muestran especificidad por el ergosterol, que forma parte de la membrana fúngica. La unión con los esteroides de membrana genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas carbonadas. (Ruíz, 2009)

2.2.1.2 Espectro de actividad

Su perfil de actividad es muy amplio, ya que pocas especies muestran resistencia intrínseca y pocas cepas desarrollan resistencia secundaria. Muestran actividad frente a levaduras, hongos filamentosos y hongos patógenos primarios. No obstante, se han descrito muestras resistentes. (Ruíz, 2009)

2.2.2 5-Fluorocitosina

Es el único antifúngico disponible perteneciente a la clase de las pirimidinas. Fue comercializado en los años sesenta del siglo XX como un antifúngico de amplio espectro, aunque su limitada actividad fue reduciendo su uso en la práctica clínica y en la actualidad apenas se utiliza. (Ruíz, 2009)

2.2.2.1 Mecanismo de acción

La fluoricitosina es un fármaco fungistático que penetra en el interior de la célula fúngica tras contactar con una enzima de membrana llamada citosina permeasa. Como se observa en la figura 6, ya en el interior de la célula, la fluorocitosina es desaminada a 5-fluorouracilo, tras lo que se producen varias fosforilaciones que acaban por generar ácido fluorardílico, que se incorpora a la cadena de ARN, lo que ocasiona la producción de ARN aberrante. (Ruíz, 2009)

2.2.2.2 Espectro de actividad

Su espectro de acción se reduce a las levaduras, ya que es inactiva frente a hongos filamentosos. Existen algunas cepas de *Candida spp.*, y de *Cryptococcus* que muestran resistencia primaria. Asimismo, cuando se utiliza en monoterapia, genera resistencia secundaria con facilidad. (Ruíz, 2009)

2.2.3 Azoles

Los azoles constituyeron uno de los principales avances terapéuticos en la micología. Su amplio espectro de actividad y sus reducidos efectos adversos modifican el panorama de los antifúngicos en unos años en los que solo existía anfotericina B convencional y fluorocitosina. (Ruíz, 2009)

2.2.3.1 Mecanismo de acción

Los azoles son moléculas sintéticas con un anillo de 5 carbonos unido a una cadena alifática que cuenta con un grupo fenilo. Existen dos familias de azoles que se distinguen por las moléculas de nitrógeno que contienen el anillo azólico: 2 en el caso de los imidazoles y 3 en el de los triazoles. Los azoles tienen la capacidad de unirse con el grupo hemo, que forma parte de muchas enzimas. En esta capacidad reside su actividad antifúngica, ya que varias de las enzimas que participan en la síntesis del ergosterol presentan un grupo hemo. La enzima que más se afecta es la 14- α demetilasa; de esta forma, en la figura 6 se observa como el tratamiento con azoles bloquea la síntesis de ergosterol, y se acumulan esteroides 14- α metilo. El bloqueo inhibe el crecimiento de la célula fúngica. (Ruíz, 2009)

2.2.3.2 Espectro de actividad

El perfil de actividad de los azoles depende de cada fármaco, pero, en términos generales, muestran un espectro de acción amplio. Los imidazoles muestran una buena actividad frente a levaduras, dermatofitos, hongos patógenos primarios y algunos hongos miceliales. Sin embargo, tienen una toxicidad significativamente

superior a la de los triazoles, lo que ha hecho que casi hayan desaparecido de la práctica clínica. (Ruíz, 2009)

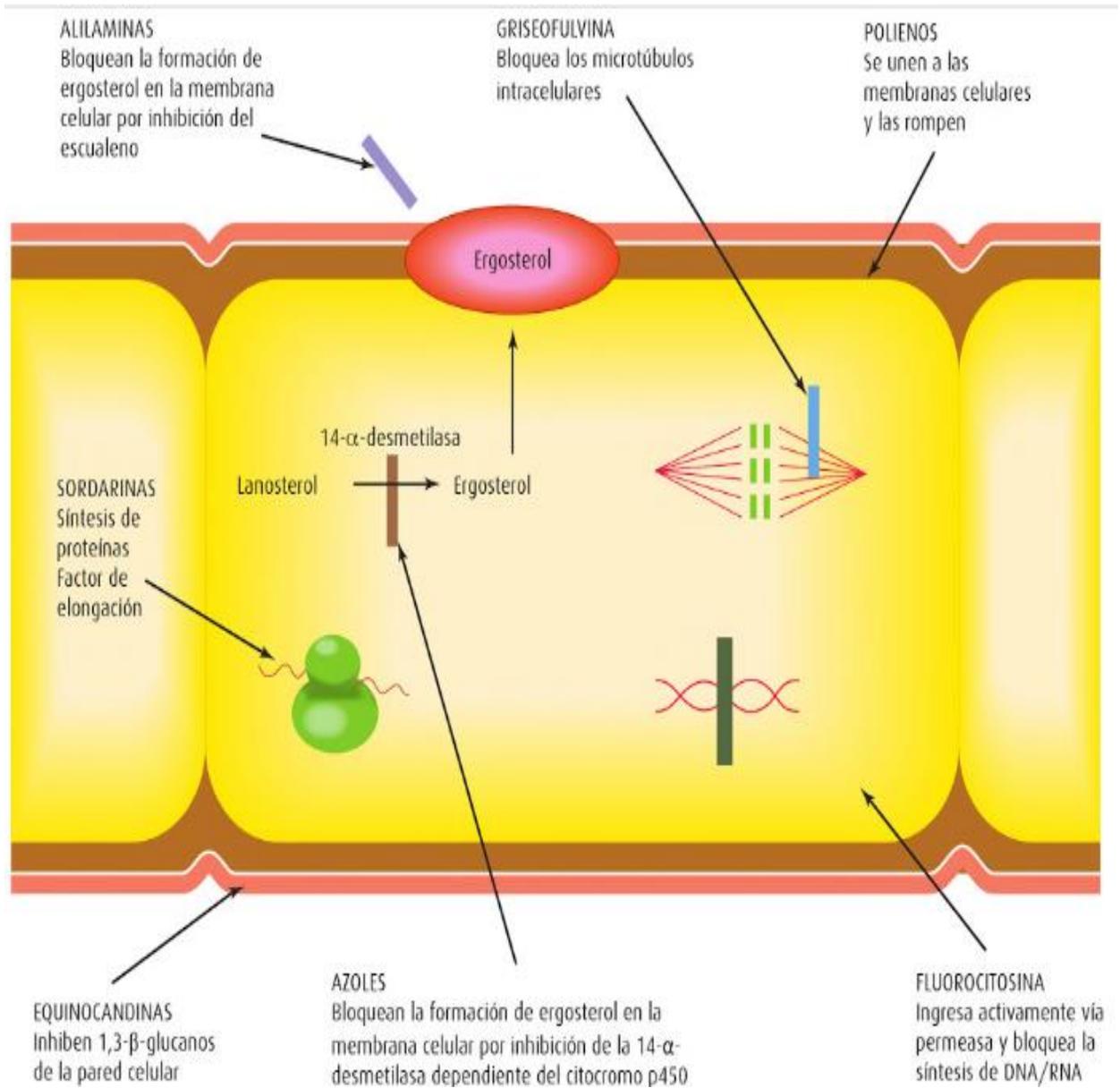


Figura 6. Mecanismo de acción de los antimicóticos. (Bonifaz, 2012).

3.JUSTIFICACIÓN

Las infecciones vaginales por hongos levaduriformes del género *Candida* representan la causa de millones de consultas médicas por año. Se estima que al alcanzar la edad de 25 años la mitad de las mujeres en edad universitaria habrá tenido al menos un episodio diagnosticado por el médico ocasionando molestias como secreción vaginal, eritema y edema de los labios y la piel vulvar, entre otros signos y síntomas que podrían complicarse.

En México hasta el año 2017 se reportan 15,966 casos de pacientes con vulvovaginitis; en ese mismo año existió una incidencia de 192.54 de candidiasis urogenital por cada 100,000 habitantes, la mayoría de los casos reportados se presenta en edades de 20 a 24 años. (Dirección general de epidemiología, 2017).

Hasta la semana 40 del año 2018 se presentan 13,685 casos de candidiasis vulvovaginal en mujeres, comparando 685 casos de candidiasis urogenital en pacientes masculinos. (Dirección general de epidemiología, 2018).

En este estudio se pretende contribuir en el entendimiento de la interacción que tienen los antimicóticos sobre un buen tratamiento de Candidiasis vaginal, al determinar la sensibilidad o resistencia de *Candida albicans* obtenida de muestras clínicas vaginales frente a los distintos antimicóticos, seleccionando al de mejor efectividad siendo que los antimicóticos de venta libre contra estas infecciones figuran entre los productos de mayor venta.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la sensibilidad de aislamientos de *C. albicans*, obtenidos de muestras clínicas vaginales, frente a nistatina, anfotericina B, 5-fluorositocina, clotrimazol, miconazol y ketoconazol mediante el método de difusión en disco (M44-A2) de acuerdo con el CLSI.

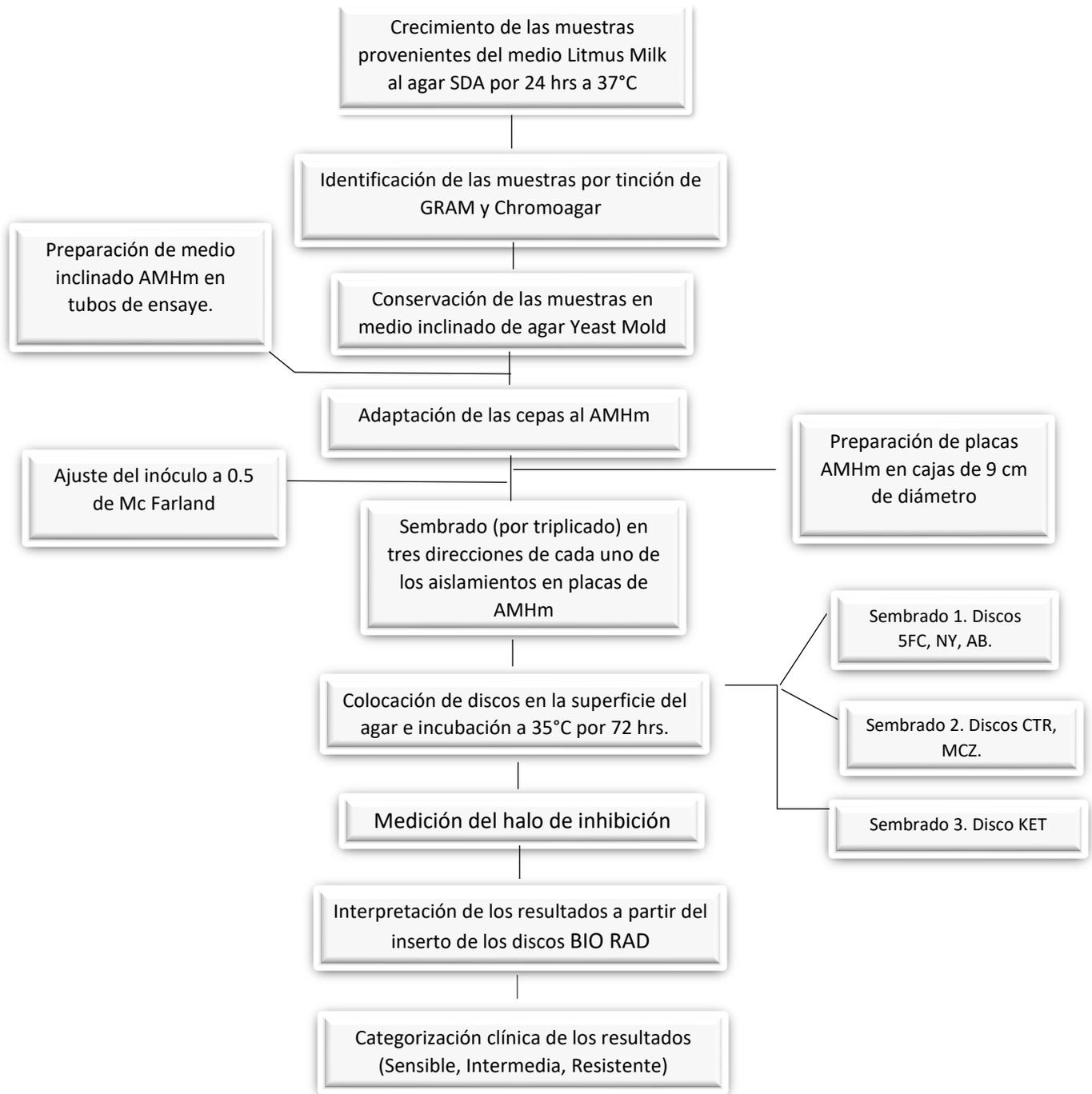
4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el método M44-A2 de acuerdo con el CLSI en placa para lograr una mayor exactitud y reproductibilidad de los resultados.
- Obtener el perfil de sensibilidad/resistencia de *C. albicans* obtenida a partir de muestras clínicas vaginales frente a los antifúngicos nistatina, anfotericina B, 5-fluorositocina, clotrimazol, miconazol y ketoconazol a través del método difusión en agar con disco.
- Determinar al antifúngico con mayor efectividad frente a los aislamientos de *C. albicans* de origen vaginal.

5. HIPÓTESIS

Los aislamientos de *Candida albicans* obtenidos de muestras clínicas vaginales mostrarán sensibilidad a los antimicóticos como son nistatina, anfotericina B, 5-fluorositocina, clotrimazol, miconazol y ketoconazol.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado se llevó a cabo a partir de 50 aislamientos seleccionados al azar de *Candida albicans* con origen de muestras clínicas vaginales del Hospital Regional de Tlalnepantla ISSEMyM, donados por el Laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Realizando el método de difusión en agar con disco empleando 6 antimicóticos (BIORAD) los cuales son 5-fluorocitosina (62846), anfotericina B (62806), nistatina (62856), clotrimazol (62816), miconazol (62836) y ketoconazol (62866).

6.1 Identificación de las muestras

Los 50 aislamientos obtenidos del Hospital Regional de Tlalnepantla ISSEMyM de *C. albicans* fueron mantenidos en un medio que consiste en Litmus Milk y glicerina estéril como se aprecia en la figura 7, congeladas a -74°C , las cuales posteriormente fueron resembradas en agar SDA (figura 8) por 24 horas a 37°C con el fin de que se adaptaran las muestras a una menor temperatura para la realización de los siguientes pasos.



Figura 7. Aislamientos de *C. albicans* en medio Litmus Milk.



Figura 8. Resiembra de *C. albicans* en SDA de origen clínico vaginal.

Se realizó una tinción de Gram a cada una de las cepas, con el propósito de ser revisadas al microscopio óptico, comprobando que se tratara de levaduras y no estuvieran contaminadas con bacterias a consecuencia de un mal manejo de la muestra. Para ratificar que la especie de *Candida* con la que se iba a trabajar se trataba de *albicans*, las cepas fueron sembradas en CHROMoagar Difco™.

7.1.2 Conservación de las muestras

Una vez identificadas correctamente las muestras, se resembraron en tubos inclinados con agar Yeast Mold (YM) manteniendo a una temperatura de 4°C para favorecer su viabilidad.

7.1.3 Adaptación de las cepas al Agar Mueller Hinton modificado (AMHm)

Para adaptar las cepas al medio AMHm se tomó una colonia proveniente del medio YM con el asa estéril y se sembró sobre la superficie del medio sólido AMHm en forma de estrías. Las muestras sembradas se incubaron a 35°C por 24 horas.

Preparación de placas Petri :

Después de que las cepas se adaptaron al medio AMHm en tubos de ensaye de forma inclinada, se prepararon cajas de 9 cm de diámetro con 25 mL de medio AMHm con una profundidad de 4 mm con el fin de que dichas cajas se utilicen para la prueba de sensibilidad.

7.1.4 Preparación y ajuste del inóculo

A partir de los 50 aislamientos de *C. albicans* que se encontraban sembrados en AMHm (tubos inclinados), se ajustó la concentración del inóculo para un posterior sembrado de cada una de las cepas en las placas Petri con AMHm.

Ajuste del inóculo:

El inóculo obtenido de cada uno de los aislamientos incubados se suspendió en los 5 mL de cada tubo con SSF y se homogenizó vigorosamente ajustando la turbidez a 0.5 en la escala de McFarland (1×10^6 - 5×10^6 UFC/mL) (Zurita, 2017)

7.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD

7.2.1 Siembra de los aislamientos de *C. albicans* en AMHm

Colocando un hisopo dentro de cada tubo que contenía la suspensión de cada aislamiento, se embebió y rotó contra las paredes del tubo eliminando el exceso de líquido, se inoculó por técnica masiva (sin presionar el hisopo) la placa de Mueller Hinton modificado (MHm) en tres direcciones, para obtener crecimiento uniforme en toda la superficie de la misma. Cada uno de los aislamientos se sembró por triplicado.

7.2.2 Colocación de los discos e incubación

Los frascos que contenía los discos BIORAD impregnados de cada antimicótico se mantuvieron a una temperatura ambiente durante 5-10 min, para que posteriormente fueran utilizados.

Con ayuda de una pinza estéril de punta fina, se extrajo cada uno de los discos; posteriormente como se observa en las figuras 9, 10 y 11, fueron colocados (presionando suavemente en el centro del disco con la punta de la pinza) en la superficie del AMHm de cada uno de los aislamientos.

La distribución de los discos quedó a 20mm del borde de la placa, separados entre sí. La placa se dejó a una temperatura ambiente con la tapa hacia arriba durante 10-15 min antes de ser colocados en la estufa. Transcurrido el tiempo establecido, las placas fueron colocadas en la estufa a 25°C durante 72 horas.

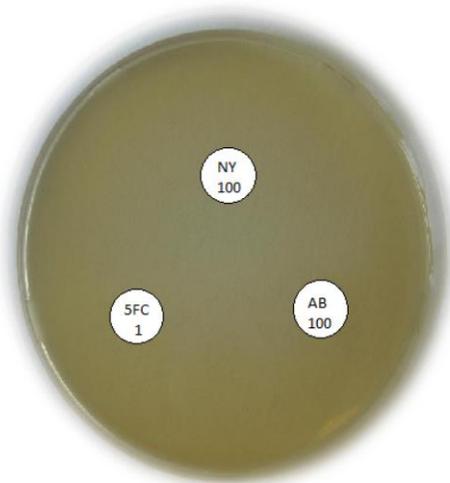


Figura 9. Posición de los discos (BIORAD) NY, 5FC y AB en AMHm.

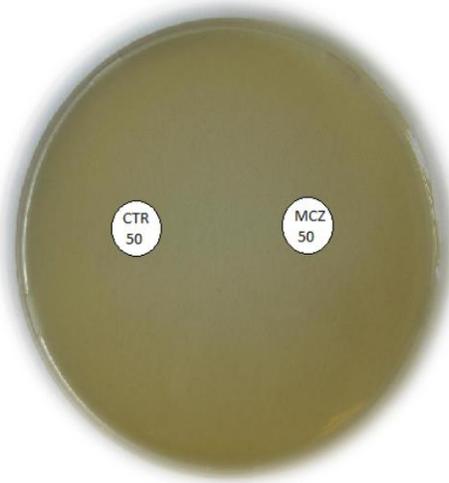


Figura 10. Posición de los discos (BIORAD) CTR y MCZ en AMHm.

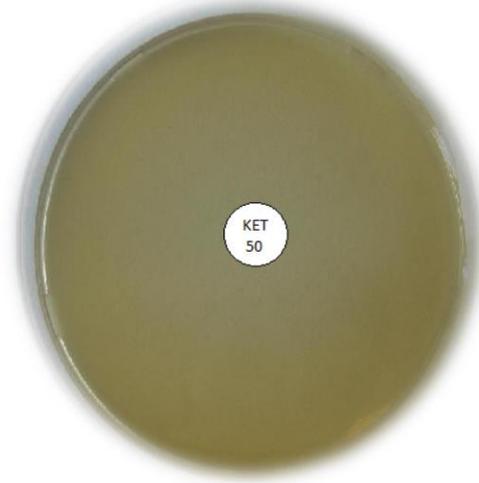


Figura 11. Posición del disco (BIORAD) KET en AMHm.

Lectura de resultados

Para la correcta lectura de resultados se midió el halo de inhibición con ayuda de un vernier, tomando en cuenta las colonias con desarrollo confluyente como lo muestra la figura 13, es decir, se debe evitar medir aquellas colonias con desarrollo inhibido como se muestra el ejemplo en la figura 12.

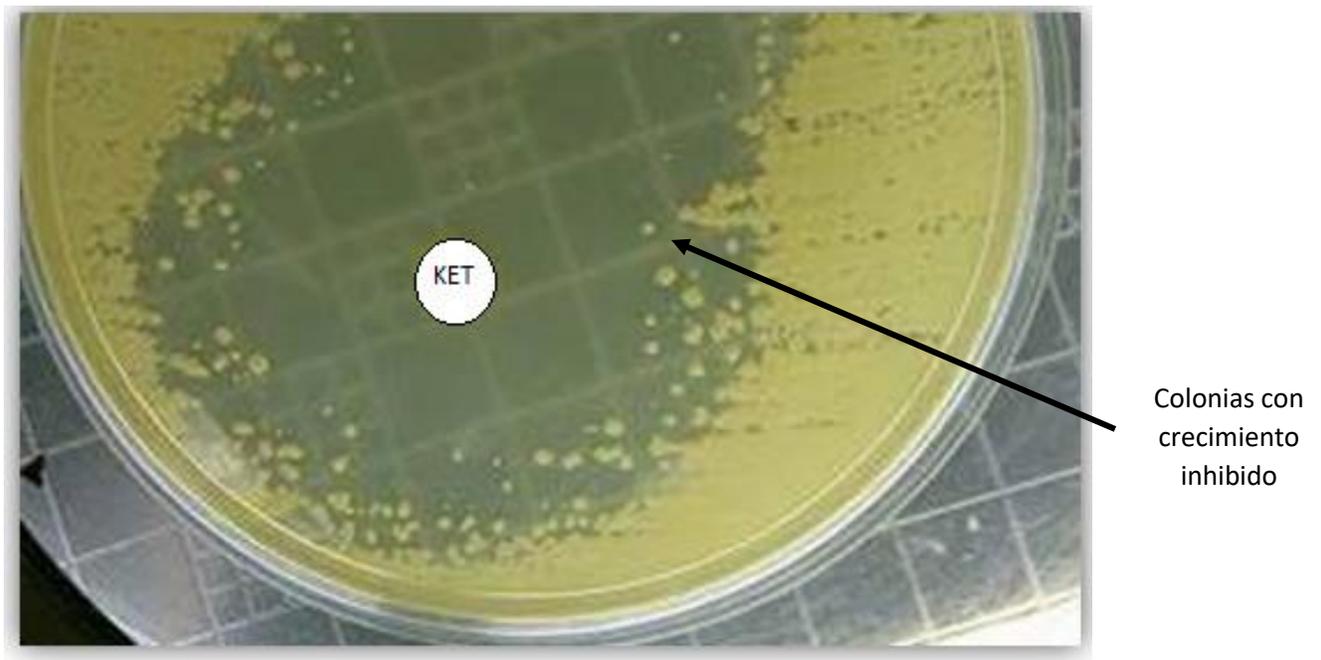
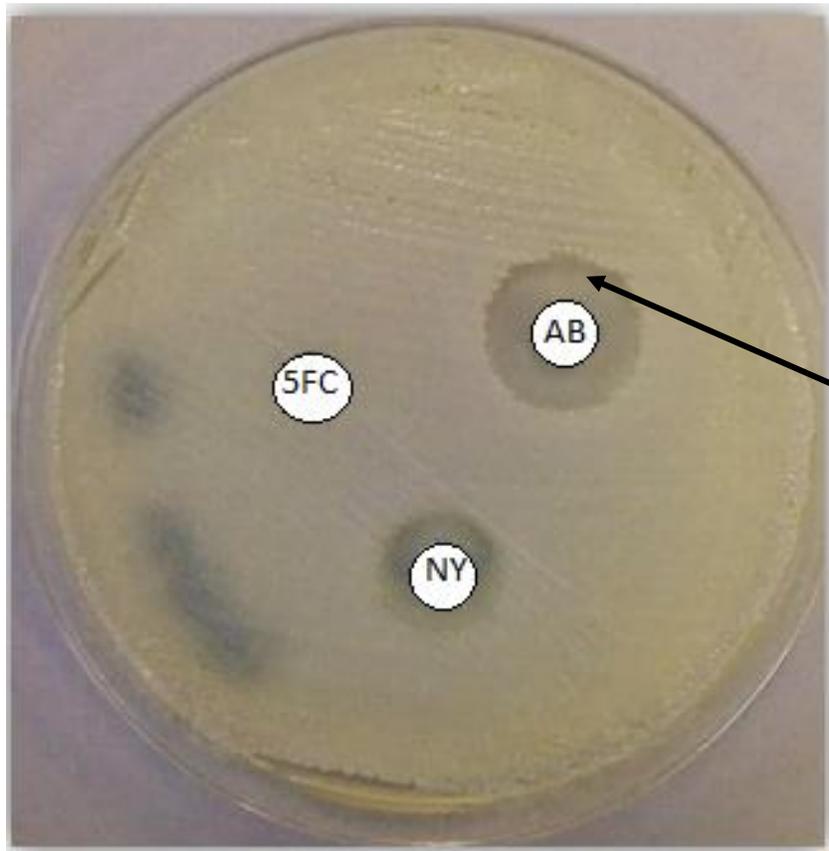


Figura 12. Ejemplo de las colonias desarrolladas dentro de la zona de inhibición.



Colonias con crecimiento
confluyente

Figura 13. Ejemplo de diámetro de inhibición.

7.2.3 Interpretación de resultados

Para la interpretación de los resultados, se tomó como referencia el inserto de los discos para antifungigrama BIO RAD con los que se trabajó, que son los siguientes:

	Diámetro de la zona de inhibición en mm	Interpretación de resultados
5-Fluorocitosina	> 20	Sensible
	10-20	Intermedio
	≤ 10	Resistente
Anfotericina B	> 10	Sensible
	≤ 10	Resistente
Nistatina	> 10	Sensible
	≤ 10	Resistente
Clotrimazol	> 20	Sensible
	10-20	Intermedio
	≤ 10	Resistente
Miconazol	> 20	Sensible
	10-20	Intermedio
	≤ 10	Resistente
Ketoconazol	> 20	Sensible
	10-20	Intermedio
	≤ 10	Resistente

8. RESULTADOS

Los 50 aislamientos clínicos proporcionados en el Laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, se sometieron a una identificación con la tinción Gram y en CHROMagar. Como se aprecia en la figura 14, al realizar la tinción y observarla al microscopio a 100X, se comprobó que efectivamente se trataba de *C. albicans* libre de contaminantes.

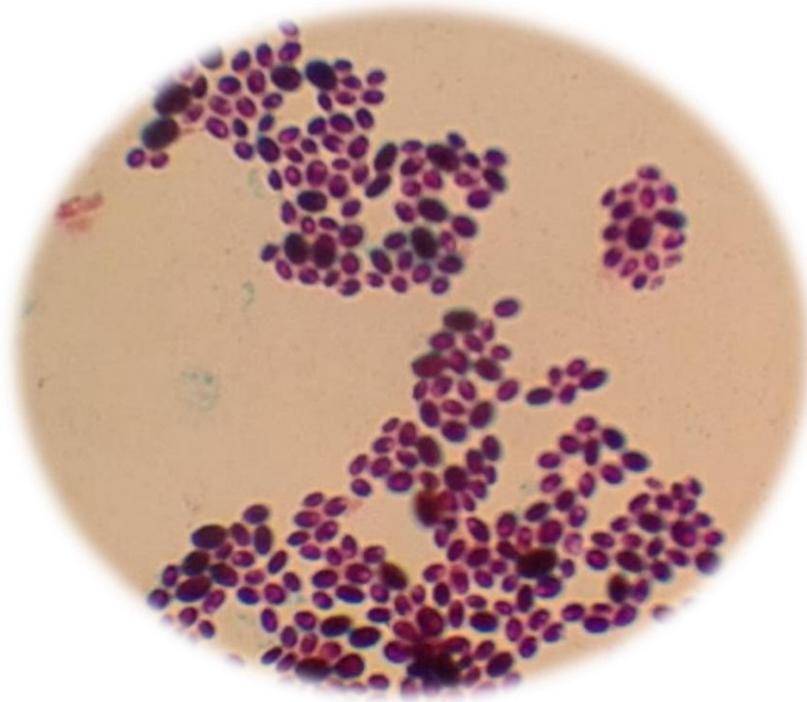


Figura 14. Tinción Gram de *Candida albicans*.

Después de realizar la prueba de sensibilidad, el comportamiento de cada una de las cepas frente a los antimicóticos se asignó de acuerdo con la categoría clínica (Sensible, Intermedio, Resistente) según las medidas obtenidas a partir de los halos de inhibición.

En la tabla 1 se observan los promedios obtenidos del diámetro de inhibición de las cepas frente a cada uno de los antimicóticos después de realizar la prueba de sensibilidad por triplicado.

Tabla 2. Diámetro de inhibición de cada una de las cepas frente a los antimicóticos

Código de cepa del Lab 17 UIM	5FC	AB	NY	CTR	MCZ	KET
3	23 mm	24 mm	12 mm	36 mm	44 mm	62 mm
6	0 mm	27 mm	15 mm	49 mm	40 mm	65 mm
11	20 mm	24 mm	14 mm	36 mm	40 mm	62 mm
106	0 mm	20 mm	15 mm	36 mm	36 mm	62 mm
216	0 mm	21 mm	15 mm	32 mm	35 mm	55 mm
267	0 mm	17 mm	14 mm	35 mm	32 mm	56 mm
274	0 mm	23 mm	15 mm	29 mm	28 mm	60 mm
298	26 mm	24 mm	12 mm	42 mm	31 mm	86 mm
328	30 mm	24 mm	15 mm	47 mm	43 mm	61 mm
481	0 mm	25 mm	15 mm	30 mm	30 mm	57 mm
534	0 mm	20 mm	15 mm	40 mm	48 mm	80 mm
543	0 mm	27 mm	15 mm	43 mm	37 mm	64 mm
624	0 mm	22 mm	11 mm	27 mm	29 mm	45 mm
625	0 mm	28 mm	20 mm	55 mm	50 mm	65 mm
650	0 mm	20 mm	15 mm	21 mm	27 mm	50 mm
683	36 mm	24 mm	15 mm	41 mm	44 mm	60 mm
704	33 mm	27 mm	13 mm	36 mm	39 mm	64 mm
796	0 mm	18 mm	14 mm	35 mm	35 mm	52 mm
820	0 mm	25 mm	11 mm	32 mm	31 mm	51 mm
941	0 mm	19 mm	14 mm	32 mm	35 mm	57 mm
947	0 mm	24 mm	16 mm	30 mm	33 mm	57 mm
956.2	0 mm	19 mm	15 mm	42 mm	38 mm	55 mm
963	0 mm	20 mm	15 mm	38 mm	34 mm	60 mm
984	0 mm	21 mm	17 mm	23 mm	25 mm	47 mm
1171	0 mm	17 mm	15 mm	35 mm	35 mm	54 mm
1269	0 mm	19 mm	15 mm	22 mm	26 mm	50 mm
1575.1	0 mm	17 mm	12 mm	43 mm	38 mm	62 mm
1586	0 mm	24 mm	15 mm	44 mm	41 mm	62 mm
2350	0 mm	24 mm	15 mm	39 mm	36 mm	59 mm
2494	0 mm	20 mm	15 mm	39 mm	36 mm	56 mm
2965	0 mm	20 mm	15 mm	40 mm	34 mm	62 mm
3812	0 mm	20 mm	15 mm	42 mm	38 mm	55 mm

4459	0 mm	23 mm	15 mm	30 mm	28 mm	47 mm
4537	0 mm	19 mm	14 mm	32 mm	35 mm	57 mm
4812	0 mm	24 mm	15 mm	45 mm	50 mm	65 mm
4814	0 mm	24 mm	15 mm	40 mm	42 mm	55 mm
4853	0 mm	28 mm	15 mm	42 mm	42 mm	59 mm
4853.1	0 mm	20 mm	15 mm	25 mm	25 mm	50 mm
5507.2	0 mm	19 mm	13 mm	35 mm	33 mm	61 mm
5509	0 mm	20 mm	14 mm	32 mm	28 mm	49 mm
6321	0 mm	28 mm	19 mm	45 mm	45 mm	63 mm
6920	0 mm	22 mm	16 mm	38 mm	38 mm	65 mm
7120	0 mm	22 mm	15 mm	42 mm	40 mm	61 mm
8750.1	0 mm	17 mm	12 mm	35 mm	30 mm	59 mm
9085	0 mm	23 mm	14 mm	32 mm	29 mm	62 mm
9154	0 mm	24 mm	13 mm	40 mm	38 mm	65 mm
9655	0 mm	19 mm	13 mm	38 mm	38 mm	54 mm
9676.1	0 mm	21 mm	19 mm	36 mm	36 mm	55 mm
9686	0 mm	23 mm	15 mm	32 mm	25 mm	62 mm
9763	0 mm	22 mm	17 mm	31 mm	33 mm	64 mm

Tabla 3. Promedio de los halos de inhibición de cada antimicótico

5FC	AB	NY	CTR	MCZ	KET
28 mm	22 mm	15 mm	36 mm	36 mm	59 mm

Tabla 4. Interpretación de resultados correspondiente a la categorización clínica.

Código de cepa del Lab 17 UIM	5FC	AB	NY	CTR	MCZ	KET
3	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
6	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
11	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
106	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
216	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

267	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
274	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
298	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
328	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
481	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
534	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
543	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
624	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
625	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
650	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
683	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
704	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
796	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
820	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
941	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
947	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
956.2	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
963	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
984	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
1171	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
1269	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
1575.1	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
1586	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
2350	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
2494	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
2965	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
3812	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

4459	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
4537	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
4812	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
4814	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
4853	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
4853.1	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
5507.2	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
5509	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
6321	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
6920	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
7120	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
8750.1	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9085	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9154	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9655	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9676.1	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9686	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
9763	Resistente	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

En las siguientes imágenes se esquematizan los halos de inhibición que presentaron cada una de las cepas frente a los diferentes antimicóticos. La cepa se encuentra resistente frente a 5FC en comparación con AB y NY.

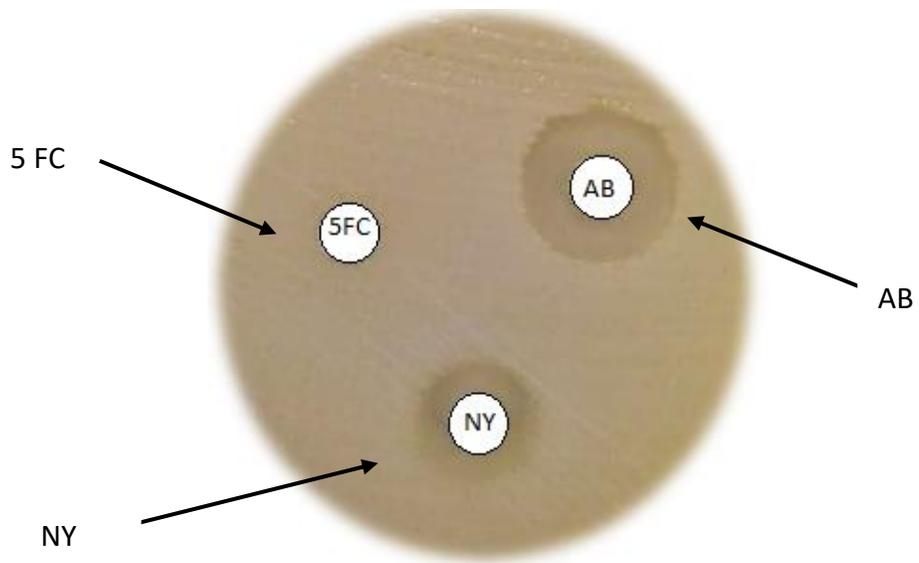


Figura 15. Halos de inhibición de los antimicóticos 5FC, NY y AB.

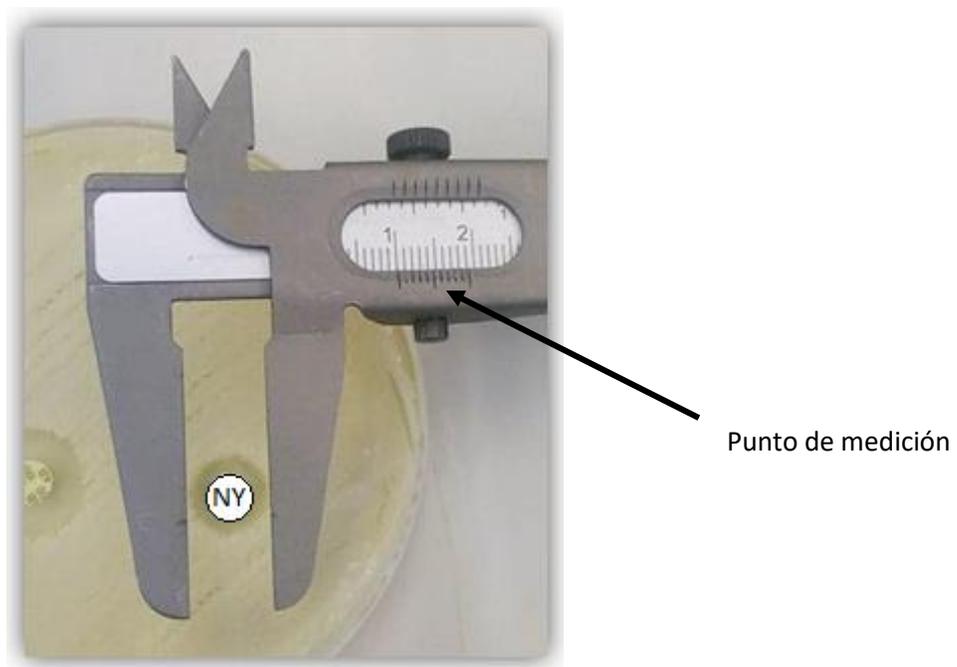


Figura 16. Diámetro de inhibición de 15 mm del antimicótico NY.

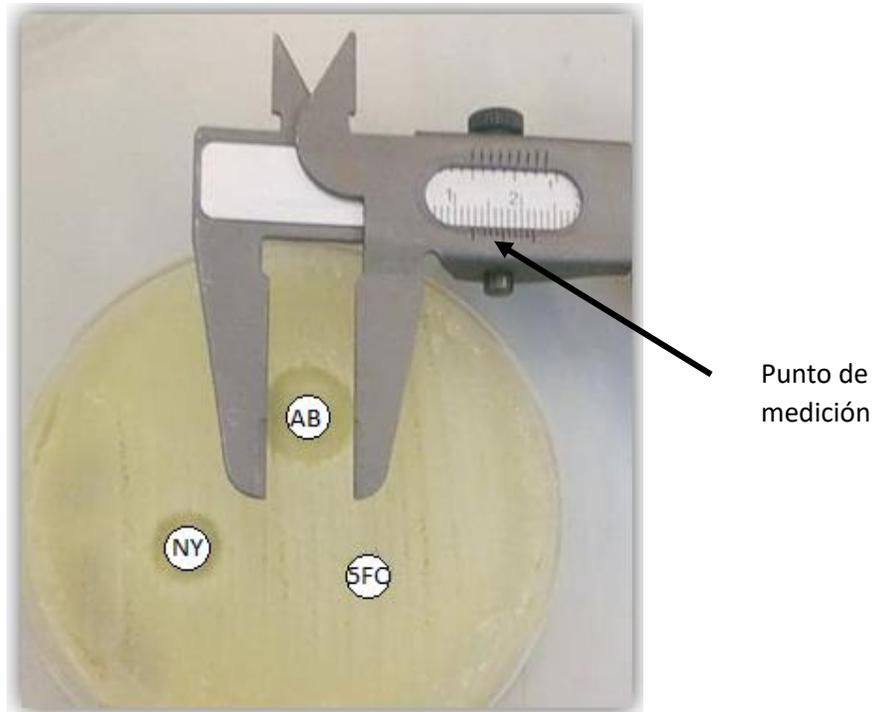


Figura 17. Diámetro de inhibición de 17 mm del antimicótico AB.

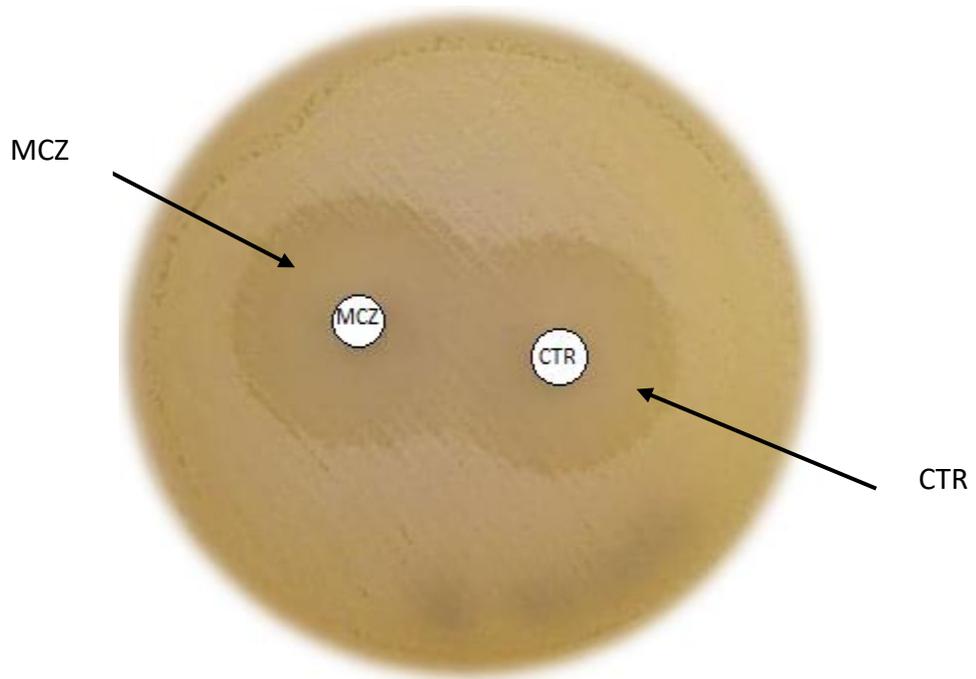


Figura 18. Halos de inhibición de los antimicóticos MCZ y CTR.

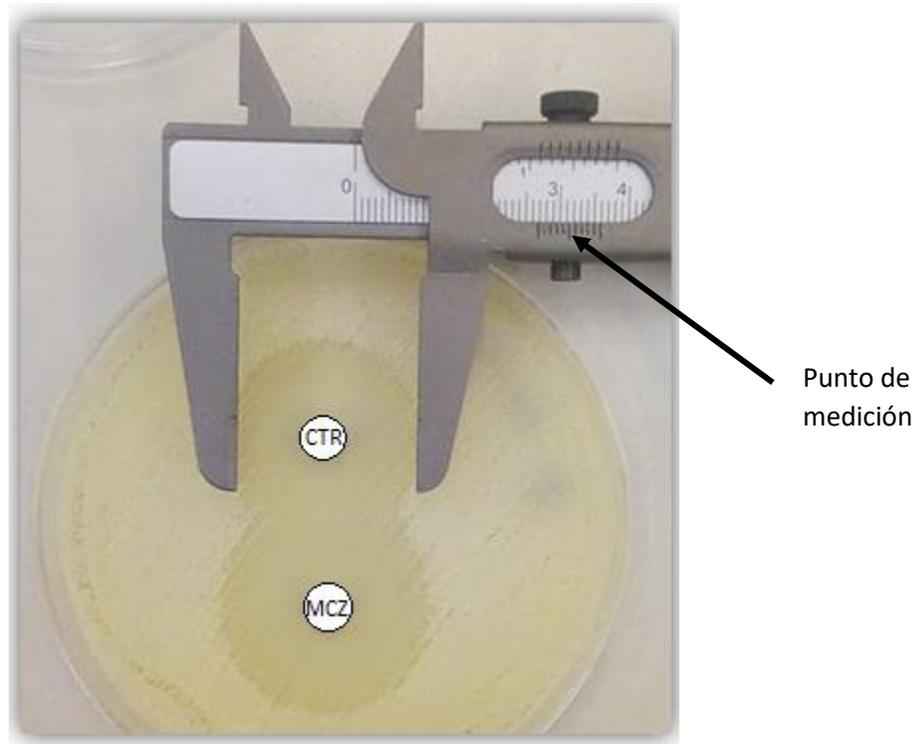


Figura 19. Diámetro de inhibición de 33 mm del antimicótico CTR

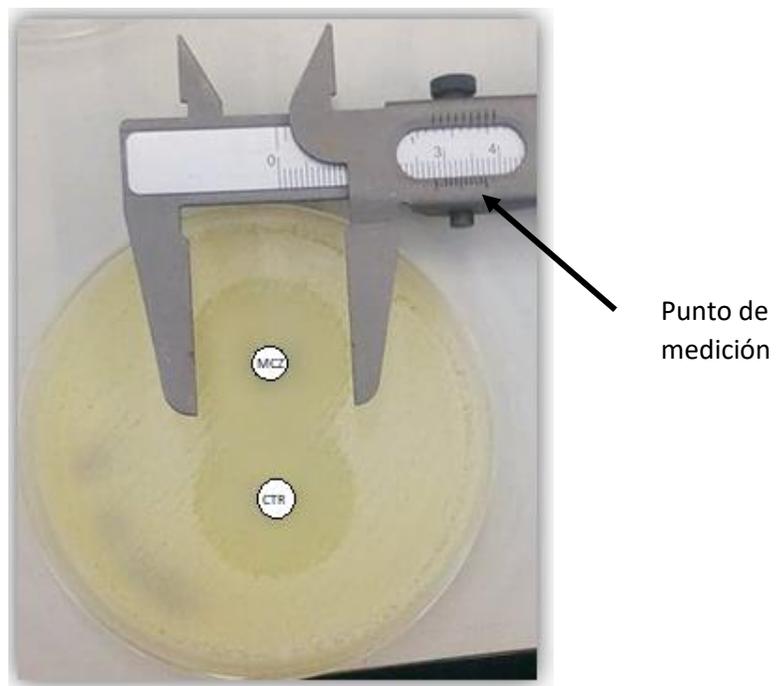


Figura 20. Diámetro de inhibición de 36 mm del antimicótico MCZ.

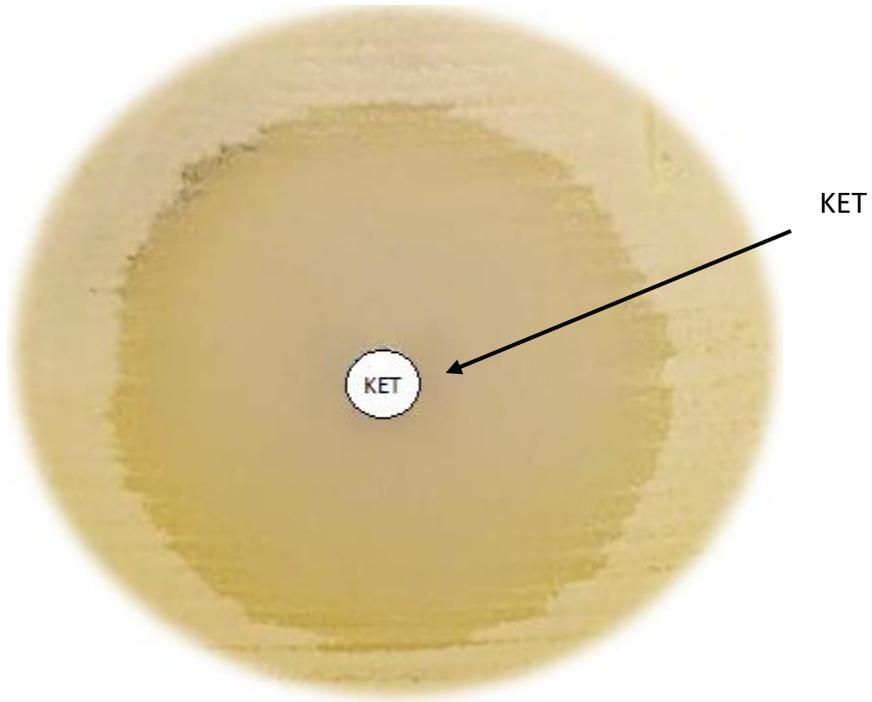


Figura 21. Halo de inhibición del antimicótico KET.

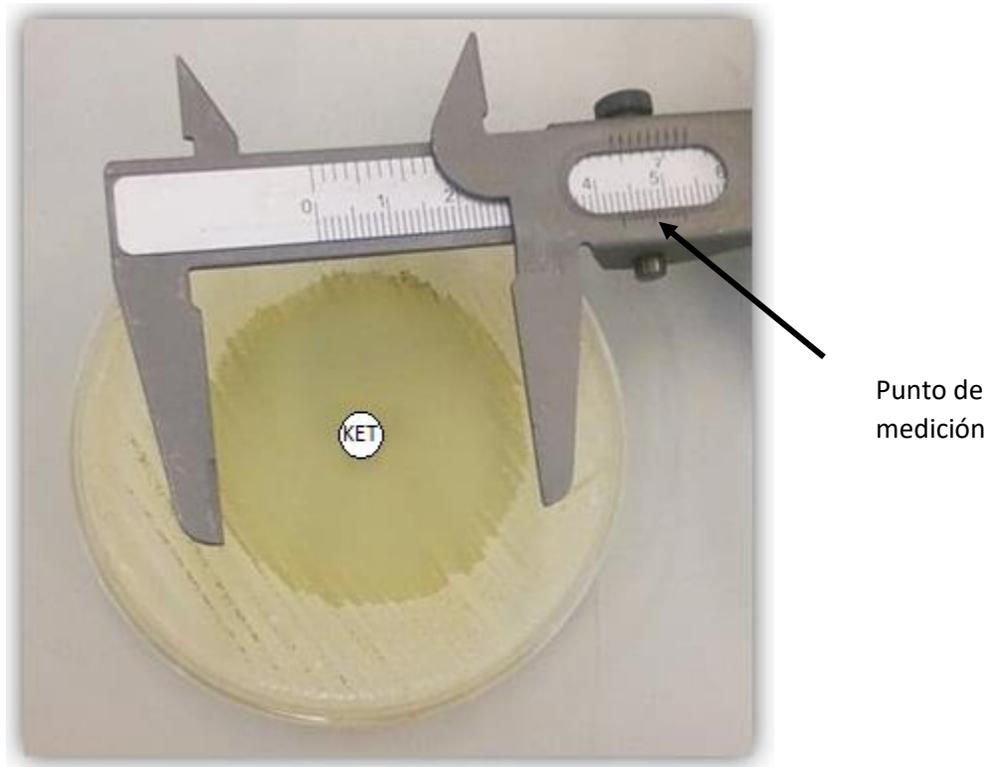
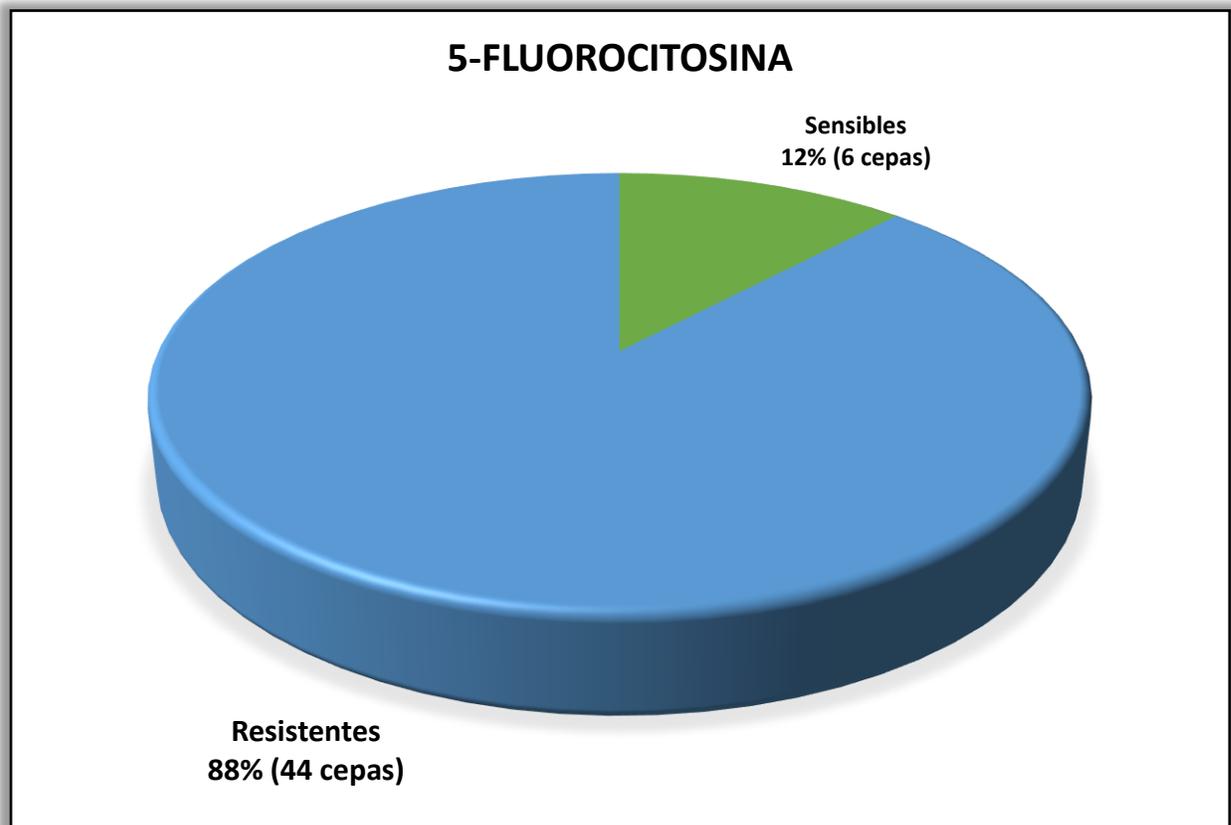
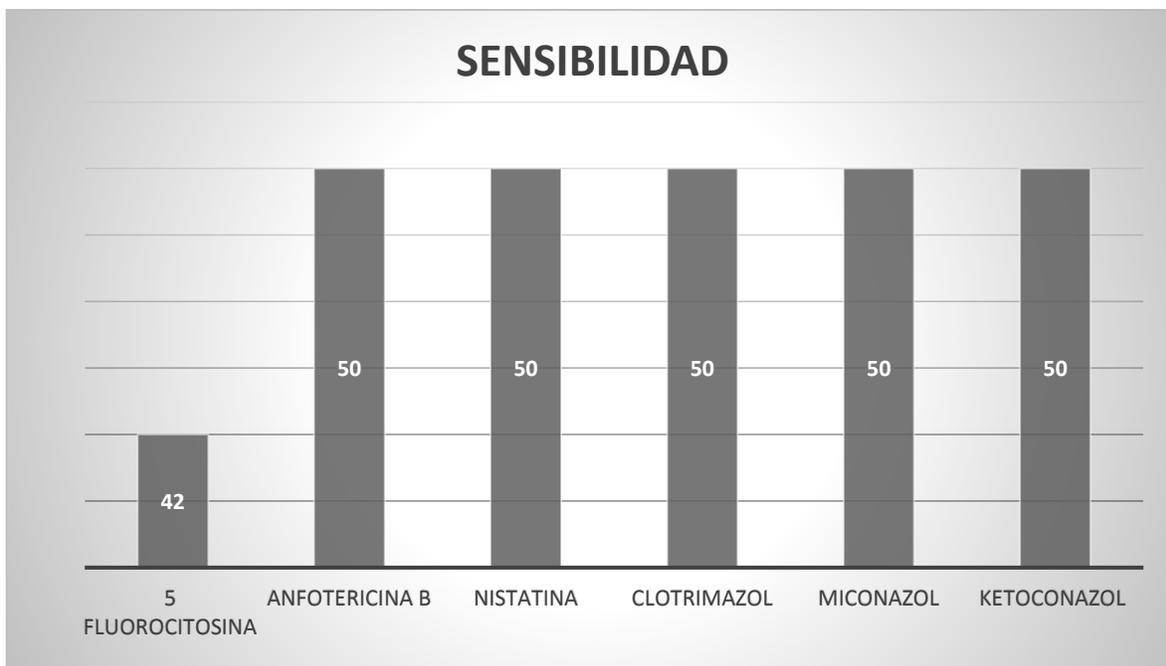


Figura 22. Diámetro de inhibición de 48 mm del antimicótico KET.

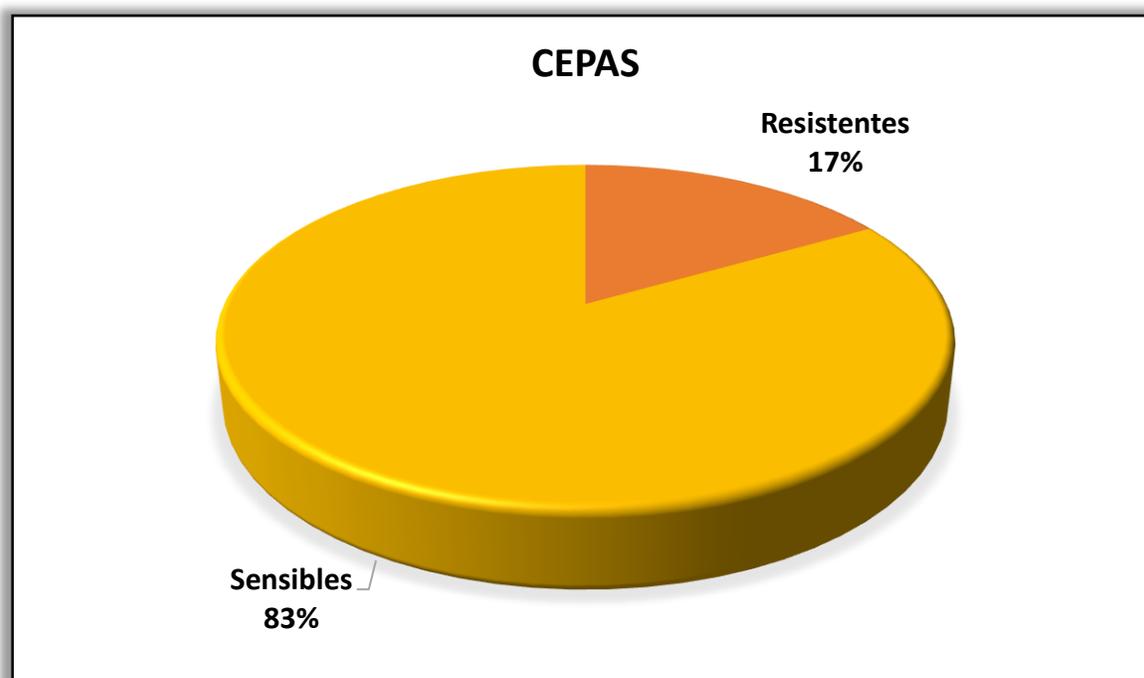
Las únicas cepas resistentes que surgieron son aquellas sometidas frente a 5FC, como se observa en la gráfica 1 tomando como un 100% un total de 50 cepas, el 88% de las cepas resultaron resistentes en comparación con los demás antimicóticos utilizados.



Gráfica 1. Porcentaje de sensibilidad y resistencia del antimicótico 5-Fluorocitosina



Gráfica 2. Número de cepas sensibles de cada antimicótico



Gráfica 3. Porcentaje de sensibilidad y resistencia de las cepas frente a todos los antimicóticos probados.

9. DISCUSIÓN

La infección vaginal por especies de *Candida*, conocida como candidiasis vulvovaginal (CVV), constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica. Afecta al 75% de las mujeres en edad reproductiva al menos una vez en su vida. Esta enfermedad es la segunda causa más común de infecciones vaginales, precedida por las vaginosis bacterianas. (Miró, 2017).

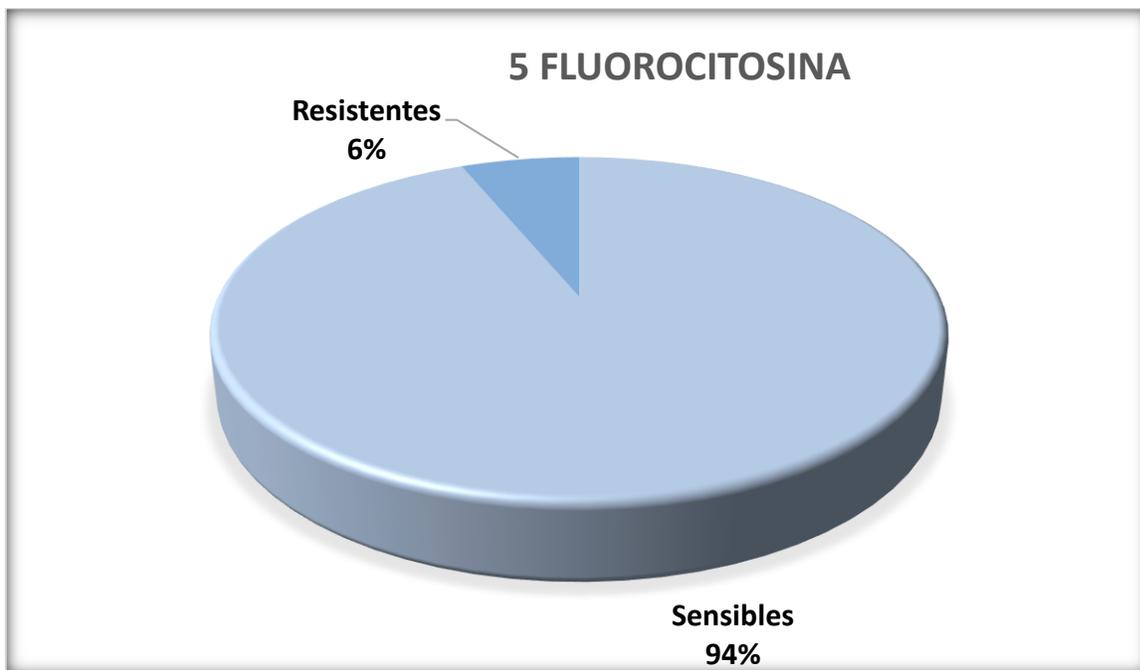
Las infecciones graves causadas por levaduras del género *Candida* son frecuentes en la población hospitalaria. Debido a las diferencias en la distribución de especies y la sensibilidad a los antifúngicos según el área geográfica y el tipo de paciente, resulta importante estudiar el mecanismo de acción de los antimicóticos. (Guzzetti, 2016). La existencia de diferentes alternativas terapéuticas permite asegurar que no todas las infecciones fúngicas deben tratarse de la misma forma, por lo que la identificación de las especies y los estudios de sensibilidad a los antifúngicos tienen un valor añadido. La aparición de cepas resistentes a los antifúngicos ha hecho que las recomendaciones terapéuticas puedan variar de una zona geográfica a otra. Por ello, el conocimiento de las propiedades, el mecanismo de acción y el perfil de sensibilidad de los diferentes antifúngicos es imprescindible en la práctica clínica diaria.

Como se mencionó anteriormente, en este estudio se demostró la sensibilidad y resistencia de 50 cepas de *C. albicans* obtenidas de muestras clínicas vaginales donadas por el Laboratorio 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, frente a los 6 antimicóticos (BIORAD) los cuales son 5-fluorocitosina (62846), anfotericina B (62806), nistatina (62856), clotrimazol (62816), miconazol (62836) y ketoconazol (62866).

Al observar la actividad de *C. albicans* con respecto a la presencia del antimicótico 5-Fluorocitosina, observamos en la tabla 1 que solo 6 cepas se comportaron de manera sensible frente a dicho antimicótico, es decir, el 88% de las cepas determinaron resistencia a dicho antimicótico, como se observa en la gráfica 1.

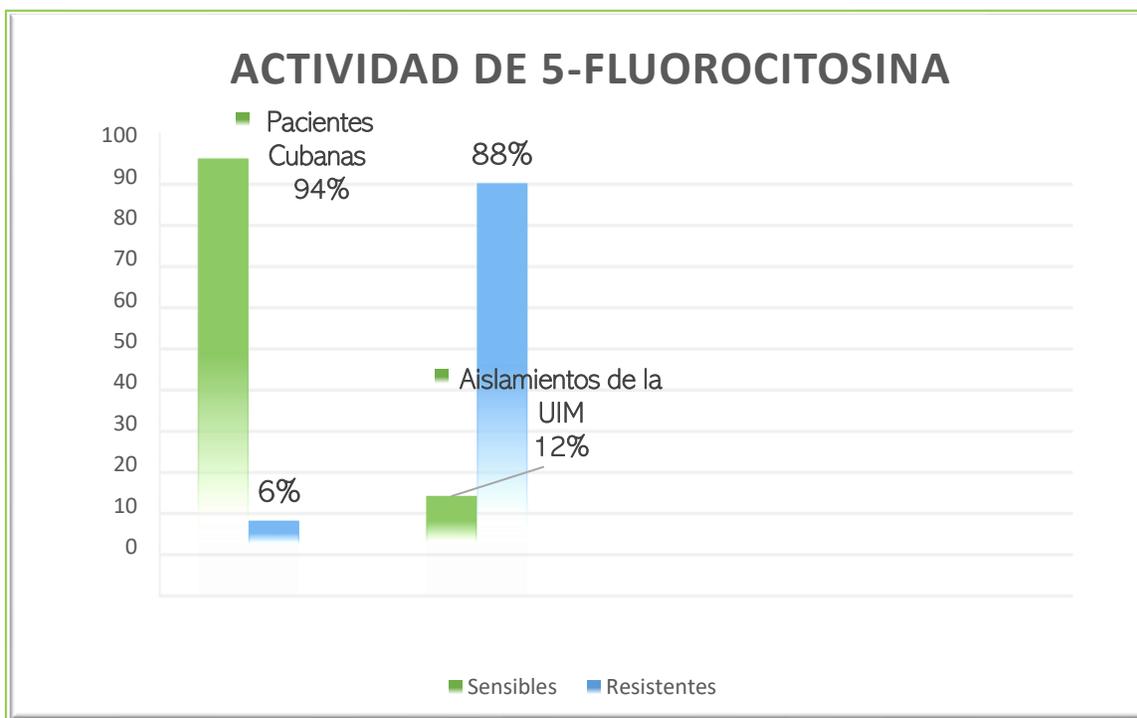
Debido a que el fármaco penetra en la célula fúngica a través de una citosina permeasa y se desamina para transformarse en 5-fluorouracilo (5-FU) en el citoplasma. La molécula de 5-FU se convierte en ácido 5-Fluorouridílico, que compete con el uracilo en la síntesis del ARN y da lugar a errores de codificación en el ARN e inhibición de la síntesis de ADN y proteínas. (Murray, 2017).

Un estudio demuestra que al evaluar 15 aislamientos de *C. albicans* derivados de pacientes cubanas con sospecha de CVV obtenidas en el 2015, 5-Fluorocitosina presento una CMI de 4mg/L, de los cuales 15 aislados (93.75%) fueron sensibles y uno (6.25%) fue resistente. (Perurena, 2016)



Gráfica 4. Porcentaje de cepas sensibles y resistentes del antimicótico 5FC. (Perurena, 2016).

El comportamiento de 5FC en los aislamientos donados por la Unidad de Investigación Multidisciplinaria es diferente con respecto a los aislamientos provenientes de pacientes cubanas con CVV, siendo que el antimicótico presentó diferente porcentaje de sensibilidad y resistencia a los aislamientos.



Gráfica 5. Comparación del porcentaje de sensibilidad y resistencia del antimicótico 5FC en pacientes cubanas con respecto a los aislamientos de la UIM.

La diferencia de los resultados de ambos estudios principalmente es debido a la CMI, siendo que en las pacientes cubanas utilizaron una mayor concentración, es decir, 4mg/L comparada con el presente estudio en el cual se utilizó una concentración de 1µg. Los aislamientos presentaron mayor resistencia a una menor concentración del antimicótico. Un estudio de CVV recurrente realizado por Richter y otros, en EUA, reporta que del total de aislados de *C. albicans*, el 3% fue resistente a 5FC, presentando altos valores de CMI (>128 mg/L). Según Liu y otros, la resistencia a la 5FC puede deberse a una pérdida o una mutación en el gen FUR1 que codifica para la enzima uracil fosforibosil transferasa, encargada de la inserción del compuesto en el ARN del microorganismo. (Perurena, 2016)

La 5-Fluorocitosina no se administra en monoterapia debido a la tendencia de la aparición de resistencia secundaria. Se ha demostrado que la combinación de 5-

Fluorocitosina con anfotericina B o fluconazol es eficaz en el tratamiento de la candidiasis. (Murray, 2017)

Dentro de los antimicóticos evaluados, correspondientes a anfotericina B y nistatina de la familia de los polienos, se logró identificar en tabla 1, la sensibilidad de las 50 cepas frente a ambos antimicóticos, es decir el 100% de las cepas. La anfotericina B tiene como mecanismo de acción farmacológica, la unión al ergosterol de la pared celular del hongo y altera la permeabilidad de la membrana, así permite la pérdida del contenido celular y causa la muerte. Es un antimicótico de amplio espectro útil en infecciones fúngicas, se une a las proteínas plasmáticas, eritrocitos y colesterol. (Achury, 2012)

Semejante a los resultados obtenidos con respecto a anfotericina B, Phillips, estudió la efectividad de dicho antimicótico en mujeres con CVV que no respondió a los antimicóticos habituales. Un régimen de 2 semanas con 50 mg de anfotericina B intravaginalmente fue efectivo en el 70% de los casos (Dovnik, 2015).

Otro estudio que utilizó anfotericina B (Sigma-Aldrich 110 Química, Madrid, España) a partir del método de microdilución en caldo, demostró sensibilidad con una dosis de 0.03-100 µg/mL en 40 aislamientos de CVV (Fornari, 2016). La anfotericina B es uno de los antimicóticos más efectivos contra CVV a CMI bajas.

Como todos los polienos, la nistatina se une de manera irreversible a los esteroides de membrana presentes en las especies susceptibles de *Candida*. Las moléculas de polienos presentan mayor afinidad por los esteroides fúngicos, incluyendo el ergosterol, que, por los esteroides humanos, lo que permite una toxicidad selectiva relativa. Esta unión irreversible altera la permeabilidad de la membrana y posibilita la salida de componentes intracelulares esenciales y, como consecuencia la muerte celular. En bajas concentraciones la nistatina es fungistática, mientras que en concentraciones más elevadas tiene actividad fungicida. Numerosos estudios han demostrado que los imidazoles tópicos son más efectivos que la nistatina para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal, por lo que la utilización de nistatina para el tratamiento de dicha infección ha disminuido en los últimos años (Wolff, 2009). Sin embargo, en un estudio de acuerdo con el método de microdilución en caldo

CLSI M 27-A3 se determinaron CMI para nistatina, exhibiendo una CMI de 4mg/L en muestras clínicas de CVV (Choukri, 2014). Por otro lado, al evaluar la susceptibilidad de nistatina (PharmaNostra, Brasil) en dos tipos de pacientes, grupo colonizado (I) se mostró una sensibilidad de 8µg/mL, mientras tanto, en el grupo de infección complicada (II), todos los aislamientos fueron resistentes a la nistatina (Fornari, 2016).

Finalmente, los halos de inhibición de la familia de los azoles (clotrimazol, miconazol y ketoconazol), determinaron la sensibilidad de las 50 cepas frente a estos antimicóticos. Como se observa en la tabla 1, ninguna de las cepas presentó alguna resistencia a la familia de los azoles, así mismo en la figura 21, observamos el amplio halo de inhibición que ejerce ketoconazol al actuar frente a *Candida* comparado con los otros antimicóticos.

Tanto los imidazoles como los triazoles actúan inhibiendo la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa dependiendo del citocromo P450 fúngico. Esta enzima participa en la conversión de lanosterol en ergosterol y su inhibición altera la síntesis de la membrana celular del hongo. Dependiendo del microorganismo y el azol administrado, la inhibición de la síntesis de ergosterol comporta la inhibición de la proliferación de la célula fúngica (fungistático) o bien la muerte celular (fungicida). (Murray, 2016).

En un estudio se analizaron 113 aislados de *C. albicans* para determinar la susceptibilidad in vitro del antimicótico clotrimazol y miconazol mostrando una CMI de 0.06mg/L para ambos antimicóticos (Choukri, 2014). Mientras en la Universidad Médica de Aichi, se evaluaron 54 cepas de *C. albicans* con los mismos antimicóticos, determinando una CMI de 988 µg/ mg para clotrimazol y 980 µg/ mg para miconazol. (Nagashima, 2016).

Recientemente, Mendling en el 2014 realizó un estudio comparativo en 160 pacientes con CVV en los que compararon el tratamiento con supositorios vaginales de clotrimazol solos y una combinación de 2% de crema de clotrimazol para uso externo y clotrimazol vaginal supositorios. Concluyeron que la combinación de ambos era mejor que los supositorios solos. (Dovnika, 2015).

Por otro lado, al evaluar la susceptibilidad de ketoconazol (PharmaNostra, Brasil) en dos tipos de pacientes, grupo colonizado (I) se mostró una sensibilidad de 0.0625 µg/mL, mientras tanto, en el grupo de infección complicada (II), todos los aislamientos fueron sensibles a la misma concentración de 0.0625 µg/mL. (Fornari, 2016).

Estudios demuestran que la terapia con 100 mg de ketoconazol resulta efectiva, sin embargo, no es favorecida para tratar una CVVC por su hepatotoxicidad. (Dovnik, 2015).

Las diferencias de los derivados imidazólicos son pequeños cambios de espectro y básicamente se utilizan para las micosis superficiales más comunes, entre ellas la candidiasis. Las indicaciones y posología dependen de las presentaciones de cada uno de los antimicóticos. (Mendoza, 2008).

10. CONCLUSIONES

- A partir de las 50 muestras clínicas vaginales de *Candida albicans* obtenidas del Hospital de Tlalnepantla ISSEMYM con base al método de difusión en agar con disco de los antimicóticos utilizados (BIO RAD), se demostró la sensibilidad y resistencia de *Candida albicans*, frente a cada uno de ellos.
- Se confirma que 5-Fluorocitosina usualmente no se utiliza como monoterapia ya que la mayoría de las veces se combina con otro antimicótico para actuar ante una candidiasis vaginal, ya que en el estudio resultó ser el único antimicótico con un 88% de cepas resistentes y solo 12% de las cepas estudiadas presentó sensibilidad.
- Con un mayor diámetro en los halos de inhibición, el 100% de las cepas estudiadas mostró sensibilidad a ketoconazol, por lo tanto, es el mejor antimicótico del estudio.

11. REFERENCIAS

1. Achury Diana. (2012). "Fundamentos enfermeros en el proceso de administración de medicamentos". 1ª. Ed. Pontificia Universidad. Bogotá.
2. Aikin, Susana (2012) "Homeopatía y salud integral. Visión libros." España. Pag 104.
3. Arenas Guzman, Roberto (2011) "Micología médica ilustrada" Cuarta edición. Ed. Mc Graw Hill., México., D.F., pag. 222
4. Ausina V., Moreno, S. (2005) "Tratado de enfermedades infecciosas y microbiología clínica." Médica panamericana. Madrid. Pag. 618.
5. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de información. "Casos por entidad federativa de Enfermedades de Transmisión Sexual hasta la semana epidemiológica 40 del 2018" [en línea] Recuperado el 25/10/18 en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/402852/BSEMANAL_41.pdf?fbclid=IwAR3TZWs9qS8Tr5xP9TT7xgOBbimmst5pH-xOFFMKmT-BliOiRypQBmGY5no
6. Bonifaz, Alejandro (2012). "Micología médica básica" Cuarta edición. Mc Graw Hill. México., D.F. pág. 509-510.
7. Choukri F., Benderdouche M. y Sednaoui P. (2014). In vitro susceptibility profile of 200 recent clinical isolates of *Candida* spp. To topical antifungal treatments of vulvovaginal candidiasis, the imidazoles and nystatin agents. *Journal de Mycologie Medicale*. 24 (1) 303-307.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. "M44-A2. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline- Second Edition" [en línea]. Recuperado el 2/10/18 en https://clsi.org/media/1634/m44a2_sample.pdf
9. Dirección general de epidemiología (2017) "Incidencia de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad. Estados Unidos Mexicanos 2017. Población General. [en línea] Recuperado el 25/10/18 en:

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2017/incidencia/incidencia_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf?fbclid=IwAR2CBWQpWR_poQ7jmGPgx8YzhcExAICQhyEamEOwfn2kKz-pvhRDcd4PQq0

10. Dovník A., Golle A., Novak D., Arko D. y Takac I. (2015). Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of literature. *Acta Dermatovenerol.* 24 (1), 5-7.
11. Figueras C., Díaz, C., García, J., Navarro, M., Ruíz, J., Rossich, R., Rumbao, J., Frick, M. y Rosello, E. (2011). Recomendaciones de la sociedad española de infectología pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *Elsevier doyma.* 74 (5) 337 e1- 337 e17.
12. Forbes, Betty (2009) "Diagnóstico microbiológico" 12° ed. Médica panamericana. Buenos Aires. Pag. 860.
13. Fornari G., Aparecida V., Rodrigues R., Dominguez M., Lameira R., Ferrari C., Herkert Patricia., Takimura M., De Carvalho y Queiroz F. (2016). Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. *Brazilian Journal of Microbiology.* 47 (1) 373-380.
14. Guzzetti, L., Vescina, C., Gil, M. y Gatti, B. (2016). Candidemias en pediatría: distribución de especies y sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Argentina de Microbiología.* 49 (4), 320-322.
15. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. "Candidiasis". [en línea]. Recuperado el 14/08/18 en:
<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Candida%20albicans.pdf>
16. Kenneth J., Ryan, C., Jorge, Ray. (2010). "Microbiología médica". Quinta edición. Mc Graw Hill. México. Pag. 554.
17. Kim R, Khachikian D, Rebolí AC. A comparative evaluation of properties and clinical efficacy of the echinocandins. *Expert Opin Pharmacother.* 2007
18. Lacroix, C. y Feuilhade de Chauvin, M. (2008) Traitements antifongiques. *Elsevier Masson SAS.* 98 (1) 906-910.

19. López Martínez Rubén, Mendez Tovar Luis J. Hernández Hernández Laura y Castañón Olivares R. (2012). "Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio". Ed. Trillas. México. Pag. 191.
20. Luciana B. Guzzetti, Cecilia M. Vescina, M. Florencia Gil y Blanca M. Gatti. Revista Argentina de Microbiología. 2017; 49 (4): 320- 322. 6
21. Mandell Gerald, Bennett John y Dolin Raphael. (2006) "Enfermedades infecciosas" 6° ed. Elsevier. España.
22. Mendoza, Nicandro. (2008). "Farmacología médica". 1ª. Ed. Médica Panamericana. México. Pag. 697.
23. Miró, M., Rodríguez, E., Vigezzi, C., Icely, P., Gonzaga, M., Riera, F., Vargas, L., Abiega, C., Caeiro, J. y Sotomayor, C. (2017). Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Iberoamericana de Micología*. 34 (2), 65-71.
24. Murray Patrick, Rosenthal Ken y Pfaller Michael. (2017). "Microbiología médica". 8ª Ed. Elsevier. España. Pag. 601.
25. Nagashima M., Yamagishi Y. y Mikamo H. (2016) Antifungal susceptibilities of Candida species isolated from the patients with vaginal candidiasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 22 (1) 124-126.
26. Nogales, Jorge. (2005). "Tratado de neurología clínica". Primera edición. Universitaria. Santiago de Chile. Pag. 357.
27. Perurena M., Pérez Y., Fernández C., Martínez G. y Illnait M. (2016). Susceptibilidad antifúngica de aislados vaginales de Candida spp. *Revista cubana de medicina tropical*. 68 (3) 248-252.
28. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 133-63.
29. Romero, Raúl (2007) "Microbiología y parasitología humana". Tercera edición. Médica panamericana. México. Pag. 1199.
30. Ruiz, Isabel y Cuenca, Manuel. (2009). Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Elsevier doyma*. 27 (6), 353-362.

31. Ruiz-Camps, M. Cuenca-Estrella. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27 (6): 353-362.
32. Saad D., Mahmoud N., Ahmad E., Mahmoud M. y Hassan S. (2016) Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. *Alexandria Journal of Medicine.* 52 (1) 269-277.
33. Tortora, Gerard (2007) "Introducción a la microbiología". 9° ed. Médica panamericana. Buenos Aires. Pag.802.
34. Vilata Corell, Juan. (2006). "Micosis cutánea". Médica panamericana. Madrid. Pag. 97
35. Wolff Klaus. (2009) "Dermatología en medicina general". 7ª. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Pag. 128.
36. Zurita Macalupú, S. y Urcia Ausejo, Flor. (2017). "Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico". Instituto Nacional de Salud. Perú.

12. ANEXO

Tinción GRAM:

1. Colocar una gota de agua esterilizada en el portaobjetos.
2. Añadir un inóculo de la muestra sobre la gota con ayuda de un asa bacteriológica.
3. Pasar el portaobjetos de dos a tres veces sobre la llama del mechero de Bunsen para fijar la muestra.
4. Añadir cristal violeta sobre la muestra durante 1 minuto.
5. Enjuagar suavemente a chorro de agua.
6. Añadir Lugol cubriendo toda la zona de la muestra y reposar por 1 minuto.
7. Decantar el Lugol.
8. Decolorar con alcohol acetona por 3 segundos y lavar a chorro de agua.
9. Agregar safranina y dejar reposar por 1 min.
10. Lavar suavemente a chorro de agua, escurrir y secar al aire.
11. Observar al microscopio (10X, 40X y 100X).

Preparación de CHROMagar:

1. Suspender 47.7g de polvo en 1 L de agua purificada.
2. Mezclar.
3. Agitar y hervir la mezcla durante 1 minuto para complementar la disolución del polvo.
4. Esterilizar en autoclave bajo las condiciones de 121°C/15lb/15min.
5. Servir en placas Petri y dejar enfriar por 24 horas a temperatura ambiente.
6. El medio deberá estar ausente de colonias.
7. En caso de que el medio se encuentre contaminado, deberá prepararse y esterilizarse un nuevo medio.

Preparación del medio YM:

1. Suspender 41 g del agar Difco YM en 1 L de agua purificada.
2. Calentar el medio de agar con agitación frecuente y hervir durante 1 min para disolver por completo el agar.
3. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 min.
4. Servir el agar en tubos de ensaye de forma inclinada.
5. Esperar 24 horas a que solidifique
6. El medio deberá estar ausente de colonias.
7. En caso de que el medio se encuentre contaminado, deberá prepararse y esterilizarse un nuevo medio.

Preparación del medio Agar Mueller Hinton modificado (AMHm)

Para la preparación de 1L de Mueller Hinton modificado según las instrucciones del fabricante, DIFCO OXOID, se agregaron 20g de glucosa en 1000 ml de agua destilada, así mismo 100 µl de la solución stock de azul de metileno.

<i>a. Mueller Hinton</i>	38 g
<i>b. Glucosa</i>	20 g
<i>c. Stock azul de metileno</i>	100 µL.
<i>d. Agua destilada</i>	1000 mL.

Solución stock de azul de metileno (SS-AM):

Para la preparación de la solución stock, se agregaron 0.1g de azul de metileno a 20 ml de agua destilada (5mg/ml) concentración final en el medio de cultivo SS-AM (5 µg/ml). Posteriormente el medio AMHm se esterilizó con autoclave bajo las condiciones 121°C/15lb/15min. Ya una vez esterilizado el medio se dejó enfriar a 50°C, para poder dispersar 12 mL en tubos de ensaye de forma inclinada. El medio deberá estar ausente de colonias. En caso de que el medio se encuentre contaminado, deberá prepararse y esterilizarse un nuevo medio.

Preparación de la Solución Salina Fisiológica

El ajuste de la concentración de las cepas se realizó con SSF al 0.9%, es decir, se disolvió 9 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada. Posteriormente se esterilizó en autoclave 121°C/15lb/15min.

Una vez que la SSF se mantuvo a temperatura ambiente, se repartió en tubos de ensaye, utilizando 1 tubo por cada cepa a trabajar vertiendo 5 mL en cada uno.