

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DEL ANTIFUNGICO
FLUCONAZOL CONTRA *Candida albicans* Y SU POSIBLE INHIBICION
CON *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™).

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

CARLOS ALBERTO BUENDIA RIVAS

FREDYS DANIEL CRUZ MUÑOZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

FEBRERO 2018

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORAS DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Coralia González de Díaz

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE ASESOR

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial queremos agradecer a:

Al tribunal calificador: MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, MSc. Coralia González de Díaz y MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez por su apoyo incondicional, paciencia y orientación.

A nuestra docente asesora: MSc. María Evelin Sánchez de Ramos por su apoyo incondicional, por su asesoría y aportación en nuestro trabajo de graduación, por el tiempo dedicado en nosotros para la buena marcha y desarrollo de nuestro trabajo de graduación.

Al laboratorio de CENSALUD de la Universidad de El Salvador: por darnos la oportunidad de realizar la etapa experimental fundamental para nuestro trabajo de graduación en tan prestigiosas instalaciones de laboratorio. En particular a la MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez coordinadora del laboratorio de Control de Calidad Microbiológico y a todo el equipo de laboratoristas por su apoyo técnico.

Al Hospital Nacional General “Dr. Juan José Fernández”, Zacamil: en específico al área de laboratorio clínico y el equipo de trabajadores por su incondicional apoyo.

DEDICATORIAS

A Dios sea la gloria y la honra por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para poder culminar mi carrera a quien le debo este triunfo profesional.

A mi padre Hugo Nelson Buendía Trigueros que está en la presencia de Dios por su esfuerzo, consejos y apoyo para poderme dar una carrera profesional a quien le debo este triunfo profesional.

A mi madre Dolores Esmeralda Rivas Fuentes por su esfuerzo, consejos, apoyo incondicional y a estar todo el tiempo pendiente de mí a quien le debo este triunfo profesional.

A mi hermano Hugo Ernesto Buendía Rivas por su esfuerzo, consejos y apoyo incondicional a quien le debo este triunfo profesional.

A la familia Paz Gonzales por su esfuerzo, consejos y apoyo incondicional a quien le debo este triunfo profesional.

Carlos Alberto Buendía Rivas.

DEDICATORIAS

A mis padres Daniel Armando Cruz y Nuria Muñoz, por motivarme a siempre ser una persona de bien, trabajadora y por enseñarme que las metas no se alcanzan sin esfuerzo y sacrificios.

A mi primo y también padrino Mauricio Araujo, por toda su ayuda a lo largo de todos estos años, sin él no hubiese sido posible alcanzar tan anhelado sueño, le estaré eternamente agradecido.

Al amor de mi vida Mazzally Guillen, por motivarme siempre ha ser la mejor versión de mí, por su apoyo incondicional aun en los peores momentos y por darme el mayor regalo de mi vida.

A mi compañero Carlos Buendía, por toda la paciencia, ayuda, comprensión y su amistad que me brindo a lo largo de todo este trayecto, la culminación de este trabajo ha sido posible gracias a su gran esfuerzo y trabajo.

Agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a nuestra asesora: MSc. María Evelin Sánchez de Ramos por sobre todo su amistad y paciencia en el trayecto de esta investigación.

Fredys Daniel Cruz Muñoz

INDICE GENERAL

Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xx
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	25
3.1 Epidemiología	25
3.1.1 Epidemiología de la micosis invasora causada por el género <i>Candida</i>	26
3.2 Características del genero <i>Candida</i>	27
3.2.1 Hábitat del genero <i>Candida</i>	27
3.2.2 Resistencia	28
3.2.3 Aislamiento	28
3.3 Morfología <i>Candida albicans</i>	29
3.3.1 Características del cultivo	30
3.4 Patogenia y Patología	30
3.4.1 Candidiasis	30
3.4.2 Candidiasis cutánea y mucosa	31
3.4.3 Vulvovaginitis	32
3.4.4 Candidiasis sistémica	34
3.4.5 Candidiasis crónica mucocutanea	34
3.4.6 Factores de virulencia	35
3.5 Resistencia microbiana	35
3.5.1 Factores que determinan la resistencia a antibióticos	36
3.5.2 Factores de riesgo para la resistencia al Fluconazol	37
3.6 Prueba de sensibilidad antibiótica	38
3.6.1 Factores que afectan al tamaño de las zonas de inhibición	39
3.6.1.1 Componentes de los medios de cultivo	39
3.6.1.2 Elección del medio	40

3.6.1.3 Efecto del Ph	40
3.6.1.4 Tamaño del inóculo	40
3.6.1.5 Prueba de sensibilidad directa	41
3.7 Prueba de sensibilidad por dilución en agar	41
3.8 Características del género <i>Lactobacillus</i>	42
3.8.1 Hábitat	42
3.8.2 División de los <i>Lactobacillus</i>	43
3.8.3 Aislamiento	43
3.9 Actividad probiótica del <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	44
3.10 Fluconazol	45
3.10.1 Descripción	45
3.10.2 Mecanismo de acción	45
3.10.3 Farmacocinética	45
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	48
4.1 Tipo de estudio	48
4.2 Investigación bibliográfica	48
4.3 Investigación de campo	49
4.4 Parte experimental	49
4.4.1 Aislamiento de cepa patrón de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	49
4.4.2 Identificación de cepa patrón de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50
4.4.2.1 Identificación a través de la prueba de tubo germinal o filamentación precoz	50
4.4.2.2 Identificación a través de la formación de clamidosporas	50
4.4.3 Estandarización de cepa patrón de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	51
4.4.4 Aislamiento de cepas de <i>Candida albicans</i> de las muestras hospitalarias	52
4.4.5 Identificación de cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i>	53

4.4.5.1 Identificación a través de la prueba de tubo germinal o filamentacion precoz	53
4.4.5.2 Identificación a través de la formación de Clamidosporas	53
4.4.6 Estandarización de cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de muestras hospitalarias	54
4.4.7 Reconstitución del <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (HOWARU™)	55
4.4.8 Identificación del <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	55
4.4.8.1 Tinción de gram	55
4.4.8.2 Prueba de la catalasa	55
4.4.9 Estandarización del <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	56
4.4.10 Comprobación de la efectividad del Fluconazol sobre <i>Candida albicans</i>	57
4.4.10.1 Preparación de la capa base	57
4.4.10.2 Preparación de la capa inculo	57
4.4.11 Evaluación de la inhibición causada por el <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> sobre cepas de <i>Candida albicans</i> obtenidas de muestras hospitalarias	58
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	61
5.1 Aislamiento de <i>Candida albicans</i> de las muestras hospitalarias De fluido vaginal	61
5.2 Identificación de <i>Candida albicans</i> de las muestras hospitalarias De fluido vaginal	62
5.3 Determinación de la efectividad del Fluconazol contra <i>Candida</i> <i>albicans</i> a una concentración de 10^3 y 10^5 a través de la técnica de dilución en Agar modificado	64
5.4 Resultados de la evaluación de la inhibición del hongo levaduriforme <i>Candida albicans</i> a una concentración de 10^3 y 10^5 con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> a una concentración de 10^6 y 10^7 a través de la técnica de dilución en Agar modificado	68
5.5 Comparación de los resultados obtenidos en las cepas aisladas	

De <i>Candida albicans</i> hospitalarias con respecto a los datos Obtenidos de la cepa patrón ATCC 10231 a concentración 10^3 Y 10^5 sensible a antifúngico	75
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	89
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	91
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Morfología característica de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> de la muestra hospitalaria 1 de fluido vaginal	61
2. Morfología microscópica de la cepa aislada de <i>Candida albicans</i> de la muestra hospitalaria 1	62
3. Formación de tubos germinales de la cepa aislada de <i>Candida albicans</i> de la muestra hospitalaria 3	63
4. Formación de clamidosporas de la cepa aislada de <i>Candida albicans</i> de la muestra hospitalaria 5	63
5. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de cada una de las muestras hospitalarias	66
6. Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias	67
7. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6	71
8. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^7	72
9. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6	73
10. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^7	74
11. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de cada una de las muestras	

- hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg 78
12. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10⁵ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg 79
13. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10³ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10⁶ 84
14. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10³ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10⁷ 85
15. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10⁵ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10⁶ 86
16. Gráfico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10⁵ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10⁷ 87

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> en las muestras hospitalarias de fluido vaginal	61
2. Identificación de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> de las muestras hospitalarias de fluido vaginal	62
3. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal	64
4. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal	65
5. Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal	67
6. Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal	68
7. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal, utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6 y 10^7	69
8. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal, utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6 y 10^7	70
9. Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de <i>Candida albicans</i> 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6 como microorganismo inhibidor	71

10. Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 como microorganismo inhibidor 73
11. Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 como microorganismo inhibidor 74
12. Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 como microorganismo inhibidor 75
13. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10^3 ATCC 10231, utilizando Fluconazol 25 μ g 76
14. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10^5 ATCC 10231, utilizando Fluconazol 25 μ g 77
15. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10^3 ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 80
16. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10^5 ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 81
17. Resultados de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras

hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷ 82

18. Resultados de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10⁵ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷ 83

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Morfología microscópica de *Candida albicans* con tinción al gram.
Levaduras gram positivas
2. Estandarización de la cepa patrón de *Candida albicans* ATCC 10231
3. Estandarización de las cepas de *Candida albicans* de las muestras hospitalarias
4. Procedimiento para la tinción al gram
5. Prueba de catalasa
6. Estandarización del *Lactobacillus rhamnosus*
7. Comprobación de la efectividad del Fluconazol sobre *Candida albicans*
8. Calculo para obtener la concentración de 10^3 y 10^5 de *Candida albicans*
9. Evaluación de la inhibición causada por el *Lactobacillus rhamnosus* sobre las cepas de *Candida albicans* obtenidas de muestras hospitalarias
10. Resultado del aislamiento de *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal
11. Resultados de la identificación de *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal
12. Conteo de colonias de las muestras de cepas hospitalarias de *Candida albicans* y de la cepa patrón ATCC 10231
13. Calculo para obtener el porcentaje de inhibición de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* y de la cepa patrón ATCC 10231

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de comprobar la efectividad del Fluconazol 25 µg contra cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizadas a una concentración de 10^3 y 10^5 principal agente causal de algunas enfermedades vaginales como la vaginitis y su posible inhibición con *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) utilizado a una concentración de 10^6 y 10^7 como microorganismo inhibidor, las cepas de *Candida albicans* se aislaron de las muestras y se inocularon en Agar Sabouraud Dextrosa donde todas las cepas en las muestras hospitalarias presentaron colonias características de *Candida albicans* y para su identificación se realizaron diferentes pruebas como la tinción al gram, prueba de formación de tubos germinales y la prueba de formación de Clamidosporas donde se encontró que todas las muestras hospitalarias presentaron morfología microscópica característica de *Candida albicans* por lo tanto se identificaron como cepas de *Candida albicans*.

Se realizó la comprobación de la efectividad del Fluconazol 25 µg contra las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10^3 y 10^5 mediante el método de dilución en Agar Modificado en el cual el Fluconazol 25 µg fue efectivo para las muestras 1,2,3 de *Candida albicans* 10^3 debido a que inhibió al microorganismo y no fue efectivo para las muestras hospitalarias 4,5,6 de *Candida albicans* 10^3 . En las seis muestras hospitalarias de *Candida albicans* 10^5 el Fluconazol 25 µg no fue efectivo ya que no inhibió el crecimiento del microorganismo.

Las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10^3 y 10^5 con *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 presento inhibición solamente en la concentración 10^3 en las muestras hospitalarias 1,2,3 de *Candida albicans* esto es debido a que *Lactobacillus rhamnosus* ataca directamente al crecimiento del microorganismo debido a la formación de bacteriocinas y la formación de ácido láctico, las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10^3 en las muestras 4,5,6 y para las seis muestras de *Candida albicans* 10^5 el *Lactobacillus*

ramnosus 10^6 y 10^7 no inhibió al microorganismo. Todos los análisis y ensayos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) durante el periodo de septiembre 2016 a mayo del 2017.

Con los resultados obtenidos se concluye que el *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10^6 y 10^7 es más efectivo que el Fluconazol 25 μg y se recomienda disminuir el uso excesivo del Fluconazol para el tratamiento de enfermedades vaginales porque puede generar resistencia de la *Candida albicans* a los antifúngicos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La mayoría de las enfermedades infecciosas vaginales como la vaginitis son causadas por microorganismos como la *Candida albicans* según los lineamientos técnicos para el control de las infecciones de transmisión sexual del Ministerio de Salud, la incidencia de las enfermedades vaginales en las mujeres como la vaginitis y la candidiasis va en incremento, se estima que el 75% de las mujeres han tenido candidiasis una vez en su vida y el 5% han presentado episodios recurrentes de esta.⁽²⁰⁾

La presente investigación se proyectó a establecer un punto de partida a futuras investigaciones sobre la efectividad del Fluconazol 25 µg contra cepas hospitalarias de *Candida albicans*, ante la necesidad de darle un tratamiento a los problemas de salud de la sociedad Salvadoreña debido al alto índice de enfermedades vaginales en las mujeres, de ahí la importancia de la investigación que se basó en la comprobación de la efectividad del Fluconazol 25 µg sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de muestras proporcionadas por Hospitales Nacionales del país que fueron utilizadas a una concentración de 10^3 y 10^5 y una posible inhibición con *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10^6 y 10^7 ; el *Lactobacillus rhamnosus* es un microorganismo que se encuentra en la microbiota normal en la vagina de la mujer y el cual se utiliza como tratamiento alternativo de enfermedades vaginales.

El tipo de estudio realizado fue: prospectivo, transversal y experimental, donde se realizó una investigación bibliográfica y de campo, se proporcionaron por Hospitales Nacionales seleccionados del país seis muestras en placas de Petri con Agar Sangre que contenían colonias sospechosas de *Candida albicans* aisladas de muestras de fluido vaginal, debido a la dificultad de poder tomar las muestras directamente de las pacientes con sospechas de enfermedades vaginales y la dificultad de los Hospitales Nacionales de proporcionarlas solo se utilizaron seis muestras. Las muestras fueron transportadas en una hielera a una temperatura de refrigeración hacia el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

(CENSALUD) donde se procesaron, se realizó la identificación de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* a través de la tinción al gram, prueba de tubos germinales, prueba de formación de Clamidosporas, la comprobación de la efectividad del Fluconazol a 25 µg contra cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10^3 y 10^5 y la inhibición con *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 por la técnica de dilución en agar modificado, la investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), durante los meses de septiembre del año 2016 a mayo del año 2017.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

2.1.1. Comprobar la efectividad del antifúngico Fluconazol contra *Candida albicans* y su posible inhibición con *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™).

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

2.2.1. Aislar la *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

2.2.2. Identificar la *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

2.2.3. Determinar la efectividad del Fluconazol contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^3 y 10^5 a través de la técnica de Dilución en agar modificado.

2.2.4. Evaluar la inhibición del hongo levaduriforme *Candida albicans* a una concentración de 10^3 y 10^5 con *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) a una concentración de 10^6 y 10^7 a través de la técnica de Dilución en agar modificado.

2.2.5. Comparar los resultados obtenidos de las cepas aisladas de *Candida albicans* hospitalaria con respecto a los resultados obtenidos de la cepa patrón ATCC 10231 a concentración 10^3 y 10^5 sensible a antifúngico.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3. GENERALIDADES.

3.1. EPIDEMIOLOGIA.

La incidencia de infecciones por levaduras del género *Candida* se ha incrementado en los últimos 30 años, asimismo ha aumentado la frecuencia de candidiasis vulvovaginal. Se estima que 75 % de las mujeres padecen al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal durante su vida, y 40 a 50 % desarrolla infección vaginal recurrente por *Candida albicans* y adicionalmente en 5 % de las mujeres adultas se presentan episodios de candidiasis vulvovaginal recurrente refractaria al tratamiento. Los progresos en la comprensión de la patogénesis y epidemiología de la candidiasis vulvovaginal recurrente fueron escasos durante muchos años por causa de la falta de un sistema de identificación de *Candida albicans* que diferenciara entre recidiva y reinfección, porque básicamente el diagnóstico se realizaba solo de forma clínica sin confirmación por estudio micológico de laboratorio. Actualmente, sería interesante someter este criterio a nuevas discusiones, considerando el conocimiento de que hasta 20 % de la candidiasis vulvovaginal son ocasionadas por especies del género *Candida* distintas a *C. albicans* y por otros géneros de levaduras que no producen filamentos al parasitar, cuyos síntomas pueden ser clínicamente casi indistinguibles de los causados por *C. albicans*.⁽²⁰⁾

Las especies de *Candida* causan infecciones micóticas oportunistas encontradas con más frecuencia. Este tipo de infección es causada por varias especies de cándida aunque *Candida albicans* es el agente etiológico más común. Otras levaduras son parte de la flora endógena normal y se cree que las infecciones son de origen endógeno.

En los últimos 30 años hemos asistido a un notable incremento en la incidencia de candidiasis vaginal. Aunque globalmente la *C. albicans* sigue

siendo la especie más importante. (7) La profilaxis antifúngica con azoles instaurada en la última década, junto con otros factores, han ocasionado una redistribución en las especies de *Candida* causantes de infección. Durante el período revisado (1996-2005), varios trabajos han confirmado el impacto de las profilaxis con azoles en la emergencia de especies distintas de *Candida albicans*. El amplio uso de Fluconazol ha podido reducir la prevalencia de *C. albicans*, con un incremento de especies menos sensibles o resistentes a Fluconazol, como *Candida glabrata* y *Candida krusei*. (12)

3.1.1. EPIDEMIOLOGIA DE LAS MICOSIS INVASORAS CAUSADAS POR EL GENERO *Candida*.

Sin lugar a dudas, la candidemia es la enfermedad fúngica invasora (EFI) más común y aunque hay descritas más de cien especies distintas de *Candida*, el 95-97% de todas las EFI producidas por levaduras de este género están causadas por solo cinco especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. El 3–5% restante se encuentra representado por un grupo de 15–18 especies diferentes entre las que destacan *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae* y *Candida rugosa*. La variabilidad geográfica en la distribución de las especies causantes de candidemia es un hecho ampliamente reconocido y, puesto que la sensibilidad de las mismas a los antifúngicos no es uniforme, antes de instaurar un tratamiento antifúngico empírico frente a estas graves infecciones es aconsejable conocer la realidad epidemiológica del entorno del paciente y del centro en que es asistido.

Por lo tanto, es muy importante conocer la realidad epidemiológica de cada región o país (que tampoco suele ser globalmente uniforme) y las características propias de cada centro hospitalario con sus poblaciones especiales de pacientes y diferentes estrategias terapéuticas antifúngicas. (15) La estratificación de los pacientes según el mayor o el menor riesgo de presentar una infección fúngica invasiva (IFI) y el uso de diversas estrategias terapéuticas (tratamientos profilácticos, empíricos, anticipados o dirigidos) se

ha acompañado de cambios significativos en la epidemiología de las infecciones fúngicas y de un mejor pronóstico y supervivencia.

Tradicionalmente, los agentes etiológicos más frecuentes eran las levaduras, particularmente *Candida albicans*. Pero en los últimos años, coincidiendo con la mayor utilización de antifúngicos empíricos, y en especial Fluconazol, se ha visto un descenso de las infecciones por *Candida* a favor de un incremento de las infecciones por hongos filamentosos u otros hongos resistentes a este azol. Fluconazol sigue siendo el tratamiento de elección de la candidemia en pacientes no neutropénicos en muchas áreas geográficas, aunque cada vez es más frecuente que las especies resistentes superen el 10% de prevalencia.⁽⁹⁾

3.2. CARACTERISTICAS DEL GENERO *Candida*.

En cultivo o tejidos las especies de *Candida* crecen como levaduras ovoides en gemación (3 a 6 μm de tamaño). También forma pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas pinzadas o constreñidas en los tabiques entre las células. Las especies de *Candida* producen colonias blandas, lisas, de colores cremosos con olor a levadura y las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar. ⁽¹⁾ El género *Candida* está formado por más de 150 diversas especies y las de interés clínico son: (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y otras). ⁽²⁵⁾

3.2.1. HABITAT DEL GENERO *Candida*.

En un sentido amplio, el término hábitat se aplica con propiedad a los lugares de residencia de los microorganismos. Aunque este término se incluye en las clasificaciones de las bacterias hay que reconocer que es solo de valor relativo y limitado. No obstante, sirve para agrupar a las bacterias según el lugar donde residen habitualmente, ya que el conocimiento de la flora de alguna

región de la tierra o de la atmosfera o la de animales y vegetales, es útil en la orientación. (7) Las levaduras del género *Candida* existen en la naturaleza, en el suelo y agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples. (3)

La *Candida* son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas, del aparato gastrointestinal y de la vagina. Las especies de *Candida* colonizan las superficies mucosas de todos los humanos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. (10)

3.2.2. RESISTENCIA.

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los antimicrobianos (como antibióticos, antivíricos y antipalúdicos) actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas.(28)

Las especies de *Candida* mueren en noventa minutos a 60°C y en cinco a 70°C. La mayor parte de las especies resisten a la temperatura de refrigerador, 5 a 10°C, durante largo tiempo. Los desinfectantes químicos usuales, mertriolato, metafen, tintura de yodo y formol a 10% son agentes fungicidas eficaces. Las sulfonamidas y con raras excepciones los antibióticos candidicina y nystatin, no son inhibitorios. (19)

3.2.3. AISLAMIENTO.

Para el aislamiento del género *Candida* se utiliza el cultivo en agar dextrosa Sabouraud con y sin cicloheximida. Crecimiento de colonias levaduriformes, de bordes enteros, limitadas, poco elevadas y de color blanco. Crecen en un

promedio de 3 a 5 días a temperatura ambiente. Al examen microscópico, se observan múltiples levaduras, redondas u ovales, únicas o en gemación y en ocasiones formando pseudomicelio. Algunas cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* son resistentes a la cicloheximida. El crecimiento de colonias 'puras' aisladas del mismo producto en cultivos consecutivos, apoya el papel patógeno de *Candida*.⁽⁴⁾

Una vez aislada la levadura, se practican las siguientes pruebas, para confirmar *C. albicans* y distinguirla de otras especies:

- **Filamentización en suero:** Permite observar la formación de tubos germinativos entre las 2 ½ y 3 horas a 37°C, si la levadura a identificar se trata de *C. albicans*.
- **Siembra en Agar Harina de Maíz + Tween 80:** Si la especie en estudio es *C. albicans*, se observa, además de blastoconidios (levaduras brotadas) y pseudomicelio, la formación de clamidoconidios terminales a las 48 horas de incubación. La ausencia de clamidoconidios indica que la especie no es *Candida albicans*. En éstos casos se pueden observar levaduras y pseudomicelio o solo levaduras y se debe informar como levadura no *Candida albicans* (y no como *Candida spp.*).⁽²⁵⁾

3.3. MORFOLOGIA *Candida albicans*.

C. albicans es un hongo pequeño, de tipo levadura, oval, que se reproduce por gemación, de 2.5 a 6 micras. Desarrolla un pseudomicelio por alargamiento de células que no llegan a desprenderse. En el esputo, tejidos y exudados pueden verse las células en gemación y fragmentos del pseudomicelio. Las clamidosporas típicas sirven para distinguir *C. albicans* de otras especies de *Candida*. Sin embargo, hay diferencias, entre las cepas de esta especie en su capacidad de producir clamidosporas; con este propósito se han descrito diversos medios.

3.3.1. CARACTERISTICAS DE CULTIVO.

C. albicans se desarrolla rápidamente (24-48 horas) a la temperatura de la habitación y a la de la estufa en agar glucosado de saboraud. Las colonias son de tamaño medio, lisas, pastosas, y tienen olor a moho característico. Las más viejas (colonias gigantes) pueden ser alveoladas en el centro y forman surcos radiales. No hay desarrollo de superficie en caldo (48 horas); hace fermentar la glucosa y la maltosa con producción de ácido y gas, la sacarosa solo con ácido y no fermenta la lactosa. Las fermentaciones suelen ser irregulares, a menos que se vigilen cuidadosamente las condiciones.

C. albicans produce una colonia filamentosa distintiva a los dos días de sembrada en estrías en placa de agar-eosina-azul de metileno de levine e incubado a 37°C en atmosfera de 10% de CO₂. Las diferentes especies de *Candida* pueden identificarse con cierta seguridad por el tipo de colonia producida sobre placas de agar sangre a 37°C (10 días), el tipo de crecimiento en caldo glucosado de Saboraud a 37°C (48 horas), la producción y morfología de blatosporas, clamidosporas y pseudomicelios sobre agar-harina de maíz a la temperatura de habitación y la reacción de fermentación después de diez días a 37° C en glucosa, maltosa, sacarosa y lactosa. (19)

3.4. PATOGENIA Y PATOLOGIA.

3.4.1. CANDIDIASIS.

La candidiasis causada por *Candida albicans* es de origen endógeno, ya que se han aislado cepas patógenas de la boca, vagina e intestino de individuos normales. En la mayor parte de los casos las infecciones son superficiales y leves; con frecuencia se encuentra este organismo como invasor secundario en procesos patológicos iniciados por otros microorganismos patógenos o en neoplasias. Sin embargo, hongos del tipo levadura particularmente *C.*

albicans, han sido identificados como los agentes etiológicos primarios de infecciones micóticas de la piel y de las uñas, en bronquitis, infecciones pulmonares, estomatitis, vaginitis, endocarditis micótica, meningitis e infecciones generalizadas. (19)

La candidiasis superficial (cutánea o mucosa) se establece a consecuencia de un incremento de la población local de *Candida* y del daño a la piel o el epitelio que permite la invasión local por la levadura y las pseudohifas. La candidiasis sistémica se presenta cuando la *Candida* penetra al torrente sanguíneo y las defensas fagocíticas del huésped son inadecuadas para contener su crecimiento y su diseminación. Desde la circulación la *Candida* puede infectar los riñones, fijarse a las prótesis valvulares cardíacas o producir infección candidiasica casi en cualquier parte (por ejemplo, artritis, meningitis, endoftalmitis).

La histología local de las lesiones cutáneas o mucocutaneas se caracteriza por reacción inflamatoria que varía desde abscesos piogénicos hasta granulomas crónicos. Las lesiones contienen abundantes yemas de levaduras y pseudohifas. Después de la administración de antimicrobianos por vía oral con frecuencia ocurre un gran incremento de la *Candida* en el intestino y puede penetrar a la circulación a través de la mucosa intestinal. (10)

3.4.2. CANDIDIASIS CUTANEA Y MUCOSA.

Los factores de riesgo vinculados con la candidiasis superficial incluyen el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA), el embarazo, la diabetes, los extremos de la vida, los anticonceptivos orales y el traumatismo (quemaduras, maceración de la piel). El algodoncillo bucal puede ocurrir sobre la lengua, labios, encías o paladar. Es una lesión en placas o confluyente de pseudomembranas blanquecinas compuestas de células epiteliales, levaduras y pseudohifas. El algodoncillo bucal se desarrolla en la mayoría de los pacientes con SIDA. Otros factores de riesgo incluyen el tratamiento con

corticosteroides o antibióticos, el aumento de la concentración de glucosa y la inmunodeficiencia celular. La invasión por levaduras en la mucosa vaginal produce vulvovaginitis, caracterizada por irritación, prurito y secreción vaginal.⁽¹⁰⁾

3.4.3. VULVOVAGINITIS.

Se han formulado dos grupos de hipótesis para explicar los episodios de vulvovaginitis candidiásica recurrente. Por un lado, se postula la reinfección bien a partir de reservorios en otros sistemas orgánicos (sistema digestivo, tracto urinario, etc.) o por contaminación por transmisión sexual por ejemplo. Por otro, la verdadera recurrencia/recidiva, hipótesis basada en la similitud de biotipos de las cepas detectadas en sucesivos episodios. Diferentes factores han sido implicados en ambas hipótesis incluyendo aquellos que hacen referencia al agente infeccioso y al huésped. La ausencia de una completa erradicación por un tratamiento inadecuado o por la existencia de cepas resistentes puede ocasionar un fallo terapéutico y, por tanto, una recidiva. *C. albicans* es habitualmente sensible a los imidazoles pero otras especies (*C. glabrata* por ejemplo) son menos sensibles aumentando la frecuencia de recidivas. También, variaciones antigénicas y mutaciones podrían estar implicados en un aumento de la virulencia micótica y consiguiente recidiva.

En cualquier caso, el posible origen de la vulvovaginitis recidivante a partir de un reservorio intestinal es controvertido. El tipaje de los organismos obtenidos de vagina y recto debería revelar la presencia de una cepa idéntica, pero un número importante de autores han encontrado una escasa correlación entre los cultivos vaginales y rectales. Factores predisponentes El embarazo predispone tanto a la infección candidiásica primaria como, de forma más importante, a las recurrencias. Ello es especialmente más frecuente a partir de las 28 semanas de gestación. La infección en esta situación supone un reto terapéutico importante probablemente debido al alto nivel de glucógeno

producido por el epitelio vaginal estimulado por los altos niveles estrogénicos gestacionales.

Ello supone un elemento nutritivo facilitador tanto de la multiplicación como de la germinación micótica. Además, unos niveles elevados de progesterona tienen unos efectos supresores de la inmunidad celular por una parte y, por otra, un efecto promotor de una mayor expresión del gen responsable de la síntesis celular del receptor epitelial capaz de unirse a *Candida*. Del mismo modo, la utilización de anticonceptivos orales de alta dosis (ciertamente de escasa utilización en la actualidad) predispone a la aparición de micosis vaginales. Los dispositivos intrauterinos también han sido asociados a episodios de vaginitis micótica probablemente porque los hilos actúan como reservorio.

Cualquier alteración en los niveles de glucosa (especialmente en situaciones de hiperglucemia y en cualquier estado en el que se produce una elevación del glucógeno vaginal) puede promover una candidiasis vaginal. El exceso de glucógeno, además de aumentar el sustrato. Patogénesis de la candidiasis vulvovaginal recidivante. La reinfección ETS Pareja puede o no estar causada por la misma cepa. La utilización de antibióticos puede incrementar tanto la colonización como la infección por *Candida*. Aunque diferentes estudios caso-control no han sido definitivos en este sentido, los antibióticos eliminarían la flora vaginal, principal baluarte defensivo del ecosistema vaginal frente a los hongos.⁽²³⁾

Este estado con frecuencia va precedido por factores como diabetes, embarazo, o por antibacterianos que alteran la flora microbiana, la acidez local o las secreciones. Otras variantes de candidiasis cutánea incluyen invasión de la piel. Esto ocurre cuando la piel se debilita por traumatismo, quemadura o maceración. La infección intertriginosa ocurre en las partes húmedas y tibias del cuerpo como la axila, la ingle y los pliegues intergluteo o inframamario; es más común en personas obesas o en diabéticos. Las partes infectadas se muestran rojas y húmedas y pueden presentar vesículas.

La afección interdigital en los dedos aparece después de inmersión prolongada y repetida en el agua; es más común en amas de casa, empleados de bares, cocineros, y en quienes manejan vegetales y pescado. La invasión de las uñas y alrededor de la placa ungueal por cándida causa onicomycosis, una inflamación dolorosa y eritematosa del pliegue ungueal parecida a la paroniquia piógena, la cual con el tiempo, puede destruir la uña.

3.4.4. CANDIDIASIS SISTEMICA.

Los catéteres permanentes, la intervención quirúrgica, el abuso de drogas intravenosas, la aspiración, o el daño a la piel o al aparato gastrointestinal pueden causar candidemia. En la mayoría de los pacientes con defensas normales las levaduras son eliminadas y la candidemia es transitoria. Sin embargo, los pacientes con defensas fagocíticas comprometidas pueden desarrollar lesiones ocultas en cualquier parte, en especial riñón, piel (lesiones maculonodulares), ojos, corazón y meninges.

La candidiasis sistémica casi siempre se correlaciona con la administración crónica de corticosteroides o de otros agentes inmunodepresores, con enfermedad hematológica como leucemia, linfoma y anemia aplásica, o con enfermedad granulomatosa crónica. La endocarditis candidiasica suele acompañarse de depósito y crecimiento de levaduras y pseudohifas sobre una prótesis valvular o las vegetaciones cardiacas. Las infecciones del riñón habitualmente son una manifestación sistémica, en tanto que las infecciones del aparato urinario en general se vinculan con una sonda de Foley, diabetes, embarazo o antibióticos antibacterianos.

3.4.5. CANDIDIASIS CRONICA MUCOCUTANEA.

Casi todas las variedades de esta enfermedad se inician en la infancia temprana, se vinculan con inmunodeficiencia celular y endocrinopatías, y

como resultado se produce infección superficial de alguna o de todas las partes de piel o mucosas.⁽¹⁰⁾

3.4.6. FACTORES DE VIRULENCIA.

Candida albicans presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador. También existen otros tipos de factores de virulencia, tales como:

- Adhesinas: que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres.
- Proteinasas y fosfolipasas: Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador.
- Tigmotropismo: que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.
- Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras. ⁽¹⁸⁾

3.5. RESISTENCIA MICROBIANA.

La resistencia antibiótica puede ser de dos tipos: natural o intrínseca y puede ser también adquirida.

La resistencia natural es una situación no variable; es una capacidad propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los gérmenes gramnegativos son resistentes a la Vancomicina.

Por el contrario la resistencia adquirida es una capacidad que se obtiene en el camino por así decirlo, es variable y es adquirida por una cepa de una

especie bacteriana. Así, existen cepas de neumococo que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *Escherichia coli* resistentes a la Ampicilina, cepas de estafilococos resistentes a la meticilina (1). Esta resistencia adquirida es la que representa una amenaza cuando se trata una infección ya que el antibiótico va dirigido a eliminar el agente infeccioso pero existe el peligro que este ya sea resistente al fármaco y no cumpla con las expectativas terapéuticas.

Las bacterias son capaces de adquirir resistencia en función de su variabilidad genética pues pueden desarrollar otras vías metabólicas alternativas utilizando factores de crecimiento distintos de los de las células no resistentes.(1)

Pueden adquirir nuevos mecanismos de resistencia mediante mutación o mediante transferencia de material genético entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes. (1)

3.5.1 FACTORES QUE DETERMINAN LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.

Los factores implicados en la incidencia creciente de resistencia son el efecto selectivo del uso de antimicrobianos, la diseminación de la infección en poblaciones humanas y la capacidad de los plásmidos para pasar de una especie a otra, incluso de un género a otro.

Después de la segunda guerra mundial cuando el uso de la penicilina se introdujo al público en general casi todas las cepas de *Staphylococcus aureus* eran susceptibles, después de esa época las proporciones han cambiado mucho hasta el punto en que 80 a 90 % de los aislamientos actuales son resistentes a la penicilina. Es posible que las cepas resistentes existan desde antes de la introducción de un antimicrobiano, pero con frecuencia tan baja que es improbable detectarlas. Por ej. *S. aureus* productor de penicilasa se encontró en colecciones de cultivos previos al desarrollo y empleo de este

antimicrobiano, es probable que las clonas resistentes aumenten y, si son virulentas, se diseminen.⁽¹⁾

Hasta la introducción en la clínica de los antifúngicos azólicos en la década de los 80 y los 90, apenas se había planteado la necesidad de realizar estudios de sensibilidad, ya que el único fármaco disponible para tratar las infecciones por hongos había sido durante muchos años la Anfotericina B. La mayoría estaban producidas por *C. albicans*, que era habitualmente sensible a casi todos los antifúngicos. Sin embargo, esta situación cambió a finales de la década de los 80. Por entonces se describieron los primeros casos de fracaso del tratamiento antimicótico, que hasta entonces sólo se habían producido en situaciones muy restringidas y predecibles, como en las endocarditis, y se detectaron cada vez con mayor frecuencia especies con resistencia intrínseca a los antifúngicos, es decir, independiente de la exposición previa al fármaco, como *C. krusei* y *C. glabrata*.⁽¹³⁾

A partir de la introducción del Fluconazol en 1990, se generó una presión selectiva a través del uso de este agente para tratamiento o profilaxis, que pudo generar selección de microorganismos resistentes. Se determinaron cambios en la ecología de la flora intrahospitalaria en varios estudios que demostraron que tras el uso de Fluconazol se incrementaba la colonización por *Candida no-albicans*. Esto fue claramente visible en especial con la estrategia de profilaxis en pacientes con neoplasias hematológicas bajo protocolos de quimioterapia.

3.5.2 FACTORES DE RIESGO PARA LA RESISTENCIA AL FLUCONAZOL.

La determinación de factores de riesgo para resistencia al Fluconazol y candidemia en pacientes no HIV se ha estudiado, aunque no tan extensamente. En algunas series de casos pequeños en pacientes neutropénicos se ha documentado la presencia de infecciones por *C. krusei* que se ha asociado con la exposición previa a Fluconazol, la neutropenia

severa y el antecedente de leucemia aguda. En el caso de *C. glabrata*, el uso previo de anfotericina B, antibióticos de amplio espectro, uso de catéteres intravenosos centrales, hemodiálisis y tumores sólidos se han asociado como facilitadores de la colonización e infección por este microorganismo.

Takakura y colaboradores realizaron un programa de vigilancia y evaluaron sobrevida en aquellos pacientes con infecciones por *Candida* en torrente sanguíneo y factores de riesgo relacionados con resistencia al Fluconazol. Encontraron que el 4,6 % de 326 aislamientos eran resistentes al Fluconazol; en el análisis univariado se documentó que la edad avanzada, la presencia de neoplasia hematológica y la neutropenia se correlacionaban con la resistencia al Fluconazol.

Por otra parte, Tumbarello y colaboradores en un estudio de casos y controles documentaron como factores predictores de resistencia a azoles nuevamente la exposición previa a azoles, (OR) 12,24, IC 95% 1,77–84,39 $P < 0.01$, antecedente de Diabetes mellitus (OR 10.47, 95% CI 1,96–55,96, $P < 0,006$) y uso de acceso venoso central previamente (OR 8,48, 95% CI 1,82–39,36, $P < 0,006$).

En Colombia, Rivas y colaboradores, en una serie de casos de candidiasis sistémica de pacientes oncológicos del Instituto Nacional de Cancerología, documentaron resistencia al Fluconazol en 19,6% de los aislamientos, que correspondían en su mayoría (51,6%) a *Candida albicans*, seguida por *C. tropicalis* (34,2%) de un total de 181 muestras. ⁽⁸⁾

3.6 PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIBIOTICA.

Las técnicas ordinarias de difusión para la determinación de la sensibilidad a los antibióticos de organismos aislados de especímenes clínicos han sufrido gravemente las dificultades de la estandarización. Se duda si los ensayos con

el mismo microorganismo, hechos en diferentes lugares, conducirán a recomendaciones para el tratamiento constante.

La técnica de difusión clásica exige que se aplique una fuente de agente antimicrobiano a la superficie de un medio sólido. La difusión del agente a través del medio inhibe el crecimiento de un organismo sensible que crezca en o sobre el hasta un grado determinado parcialmente por la receptividad del organismo. Sin embargo, se sabe actualmente que un cierto número de otros factores pueden afectar al tamaño de las zonas de inhibición y que estos factores deben ser controlados.

3.6.1 FACTORES QUE AFECTAN AL TAMAÑO DE LAS ZONAS DE INHIBICION.

3.6.1.1 COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Son los más importantes. Independiente de la viscosidad o el grosor de las placas de Petri, muchas sustancias presentes en el medio de cultivo pueden afectar a las zonas de inhibición. Se encuentran entre ellas la peptona, triptona, extracto de levadura y agar. Pueden variar en su contenido mineral y se sabe perfectamente hoy en día que el calcio, el magnesio y el hierro modifican el tamaño de las zonas, disminuye la actividad de los aminoglicosidos y aumenta el efecto del ácido fusídico. Los carbohidratos pueden aumentar la acción de la furantoína o de la ampicilina.

Quizá los componentes más notables de los medios de cultivo que modifican las pruebas de sensibilidad son los referentes a los fármacos que actúan inhibiendo el metabolismo del ácido fólico, por ejemplo, sulfamidas y trimetropin. La acción de los fármacos, incluso sobre los microorganismos más sensibles, pueden afectarse si se utiliza un medio que contenga tan solo una cantidad muy pequeña de productos finales de síntesis bacteriana del ácido fólico.

3.6.1.2 ELECCION DEL MEDIO.

Se obtienen resultados consistentes y reproducibles cuando se utilizan medios ideados especialmente para ensayos de sensibilidad. De manera ideal, las placas deben llenarse en posición horizontal, con un espesor uniforme del medio por toda la placa. No dan buenos resultados las placas muy delgadas o muy gruesas.

3.6.1.3 EFECTO DEL pH.

El pH tiene efecto sobre el tamaño de las zonas de inhibición producidas por algunos antibióticos. La actividad de los aminoglicosidos se ve aumentada en medio alcalino y disminuido en medios básicos. Para las tetraciclinas es cierto el efecto inverso. El dióxido de carbono en la atmosfera de la estufa y la presencia de carbohidratos fermentables en los medios de cultivo pueden también inducir condiciones acidas.

3.6.1.4 TAMAÑO DEL INOCULO.

Aunque muchas sustancias antimicrobianas no se afectan sustancialmente por la presencia de un gran número de organismos, las siembras densas disminuyen en algún grado las zonas de inhibición. El inoculo ideal es el que da lugar a un crecimiento uniforme y denso sin ser confluyente. Es imposible establecer la densidad real de un cultivo confluyente. Los cultivos en caldo y las suspensiones adecuadas del germen en medios solidos pueden diluirse exactamente para obtener un inoculo óptimo para las pruebas de sensibilidad, aunque en la práctica pueden obtenerse generalmente resultados satisfactorios tomando un asa de cultivo bien desarrollado o haciendo una suspensión adecuada del organismo y extendiéndola con un hisopo estéril seco.

3.6.1.5 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DIRECTA.

Las pruebas de sensibilidad pueden realizarse sobre cultivos primarios en lugar de indirectamente sobre suspensiones puras preparadas por selección de colonias de tales cultivos. Estas pruebas directas permiten dar un informe con 24 horas de anticipación. Las colonias semejantes sobre los medios de cultivo primarios usuales pueden presentar poblaciones claramente diferentes en la placa de sensibilidad directa.

Sin embargo, ciertas fuentes de error peculiares a las pruebas de sensibilidad primaria deben tenerse en cuenta cuando se realizan estas pruebas. En primer lugar, existe la posibilidad de que se halle presente en un cultivo mixto un organismo productor de penicilinas que proteja a otros gérmenes sensibles contra la acción de un antibiótico que sea sensible a la penicilinas.⁽⁵⁾

3.7 PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DILUCION EN AGAR.

El procedimiento de dilución en agar, el segundo método de referencia, ha sido adaptado de manera satisfactoria para el uso de rutina en los laboratorios de gran volumen, solo para probar concentraciones seleccionadas de antibióticos. Se siembra una suspensión estandarizada de bacterias sobre la superficie de una serie de placas de agar, cada una de las cuales contiene una concentración diferente de antibiótico, que abarca los límites terapéuticos de la droga. Por ejemplo, si el límite terapéutico para un antibiótico dado es de 2 a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, puede utilizarse una serie de placas de agar que contengan 1, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico, para determinar la susceptibilidad del microorganismo a ser probado. Si este se desarrolla en las primeras tres placas pero no en la que contiene 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico, puede establecerse un valor de CIM de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, similar a la interpretación del punto final en la técnica de dilución en caldo. Nótese que los microorganismos sensibles a la concentración del antibiótico presente en una placa de agar no produce un

círculo de crecimiento en el sitio de la siembra, mientras que aquellos que son resistentes aparecen con colonias circulares. Las placas de agar son marcadas con una grilla de modo que cada microorganismo pueda ser identificado por un número y el resultado anotado en el protocolo. Después que todas las placas han sido inoculadas, se incuban a 35 °C durante 18 horas.⁽¹¹⁾

3.8 CARACTERÍSTICAS DEL GENERO *Lactobacillus*.

Son bacilos microaerofilos y catalasa negativa, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Morfológicamente, algunos bacilos son bastones delgados y largos; otros son algo parecido al colibacilo, pero, al contrario de este, todos son Gram positivos, casi todos son móviles, pero se han señalado excepciones. Muchos cultivos muestran una forma diplobacilar característica, a menudo reniforme. Frecuentemente los cultivos viejos muestran considerable pleomorfismo. ⁽¹⁹⁾

Los *Lactobacillus*, pueden desarrollarse en presencia de aire. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no pueden cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Aunque se han encontrado raros casos de relación de *Lactobacillus* con procesos patológicos como endocarditis y enfermedad febril, estas bacterias esencialmente no son patógenos, excepto las raras veces que pueden relacionarse con caries dentales. Son fundamentalmente interesantes en la industria de derivados lácteos y de fermentación, donde tienen importancia considerable. ⁽¹⁷⁾

3.8.1 HABITAT.

Las especies de *Lactobacillus* son miembros importantes de la flora normal de la vagina. El ácido láctico producto de su metabolismo ayuda a mantener bajo

el pH del aparato genital femenino adulto normal. Pocas veces causan enfermedades.⁽¹⁰⁾

Los *Lactobacillus* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, con existencia parasita y saprofita. El tipo parasito se aísla de la cavidad bucal en casos de caries en seres humanos susceptibles y de las materias fecales del hombre y de los animales, cuando consumen dietas con lactosa y dextrina. El tipo saprofita se puede obtener de gran variedad de productos lácteos. ⁽¹⁹⁾

3.8.2 DIVISION DE LOS *Lactobacillus*.

Los *Lactobacillus*, según los productos de fermentación de azúcar, se dividen en dos grupos. El grupo homofermentativo es el mayor y convierte casi completamente el azúcar fermentado en ácido láctico; el grupo heterofermentativo está constituido por formas que producen cantidades importantes de otros productos de fermentación, incluyendo bióxido de carbono, etanol y ácido acético. ⁽¹⁶⁾

3.8.3 AISLAMIENTO.

Se siembra en placas por duplicado en medios MRS, Rogosa o similar a pH 5.0-5.8. Es especialmente útil en medio diferencial Lisina Original LS (O) en el examen del yogur. Muchas cepas crecen muy mal, si lo hacen, a PH 7.0, aunque el material patológico humano se siembra en agar sangre. Se incuban una serie de placas en aerobiosis y las otras en atmosfera de dióxido de carbono-hidrogeno 5:95. Se incuban los cultivos procedentes de alimentos a 28 – 30°C y los de procedencia humana o animal a 35 – 37°C durante 48-72 horas. Se investiga las presencias de colonias blancas, muy pequeñas. ⁽⁵⁾

3.9 ACTIVIDAD PROBIOTICA DEL *Lactobacillus rhamnosus*.

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso a la salud del hospedador”. (24)

Evidencias científicas, demuestran la efectividad de la administración de probióticos frente a situaciones clínicas o infecciones en el tracto urogenital. Las infecciones de uretra, periuretra, vejiga, riñón, vagina y cérvix no de transmisión sexual son altamente prevalentes y normalmente son tratadas con antibióticos. Pese a ello, se cree que los patógenos han entrado en el sistema “biofilm” del tracto urogenital, haciéndose inútiles los tratamientos con antibióticos.

Estudios *in vitro* muestran que ciertas especies de *Lactobacillus* presentes en la microbiota vaginal tienen efecto protector por la producción de peróxido de hidrógeno con actividad microbicida contra patógenos que alteran este microambiente. El bajo número o ausencia de estas bacterias está asociado con un incremento en la colonización de uropatógenos como *E.coli*, así como bacilos gran-negativos anaerobios asociados con vaginosis por lo general *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* y otros.

La administración por vía oral y/o vaginal de *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus* GG o *L. fermentum* ha demostrado ser seguro y reducir el riesgo de infecciones del tracto urinario, vaginosis bacteriana, vulvovaginitis por cándida y enfermedades de transmisión sexual causadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*. (16)

3.10 FLUCONAZOL.

3.10.1 DESCRIPCION.

El Fluconazol es un antifúngico sintético de la familia de los imidazoles, que se puede administrar por vía oral e intravenosa. Su espectro de actividad es mayor que el de otros antifúngicos imidazólicos incluyendo el Miconazol, el Ketoconazol o el Clotrimazol. Además, el Fluconazol es más resistente al metabolismo hepático de primer paso, es menos lipofílico y se une menos a las proteínas del plasma, por lo que tiene una mayor biodisponibilidad. ⁽¹⁹⁾

El Fluconazol muestra un alto grado de hidrosolubilidad y buena penetración en el líquido cefalorraquídeo, las interacciones farmacológicas son también menos frecuentes porque el Fluconazol tiene el efecto más débil de todos los compuestos azólicos sobre las enzimas microsómicas hepáticas. Tiene el índice terapéutico más amplio de los compuestos azólicos, que permite una dosificación más intensiva en diversas infecciones micóticas. ⁽²⁾

3.10.2 MECANISMO DE ACCION.

Como otros antifúngicos azoles, el Fluconazol ejerce su efecto alterando la membrana celular del hongo. El Fluconazol inhibe la síntesis de ergosterol mediante la interacción con desmetilasa 14-alfa, una enzima del citocromo P-450 que se necesita para convertir el lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana. La inhibición de la síntesis de ergosterol resulta en un aumento de la permeabilidad celular provocando fugas del contenido celular. El Fluconazol no parece tener la misma actividad en la síntesis de colesterol humano.

3.10.3 FARMACOCINETICA.

El Fluconazol se administra por vía oral e intravenosa. La farmacocinética de ambos Fluconazol IV y oral son similares. La absorción gastrointestinal es rápida y casi completa. La biodisponibilidad oral es superior al 90% en ayunas

en los adultos, y las concentraciones séricas máximas se alcanzan en 1-2 horas después de la administración oral. La comida no afecta ni a la velocidad ni el grado de absorción. El pH gástrico no tiene ningún efecto sobre la biodisponibilidad del Fluconazol. Las concentraciones séricas máximas y el Area Bajo la Curva (AUC) aumentan en proporción a la dosis. Las concentraciones plasmáticas de Fluconazol en el estado estacionario se alcanzan dentro de 5-10 días a dosis en el rango de 50-400 mg / día, y el plazo de 2 días cuando se administra por primera vez una dosis de carga de doble de la dosis diaria habitual.

El Fluconazol se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales. La saliva, el esputo, las uñas, las ampollas, y las concentraciones en las secreciones vaginales son aproximadamente iguales a las concentraciones plasmáticas. Las concentraciones de orina y la piel son aproximadamente 10 veces mayor que la de las concentraciones plasmáticas. También se pueden conseguir concentraciones altas en la córnea, el humor acuoso, y el cuerpo vítreo después de la administración IV. El Fluconazol se distribuye bien en el Líquido Cefalorraquídeo (LCR), y alcanza concentraciones en el LCR que son 50-94% de las concentraciones plasmáticas, independientemente del grado de la inflamación meníngea. La unión a proteínas oscila entre el 11-12%.

El Fluconazol no parece experimentar un metabolismo de primer paso. La eliminación es principalmente renal, y aproximadamente el 60-80% de la dosis se excreta en la orina sin cambios, y el 11% en forma de metabolitos. La disfunción renal prolonga la vida media y aumenta las concentraciones plasmáticas. (22)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO:

- Prospectivo; porque el análisis que se realizará servirá como antecedentes para futuras investigaciones realizadas con el tema, que se enfocó en comprobar si el Fluconazol es efectivo contra la *Candida albicans* aislada de muestras hospitalarias de fluido vaginal a una concentración de 10^3 y 10^5 y su inhibición con el *Lactobacillus rhamnosus*.
- Transversal; dicho estudio se realizó en los meses de julio 2016 a mayo del año 2017.
- Experimental; porque se hicieron pruebas de laboratorio donde se realizó un estudio microbiológico que comprendió el aislamiento e identificación de *Candida albicans* y la comprobación de la efectividad del antifúngico de prueba (Fluconazol 25 µg) por la técnica de dilución en agar modificado y la inhibición con *Lactobacillus rhamnosus*.

4.2. INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

Las bibliotecas en las cuales se realizó la investigación bibliográfica fueron las siguientes:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM), Facultad de Química y Farmacia.
- Universidad Nueva San Salvador (UNSSA), Facultad de Ciencias de la Salud.

- Internet.

4.3. INVESTIGACION DE CAMPO:

Universo: Pacientes que presentaron infección vaginal producida por *Candida albicans*.

Muestra: 6 muestras de fluido vaginal que contienen cepas hospitalarias de *Candida albicans*.

Muestreo: Se tomaron por el personal autorizado de salud de Hospitales Nacionales seleccionados del país seis muestras de fluido vaginal de forma aleatoria de algunos pacientes mujeres que presentaron infección vaginal producida por *Candida albicans*. Las muestras se recolectaron durante el periodo de septiembre del 2016 hasta enero del 2017 y se proporcionaron en seis placas de Petri con Agar Sangre que contenían colonias sospechosas de *Candida albicans* aisladas de muestras de fluidos vaginales. Se utilizó esta cantidad de muestras debido a la dificultad de poder tomar las muestras directamente de las pacientes con sospechas de enfermedades vaginales y la dificultad de los Hospitales Nacionales de proporcionarlas. Las muestras fueron transportadas en una hielera a una temperatura de refrigeración hacia el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador donde se procesaron las muestras que comprendió el aislamiento e identificación de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* y la comprobación de la efectividad del Fluconazol a 25 µg por la técnica de dilución en agar modificado y la inhibición con *Lactobacillus rhamnosus*.

4.4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.4.1. AISLAMIENTO DE LA CEPA PATRON DE *Candida albicans* ATCC 10231. ⁽¹¹⁾

La cepa patrón de *Candida albicans* que se utilizó es la cepa ATCC 10231 que se encontraba en un criovial proporcionado por el laboratorio de

microbiología de la Facultad de Química y Farmacia. De este criovial se tomó una asada y se inoculó en una placa de Petri con Agar Saboraud Dextrosa por la técnica de estriado se incubó por 3 a 5 días a 32-35°C para verificar su crecimiento.

4.4.2. IDENTIFICACION DE LA CEPA PATRON DE *Candida albicans* ATCC 10231.⁽¹¹⁾

- Después del tiempo de incubación se tomaron las colonias de la placa con Agar Saboraud Dextrosa para realizar las pruebas de identificación.
- Tinción al gram (de igual forma para las cepas aislada de la muestra).(ver anexo N°1)

4.4.2.1. IDENTIFICACION A TRAVES DE LA PRUEBA DE TUBO GERMINAL O FILAMENTACION PRECOZ. ⁽¹¹⁾

- Emulsionar una porción de la colonia aislada en 0,5 mL de suero humano o de conejo.
- Incubar a 35°C durante 2 h.
- Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubre-objetos y visualizar al 100x (de igual forma para las cepas aislada de la muestra).
- La prueba es positiva si se identifican tubos germinales.

4.4.2.2. IDENTIFICACION A TRAVES DE LA FORMACIÓN DE CLAMIDOSPORAS. ⁽¹¹⁾

- El medio a utilizar para esta prueba es el Agar Harina de Maíz al 0.02%.
- Realizar la inoculación según la técnica de Dalmau, haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el asa en un ángulo aproximado de 45°.

- Colocar un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra.
- Incubar las placas sembradas a 30 °C durante 24-48 h y luego se examinaron al microscopio a través del cubre-objetos al 100x.
- La prueba es positiva si se observa la formación de clamidosporas.
- De esta forma se verificara si la cepa había experimentado alguna contaminación y además servirá de comparación para los resultados obtenidos de las cepas hospitalarias.
- Proceder a la estandarización de la cepa patrón para el ajuste de concentración 10^3 y 10^5 ^(29,30,31) y la posterior aplicación de la técnica de Dilución en agar modificado, de igual forma para las cepas en la muestra de estudio.

4.4.3. ESTANDARIZACION DE LA CEPA PATRON DE *Candida albicans* ATCC 10231.^(14,31) (ver anexo N°2)

- Transferir a un tubo con 10.0 mL de caldo Saboraud dextrosa del vial que contiene la cepa patrón de *Candida albicans* ATCC 10231.
- Agitar la suspensión de la *Candida albicans* en el caldo durante un minuto en un agitador Vortex.
- Incubar por 4 días a 32-35°C.
- Adicionar 1.0 mL de la suspensión de *Candida albicans* del caldo en 10.0 mL de solución salina estéril.
- Transferir 1000.0 µL a una celda espectrofotométrica de cuarzo.
- Configurar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.⁽⁶⁾
- Llevar el espectrofotómetro a una transmitancia de 0⁰, usando como blanco solución salina estéril.

- Llevar en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.
- Agregar suspensión de *Candida albicans* o solución salina estéril hasta obtener una concentración de 10^8 UFC/mL y leer en el espectrofotómetro a 580 nm y 25% de transmitancia.
- Preparar diluciones seriadas duplicadas.
- Verter Agar Saboraud Dextrosa, luego homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar.
- Incubar por 4 días a 32-35°C.
- Realizar el conteo de colonias de *Candida albicans*, utilizando un contador de colonias.

4.4.4. AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Candida albicans* DE LAS MUESTRAS HOSPITALARIAS. (10,11)

- Utilizar las seis muestras que contienen colonias sospechosas de *Candida albicans* contenidas en placas de Petri con agar sangre para el aislamiento y para la comprobación de la efectividad del Fluconazol y la inhibición del *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) contra esta.
- Proceder a picar de las colonias sospechosas de *Candida albicans* contenidas en la placa de Petri con agar sangre y transferirlos a un tubo con 10.0 mL de caldo Saboraud dextrosa, flamear la boca del tubo antes y después de cada inoculación.
- Incubar por 4 días a 32-35°C. Tomar una asada de forma aséptica y aislar utilizando la técnica de siembra por estría en una placa de Petri con Agar Saboraud Dextrosa.

4.4.5. IDENTIFICACION DE CEPAS HOSPITALARIAS DE *Candida albicans*.⁽¹¹⁾

- Incubar la placa de Petri por 3 a 5 días a 32-35°C. Después del tiempo de incubación tomar de las colonias de la placa con Saboraud Dextrosa para la realización de las pruebas de identificación.
- Tinción al gram (de igual forma para las demás cepas aislada de la demás muestras hospitalarias).

4.4.5.1. IDENTIFICACIÓN A TRAVES DE LA PRUEBA DE TUBO GERMINAL O FILAMENTACION PRECOZ.⁽¹¹⁾

- Emulsionar una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano o de conejo.
- Incubar a 35°C durante 2 h.
- Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubre-objetos y visualizar al 100x (de igual forma para las cepas aislada de la muestra).
- La prueba es positiva si se identifican tubos germinales.

4.4.5.2. IDENTIFICACION A TRAVES DE LA FORMACIÓN DE CLAMIDOSPORAS.⁽¹¹⁾

- El medio a utilizar para esta prueba es el Agar Harina de Maíz al 0.02%.
- Realizar la inoculación según la técnica de Dalmau, haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el asa en un ángulo aproximado de 45°.
- Colocar un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra.
- Incubaron las placas sembradas a 30°C durante 48 horas y luego examinar al microscopio a través del cubre-objetos al 100x.

- De esta forma se verificó si la cepa había experimentado alguna contaminación y además servirá de comparación para los resultados obtenidos de las cepas hospitalarias.
- Proceder a la estandarización de la cepa patrón para el ajuste de concentración 10^3 y 10^5 y la posterior aplicación de la técnica de Dilución en agar modificado de igual forma que para las cepas en la muestra de estudio.

4.4.6. ESTANDARIZACION DE CEPAS DE *Candida albicans* OBTENIDAS DE MUESTRAS HOSPITALARIAS.^(14,31) (ver anexo N°3)

- Transferir a un tubo con 10.0 mL de caldo Saboraud Dextrosa de la placa de petri que contiene la cepa hospitalaria de *Candida albicans*.
- Agitar la suspensión de la *Candida albicans* en el caldo durante un minuto en un agitador Vortex.
- Incubar por 4 días a 32-35°C.
- Adicionar 1.0 mL de la suspensión de *Candida albicans* del caldo en 10.0 mL de solución salina estéril.
- Transferir 1000.0 μ L a una celda espectrofotométrica de cuarzo.
- Configurar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580nm.
- Llevar el espectrofotómetro a una transmitancia de 0^0 , usando como blanco solución salina estéril.
- Llevar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.
- Agregar suspensión de *Candida albicans* o solución salina estéril hasta obtener una concentración de 10^8 UFC/mL, leer en el espectrofotómetro a 580nm y 25% de transmitancia.
- Preparar diluciones seriadas duplicadas.

- Verter Agar Saboraud Dextrosa, homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar.
- Incubar por 4 días a 32-35°C.
- Realizar el conteo de colonias de *Candida albicans*, utilizando un contador de colonias.

4.4.7. RECONSTITUCION DEL *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™).

Pesar 0.1g del polvo de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™) y transferir a un tubo con 10 mL de caldo MRS, flamear la boca del tubo, luego incubar a 37°C 5% de CO₂ por 48-72 horas. Después de transcurrido el tiempo de incubación de la suspensión de bacterias tomar una asada de forma aséptica y aislar en una placa de Petri con agar MRS utilizando la técnica de siembra por estría e incubar a 37°C 5% de CO₂ por 48-72 horas. Se observaron bacilos delgados gram positivos.

4.4.8. IDENTIFICACION DEL *Lactobacillus rhamnosus*. (11)

4.4.8.1. TINCION DE GRAM. (ver anexo N°4)

Con tinción de Gram teñir las colonias sospechosas de *Lactobacillus rhamnosus* y colocar al microscopio donde se observara su morfología microscópica.

4.4.8.2. PRUEBA DE LA CATALASA. (ver anexo N°5)

- Colocar una gota de solución de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos.
- Con el asa metálica picar una de las colonias de *Lactobacillus rhamnosus* de la placa de Petri.
- Colocar la colonia sobre la gota de peróxido de hidrogeno. La producción de burbujas de gas (oxigeno) indicará un resultado positivo.

4.4.9. ESTANDARIZACION DEL *Lactobacillus rhamnosus*.^(14,31)(ver anexo N°6)

- Pesar 0.1 g de polvo de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* (HOWARU™).
- Adicionar en 10.0 mL de caldo MRS.
- Agitar la suspensión del microorganismo en el caldo durante 1 minuto con un agitador Vortex.
- Adicionar 1.0 mL de la suspensión del *Lactobacillus rhamnosus* en 10.0 mL de solución salina estéril.
- Transferir 1000.0 µL a una celda espectrofotométrica de cuarzo.
- Configurar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.⁽²¹⁾
- Llevar el espectrofotómetro a una transmitancia de 0⁰, usando como blanco solución salina estéril.
- Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.
- Agregar suspensión de *Lactobacillus rhamnosus* o solución salina estéril hasta obtener una concentración de 10⁸ UFC/mL, leer en el espectrofotómetro a 625 nm y 25% de transmitancia.
- Preparar diluciones seriadas duplicadas.
- Verter Agar MRS, homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar.
- Incubar las placas a 37°C, 5% de CO₂ por 48-72 horas
- Realizar el conteo de colonias de *Lactobacillus rhamnosus*, utilizando un contador de colonias.

4.4.10. COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DEL FLUCONAZOL SOBRE *Candida albicans*.^(6,11) (ver anexo N°7)

4.4.10.1. PREPARACION DE LA CAPA BASE.

- Tomar 8 placas de Petri vacías y rotularlas de forma adecuada.
- Verter 15 ml de agar Mueller-Hinton con 2% de dextrosa y dejar solidificar. (Se realizó el mismo procedimiento para las cepas restantes de *Candida albicans* obtenidas de las muestras hospitalarias y para la cepa patrón de *Candida albicans* ATCC 10231).
- Tapar las placas y esperar 15 minutos para que la superficie del agar se seque.

4.4.10.2. PREPARACION DE LA CAPA INOCULO.

- Previamente realizar el cálculo para obtener una concentración de 10^3 y 10^5 de *Candida albicans*. (ver anexo N°8).
- Tomar 2 erlenmeyer vacíos de 50 ml y rotularlos debidamente.
- Agregar a cada Erlenmeyer 30 ml de agar Mueller-Hinton con 2% de dextrosa.
- Tomar 75 μ L de la suspensión de *Candida albicans* a la concentración 10^7 y 10^5 e inocular en cada erlenmeyer que se habían colocado en baño maría a una temperatura de 45°C para obtener una concentración de 10^5 y 10^3 de *Candida albicans*.
- Con una pipeta estéril de 5 mL tomar 4 mL de la capa inoculo de *Candida albicans* a la concentración de 10^5 y 10^3 .
- Inocular en las placas de Petri tratando de esparcir el microorganismo sobre el medio de cultivo contenido en la placa.
- Tapar las placas y esperar 15 minutos para que la superficie de la capa inoculo se seque.

- Luego colocar un disco de sensibilidad de Fluconazol de 25 µg con ayuda de una pinza estéril presionando suavemente y colocándolo al centro de la placa.
- Invertir e incubar las placas a 32-35°C. en incubadora por un tiempo de 4 días.
- Pasado este tiempo de incubación proceder al conteo de colonias para verificar cuantas colonias habían en comparación con las placas control de crecimiento normal de la *Candida albicans* sin el Fluconazol.
- El procedimiento es igual para la cepa control y las muestras hospitalarias de *Candida albicans*.

4.4.11. EVALUACION DE LA INHIBICION CAUSADA POR EL *Lactobacillus rhamnosus* SOBRE CEPAS DE *Candida albicans* OBTENIDAS DE MUESTRAS HOSPITALARIAS. ^(6,11) (ver anexo N°9)

- Con una pipeta estéril de 5 mL tomar 4 mL de la capa inculo de *Candida albicans* a la concentración de 10^5 y 10^3 .
- Inocular en las placas de Petri tratando de esparcir el microorganismo sobre el medio de cultivo contenido en la placa.
- Tapar las placas y esperar 15 minutos para que la superficie de la capa inculo se seque.
- Colocar un cilindro de acero inoxidable con ayuda de una pinza estéril al centro de la placa.
- Agregar 100 µL de *Lactobacillus rhamnosus* previamente estandarizado a 10^6 y 10^7 ₍₃₂₎ en el cilindro de acero inoxidable contenidas en cada una de las placas respectivamente.
- incubar a 32-35°C en aerobiosis en una incubadora por un tiempo de 4 días.

- Pasado este tiempo de incubación proceder al conteo de colonias para verificar cuantas colonias habían en comparación con las placas control de crecimiento normal de la *Candida albicans* sin el *Lactobacillus rhamnosus*.
- El procedimiento es igual para la cepa control y las muestras hospitalarias de *Candida albicans*.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1. Aislamiento de *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

Tabla N° 1. Cepas aisladas de *Candida albicans* en las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

Cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i>	Agar Saboraud Dextrosa
1	(+)
2	(+)
3	(+)
4	(+)
5	(+)
6	(+)

Se aislaron las cepas de las muestras hospitalarias de fluido vaginal en placas con Agar Saboraud Dextrosa en todas se observaron colonias características de *Candida albicans*, blancas, blandas, cremosas, lisas, con olor a moho característico (ver figura N° 1)



Figura N° 1. Morfología características de las cepas aisladas de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria 1 de fluido vaginal.

5.2. Identificación de *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

Tabla N° 2. Identificación de las cepas aisladas de *Candida albicans* de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

Cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i>	Tinción al Gram	Formación de tubos germinales	Formación de clamidosporas
1	(+)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(+)
3	(+)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)

Para la identificación de las muestras hospitalarias de *Candida albicans* al realizarse con la tinción al gram en todas se encontró que el 100% eran levaduras, gram positivas. (Ver figura N°2).

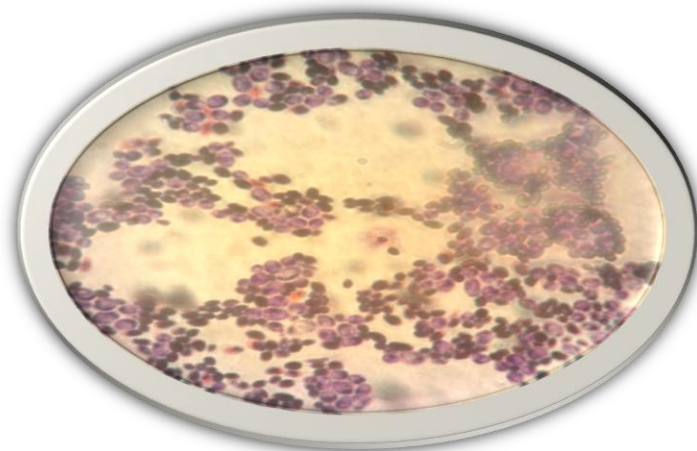


Figura N° 2. Morfología microscópica de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria 1.

Con la prueba de identificación a través de tubos germinales o filamento precoz a las cepas aisladas de las muestras hospitalarias de fluido vaginal se observó la formación de una extensión filamentosa de la levadura sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora encontrándose que el 100% de las muestras mostraban la formación de tubos germinales dando la prueba positiva para identificación de *Candida albicans*. (Ver figura N°3).

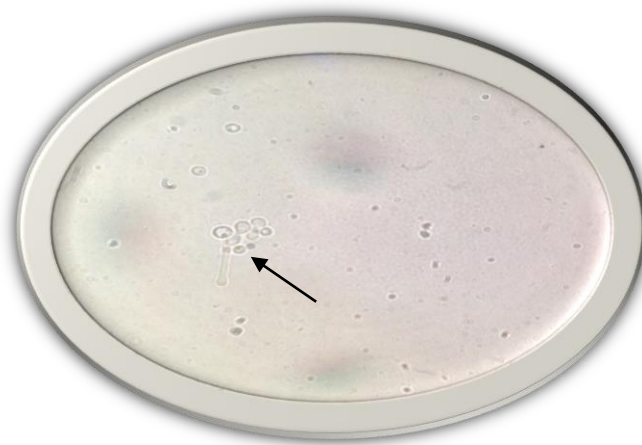


Figura N° 3. Formación de tubos germinales de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria 3.

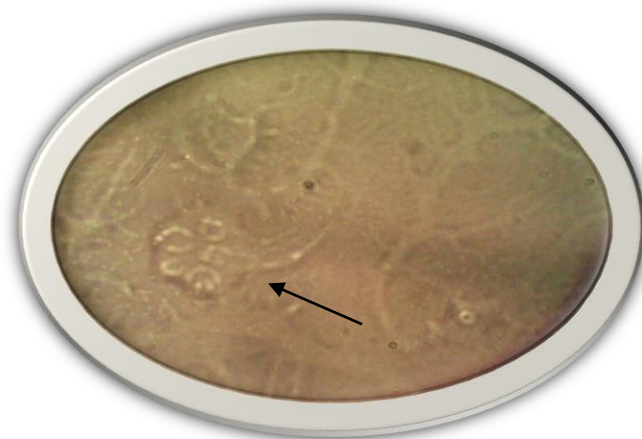


Figura N° 4. Formación de clamidosporas de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria 5.

Para la prueba de formación de clamidosporas a las cepas aisladas de las muestras hospitalarias de fluido vaginal donde se observaron formas de resistencia, redondas u ovals y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales, encontrándose que el 100% de las muestras mostraba la formación de clamidosporas dando la prueba positiva para identificación de *Candida albicans* (ver figura N°4) encontrándose que del total de las cepas aisladas de las muestras correspondían a *Candida albicans*.

5.3. Determinación de la efectividad del Fluconazol contra *Candida albicans* a una concentración de 10^3 y 10^5 a través de la técnica de dilución en Agar modificado.

Tabla N° 3. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal. (Ver anexo N°10 para los demás cálculos).

Muestras	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10^3 sin Fluconazol 25 μ g	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10^3 + Fluconazol 25 μ g	Porcentaje de inhibición (%)	Efectividad (+) Positivo (-) Negativo
1	208	0	100	+
2	186	0	100	+
3	204	0	100	+
4	272	260	41	-
5	140	132	6	-
6	100	76	24	-

En la tabla N° 3 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 utilizando Fluconazol 25 μ g como antifúngico de prueba, así como el conteo de colonias de *Candida albicans* sin Fluconazol y sus respectivos porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición se obtuvieron a través del siguiente cálculo:

Ejemplo:

Mx_1 *Candida albicans* [10^3]

208 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100%

Tabla N° 4. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal. (Ver anexo N°10 para los demás cálculos).

Muestras	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ sin Fluconazol 25 µg	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ + Fluconazol 25 µg	Porcentaje de inhibición (%)	Efectividad (+) Positivo (-) Negativo
1	256	192	25	-
2	212	192	10	-
3	216	204	6	-
4	440	392	11	-
5	500	488	2	-
6	440	412	6	-

En la tabla N° 4 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 utilizando Fluconazol 25 µg como antifúngico de prueba, así como el conteo de colonias de *Candida albicans* sin Fluconazol y sus respectivos porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición se obtuvieron de la misma forma como en los anteriores a través del siguiente cálculo: Ejemplo:

Mx_1 *Candida albicans* [10^5]

256 UFC/mL ----- 100%

192 UFC/mL ----- X

X= 75.00%

% Inhibición = 100% - 75.00%

% Inhibición = 25.00%

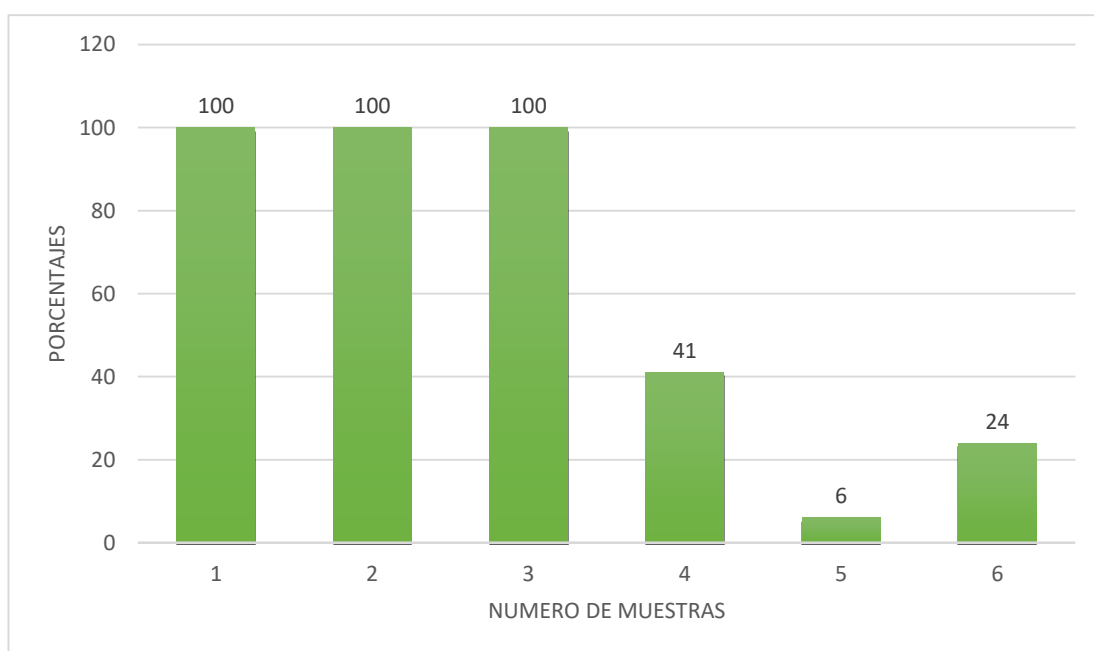


Figura N° 5: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^3 de cada una de las muestras hospitalarias.

Los resultados indican que para las cepas de *Candida albicans* aisladas de las muestras hospitalarias 1,2,3 a una concentración de 10^3 el Fluconazol 25 μ g fue efectivo en contra de estas ya que inhibió en un 100% el microorganismo. También se observa que para las muestras 4,5,6 el Fluconazol a 25 μ g no fue capaz de inhibir al microorganismo, por lo que no es efectivo ya que presentaron porcentajes de 41%,24%,6%. (Ver figura N°5).

Tabla N° 5: Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

CONCENTRACION DE <i>Candida albicans</i>	NUMERO DE MUESTRAS	MEDIA ARITMETICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICION
10^3	6	61.83

En la tabla N° 5 se muestra la media aritmética utilizado como estadístico de prueba de los porcentajes de inhibición que causo el Fluconazol 25 μ g contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^3 , esto nos indica la variabilidad de las 6 muestras hospitalarias de *Candida albicans* que fue del 61.83% de inhibición del microorganismo.

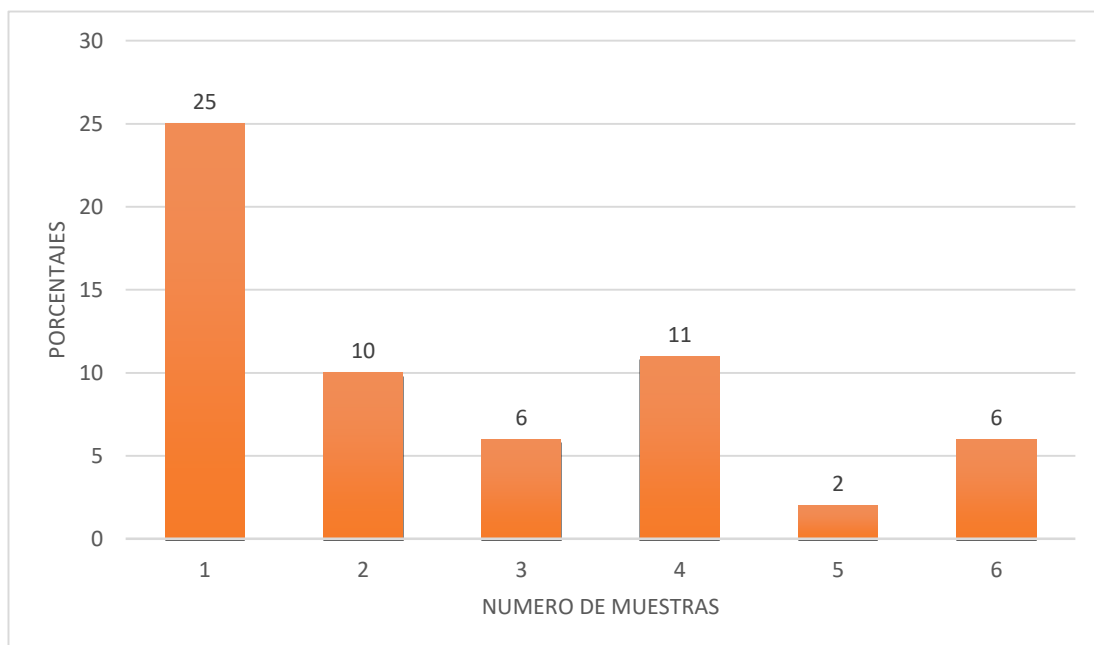


Figura N° 6: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias.

Los resultados indican que para las seis muestras hospitalarias a una concentración de 10^5 el Fluconazol a 25 μ g no fue capaz de inhibir el microorganismo, por lo tanto no fue efectivo. (Ver figura N° 6)

Tabla N° 6:Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal.

CONCENTRACION DE <i>Candida albicans</i>	NUMERO DE MUESTRAS	MEDIA ARITMETICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICION
10^5	6	10.00

En la tabla N° 6 se muestra la media aritmética utilizado como estadístico de prueba de los porcentajes de inhibición que causo el Fluconazol 25 µg contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^5 , esto nos indica la variabilidad de las 6 muestras hospitalarias de *Candida albicans* que fue del 10.00% de inhibición del microorganismo.

5.4. Resultados de la evaluación de la inhibición del hongo levaduriforme *Candida albicans* a una concentración de 10^3 y 10^5 con *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10^6 y 10^7 a través de la técnica de dilución en Agar modificado. (ver tabla N° 7 y 8)

Tabla N° 7. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 .

Muestras	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10^3 sin <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10^3 utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6	Porcentaje de inhibición (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^6	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10^3 utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^7	Porcentaje de inhibición (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10^7
1	208	0	100	0	100
2	186	0	100	1	99
3	204	0	100	0	100
4	272	252	7	272	0
5	140	116	17	124	11
6	100	76	24	68	32

En la tabla N° 7 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a concentración de 10^6 y 10^7 como microorganismo inhibidor de prueba, así como el conteo de colonias de *Candida albicans* sin *Lactobacillus rhamnosus* y sus respectivos porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición se realizaron como en los anteriores ejemplos.(ver anexo N° 13).

Tabla N° 8. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10⁵ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷.

Muestras	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10⁵ sin <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10⁵ utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁶	Porcentaje de inhibición (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁶	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10⁵ utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁷	Porcentaje de inhibición (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁷
1	256	204	20	180	27
2	212	204	4	196	8
3	216	116	46	144	33
4	440	436	1	408	7
5	500	492	2	484	3
6	440	432	2	420	5

En la tabla N° 8 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10⁵ utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a concentración de 10⁶ y 10⁷ como microorganismo inhibidor de prueba, así como el conteo de colonias de *Candida albicans* sin *Lactobacillus rhamnosus* y sus respectivos porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición se realizaron como en los anteriores ejemplos.(ver anexo N° 13).

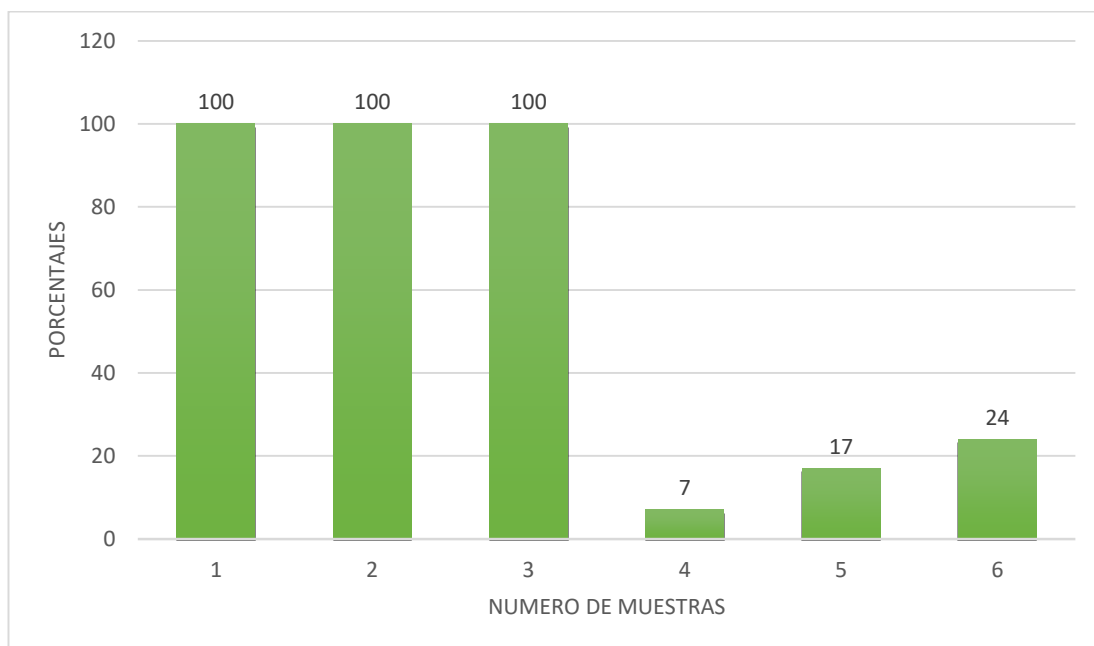


Figura N° 7: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^3 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 .

Los resultados indican que para las cepas aisladas de *Candida albicans* a una concentración de 10^3 de las muestras hospitalarias 1,2,3 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 fue efectivo porque inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 100% y para las muestras 4,5,6 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 no fue efectivo porque no inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 7%,17%,24% respectivamente. (Ver Figura N° 7).

Tabla N° 9:Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 como microorganismo inhibidor.

CONCENTRACION DE <i>Candida albicans</i>	NUMERO DE MUESTRAS	MEDIA ARITMETICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICION
10^3	6	58.00

En la tabla N° 9 se muestra la media aritmética utilizado como estadístico de prueba de los porcentajes de inhibición que causo el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^3 , esto nos indica la variabilidad de las 6 muestras hospitalarias de *Candida albicans* que fue del 58.00% de inhibición del microorganismo.

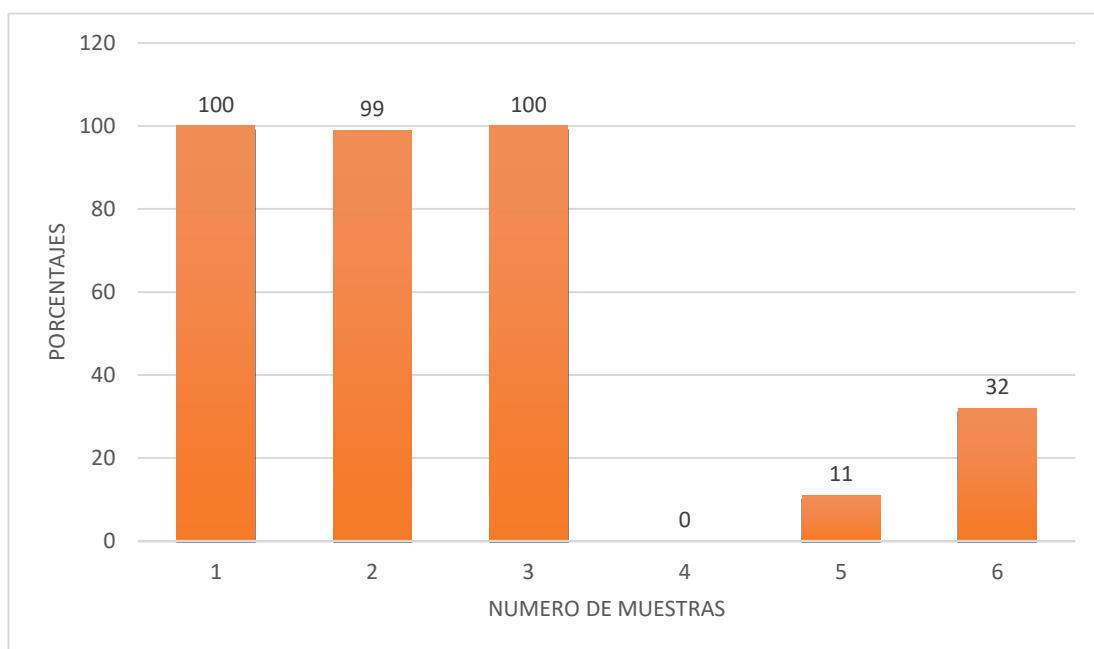


Figura N° 8: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^3 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 .

Los resultados indican que para las cepas aisladas de *Candida albicans* a una concentración de 10^3 de las muestras hospitalarias 1,2,3 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 fue efectivo porque inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 100%,99%,100% y para las muestras 4,5,6 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 no fue efectivo porque no inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 0%,11%,32% respectivamente. (Ver Figura N° 8).

Tabla N° 10: Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^3 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 como microorganismo inhibidor.

CONCENTRACION DE <i>Candida albicans</i>	NUMERO DE MUESTRAS	MEDIA ARITMETICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICION
10^3	6	57.00

En la tabla N° 10 se muestra la media aritmética utilizado como estadístico de prueba de los porcentajes de inhibición que causo el *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^3 , esto nos indica la variabilidad de las 6 muestras hospitalarias de *Candida albicans* que fue del 57.00% de inhibición del microorganismo.

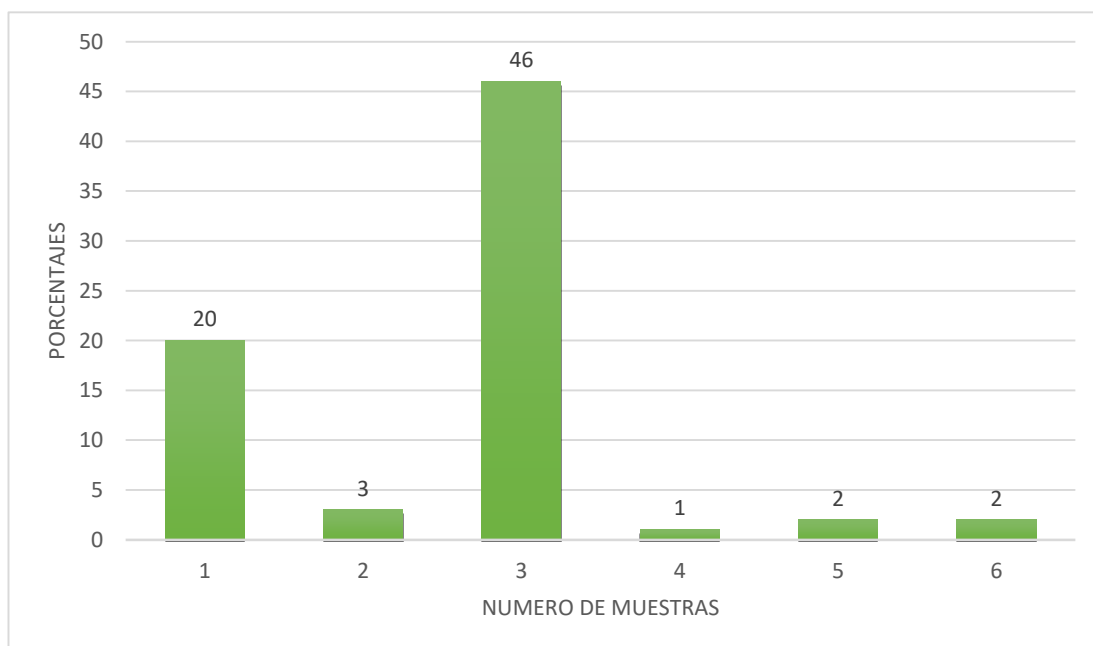


Figura N° 9: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 .

Los resultados indican que para las seis muestras hospitalarias a una concentración de 10^5 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 no fue efectivo porque

no fue capaz de inhibir el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición de: 46%,20%,3%,2%,2%,1% respectivamente. (Ver figura N° 9).

Tabla N° 11:Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 como microorganismo inhibidor.

CONCENTRACION DE <i>Candida albicans</i>	NUMERO DE MUESTRAS	MEDIA ARITMETICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICION
10^5	6	12.33

En la tabla N° 11 se muestra la media aritmética utilizado como estadístico de prueba de los porcentajes de inhibición que causo el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^5 , esto nos indica la variabilidad de las 6 muestras hospitalarias de *Candida albicans* que fue del 12.33% de inhibición del microorganismo.

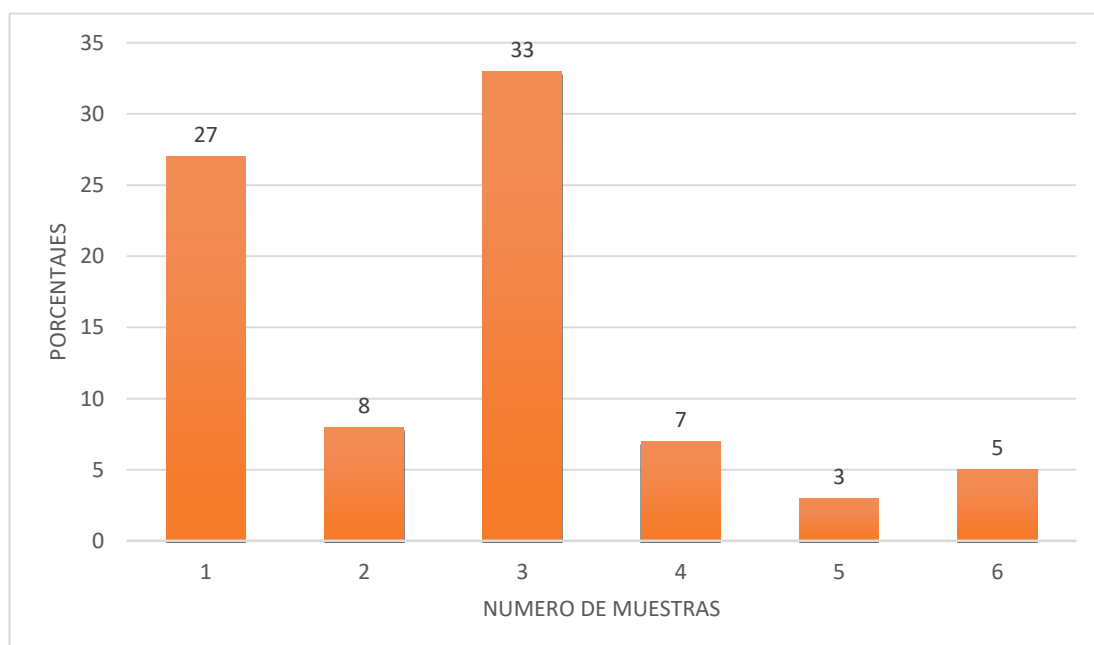


Figura N° 10: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 .

Los resultados indican que para las seis muestras hospitalarias a una concentración de 10^5 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 no fue efectivo porque no fue capaz de inhibir el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición de: 33%,27%,8%,7%,5%,3% respectivamente. (Ver figura N° 10).

Tabla N° 12:Media aritmética de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10^5 de las muestras hospitalarias de fluido vaginal utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 como microorganismo inhibidor.

CONCENTRACION DE <i>Candida albicans</i>	NUMERO DE MUESTRAS	MEDIA ARITMETICA DE LOS PORCENTAJES DE INHIBICION
10^5	6	13.83

En la tabla N° 12 se muestra la media aritmética utilizado como estadístico de prueba de los porcentajes de inhibición que causo el *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 contra la *Candida albicans* a una concentración de 10^5 , esto nos indica la variabilidad de las 6 muestras hospitalarias de *Candida albicans* que fue del 13.83% de inhibición del microorganismo.

5.5. Comparación de los resultados obtenidos en las cepas aisladas de *Candida albicans* hospitalarias con respecto a los datos obtenidos de la cepa patrón ATCC 10231 a concentración 10^3 y 10^5 sensible a antifúngico. (ver tabla N° 13 y 14)

Tabla N° 13. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10³ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg.

Muestras	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10 ³ ATCC 10231 sin Fluconazol 25 µg	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10 ³ ATCC 10231 + Fluconazol 25 µg	% de inhibición <i>Candida albicans</i> 10 ³ ATCC 10231	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10 ³ sin Fluconazol 25 µg	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10 ³ + Fluconazol 25 µg	% de inhibición de muestras de <i>Candida albicans</i> 10 ³
1	226	0	100	208	0	100
2				186	0	100
3				204	0	100
4				272	260	41
5				140	132	6
6				100	76	24

En la tabla N° 13 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de 10³ utilizando Fluconazol 25 µg como antifúngico de prueba, así como el conteo de colonias de *Candida albicans* sin Fluconazol y sus respectivos porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición se realizaron como en los anteriores ejemplos.(ver anexo N° 13).

Tabla N° 14. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10⁵ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg.

Muestras	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10 ⁵ ATCC 10231 sin Fluconazol 25 µg	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10 ⁵ ATCC 10231 + Fluconazol 25 µg	% de inhibición de <i>Candida albicans</i> 10 ⁵ ATCC 10231	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10 ⁵ sin Fluconazol 25 µg	Conteo (UFC/mL) de <i>Candida albicans</i> 10 ⁵ + Fluconazol 25 µg	% de inhibición de muestras de <i>Candida albicans</i> 10 ⁵
1	264	232	12	256	192	25
2				212	192	9
3				216	204	6
4				440	392	11
5				500	488	2
6				440	412	6

En la tabla N° 14 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de 10⁵ utilizando Fluconazol 25 µg como antifúngico de prueba, así como el conteo de colonias de *Candida albicans* sin Fluconazol y sus respectivos porcentajes de inhibición.

Los porcentajes de inhibición se realizaron como en los anteriores ejemplos.(ver anexo N° 13).

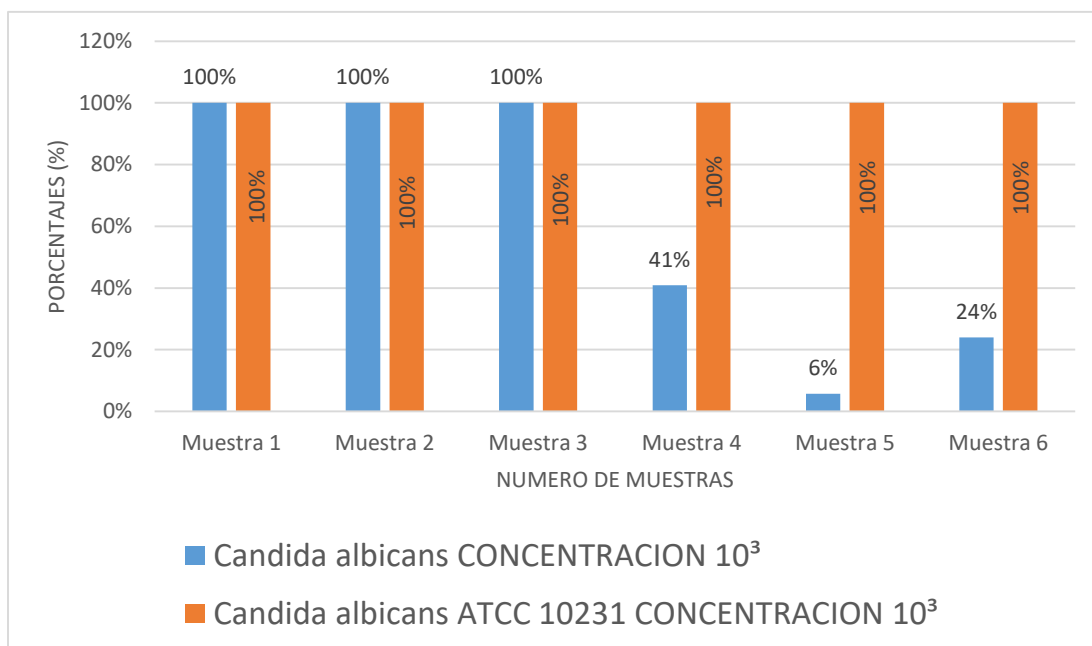


Figura N° 11: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10³ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg.

Los resultados indican que para las muestras hospitalarias 1,2,3 de *Candida albicans* 10³ en comparación con los resultados de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 fueron los mismos ya que el Fluconazol 25 µg fue efectivo en contra de estas porque inhibió en un 100% el microorganismo.

También se observa que para las muestras hospitalarias 4,5,6 de *Candida albicans* 10³ el Fluconazol 25 µg no fue efectivo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 41%,6%,24% respectivamente en cambio para la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 el Fluconazol fue efectivo ya que presentó un porcentaje de inhibición del 100%

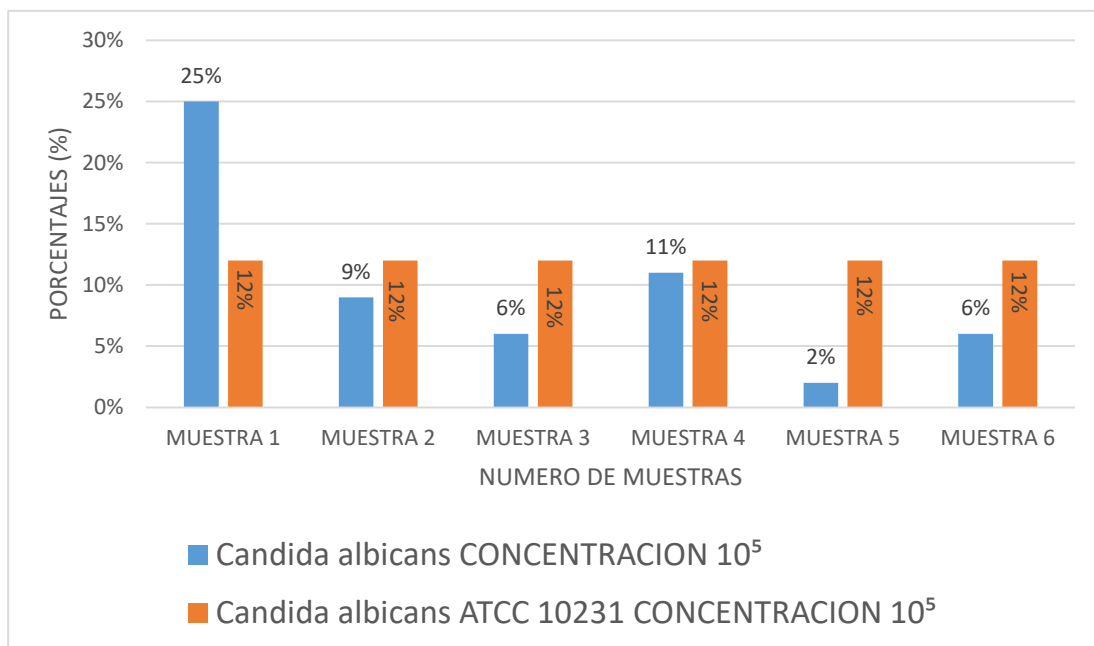


Figura N^o 12: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10⁵ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg.

Los resultados indican que para las seis muestras hospitalarias de *Candida albicans* 10⁵ el Fluconazol 25 µg no fue efectivo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 25%,11%,9%,6%,6%,2% al igual que la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 ya que presento un porcentaje de inhibición del 12%.

Tabla N° 15. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10³ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷.

Muestras	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10³ sin <i>L. rhamnosus</i>	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10³ + <i>L. rhamnosus</i> 10⁶	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10³ + <i>L. rhamnosus</i> 10⁷	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10³ ATCC 10231 sin <i>L. rhamnosus</i>	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10³ ATCC 10231 + <i>L. rhamnosus</i> 10⁶	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10³ ATCC 10231 + <i>L. rhamnosus</i> 10⁷
1	208	0	0	226	1	4
2	186	0	1			
3	204	0	0			
4	272	252	272			
5	140	116	124			
6	100	76	68			

En la tabla N°15 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10³ y de la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷ como microorganismo inhibidor de prueba, así como el conteo de colonias de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10³ y de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 sin *Lactobacillus rhamnosus*.

Tabla N° 16. Resultados del conteo de colonias de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10⁵ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷.

Muestras	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ sin <i>L. rhamnosus</i>	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ + <i>L. rhamnosus</i> 10⁶	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ + <i>L. rhamnosus</i> 10⁷	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ ATCC 10231 sin <i>L. rhamnosus</i>	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ ATCC 10231 + <i>L. rhamnosus</i> 10⁶	Conteo (UFC/mL) <i>Candida albicans</i> 10⁵ ATCC 10231 + <i>L. rhamnosus</i> 10⁷
1	256	204	180	264	240	224
2	212	204	196			
3	216	116	144			
4	440	436	408			
5	500	492	484			
6	440	432	420			

En la tabla N° 16 se presentan los resultados obtenidos del conteo de colonias de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10⁵ y de la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷ como microorganismo inhibidor de prueba, así como el conteo de colonias de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10⁵ y de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 sin *Lactobacillus rhamnosus*.

Tabla N° 17. Resultados de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10³ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷.

Muestras	Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i> 10 ³ (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ⁶	Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i> 10 ³ (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ⁷	Porcentaje de inhibición de la cepa de <i>Candida albicans</i> 10 ³ ATCC 10231 (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ⁶	Porcentaje de inhibición de la cepa de <i>Candida albicans</i> 10 ³ ATCC 10231 (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10 ⁷
1	100	100	100	98
2	100	99		
3	100	100		
4	7	0		
5	17	11		
6	24	32		

En la tabla N°17 se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10³ y de la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷ como microorganismo inhibidor de prueba.

Los porcentajes de inhibición se realizaron como en los anteriores ejemplos.(ver anexo N° 13).

Tabla N° 18. Resultados de los porcentajes de inhibición de las cepas aisladas de *Candida albicans* 10⁵ de las muestras hospitalarias de fluido vaginal y de la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷.

Muestras	Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i> 10⁵ (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁶	Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de <i>Candida albicans</i> 10⁵ (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁷	Porcentaje de inhibición de la cepa de <i>Candida albicans</i> 10⁵ ATCC 10231 (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁶	Porcentaje de inhibición de la cepa de <i>Candida albicans</i> 10⁵ ATCC 10231 (%) utilizando <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 10⁷
1	20	27	9	15
2	4	8		
3	46	33		
4	1	7		
5	2	3		
6	2	5		

En la tabla N° 18 se presentan los resultados de los porcentajes de inhibición de las cepas hospitalarias de *Candida albicans* 10⁵ y de la cepa de *Candida albicans* 10⁵ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ y 10⁷ como microorganismo inhibidor de prueba.

Los porcentajes de inhibición se realizaron como en los anteriores ejemplos. (ver anexo N° 13).

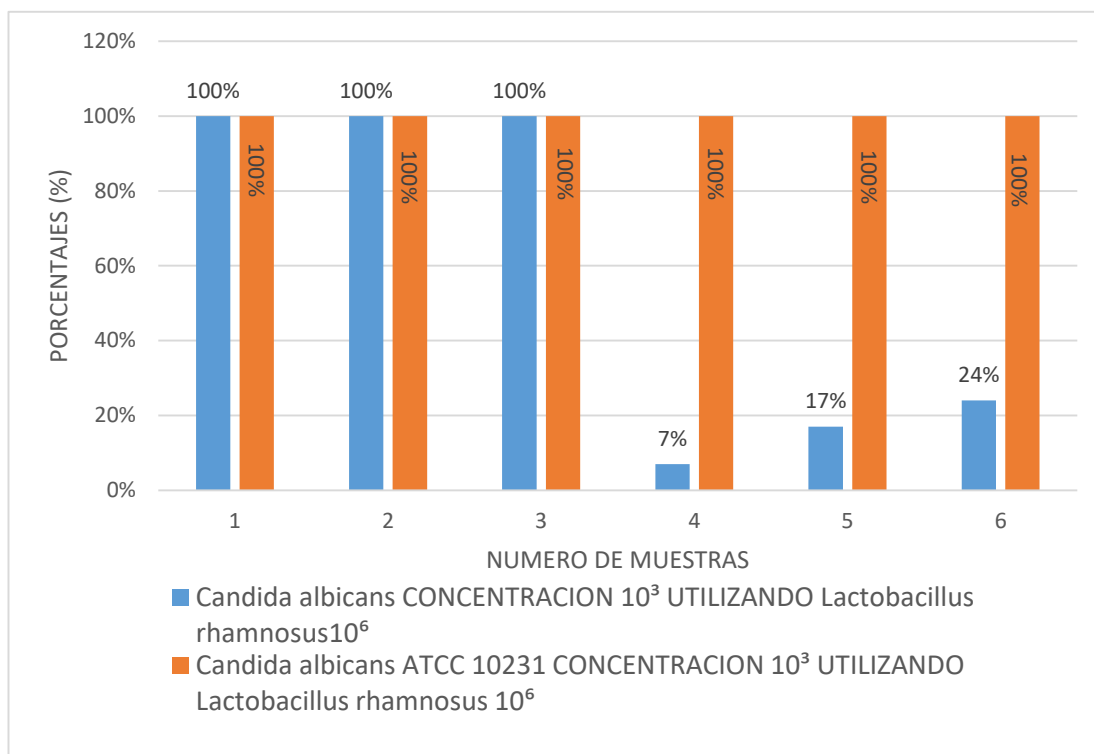


Figura N° 13: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10³ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10⁶.

Los resultados indican que para las muestras hospitalarias 1,2,3 de *Candida albicans* 10³ en comparación con los resultados de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 fueron los mismos porque el *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ fue efectivo ya que inhibió en un 100% el microorganismo.

También se observa que para las muestras hospitalarias 4,5,6 de *Candida albicans* 10³ el *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ no fue efectivo porque no inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes del 7%,17%,24% respectivamente, en cambio para la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 el *Lactobacillus rhamnosus* 10⁶ fue efectivo porque inhibió en un 100% el microorganismo. (Ver Figura N° 13).

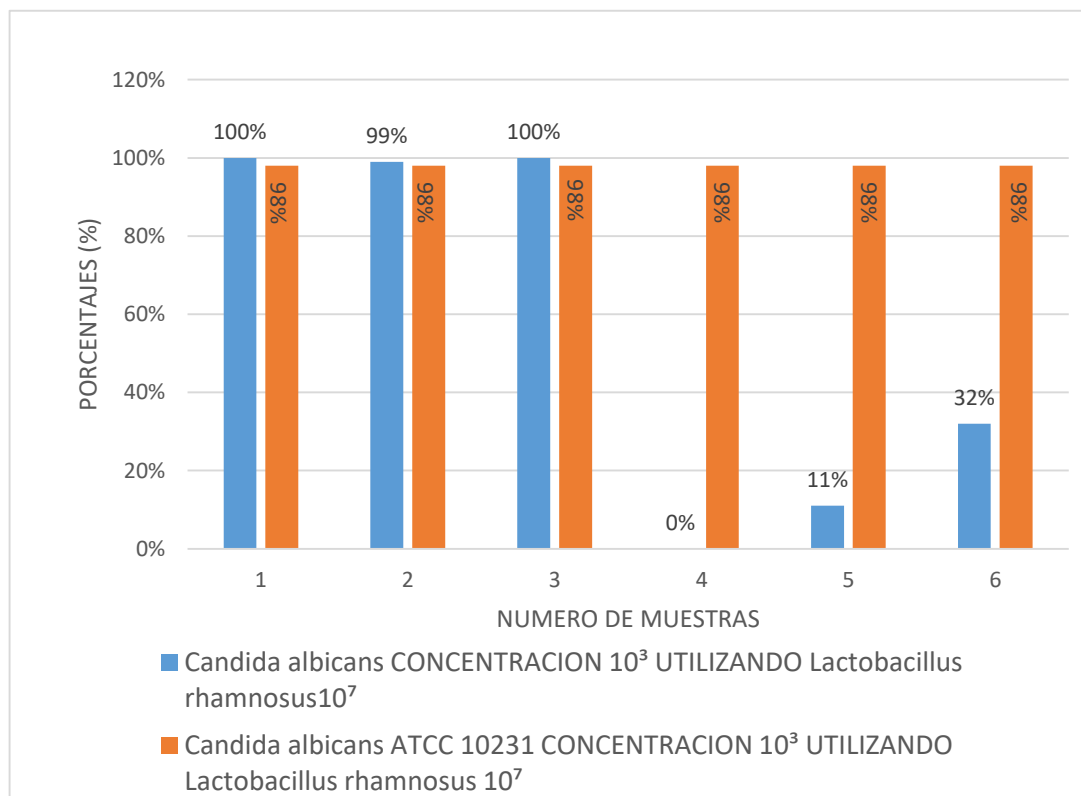


Figura N° 14: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10³ de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10⁷.

Los resultados indican que para las muestras hospitalarias 1,2,3 de *Candida albicans* 10³ el *Lactobacillus rhamnosus* 10⁷ fue efectivo porque inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición del 100%,99%,100% y para la cepa de *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 el *Lactobacillus rhamnosus* 10⁷ fue efectivo porque inhibió en un 98% el microorganismo.

También se observa que para las muestras hospitalarias 4,5,6 de *Candida albicans* 10³ el *Lactobacillus rhamnosus* 10⁷ no fue efectivo porque no inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes del 0%,11%,32% respectivamente, en cambio para la *Candida albicans* 10³ ATCC 10231 el

Lactobacillus rhamnosus 10^7 fue efectivo porque inhibió en un 98% el microorganismo. (Ver Figura N° 14).

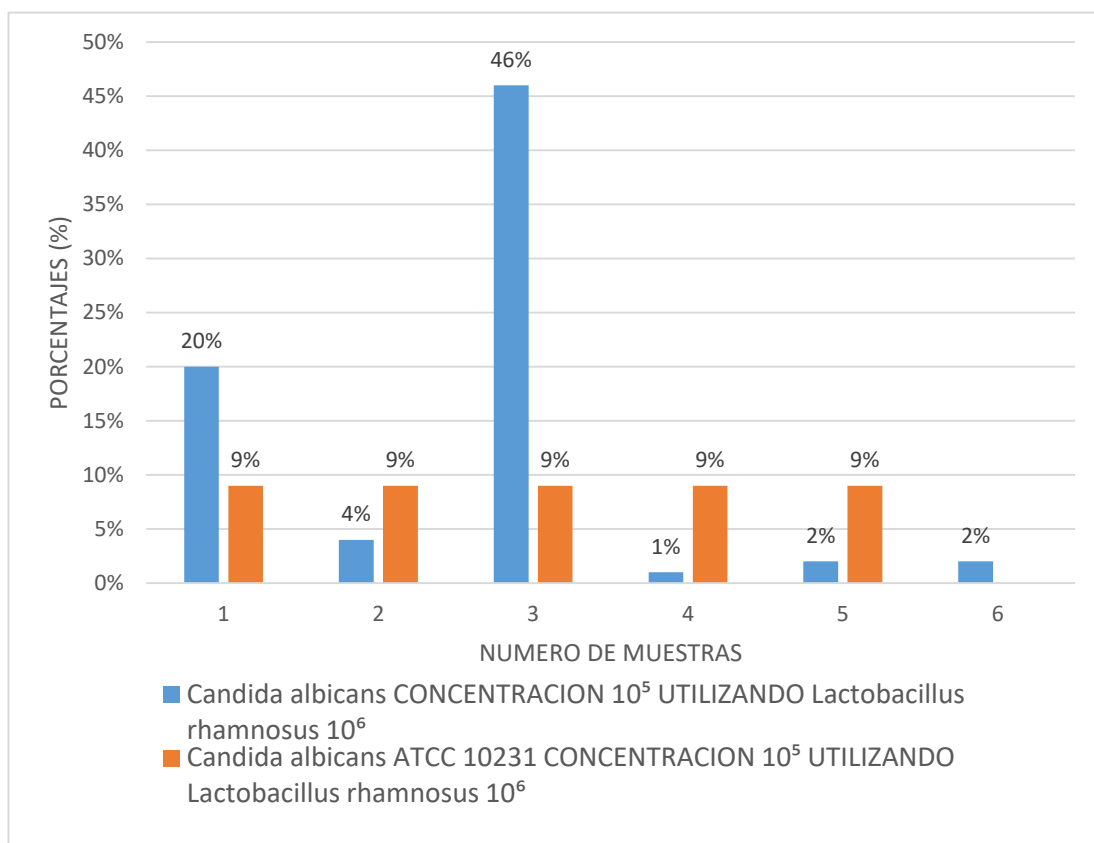


Figura N° 15: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10^5 ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10^6 .

Los resultados indican que para las seis muestras hospitalarias de *Candida albicans* 10^5 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 no fue efectivo porque no inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición de 46%,20%,4%,2%,2%,1% al igual que la cepa de *Candida albicans* 10^5 ATCC 10231 ya que presento un porcentaje de inhibición del 9%. (Ver Figura N° 15).

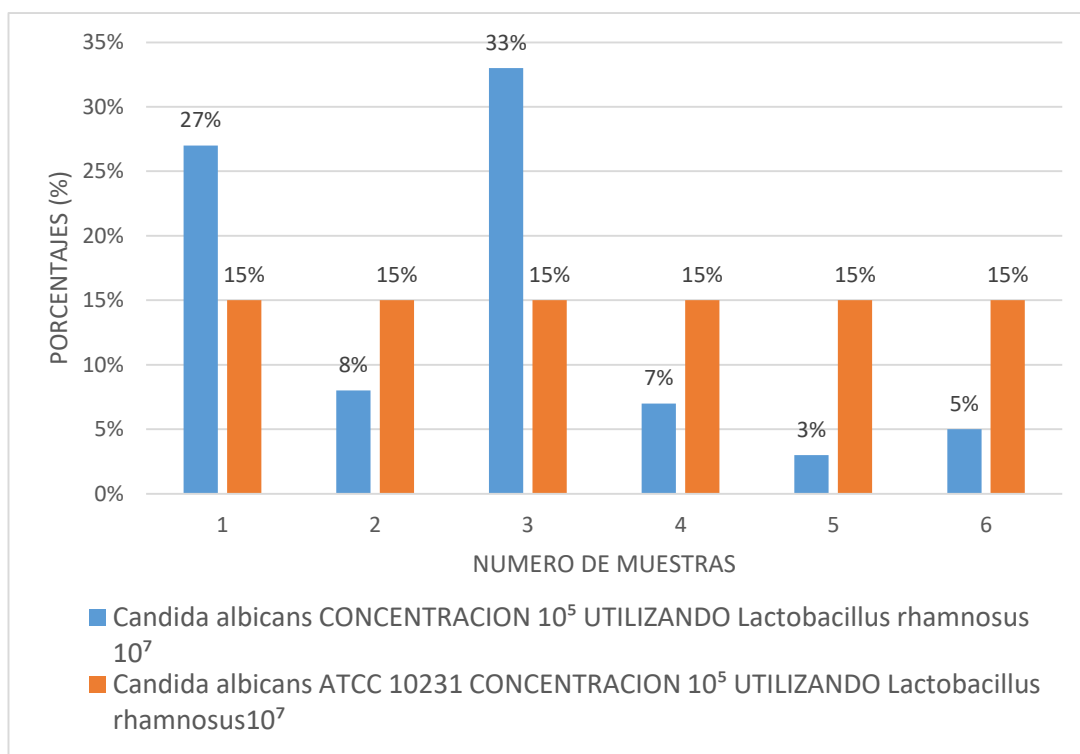


Figura N° 16: Grafico de porcentajes de inhibición de las cepas de *Candida albicans* 10^5 de cada una de las muestras hospitalarias contra el porcentaje de inhibición de la *Candida albicans* 10^5 ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración de 10^7 .

Los resultados indican que para las seis muestras hospitalarias de *Candida albicans* 10^5 el *Lactobacillus rhamnosus* 10^7 no fue efectivo porque no inhibió el microorganismo ya que presentaron porcentajes de inhibición de 33%, 27%, 8%, 7%, 5%, 3% al igual que la cepa de *Candida albicans* 10^5 ATCC 10231 ya que presento un porcentaje de inhibición del 15%. (Ver Figura N° 16).

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las cepas aisladas de *Candida albicans* concentración 10^3 en el 50% de las muestras el Fluconazol 25 μg fue efectivo ya que supero el 50% de inhibición del microorganismo.
2. Las cepas aisladas de *Candida albicans* concentración 10^5 en todas las muestras hospitalarias el Fluconazol 25 μg no fue efectivo ya que no supero el 50% de inhibición del microorganismo.
3. Las cepas aisladas de *Candida albicans* concentración 10^3 en el 50% de las muestras el *Lactobacillus rhamnosus* concentración de 10^6 y 10^7 fue efectivo ya que supero 50% de inhibición del microorganismo esto es debido a que el *Lactobacillus rhamnosus* ataca directamente al crecimiento del microorganismo debido a la formación de bacteriocinas y la formación de ácido láctico.
4. Las cepas aisladas de *Candida albicans* a la concentración de 10^5 en todas las muestras hospitalarias el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 no fue efectivo ya que no supero el 50% de inhibición del microorganismo y la carga microbiana del hongo levaduriforme es muy concentrada.
5. La cepa patrón de *Candida albicans* ATCC 10231 concentración 10^3 tanto el Fluconazol 25 μg como el *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 fueron efectivos debido a que inhibieron el microorganismo ya que no se habían sometido a ningún tratamiento con antifúngico no así para las cepas aisladas de *Candida albicans* a la misma concentración ya que solo fue efectivo para el 50% de las muestras.
6. La cepa patrón a una concentración de 10^5 no presento inhibición utilizando Fluconazol 25 μg y *Lactobacillus rhamnosus* 10^6 y 10^7 al igual que las cepas hospitalarias de *Candida albicans* a la misma concentración.
7. El *Lactobacillus rhamnosus* a una concentración 10^6 y 10^7 es más efectivo que el Fluconazol 25 μg .

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Disminuir el uso excesivo del Fluconazol para el tratamiento de enfermedades vaginales porque puede generar resistencia de la *Candida albicans* a los antifúngicos.
2. Concientizar a los pacientes de los hospitales a la no automedicación con antifúngicos como el Fluconazol.
3. Utilizar para futuras investigaciones un mayor número de muestras de cepas hospitalarias de *Candida albicans* para su respectivo análisis.
4. Desarrollar para futuras investigaciones nuevas metodologías para la comprobación de la efectividad del Fluconazol contra la *Candida albicans* y su inhibición frente al *Lactobacillus rhamnosus*.
5. Realizar nuevas metodologías como la utilización de medios cromogénicos, sistemas enzimáticos, pruebas API y criterios inmunológicos para facilitar la identificación de *Candida albicans* y para diferenciarlo de otras especies.

BIBLIOGRAFIA

1. Benítez Cruz, E. E. y Centi Lima, K. G. *Determinación de la resistencia del Staphylococcus aureus aislados de quesos no madurados comercializados en el mercado central de San salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados*. Trabajo de graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. El Salvador. Universidad de El Salvador. (2012). p 38-40,43.
2. Bertram, G. K. (2010). *Farmacología básica y clínica*. 11ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. p 840-841
3. Biasoli, M. [consultado 30 de mayo de 2016] Centro de Referencia de Micología.[online]. Disponible: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_20131.pdf
4. Castañon Olivares, L. R. [consultado 30 de mayo de 2016] Candidiasis Candidosis.[online]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
5. Collins, C. H. y Lyne, P. M. (1989). *Métodos microbiológicos*. 5ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. p 195 – 198, 203, 417.
6. Convention. USP. Biological Tests and Assays. In USP 34 NF 29. Rockville. The United States Pharmacopeical. The National formulary. 2001. p 71,77
7. Cornistein, W.; Mora, A.; Orellana, N.; Capparelli, F. J.; del Castillo, M. *Cándida: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans*. [revista científica on-line]. 2012 abril - noviembre [consultado 29 de mayo de 2016]; Volumen XXXI (6) [pp. 380-384]. Disponible: http://extranet.who.int/hinari/es/login_warning.php?jid=20797
8. Gómez Quintero, C. H. [consultado 1 de junio de 2016]. Resistencia de levaduras del género cándida al Fluconazol. [online]. Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a09.pdf>

9. Gurgui, M. y Cuenca-Estrella, M. *Situación actual de las infecciones fúngicas invasivas. Las nuevas técnicas diagnósticas y los nuevos antifúngicos*. [revista científica on-line]. 2008. [consultado 29 de mayo de 2016]; Volumen XXVI (14) [pp. 1-6]. Disponible: http://extranet.who.int/hinari/es/login_warning.php?jid=20797
10. Jawetz, E.; Melnick, J. y Adelberg, E. (1999). *Microbiología medica de Jawetz*. 16ª ed. México D.F: Editorial el manual moderno. P 75-76, 329, 732 – 734.
11. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M; Schreckenber, P. C y Winn, W. C. (1999). *Diagnostico microbiológico*. 5ª ed. Editorial medica panamericana. P 85, 93-96, 102, 797-799.
12. Lleti, M. S.; Jarque Ramos, I. y Peman García, J. *Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapeuticas*. [revista científica on-line]. 2006. [consultado 29 de mayo de 2016]; Volumen XXIV (1) [pp. 36-45]. Disponible:http://extranet.who.int/hinari/es/login_warning.php?jid=20797
13. Masia Canuto, M. M. (1998). Factores determinantes de la colonización e infección por especies de *cándida* resistentes al Fluconazol en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Tesis de doctorado no publicada, Universidad Miguel Hernández, Facultad de Medicina, España.
14. Pacheco Molina, J. M. y Serpas Tejada, R. A. Evaluación de dos métodos para la conservación de cepas bacterianas de trabajo utilizadas en el laboratorio de microbiología de medicamentos. Manual para la conservación de cepas bacterianas de trabajo. Trabajo de graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. El Salvador. Universidad de El salvador. (2013). p 48-49. Manual p 1 de 4.
15. Peman, J. y Salavert, M. *Epidemiologia general de la enfermedad fúngica invasora*. [revista científica on-line]. 2012. [consultado 29 de mayo de

- 2016]; Volumen XXX (2) [pp. 90-98]. Disponible: http://extranet.who.int/hinari/es/login_warning.php?jid=20797
16. Rodríguez Martínez, M. J. [consultado 30 de abril de 2016]. Uso de los Probióticos desde la Farmacia Comunitaria [online]. Disponible: <http://147.96.70.122/web/TFG/TFG/Memoria/BARBARA%20UBEDA%20RUIZ.pdf>.
 17. Salas Rueda, M. X. [consultado mayo 16 de 2016]. Identificación de *Lactobacillus* y levaduras aisladas de excretas fermentadas de aves con potencialidades probióticas [online]. Disponible: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1390/1/17T0893.pdf>
 18. Silva González, M. [consultado 1 de junio de 2016]. *Cándida albicans*. [online]. Disponible: <http://candidalbicans.blogspot.com/>
 19. Smith, D. T. (1960). *Bacteriología de Zinsser*. 2ª ed. México: Editorial Hispanoamérica. p 132, 586,963-965.
 20. Suarez, V. L. y Perurena Lancha, M. R. [consultado 31 de mayo de 2016]. Identificación de levaduras de exudados vaginales. [online]. Disponible: <http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v56n1/mtr05104.pdf>.
 21. Torrico Helguero, E. y Trigo Agudo, C. (2003). *Manual de procedimientos Kirby- Bauer y su control de calidad interno*. La paz, Bolivia. p 6.
 22. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f025.htm>. Vademecum, Fluconazol [consultado 30 de abril de 2016].
 23. <http://www.reviberoammicol.com/200219/022024.pdf>. Vulvovaginitis. [consultado 30 de abril de 2016].
 24. http://www.sepyp.es/pdf/probioticos_y_salud_humana_sepyp2012.pdf. Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. [consultado 30 de abril de 2016].

25. http://www.academia.edu/7516704/LOS_HONGOS,loshongos[consultado 30 de mayo de 2016].
26. <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4130/course/section/1519/Estructura%20y%20actividad%20de%20los%20antifungicos.pdf>.Estructura y actividad de los antifúngicos. [consultado 3 de julio de 2016].
27. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/sexuallytransmitteddiseases.html>. Enfermedades de transmisión sexual. [consultado 3 de julio de 2016].
28. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/> [consultado 2 de agosto de 2017].
29. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/9/36_b1300270/_html[consultado 2 de agosto de 2017].
30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536122/> [consultado 2 de agosto de 2017].
31. http://www.uv.es/cect2/65_Informe_Cepas_Trabajo [consultado 2 de agosto de 2017].
32. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X2015000500008 [consultado 2 de agosto de 2017].

GLOSARIO.

Antibiótico: Cualquier agente antimicrobiano producido por un microorganismo. Este inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo. Por ejemplo la penicilina del *Penicillium notatum*. En la naturaleza existe un gran número de antibióticos, pero solamente unos pocos son seguros para uso humano. (1)

Antifúngico: Engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. (24)

Antimicrobiano: Cualquier sustancia natural, semi-sintética o de origen sintético que inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo. (1)

Cepa resistente: Implica que la bacteria no es inhibida por concentraciones de la droga que puedan alcanzarse y, por lo tanto, la droga no debe ser seleccionada para el tratamiento, excepto en ciertos líquidos corporales donde puedan acumularse grandes concentraciones del antibiótico. (1)

EFI: Enfermedades Fúngicas Invasoras. Son aquellas enfermedades fúngicas que afectan habitualmente a tejidos (tanto superficiales como profundos), órganos (tanto vísceras huecas como parénquimas sólidos) y a líquidos orgánicos estériles (incluyendo la sangre). (14)

ETS: Enfermedades de Transmisión Sexual. Son infecciones que se adquieren por tener relaciones sexuales con alguien que esté infectado. (25)

Lesiones maculonodulares: Es una lesión sólida, redondeada, sin relieve ni cambio de textura, por lo que no es palpable, que puede originarse en la dermis o en el tejido celular subcutáneo. (15)

MIC o CIM (Concentración inhibitoria mínima): Es la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo. (1)

NCCLS: El Instituto para la normatización de Laboratorios Clínicos anteriormente conocido como El Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS); es una organización sin fines de lucro, con miembros representando a varias disciplinas. Es una organización educativa que enseña a través de foros el desarrollo, promoción y uso de normas nacionales e internacionales relacionadas con las pruebas de susceptibilidad, su uso apropiado y la interpretación de los resultados. (1)

Neutropenia: La neutropenia es un problema caracterizado por niveles anormalmente bajos en la sangre de los neutrófilos que combaten las infecciones, que son un tipo específico de glóbulos blancos. (26)

Patogénesis: Describe el origen y evolución de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella. (27)

ANEXOS

ANEXO N° 1

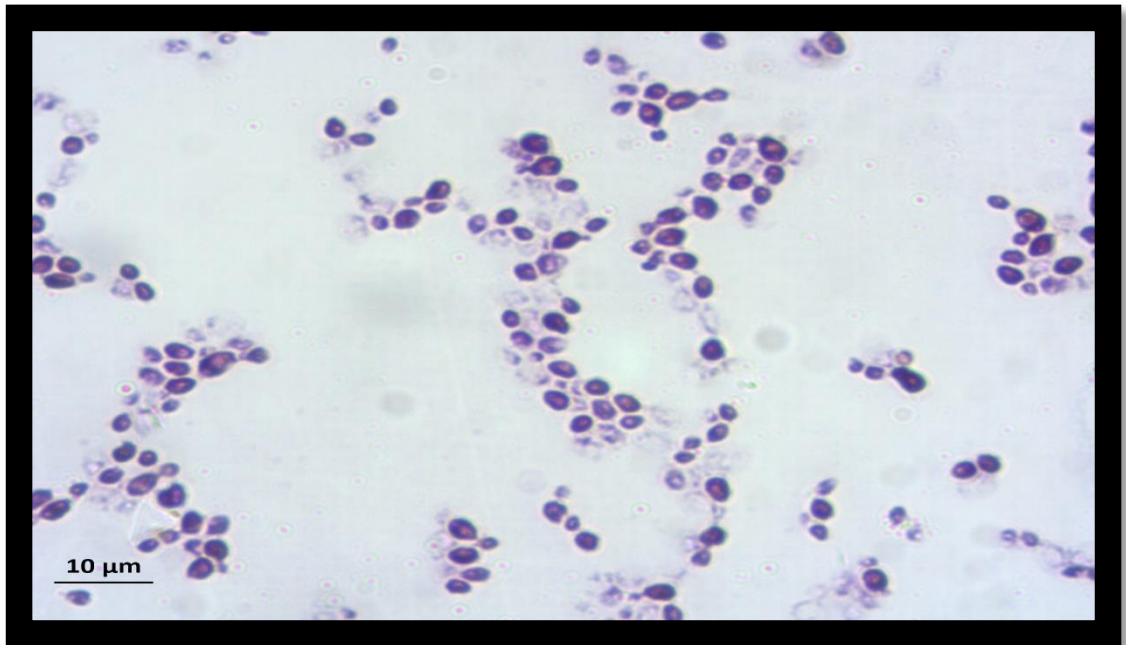


Figura N° 17. Morfología microscópica de *Candida albicans* con tinción al gram. Levaduras gram positivas.

ANEXO N° 2

ESTANDARIZACION DE LA CEPA PATRON DE *Candida albicans*
ATCC 10231.

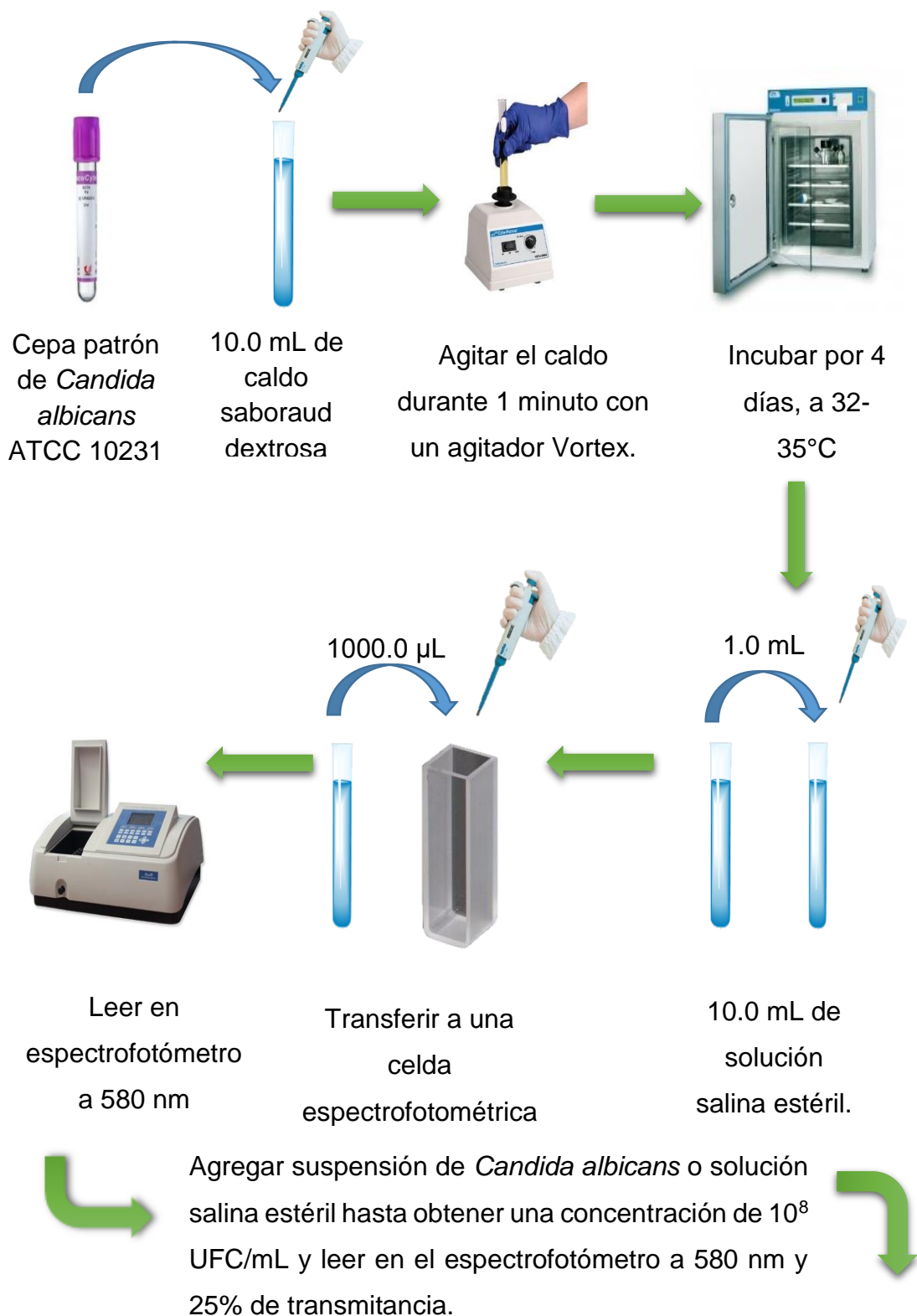
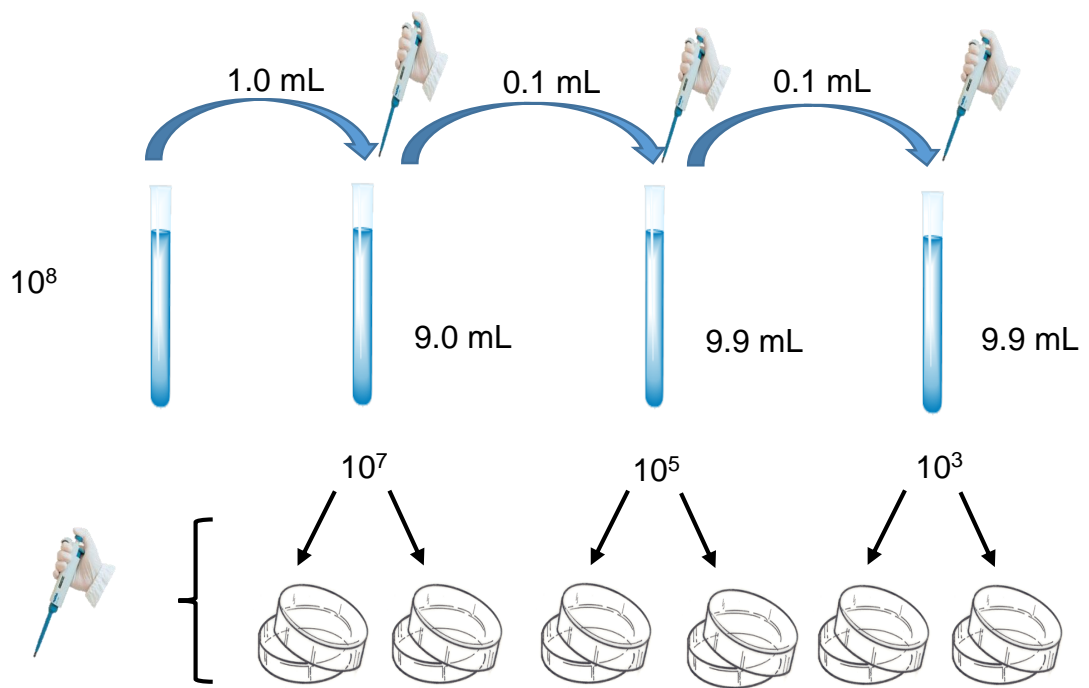


Figura N° 18. Esquema de estandarización de Cepa patrón *Candida albicans* ATCC 10231.



Inocular con 1.0 mL de las diluciones las placas



Realizar el conteo de colonias de *Candida albicans*.

Incubar por 4 días, a 32-35°C

Verter Agar Saboraud Dextrosa, homogenizar en forma de ocho y dejar solidificar.

Figura N° 18. Continuación de esquema de estandarización de Cepa patrón *Candida albicans* ATCC 10231.

ANEXO N° 3

ESTANDARIZACION DE LAS CEPAS DE *Candida albicans*
OBTENIDAS DE LAS MUESTRAS HOSPITALARIAS

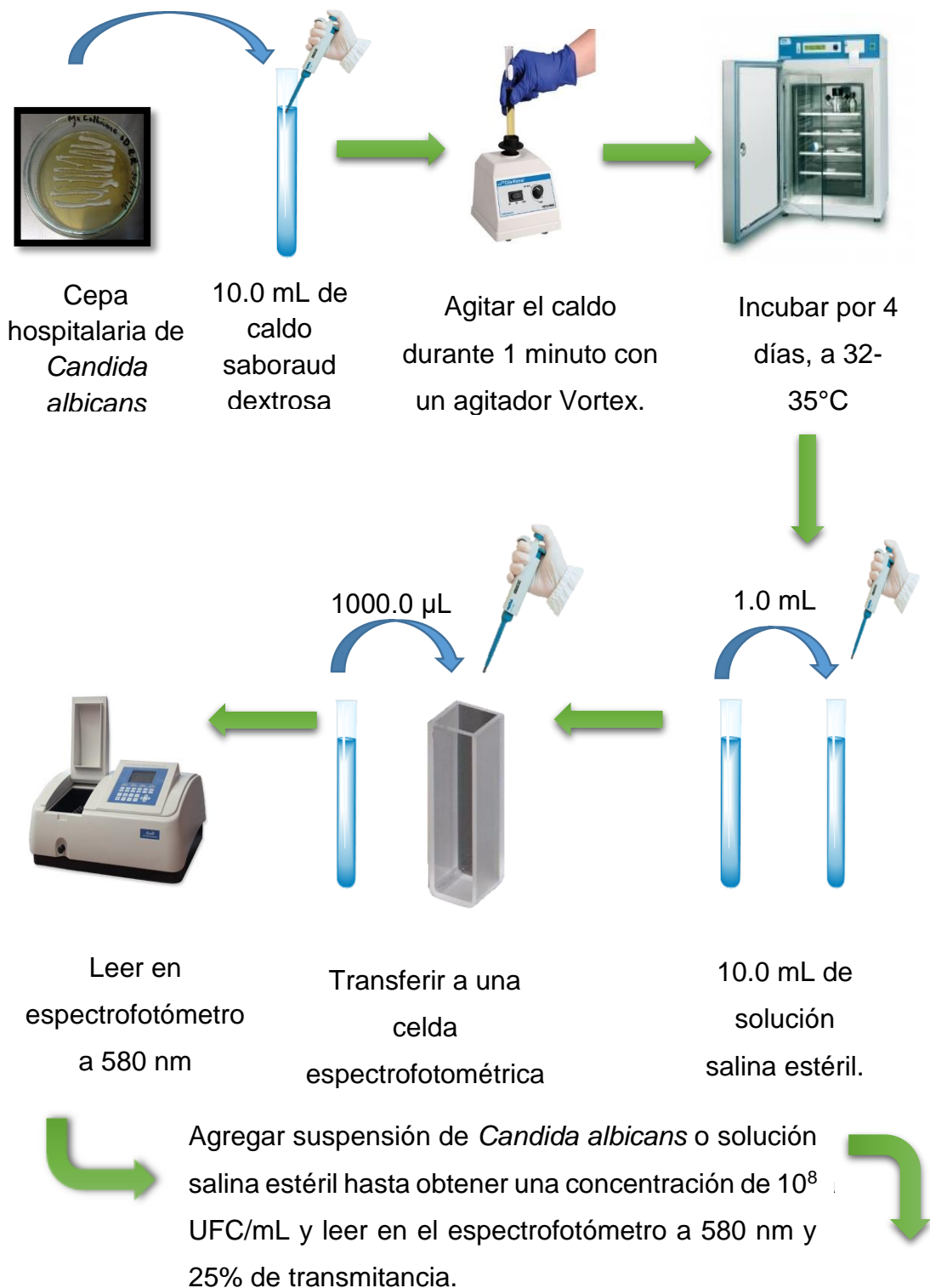


Figura N° 19. Esquema de estandarización de las cepas de *Candida albicans* obtenidas de las muestras hospitalarias.

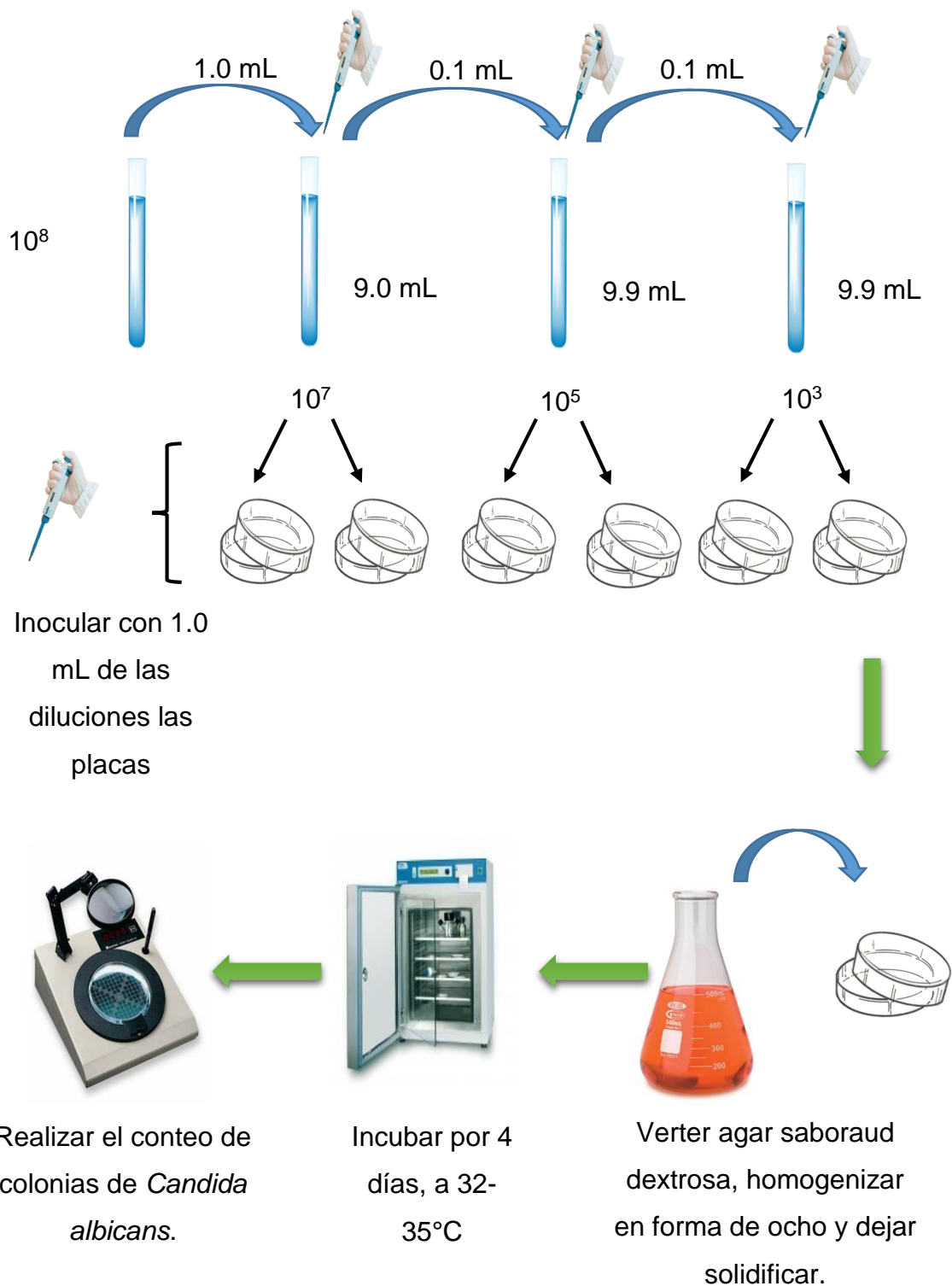


Figura N° 19. Continuación de esquema de estandarización de las cepas de *Candida albicans* obtenidas de las muestras hospitalarias.

ANEXO N° 4

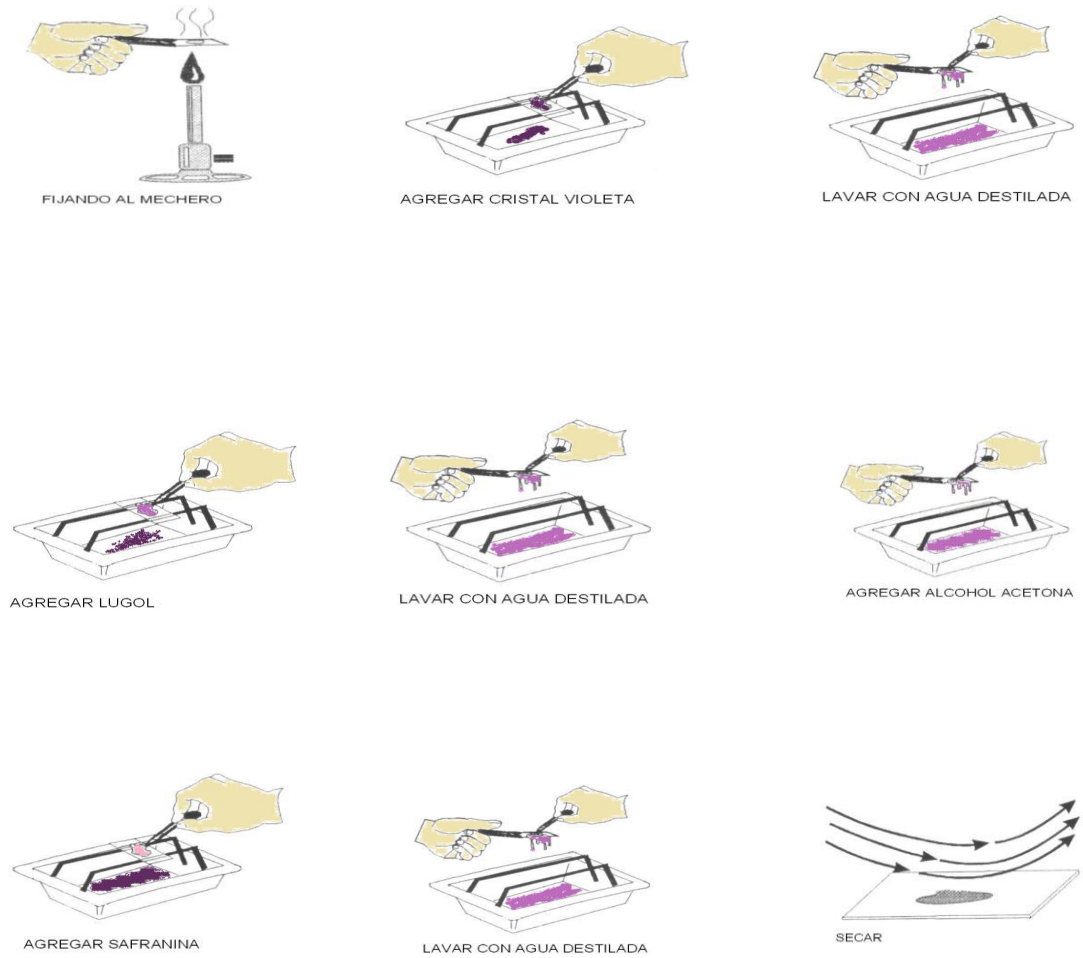


Figura N° 20. Procedimiento para la tinción al Gram.

ANEXO N° 5

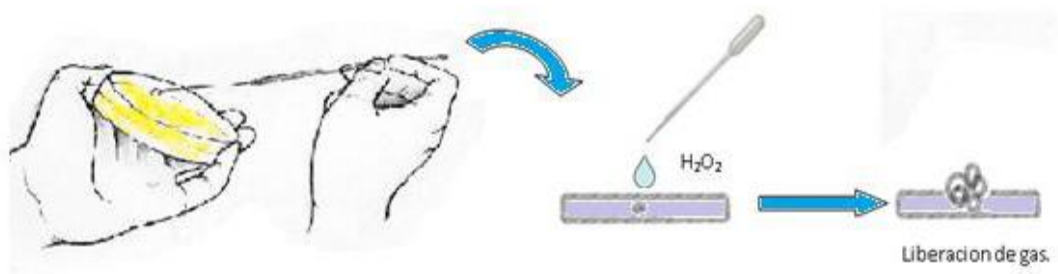


Figura N° 21. Prueba de catalasa.

ANEXO N° 6

ESTANDARIZACION DE *Lactobacillus rhamnosus*.

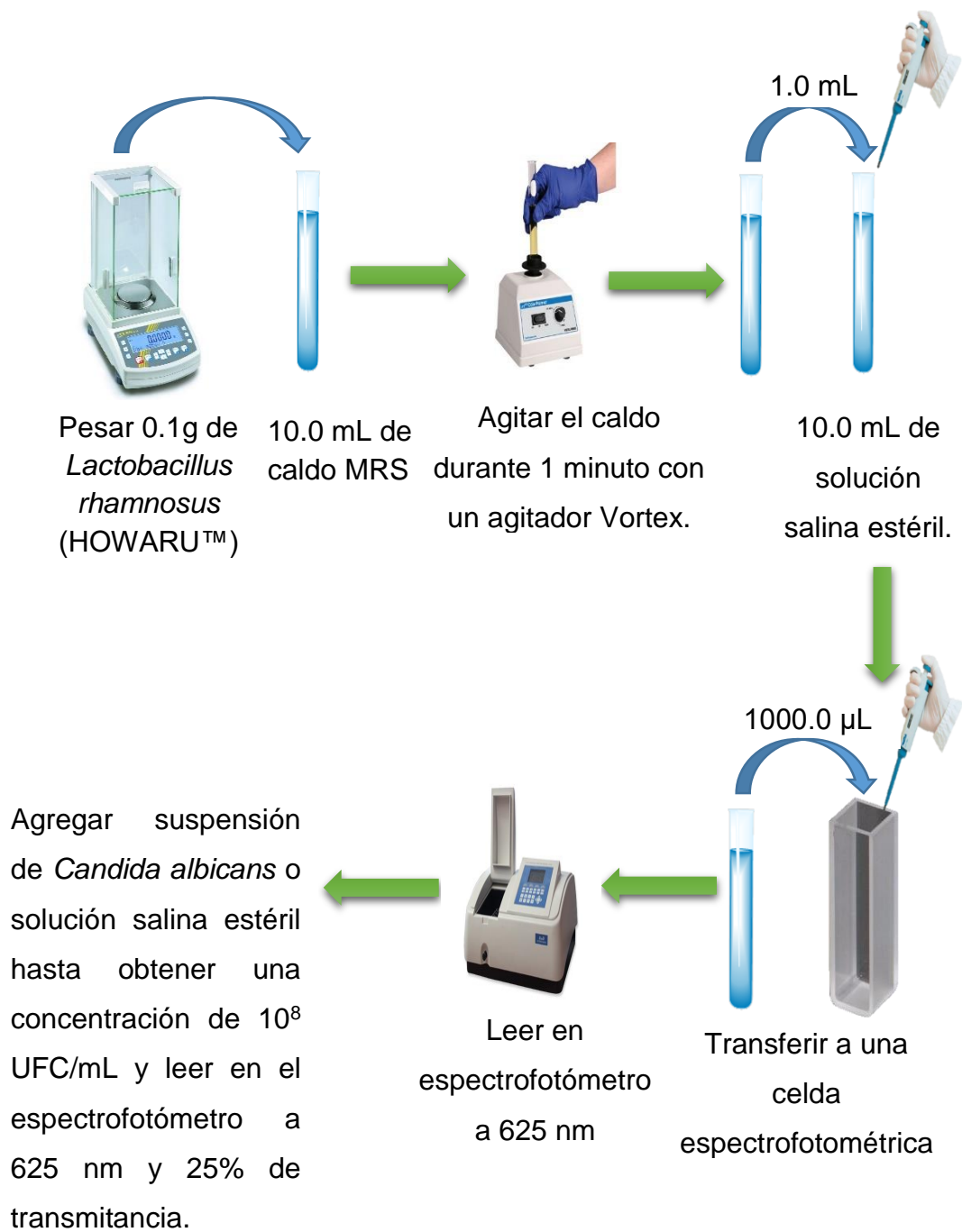


Figura N° 22. Esquema de estandarización de *Lactobacillus rhamnosus*.

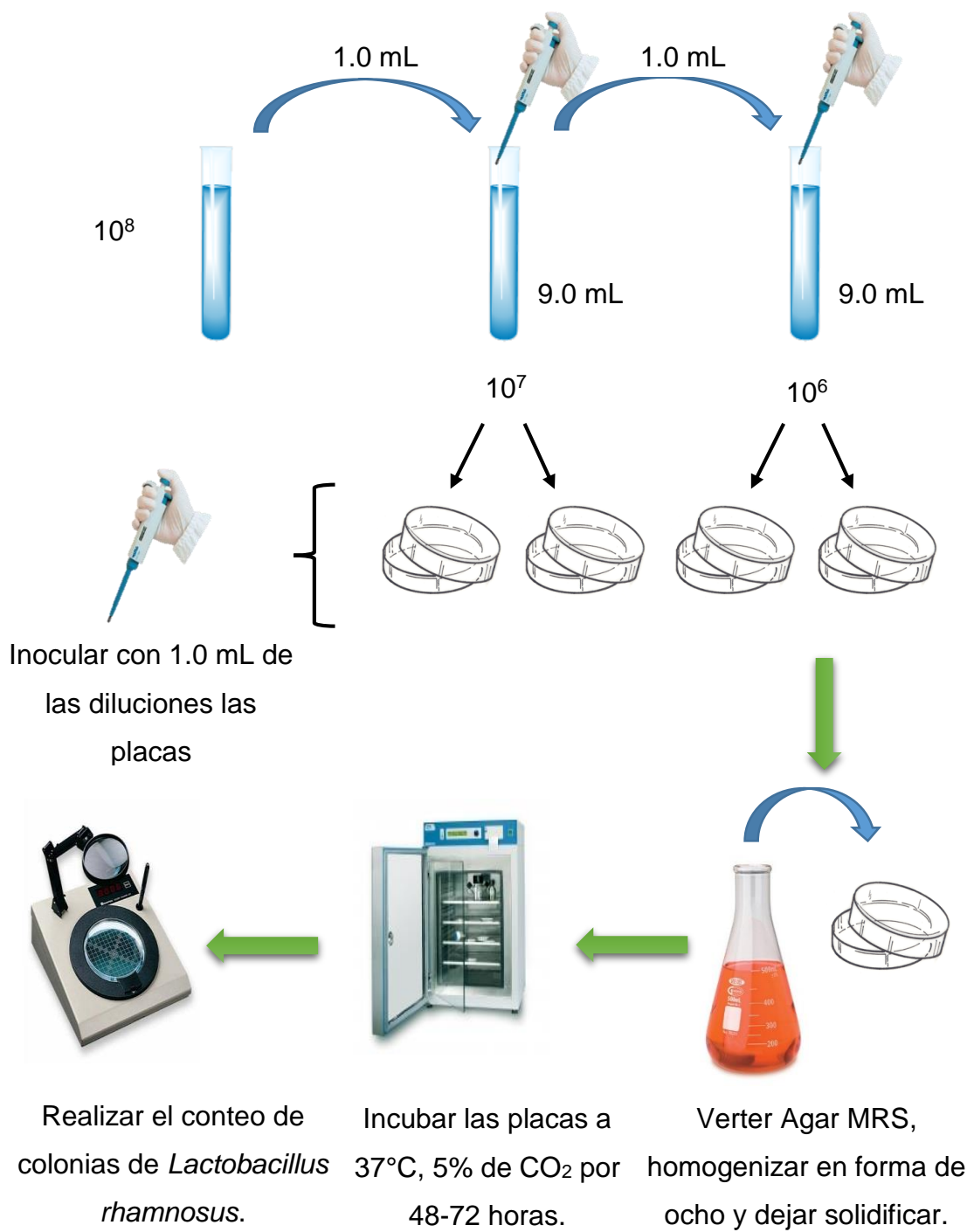
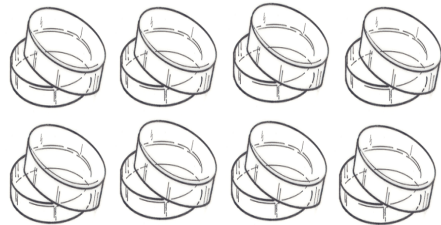


Figura N° 22. Continuación de esquema de estandarización de *Lactobacillus rhamnosus*.

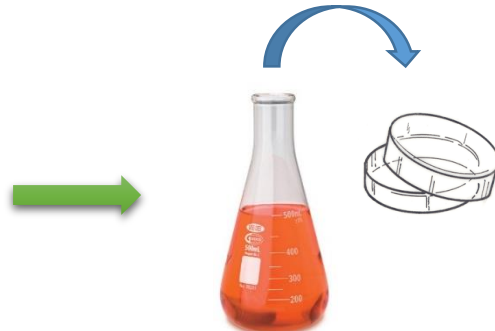
ANEXO N° 7

COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DEL FLUCONAZOL SOBRE
Candida albicans.

CAPA BASE



Tomar 8 placas de Petri y rotularlas



Verter 15 mL de Agar Mueller-Hinton con 2% de Dextrosa y dejar solidificar.

CAPA INOCULO



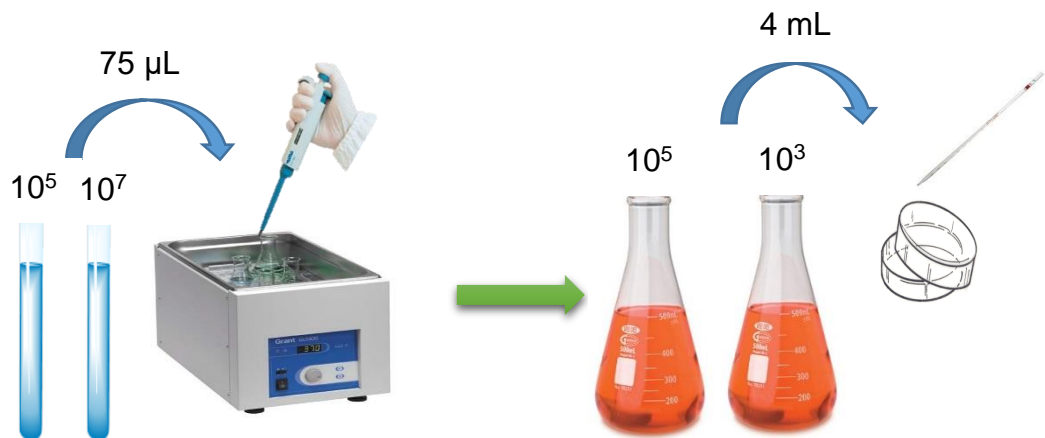
Agregar 30 mL de Agar Mueller-Hinton con 2% de Dextrosa



Tomar 2 erlenmeyer vacíos de 50 mL y rotularlos



Figura N° 23. Esquema de comprobación de la efectividad del Fluconazol sobre la *Candida albicans*.

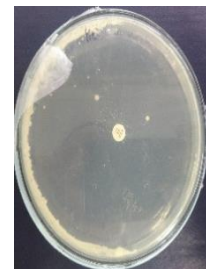


Inocular en el erlenmeyer que contiene el medio de cultivo colocado en un baño maría a 45°C para obtener una concentración de 10^5 y 10^3 de *Candida albicans* y dejar reposar durante 15 min.

Inocular con una pipeta mohr de 4 mL del microorganismo en las placas de Petri tratando de esparcir el microorganismo sobre el medio de cultivo contenido en las placas tapar y dejar reposar



Colocar las placas invertidas e incubar a 32-35°C, por 4 días.



Colocar un disco de sensibilidad de Fluconazol de 25 µg con ayuda de una pinza estéril.

Figura N° 23. Continuación de esquema de comprobación de la efectividad del Fluconazol sobre la *Candida albicans*.



Realizar el conteo de colonias de *Candida albicans* para verificar cuantas colonias habían en comparación con las placas control de crecimiento normal de la *Candida albicans* sin el Fluconazol.



El procedimiento es igual para la cepa control y las muestras hospitalarias de *Candida albicans*.

Figura N° 23. Continuación de esquema de comprobación de la efectividad del Fluconazol sobre la *Candida albicans*.

ANEXO N° 8

CALCULO PARA OBTENER LA CONCENTRACION DE 10^3 Y 10^5 DE
Candida albicans.

***Candida albicans* 10⁵ capa inoculo**

4 mL de inoculo = 10⁵ UFC/mL

10⁵/4 = 2.5X10⁴ UFC/mL

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$V_1= C_2V_2/ C_1 = \frac{2.5X10^4 \text{ UFC/mL} \times 30\text{mL}}{1X10^7}$$

$$1X10^7$$

$$V_1= 0.075 \text{ mL}$$

$$V_1= 75 \mu\text{L}$$

***Candida albicans* 10³ capa inoculo**

4 mL de inoculo = 10³ UFC/mL

10³/4 = 250 UFC/mL

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$V_1= C_2V_2/ C_1 = \frac{250 \text{ UFC/mL} \times 30\text{mL}}{1X10^5}$$

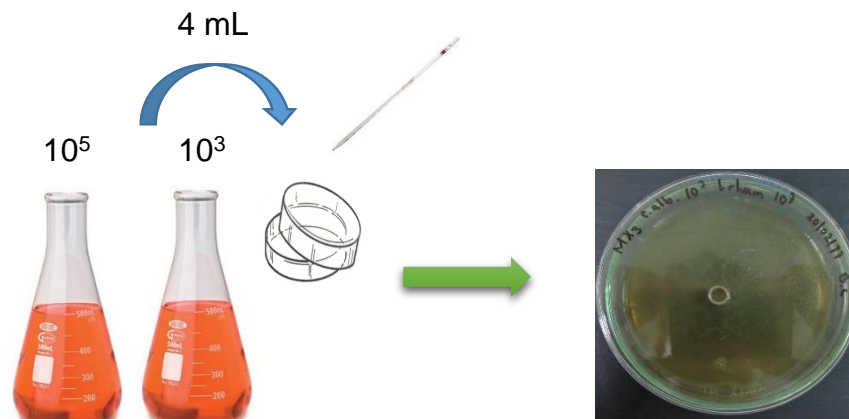
$$1X10^5$$

$$V_1= 0.075 \text{ mL}$$

$$V_1= 75 \mu\text{L}$$

ANEXO N° 9

EVALUACION DE LA INHIBICION CAUSADA POR EL *Lactobacillus rhamnosus* SOBRE LAS CEPAS DE *Candida albicans* OBTENIDAS DE MUESTRAS HOSPITALARIAS.



Inocular con una pipeta mohr 4 mL del microorganismo en las placas de Petri tratando de esparcir el microorganismo sobre el medio de cultivo contenido en las placas tapar y dejar reposar durante 15

Colocar un cilindro de acero inoxidable con ayuda de una pinza estéril.

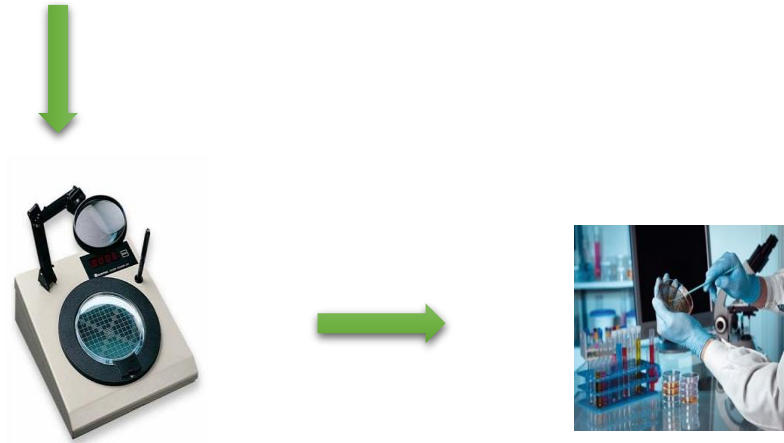


Incubar a 32-35°C en aerobiosis, por un tiempo de 4 días.



Agregar 100 μ L de *Lactobacillus rhamnosus* previamente estandarizado a 10^6 y 10^7 en el cilindro de acero inoxidable contenidas en cada una de las placas respectivamente.

Figura N° 24. Esquema de la evaluación de la inhibición causada por el *Lactobacillus rhamnosus* sobre las cepas de *Candida albicans* obtenidas de muestras hospitalarias.



Pasado este tiempo de incubación proceder al conteo de colonias para verificar cuantas colonias habían en comparación con las placas control de crecimiento normal de la *Candida albicans* sin el *Lactobacillus rhamnosus*.

El procedimiento es igual para la cepa control y las muestras hospitalarias de *Candida albicans*.

Figura N° 24. Continuación de esquema de la evaluación de la inhibición causada por el *Lactobacillus rhamnosus* sobre las cepas de *Candida albicans* obtenidas de muestras hospitalarias.

ANEXO N° 10

RESULTADO DEL AISLAMIENTO DE *Candida albicans* DE LAS
MUESTRAS HOSPITALARIAS DE FLUIDO VAGINAL.

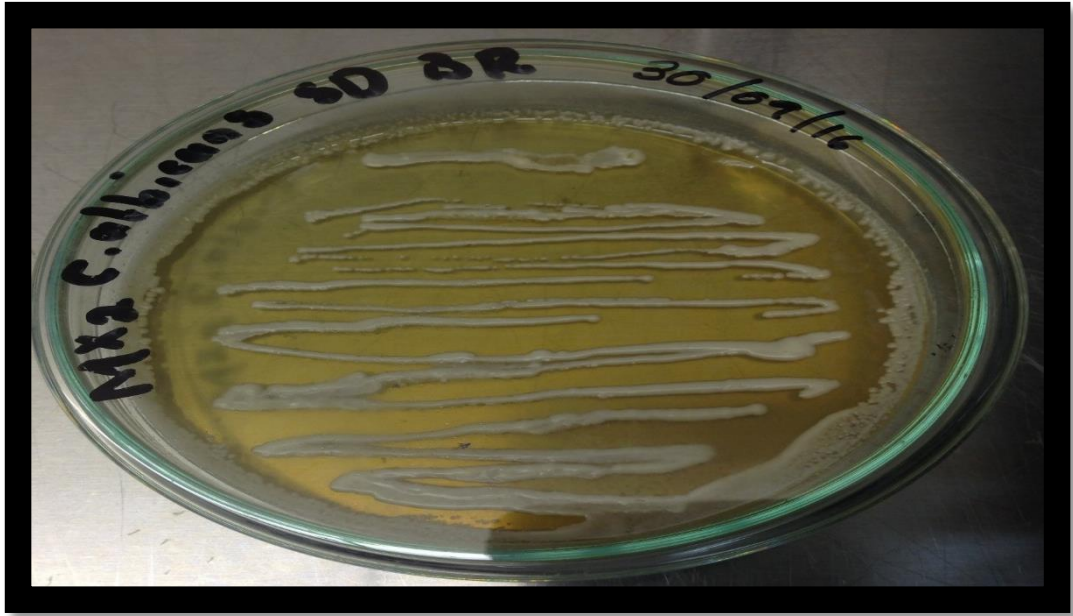


Figura N° 25. Colonias características de las cepas aisladas de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria N°2 de fluido vaginal.

ANEXO N° 11

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION DE *Candida albicans* DE
LAS MUESTRAS HOSPITALARIAS DE FLUIDO VAGINAL.

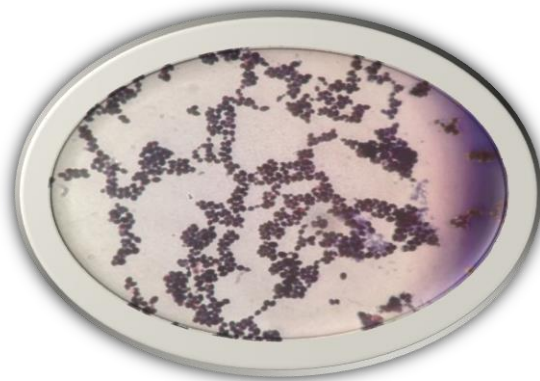


Figura N° 26. Morfología microscópica de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

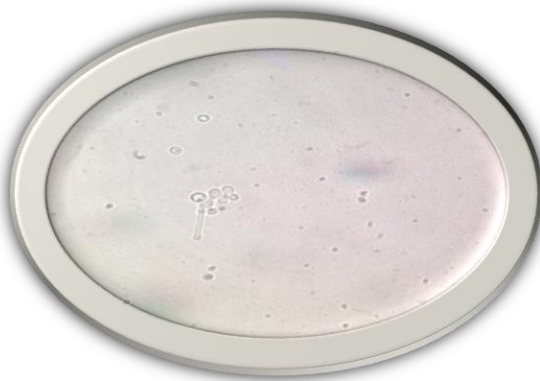


Figura N° 27. Formación de tubos germinales de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria N°2.

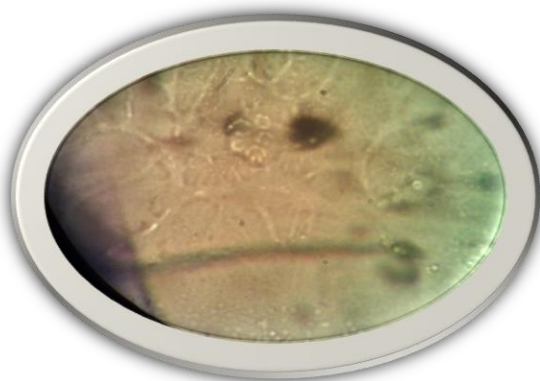


Figura N° 28. Formación de clamidosporas de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria N°3.



Figura N° 29. Formación de clamidosporas de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria N°1.



Figura N° 30. Formación de clamidosporas de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria N°2.



Figura N° 31. Formación de clamidosporas de la cepa aislada de *Candida albicans* de la muestra hospitalaria N°3.

ANEXO N° 12

CONTEO DE COLONIAS DE LAS MUESTRAS DE CEPAS
HOSPITALARIAS DE *Candida albicans* Y DE LA CEPA PATRON
ATCC 10231.

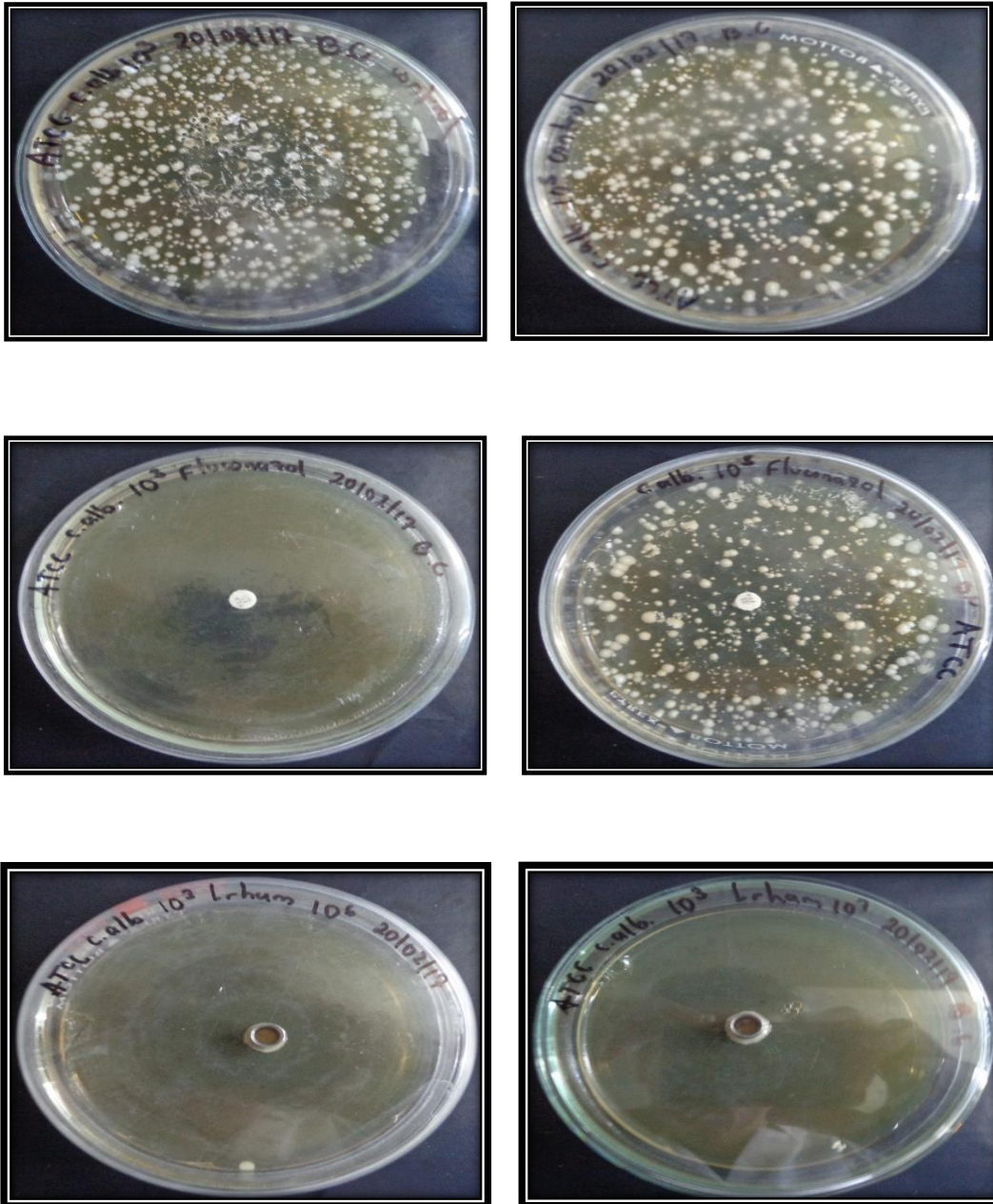


Figura N° 32. Fotografías tomadas a las placas que se utilizaron para el conteo de colonias que contienen cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

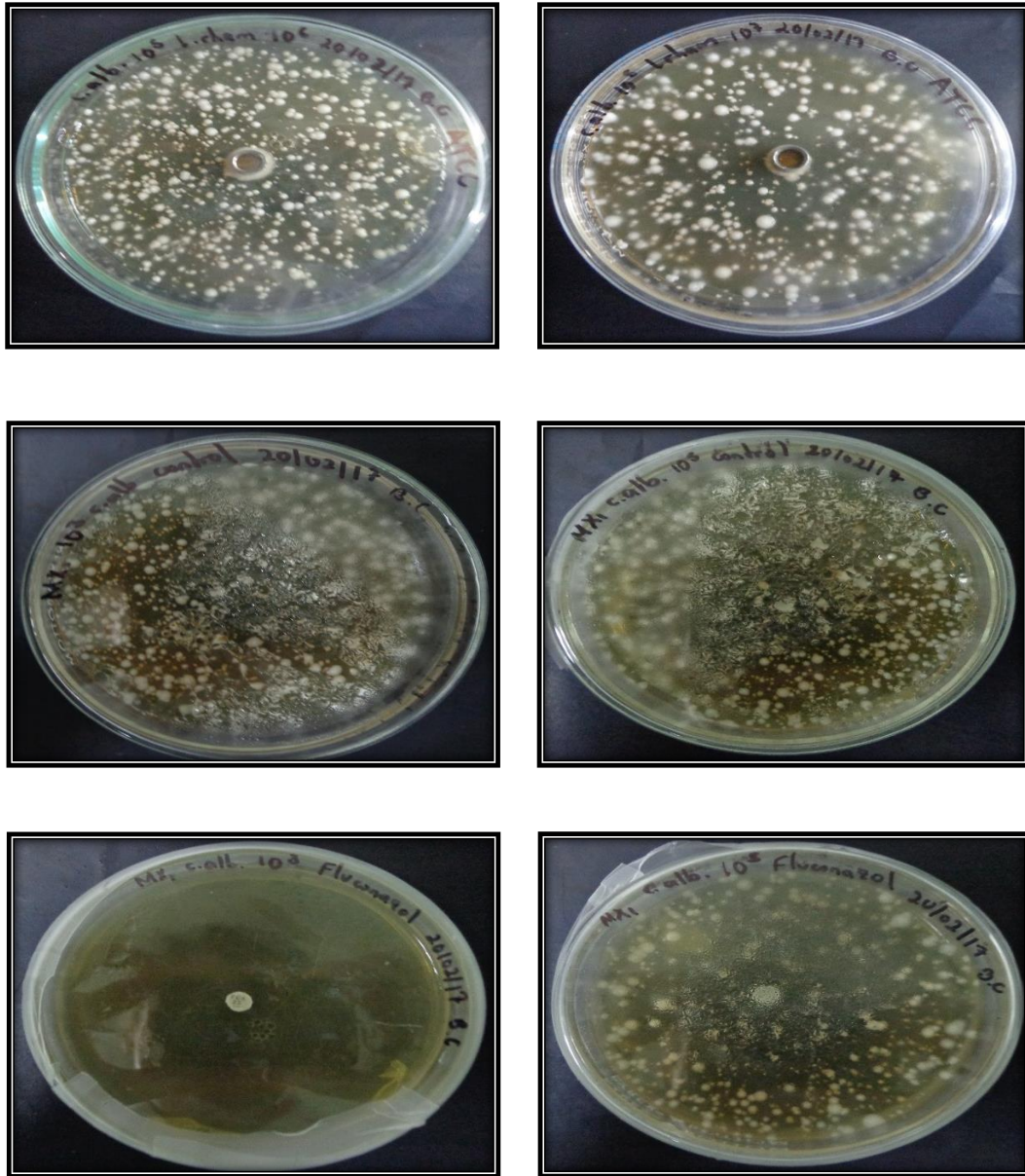


Figura N° 33. Fotografías tomadas a las placas que se utilizaron para el conteo de colonias que contienen cepas hospitalarias de *Candida albicans*.

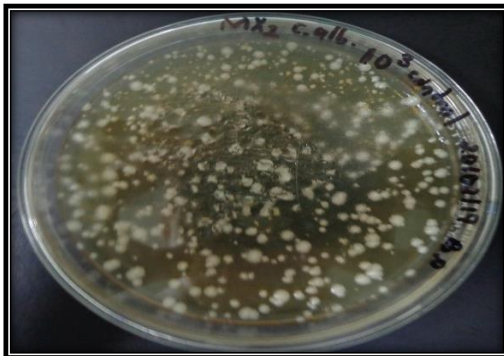
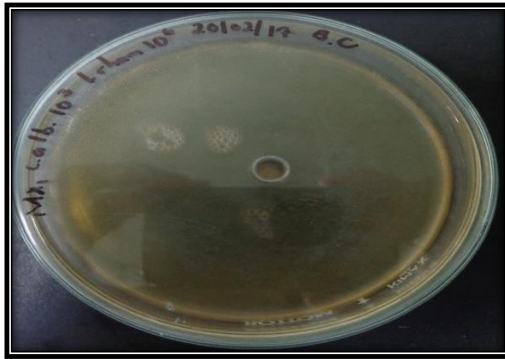


Figura N° 34. Fotografías tomadas a las placas que se utilizaron para el conteo de colonias que contienen cepas hospitalarias de *Candida albicans*.

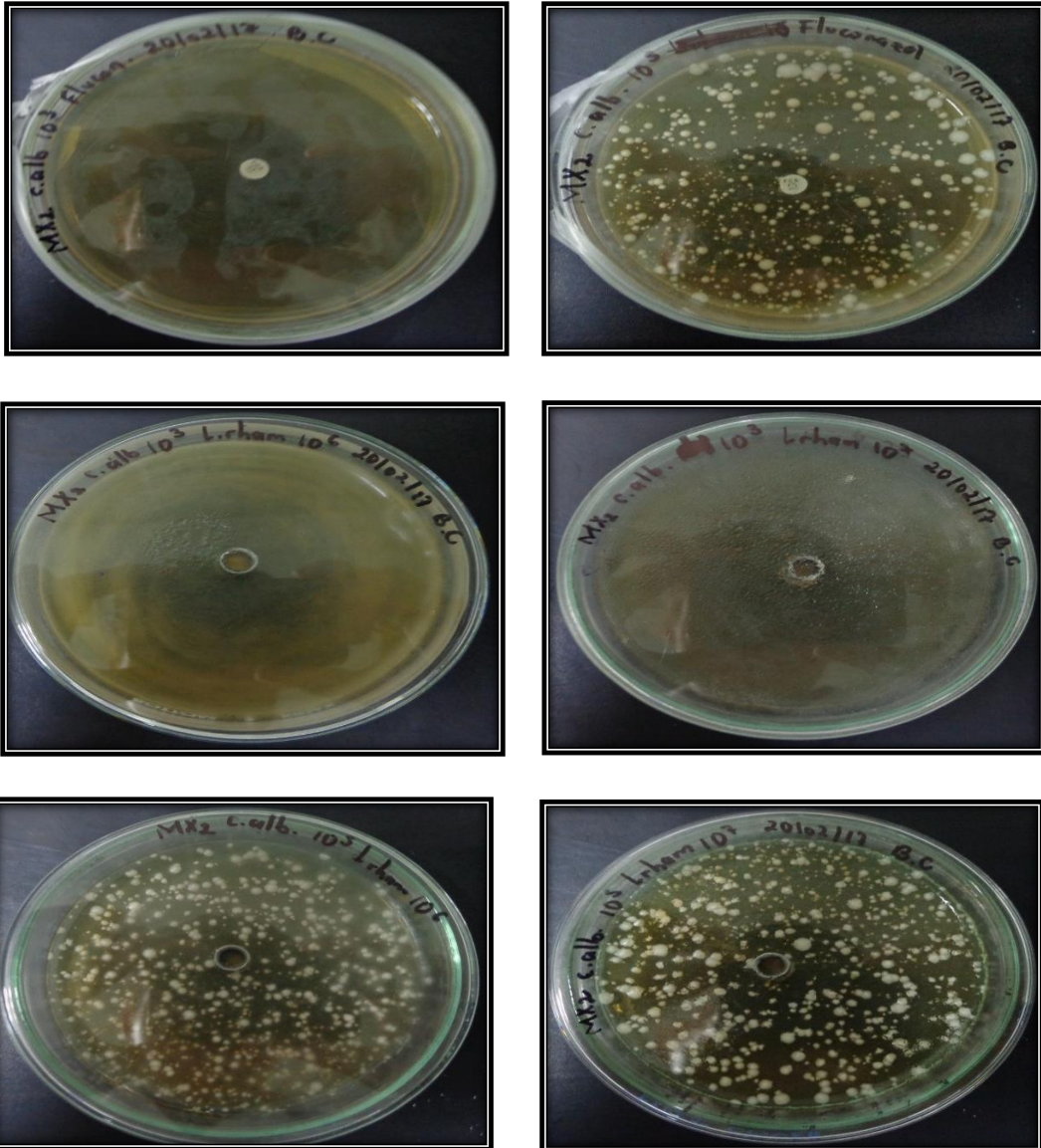


Figura N° 35. Fotografías tomadas a las placas que se utilizaron para el conteo de colonias que contienen cepas hospitalarias de *Candida albicans*.

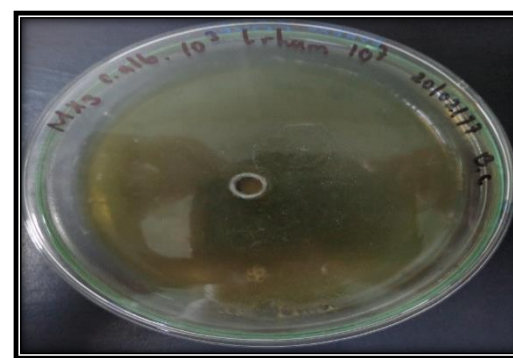
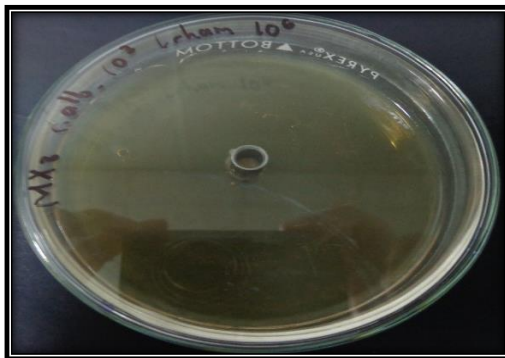
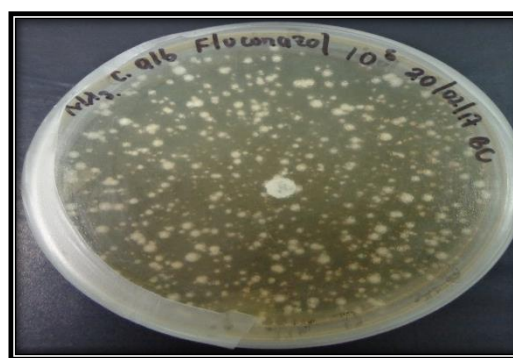
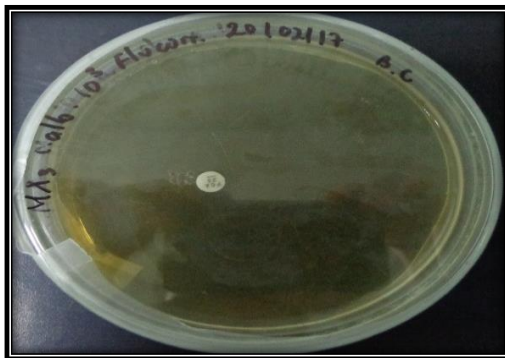


Figura N° 36. Fotografías tomadas a las placas que se utilizaron para el conteo de colonias que contienen cepas hospitalarias de *Candida albicans*.

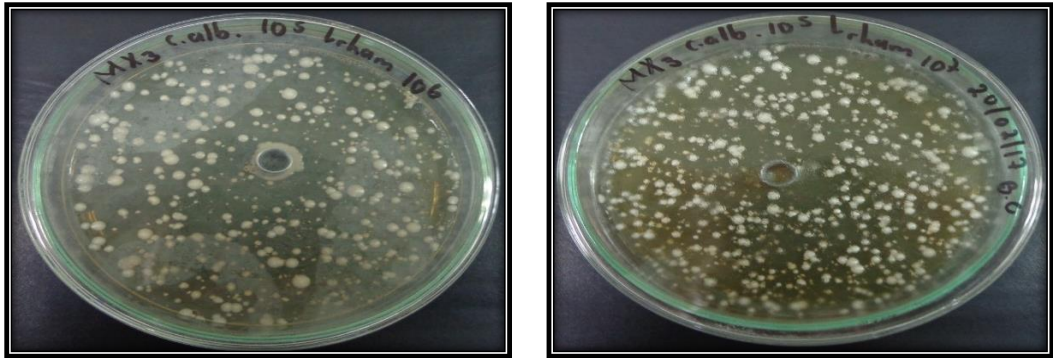


Figura N° 37. Fotografías tomadas a las placas que se utilizaron para el conteo de colonias que contienen cepas hospitalarias de *Candida albicans*.

ANEXO N° 13

CALCULO PARA OBTENER EL PORCENTAJE DE INHIBICION DE LAS CEPAS HOSPITALARIAS DE *Candida albicans* Y DE LA CEPA PATRON ATCC 10231.

Porcentaje de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 utilizando Fluconazol 25 µg.

ATCC 10231 [10⁵]

264 UFC/mL ----- 100%

232 UFC/mL ----- X

X= 87.87%

% Inhibición = 100% - 87.87%

% Inhibición = 12.13%

ATCC 10231 [10³]

226 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100%

Porcentaje de inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

ATCC 10231 [10⁵] con [10⁶]

264 UFC/mL ----- 100%

240 UFC/mL ----- X

X= 90.00%

% Inhibición = 100% - 90.00%

% Inhibición = 9.10%

ATCC 10231 [10⁵] con [10⁷]

264 UFC/mL ----- 100%

224 UFC/mL ----- X

X= 84.84%

% Inhibición = 100% - 84.84%

% Inhibición = 15.16%

ATCC 10231 [10³] con [10⁶]

226 UFC/mL ----- 100%

1 UFC/mL ----- X

X= 0.44%

% Inhibición = 100% - 0.44%

% Inhibición = 99.56%

ATCC 10231 [10³] con [10⁷]

226 UFC/mL ----- 100%

4 UFC/mL ----- X

X= 1.77%

% Inhibición = 100% - 1.77%

% Inhibición = 98.23%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando Fluconazol 25 µg.

Mx₁ *Candida albicans* [10⁵]

256 UFC/mL ----- 100%

192 UFC/mL ----- X

X= 75.00%

% Inhibición = 100% - 75.00%

% Inhibición = 25.00%

Mx₁ *Candida albicans* [10³]

208 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Mx₁ [10⁵] con [10⁶]

256 UFC/mL ----- 100%

204 UFC/mL ----- X

X= 79.68%

% Inhibición = 100% - 79.68%

% Inhibición = 20.32%

Mx₁ [10⁵] con [10⁷]

256 UFC/mL ----- 100%

180 UFC/mL ----- X

X= 70.31%

% Inhibición = 100% - 70.31%

% Inhibición = 26.69%

Mx₁ [10³] con [10⁶]

208 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100.00%

Mx₁ [10³] con [10⁷]

208 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100.00%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando Fluconazol 25 µg.

Mx₂ *Candida albicans* [10⁵]

212 UFC/mL ----- 100%

192 UFC/mL ----- X

X= 90.56%

% Inhibición = 100% - 90.56%

% Inhibición = 9.44%

Mx₂ *Candida albicans* [10³]

186 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Mx₂ [10⁵] con [10⁶]

212 UFC/mL ----- 100%

204 UFC/mL ----- X

X= 96.23%

% Inhibición = 100% - 96.23%

% Inhibición = 3.77%

Mx₂ [10⁵] con [10⁷]

212 UFC/mL ----- 100%

196 UFC/mL ----- X

X= 92.45%

% Inhibición = 100% - 92.45%

% Inhibición = 7.55%

Mx₂ [10³] con [10⁶]

186 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100.00%

Mx₂ [10³] con [10⁷]

186 UFC/mL ----- 100%

1 UFC/mL ----- X

X= 0.54%

% Inhibición = 100% - 0.54%

% Inhibición = 99.46%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando Fluconazol 25 µg.

Mx₃ *Candida albicans* [10⁵]

216 UFC/mL ----- 100%

204 UFC/mL ----- X

X= 94.44%

% Inhibición = 100% - 94.44%

% Inhibición = 5.56%

Mx₃ *Candida albicans* [10³]

204 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Mx₃ [10⁵] con [10⁶]

216 UFC/mL ----- 100%

116 UFC/mL ----- X

X= 53.70%

% Inhibición = 100% - 53.70%

% Inhibición = 46.30%

Mx₃ [10⁵] con [10⁷]

216 UFC/mL ----- 100%

144 UFC/mL ----- X

X= 66.67%

% Inhibición = 100% - 66.67%

% Inhibición = 33.33%

Mx₃ [10³] con [10⁶]

204 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100.00%

Mx₃ [10³] con [10⁷]

204 UFC/mL ----- 100%

0 UFC/mL ----- X

X= 0%

% Inhibición = 100% - 0%

% Inhibición = 100.00%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando Fluconazol 25 µg.

Mx₄ *Candida albicans* [10⁵]

440 UFC/mL ----- 100%

392 UFC/mL ----- X

X= 89.09%

% Inhibición = 100% - 89.09%

% Inhibición = 10.91%

Mx₄ *Candida albicans* [10³]

272 UFC/mL ----- 100%

260 UFC/mL ----- X

X= 59.09%

% Inhibición = 100% - 59.09%

% Inhibición = 40.91%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Mx₄ [10⁵] con [10⁶]

440 UFC/mL ----- 100%

436 UFC/mL ----- X

X= 99.09%

% Inhibición = 100% - 99.09%

% Inhibición = 0.91%

Mx₄ [10⁵] con [10⁷]

440 UFC/mL ----- 100%

408 UFC/mL ----- X

X= 92.72%

% Inhibición = 100% - 92.72%

% Inhibición = 7.28%

Mx₄ [10³] con [10⁶]

272 UFC/mL ----- 100%

252 UFC/mL ----- X

X= 92.64%

% Inhibición = 100% - 92.64%

% Inhibición = 7.36%

Mx₄ [10³] con [10⁷]

272 UFC/mL ----- 100%

272 UFC/mL ----- X

X= 100.00%

% Inhibición = 100% - 100.00%

% Inhibición = 0%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando Fluconazol 25 µg.

Mx₅ *Candida albicans* [10⁵]

500 UFC/mL ----- 100%

488 UFC/mL ----- X

X= 97.60%

% Inhibición = 100% - 97.60%

% Inhibición = 2.4%

Mx₅ *Candida albicans* [10³]

140 UFC/mL ----- 100%

132 UFC/mL ----- X

X= 94.28%

% Inhibición = 100% - 94.28%

% Inhibición = 5.72%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Mx₅ [10⁵] con [10⁶]

500 UFC/mL ----- 100%

492 UFC/mL ----- X

X= 98.40%

% Inhibición = 100% - 98.40%

% Inhibición = 1.60%

Mx₅ [10⁵] con [10⁷]

500 UFC/mL ----- 100%

484 UFC/mL ----- X

X= 96.80%

% Inhibición = 100% - 96.80%

% Inhibición = 3.2%

Mx₅ [10³] con [10⁶]

140 UFC/mL ----- 100%

116 UFC/mL ----- X

X= 82.86%

% Inhibición = 100% - 82.86%

% Inhibición = 17.14%

Mx₅ [10³] con [10⁷]

140 UFC/mL ----- 100%

124 UFC/mL ----- X

X= 88.57%

% Inhibición = 100% - 88.57%

% Inhibición = 11.43%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando Fluconazol 25 µg.

Mx₆ *Candida albicans* [10⁵]

440 UFC/mL ----- 100%

412 UFC/mL ----- X

X= 93.63%

% Inhibición = 100% - 93.63%

% Inhibición = 6.37%

Mx₆ *Candida albicans* [10³]

100 UFC/mL ----- 100%

76 UFC/mL ----- X

X= 76.00%

% Inhibición = 100% - 76.00%

% Inhibición = 24.00%

Porcentaje de inhibición de cepas hospitalarias de *Candida albicans* utilizando *Lactobacillus rhamnosus*.

Mx₆ [10⁵] con [10⁶]

440 UFC/mL ----- 100%

432 UFC/mL ----- X

X= 98.18%

% Inhibición = 100% - 98.18%

% Inhibición = 1.82%

Mx₆ [10⁵] con [10⁷]

440 UFC/mL ----- 100%

420UFC/mL ----- X

X= 95.45%

% Inhibición = 100% - 95.45%

% Inhibición = 4.55%

Mx₆ [10³] con [10⁶]

100 UFC/mL ----- 100%

76 UFC/mL ----- X

X= 76.00%

% Inhibición = 100% - 76.00%

% Inhibición = 24.00%

Mx₆ [10³] con [10⁷]

100 UFC/mL ----- 100%

68 UFC/mL ----- X

X= 68.00%

% Inhibición = 100% - 68.00%

% Inhibición = 32.00%