



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE CEPAS CLÍNICAS DEL
GÉNERO *CANDIDA* AISLADAS DE LA CAVIDAD ORAL DURANTE
EL PERIODO MARZO-AGOSTO 2019

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE ODONTÓLOGO

AUTORA: Pulla Sarmiento, Cristina Daniela

DIRECTORA: Dra. Sarmiento Ordoñez, Jessica María, Mgs.

CUENCA

2019

DECLARACIÓN:

Yo, **PULLA SARMIENTO, CRISTINA DANIELA** declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado la totalidad de las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento; y eximo expresamente a la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

La UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y normatividad institucional vigente.

.....

Autora: Pulla Sarmiento Cristina Daniela

C.I: 0106721727

CERTIFICACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE CEPAS CLÍNICAS DEL GÉNERO *CANDIDA* AISLADAS DE LA CAVIDAD ORAL DURANTE EL PERIODO MARZO-AGOSTO 2019”**, realizado por **PULLA SARMIENTO, CRISTINA DANIELA**, ha sido inscrito y es pertinente con las líneas de investigación de la Carrera de Odontología, de la Unidad Académica de Salud y Bienestar y de la Universidad, por lo que está expedito para su presentación.

Cuenca, Octubre 2019

.....

Dr. Ebingen Villavicencio Caparó

DPTO. DE INVESTIGACIÓN ODONTOLÓGICA

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Sra. Dra. Liliana Encalada Verdugo

COORDINADORA DEL DPTO. DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación denominado **“SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA DE CEPAS CLÍNICAS DEL GÉNERO *CANDIDA* AISLADAS DE LA CAVIDAD ORAL DURANTE EL PERIODO MARZO-AGOSTO 2019”**, realizado por **PULLA SARMIENTO, CRISTINA DANIELA**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, Octubre 2019

.....

Dra. Sarmiento Ordoñez Jessica María Mgs.

DEDICATORIA

El presente trabajo quiero dedicar a quienes me dieron raíces, alas y me prepararon para el camino, mis padres; Blanca Sarmiento y Marcelo Pulla, con su apoyo y amor incondicional he logrado alcanzar una meta más en mi vida.

A mis hermanos; Andrea, Gabriela, Renato y a mi querida sobrina Emilia por ser siempre fuente de inspiración y guía para culminar con este objetivo.

EPÍGRAFE.

“Quiere y podrás.

Reflexiona y te instruirás.

Busca y hallarás.

Persevera y lo lograrás.

En lo que tú te ayudes Dios te ayudará”

Anónimo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser fuente de vida, sabiduría y amor.

A la Universidad Católica de Cuenca y a sus distinguidos docentes de la
Carrera de Odontología.

A mi tutora; Dra. Jessica Sarmiento, al Dr. Andrés Yazábal y Dra. Lennys Buela, quienes con su paciencia y preparación impartieron sus conocimientos para culminar esta tesis; que para mí constituye una gran experiencia para la práctica de mi profesión. Gracias profesores.

A mis grandes amigos/as; Daniela Domínguez, Cesar Naranjo y Fabián Reinoso por su apoyo incondicional.

LISTA DE ABREVIATURAS

GAFFI: Fondo de Acción Mundial para las Infecciones por hongos

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

ATCC: American Type Collection

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

MH: Müller Hinton

SBD: Sabouraud

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO I	14
PLANTEAMIENTO TEÓRICO	14
1.-PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	15
2.-JUSTIFICACIÓN	15
3.-OBJETIVOS	16
3.1.-Objetivo General:	16
3.2.- Objetivos Específicos	16
4.-MARCO TEÓRICO.....	17
4.1.- REINO FUNGI	17
4.1. a.- GÉNERO <i>CANDIDA</i>	17
4.1. a.1.- ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> EN EL AMBIENTE ORAL SANO	17
4.1. a.2.- ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> PATÓGENAS EN LA CAVIDAD ORAL.....	18
4.1. a.3.- FACTORES DE VIRULENCIA.....	19
4.1.1.- CULTIVO MICROBIOLÓGICO DE <i>CANDIDA</i>	21
4. 1. 2.- IDENTIFICACIÓN DE <i>CANDIDA</i>	22
4. 1. 3.- SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA	23
4. 1. 3. 1.- RESISTENCIA A AZOLES.....	23
4. 1. 3. 2.- RESISTENCIA A POLIENOS	24
4.2.-ANTECEDENTES	24
5.- HIPÓTESIS.....	27
CAPÍTULO II.....	15
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....	15
1.- MARCO METODOLÓGICO	29
2.- POBLACIÓN Y MUESTRA	29
2.2.- Tamaño de la muestra	29
3.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES ³⁶	30
4.- INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	31
4.2.- Materiales	31
4.3.- Recursos	31
5.- PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS.....	31

5.3.- Procedimientos de la toma de datos	31
5.3. a.- Método para determinar susceptibilidad.....	31
5.3. b.- Criterios de registro de hallazgos.....	33
6.- PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE DATOS	34
7.- ASPECTOS BIOÉTICOS	34
CAPÍTULO III.....	35
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	35
4. BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se empleó el método de difusión en disco, aplicando dos medicamentos antimicóticos. Se cargó discos de 6 mm de diámetro de papel filtro con los antifúngicos 25 ug de fluconazol y 10 ug de anfotericina B, posteriormente se colocó en cajas Petri con medio de cultivo Müller Hinton previamente inoculadas con las cepas clínicas del género *Candida* incluidas en el estudio, luego se incubaron las cajas a 35 °C durante 72 horas. Finalmente la lectura se realizó usando una regla para medir el diámetro de halo externo de la zona de inhibición de cada disco. **RESULTADOS:** Las cepas del género *Candida* aisladas previamente de la cavidad oral, demostraron resistencia al fluconazol 82% y sensibilidad a la anfotericina B en un 60%.

PALABRAS CLAVE: *Candida*, resistencia, sensibilidad, cavidad oral.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the antifungal susceptibility of clinical strains of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **MATERIALS AND METHODS:** The method of disc diffusion was used, applying two antifungal medications. 6 mm diameter discs of filter paper were loaded with the 25 ug fluconazole and 10 ug amphotericin B antifungals and placed in Petri dishes with Mueller Hinton culture medium previously inoculated with the clinical strains of the genus *Candida* included in the study, The boxes were then incubated at 35 ° C for 72 hours. The reading was done using a ruler to measure the diameter of the outer halo of the zone of inhibition of each disc. **RESULTS:** The strains of the genus *Candida* previously isolated from the oral cavity showed 82% fluconazole resistance and amphotericin B sensitivity in 60%.

KEY WORDS: *Candida*, resistance, sensitivity, oral cavity.

INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal del ser humano es un hábitat para un conjunto muy variado de microorganismos, dentro de los cuales se encuentran los hongos microscópicos, que pertenecen al reino Fungi¹, y forman parte del ambiente oral normal, sin embargo pueden causar infecciones y controlar el desarrollo de otros microorganismos patógenos sobre todo en individuos inmunodeprimidos. Se han identificado aproximadamente 150 especies de *Candida*, de las cuales 15 son las principales causantes de candidemia, entre éstas destaca la *Candida albicans*.²⁻³⁻⁴

Las micosis invasoras causadas por cepas del género *Candida*, incrementa en los pacientes de alto riesgo, como aquellos que tienen algún trasplante, neoplasias o los inmunosuprimidos (VIH SIDA y otras), los recién nacidos con peso deficiente, pacientes de tercera edad y los pacientes hospitalizados en cuidados intensivos. En los grupos mencionados, predominan las infecciones producidas por *Candida*,⁵ esto se debe a que la mayoría de pacientes reciben varios tratamientos como antibióticos de amplio espectro, esteroides, citotóxicos, siendo necesario el uso de catéteres intravasculares y procedimientos diagnósticos invasores. Por otro lado, la candidiasis oral también se hace presente en caso de inmunosupresión, personas de edad avanzada por el prolongado uso de prótesis dentales o por el uso dispositivos removibles para tratamiento de ortodoncia. Sin embargo el uso inadecuado de fármacos, en este caso de antifúngicos; ha provocado cambios significativos en el medio oral.²⁻³

Acerca de la resistencia antifúngica se ha reportado que las cepas resistentes se desarrollan notablemente en individuos tratados por tiempo prolongado con azoles, el fracaso del tratamiento también se debe a la incorrecta identificación de cepas con resistencia intrínseca o a la presencia de cepas con resistencia secundaria.²

A pesar de que el uso de fármacos como el fluconazol o anfotericina B, forman parte de la intervención efectiva para tratar infecciones micóticas orales; existe poca información relacionada con la resistencia a estos antifúngicos a nivel local y nacional.¹⁻⁶

El propósito del presente trabajo, es establecer la susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.-PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

El problema que se investigó fue; la susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral, esta idea surge por el considerable incremento de la resistencia a los agentes antimicóticos de uso común, como es el fluconazol y en casos especiales la anfotericina B. Las infecciones por *Candida albicans* o *no albicans* están asociadas a una alta mortalidad debido a una deficiencia en la elección del medicamento antifúngico, que a su vez está vinculada al aislamiento de cepas resistentes; generando la necesidad de contar con métodos para medir la susceptibilidad antifúngica y aportar al éxito terapéutico.

Por todo lo planteado anteriormente, la interrogante principal de esta investigación fue: ¿Cuál es la susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral?

2.-JUSTIFICACIÓN

La candidiasis oral generalmente es producida por la *Candida albicans*, sin embargo en los últimos años se ha identificado un aumento de aislamientos de *Candida no albicans*, lo cual involucra la investigación constante en cuanto a su epidemiología.⁶

A nivel mundial la candidemia constituye una causa común de morbilidad y mortalidad.⁶ Estudios han demostrado que el 3 % (433.856) de la población ecuatoriana puede tener o puede estar afectada por una infección severa por hongos, de acuerdo con el Fondo de Acción Mundial para las Infecciones por Hongos (GAFFI por sus siglas en inglés).⁷

Debido a que en el Ecuador existen pocas investigaciones que incluyan estudios de susceptibilidad antifúngica de cepas del género *Candida*, y más específicamente, de la cavidad oral; el presente proyecto se enfoca en determinar la susceptibilidad que presentan las cepas aisladas de la cavidad oral, frente a la acción de dos agentes antifúngicos de uso terapéutico, y de esta manera, planificar los tratamientos más efectivos. Lo planteado anteriormente denota la relevancia científica del estudio.

El trabajo realizado tiene un nivel de originalidad nacional, debido a que no se cuenta con estudios recientes (en los últimos 5 años) acerca de la susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral. Así mismo, es importante señalar que está dentro de las líneas de investigación de la Universidad Católica de Cuenca y también dentro de los tópicos de investigación en la carrera de Odontología, por lo tanto, tiene concordancia con las políticas institucionales de investigación.

3.-OBJETIVOS

3.1.-Objetivo General:

Determinar la susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral, durante el periodo marzo-agosto 2019.

3.2.- Objetivos Específicos

- ✚ Identificar las cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral, durante el periodo marzo-agosto 2019.
- ✚ Evaluar la susceptibilidad de cada una de las cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral frente al fluconazol, durante el periodo marzo-agosto 2019.
- ✚ Evaluar la susceptibilidad de cada una de las cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral frente a la anfotericina B, durante el periodo marzo-agosto 2019.

4.-MARCO TEÓRICO

4.1.- REINO FUNGI

Los hongos son un grupo numeroso de microorganismos eucariotas que se encuentran clasificados en el Reino Fungi, constituyendo un reino apartado del vegetal, animal, bacteriano y arqueano.¹ El reino de los hongos se divide en cuatro *Phyla*: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*. El primero es considerado el más extenso, comprendiendo el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos humanos.²⁻³ Dentro de las 100 000 especies micóticas reconocidas, se considera que solamente 150 causan enfermedades en el ser humano y un cierto porcentaje de ellas producen alteraciones en los tejidos bucales y peribucal.¹

4.1. a.- GÉNERO *CANDIDA*

Las especies del género *Candida* son hongos que se encuentran comúnmente en la boca de individuos sanos considerándose residentes normales del ambiente oral.⁴

Normalmente las especies del género *Candida* son comensales inofensivos encontrándose en una proporción significativa de la población, sin embargo al existir una alteración en la cavidad bucal que favorezca la proliferación de la *Candida* o deficiencia a nivel del sistema inmunitario del huésped, puede producirse una modificación de un estado sano a uno patológico. Como tal, la infección de la *Candida* es invariablemente oportunista y depende de cierta manera de la predisposición subyacente del huésped.¹⁻³

4.1. a.1.- ESPECIES DE *CANDIDA* EN EL AMBIENTE ORAL SANO

Se estima que la incidencia real de la *Candida* oral está entre un 35 % y un 55% de individuos sanos, dependiendo del grupo de la población estudiado.³

La *Candida albicans* es considerado un comensal inofensivo hallándose aproximadamente en alrededor del 20 a 40% de los individuos sanos, pudiendo convertirse en una especie patógena.¹ Otros hongos, tales como *Saccharomyces* spp., *Geotrichum* spp y *Cryptococcus* spp, también son

encontrados, pero su aparición es infrecuente y generalmente no están relacionados con infecciones orales.³

4.1. a.2.- ESPECIES DE *CANDIDA* PATÓGENAS EN LA CAVIDAD ORAL

Existen más de 200 diversas especies de *Candida* pero solo algunas de éstas son responsables de producir infecciones en los seres humanos. La especie de *Candida* oral con mayor prevalencia, en estados comensales y en candidiasis oral, es la ***Candida albicans***.³ Los términos *Candida* y *albicans* se originan de las palabras latinas ***candia*** y ***albico*** respectivamente, que significan blanco.¹⁻³

Se estima que esta especie está presente en más del 80% de todas las levaduras orales aisladas. En términos de predominio oral, la *Candida albicans* es seguida por; *Candida glabrata*, *Candida Krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr* y *Candida parapsilosis*. En años recientes se ha reconocido la importancia de la especie de la *Candida no-albicans* en las enfermedades del ser humano, otorgando mayor atención a la *Candida glabrata* y *Krusei*, debido a su resistencia aumentada a ciertos agentes antimicóticos.³

Una especie patógena identificada relativamente hace poco, es la *C. dubliniensis* que fue descrita por primera vez en 1995 cuando se aisló con la *Candida albicans* (observándose que son fenotípicamente muy similares) en casos de candidiasis oral en individuos infectados con el VIH, sin embargo esta especie también puede estar presente en individuos sanos.¹⁻³

En Japón en el año 2009 se descubrió una nueva cepa denominada *Candida auris*, descrita como multirresistente y responsable de causar infecciones invasivas. Desde entonces se ha informado desde varios países.⁵

En el estudio realizado por Lockhart y sus colaboradores, en el año 2016, se obtuvo aislados de 54 pacientes con infección por *C. auris* de Pakistán, India, Sudáfrica y Venezuela durante 2012–2015 y el espécimen tipo de Japón. La información del paciente estuvo disponible para 41 de los aislamientos. Se realizó pruebas de susceptibilidad antifúngica y secuenciación del genoma completo. De los cuales el 93% de los aislamientos fueron resistentes al fluconazol, el 35% a la anfotericina B y el 7% a las equinocandinas; El 41% era resistente a 2 clases de antifúngicos y el 4% era resistente a 3 clases. Se concluye que el *C. auris* es un patógeno emergente asociado a la atención médica con una alta mortalidad. Las opciones de tratamiento son limitadas,

debido a la resistencia antifúngica. Los factores de riesgo y los mecanismos de transmisión deben explicarse para orientar las medidas de control.⁶

C. auris ha sido documentado en numerosos países en 3 continentes en los últimos 7 años. Es probable que haya otros lugares donde este organismo ya esté circulando pero aún no haya sido identificado o informado, y probablemente también surja en nuevos lugares.⁶

La colonización micótica de la cavidad oral puede llevar a la colonización del tubo digestivo, el cual puede actuar como reservorio para la infección de otros sitios del cuerpo o para la diseminación por la sangre.¹

4.1. a.3.- FACTORES DE VIRULENCIA

Para que la *Candida* se transforme de un comensal inofensivo a un organismo patógeno, es necesario que se produzca una alteración que puede relacionarse a un efecto combinado del huésped y de los factores de la *Candida*, que contribuya en última instancia al desarrollo de la candidiasis oral.³ A continuación se describen los factores de virulencia asociados a la *Candida*:

4.1. a.3.1.- ADHERENCIA

Es la capacidad que tiene la *Candida* de adherirse a las superficies del huésped. En la cavidad oral esto permite que el organismo impida la remoción a través de los efectos del flujo salival y de la deglución. La adherencia puede ser al tejido epitelial oral o a los biomateriales de dispositivos protésicos y la unión a tales superficies orales puede ser específica o no específica, esta última implica interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, junto con la colocación de trampas físicas simples del microorganismo en las localización específicas en la boca.³⁻⁷

Las moléculas de la superficie de la célula en la *Candida* que están implicadas en su adherencia específica se describen como adhesinas. El componente de la célula huésped con que estas adhesinas interactúan se refiere como receptores. Se ha identificado una amplia gama de adhesinas para la *C. albicans* que incluyen las manoproteínas, las adhesinas fibrilares que se unen a los receptores y a las proteínas del flucosil que se unen a los receptores de complemento en las células del huésped.³

La adherencia de estas especies micóticas es un proceso complejo y multifactorial, dependiente del huésped y características de la *Candida*.³

4.1. a.3.2.- MORFOLOGÍA

La *Candida* tiene la capacidad de crecer en varios estados morfológicos, incluyendo las gemaciones de las células de levadura, pseudohifas (cadenas alargadas de las células de levadura) y también hifas filamentosas verdaderas. Las hifas y pseudohifas son distinguibles ya que la segunda contiene constricciones en los septos de los filamentos.⁸ Una vez unido al huésped emerge la capacidad de la *Candida* y particularmente de la *C. albicans* de cambiar de su forma de levadura a una filamentosa, facilitando la penetración del epitelio y aumentando la resistencia de las células a la fagocitosis en las células inmunes del huésped.¹

El desarrollo de hifas verdaderas es una cualidad que caracteriza a la *C. albicans* y el estrechamente vinculado *C. dubliniensis*. Las otras especies de *Candida no-albicans* pueden llegar a desarrollar pseudohifas o simplemente ser incapaces de formar filamentos como es el caso de la *C. glabrata*. Se ha demostrado mediante estudios que las cepas no filamentosas son menos virulentas.⁸⁻⁹

4.1. a.3.3.- DIMORFISMO FENOTÍPICO

Es un fenómeno que se relaciona con la morfología celular y es reflejado *in vitro* como cambios reversibles en la estructura de la colonia, inducida por la exposición a varios estímulos ambientales. El dimorfismo tiene efectos múltiples en las células de la *Candida* y se relaciona a la expresión alterada del gen que afecta a la superficie de antigenicidad, adherencia, susceptibilidad a la droga y a la resistencia a la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares. Un alto modo de dimorfismo es un rasgo dependiente de la cepa y puede influenciar evidentemente en su virulencia.³

C. albicans tiene un dimorfismo especial ya que puede presentar crecimiento levaduriforme y filamentoso simultáneamente.²

4.1. a.3.4.- ENZIMAS HIDROLÍTICAS

La liberación de enzimas hidrolíticas en el entorno local y la secreción de aspartil proteasa y fosfolipasas causan la destrucción tisular y facilitan la penetración de los tejidos.³⁻¹⁰

4.1. a.3.5.- SECRECIÓN DE ASPARTIL PROTEASA (SAP)

Son enzimas (proteinasas) que tienen la capacidad de degradar las proteínas extracelulares de la matriz del huésped implicadas en la defensa contra la infección.³ La *C. albicans* posee una familia de proteinasas con al menos 10 miembros (SAP1 a SAP10). Se secretan diferentes isozimas SAP en diferentes etapas de las infecciones por *Candida* y se piensa que intervienen en la adquisición de nutrientes, adhesión, penetración de tejidos, evasión de la inmunidad, lesión celular después fagocitosis, activación de la cascada de coagulación sanguínea y aumento de la permeabilidad vascular.²⁻¹¹

4.1. a.3.6.- FOSFOLIPASAS (FP)

Son enzimas consideradas como factores de la patogenicidad de la *Candida*, cuya función es hidrolizar los fosfolípidos en ácidos grasos. Se han definido cuatro clases de fosfolipasas (A, B, C y D) dependiendo del tipo de enlace éster. La producción de todas las clases de fosfolipasas se ha descrito para la especie de *Candida* y su producción podría contribuir al daño de la membrana celular del huésped que como consecuencia produciría lisis celular o facilitar la adherencia.³⁻⁶⁻¹²

4.1.1.- CULTIVO MICROBIOLÓGICO DE CANDIDA

La *Candida* puede cultivarse a partir de muestras clínicas en el medio CHROMagar o en agar de Sabouraud.¹³

Los medios se caracterizan por contener: glucosa, que es el carbohidrato fermentable proporcionando carbono y energía; peptona que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El cloranfenicol también es uno de sus componentes cumpliendo con la función de aislar hongos patógenos del material muy contaminado, ya que inhibe la mayoría de bacterias contaminantes de las muestras. Las placas de agar suelen incubarse de manera aeróbica a 30° C por 48h.¹³

4.1. 1. 1.- CHROMAGAR CANDIDA. Es uno de los medios cromógenos más difundidos en nuestro medio, siendo utilizado en varios laboratorios para la identificación de levaduras del género *Candida* como lo especifica el fabricante. Con el CHROMagar *Candida* se han reportado datos variados de sensibilidad y especificidad en la identificación de las diferentes especies dentro del género.

También es utilizado como un medio de aislamiento e identificación primaria de levaduras, en general a partir de diferentes especímenes biológicos.¹³⁻¹⁴

4.1. 1. 2.- AGAR SABOURAUD. Es un medio de amplia utilización y parcialmente selectivo para hongos debido a su bajo pH y alta concentración de glucosa.^{6, 12} Dado que muchas bacterias toleran el pH bajo y la alta concentración de glucosa y crecen en agar Sabouraud, en especial durante incubación prolongada, a menudo necesaria para el aislamiento de hongos, se han desarrollado numerosas fórmulas con inhibidores antibacterianos.¹³ Se ha demostrado que los antimicrobianos tales como penicilina, cloranfenicol, aminoglucósidos o combinaciones de los mismos son efectivos para inhibir bacterias sin afectar el crecimiento de hongos.¹⁵

4. 1. 2.- IDENTIFICACIÓN DE *CANDIDA*

La identificación presuntiva de las cepas de *Candida* en base a medios de cultivo primarios se puede confirmar a través de una variedad de pruebas suplementarias basadas tradicionalmente en las características morfológicas y fisiológicas de los aislados.³

La identificación por CHROMagar *Candida* es uno de los métodos convencionales más utilizados, es superior que el medio de agar Sabouraud dextrosa debido a que puede diferenciar especies. Su valoración consiste en diferenciar el color y características de las colonias, colocándolas a una temperatura de 37° C y su posterior evaluación se realiza a las 24, 48 y 72 horas.¹⁶

Al contener sustratos cromogénicos actúan con enzimas producidas por las especies de *Candida* dando como resultado una coloración característica de cada una de las especies. Su identificación presuntiva de las diferentes especies es rápida incluso en presencia de cultivos mixtos.¹⁶⁻¹⁷

Para *Candida tropicalis* se observa un color azul, *C. albicans* verde, *C. krusei* Rosa- púrpura, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* violeta claro.¹⁷

También existen otros métodos para identificar hongos. La observación al microscopio de muestras clínicas puede ser informativa.³

4. 1. 3.- SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA

La resistencia antifúngica es la capacidad que tienen las levaduras de soportar los efectos de fármacos destinados a eliminarlas o controlarlas, mientras que la sensibilidad es la imposibilidad de crecimiento de la levadura por la capacidad del agente antifúngico con la aplicación de la mínima cantidad.¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰

Debido a los nuevos fármacos antifúngicos y al cambio de epidemiología de candidemias se han registrado un elevado número de resistencias por especies de *Candida*. Los mecanismos de resistencia dependen de las características propias de las especies de este género ya sean intrínsecas o extrínsecas.¹⁸

La resistencia microbiológica depende de mecanismos innatos en el que todas las cepas son resistentes primarios, donde la resistencia se presenta antes de la exposición con el fármaco antifúngico y están estrechamente relacionados con las características intrínsecas de cada especie. Por otro lado, los mecanismos de resistencia secundarios se muestran después de haber tenido contacto con el antifúngico.²⁰

4. 1. 3. 1.- RESISTENCIA A AZOLES

A finales de los 60 se introdujeron los azoles como antifúngicos, pero solo un grupo de ellos han demostrado actividad a nivel sistémico, el miconazol, ketoconazol, fluconazol e itraconazol; siendo su función inhibir el citocromo P-450 dependiente de enzimas, lo que resulta en la síntesis incompleta del ergosterol y la degeneración del ergosterol de la membrana de la célula fúngica. Su uso es limitado debido a su alta toxicidad.¹⁹⁻²¹

Sin embargo el fluconazol ha sido aprobado como agente sistémico oral activo con menor potencial de toxicidad, por su mayor unión específica a los citocromos de la célula fúngica que a los citocromos de la célula mamífera.²¹

El fluconazol es una molécula pequeña, soluble en agua, se absorbe con facilidad y posee vida prolongada, hasta de 25 horas en seres humanos. Su excreción es renal.²²⁻²³

La resistencia a este tipo de medicamento se debe a diversos mecanismos; la susceptibilidad reducida o resistencia que se genera mediante bombas de eflujo las cuales son codificadas por genes y tienden a disminuir la tiblanc

(ERG11) lo que implica la falta de unión con los azoles. Dentro de los azoles más utilizados está el fluconazol.¹⁸⁻²⁴

4. 1 .3 .2.- RESISTENCIA A POLIENOS

La Anfotericina B se encuentra en presentación liposomal perteneciendo al grupo de los macrólidos de polieno usados en el tratamiento de infecciones sistémicas y en tratamiento antifúngico prolongado.⁶⁻¹⁸

Los agentes antimicóticos del grupo polieno actúan mediante la unión con el ergosterol de la membrana de la célula fúngica, provocando inestabilidad osmótica y la pérdida de la integridad de la membrana.²¹ La toxicidad se debe en parte al daño oxidativo lo que es frecuentemente fungicida. Este efecto se transfiere a las membranas mamíferas, en las que la el agente se une al colesterol, produciendo alta toxicidad relacionada a los polienos.²⁵

La Anfotericina B es producida por *Streptomyces nodosus*; ha sido empleada por muchos años para la intervención de infecciones por hongos. La resistencia a este antifúngico es poco común, sin embargo se han correlacionado a mutaciones en los esteroides de la membrana con el desarrollo de resistencia tanto *in vitro* como *in vivo*.²⁵⁻²⁶ Una ventaja que cabe destacar es su toxicidad selectiva para las células fúngicas y no para los eritrocitos.²⁵

4.2.-ANTECEDENTES

Jørn A. Aas, Bruce J. Paster, Lauren N. Stokes, Ingar Olsen, y Floyd E. Dewhirst en su trabajo “Defining the normal bacterial flora of the oral cavity” utilizó técnicas moleculares independientes del cultivo para ampliar el conocimiento sobre la amplitud de la diversidad bacteriana en la cavidad oral humana sana, incluidas las especies de bacterias todavía no cultivadas y determinar la especificidad del sitio y del individuo de la colonización bacteriana. Se analizaron nueve sitios de cinco individuos clínicamente sanos. Las especies comunes a todos los sitios examinados pertenecieron a los géneros *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* y *Veillonella*, otras especies fueron específicas del sitio; siendo la cavidad oral sana muy diversa.²⁷

Egija Zaura, Bart JF Keijser, Susan M Huse y Wim Crielaard en su estudio titulado “Defining the healthy core microbiome of oral microbial communities”

realizaron un muestreo y secuenciaron mibrobiomas de varios sitios intraorales (superficies dentales, mejillas, paladar duro, lengua y saliva) en tres personas sanas. Los géneros predominantes pertenecieron a *Firmicutes* (género *Streptococcus*, familia *Veillonellaneae*, genero *Granulicatella*), Proteobacteria (género *Neisseria*, *Haemophilus*), Actinobacteria (género *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), Bacteroidetes (género) *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) y Fusobacteria (género *Fusobacterium*).²⁸

Catalina de Bedout y Beatriz L. Gómez en su publicación “*Candida* y candidiasis: un reto continuo para su diagnóstico temprano” describieron los métodos disponibles para el diagnóstico, sus limitaciones y las perspectivas de los que están en etapa de desarrollo y validación. Y encontraron que para el Fluconazol, *C. albicans* fue susceptible en el 92% de los casos, seguida por *C. tropicalis* en el 86% de los casos.²⁹

Dangi et al. en su publicación titulada “Oral candidiasis: A review” demostraron que la candidiasis es una infección micótica común en pacientes con un sistema inmunitario deteriorado, como aquellos que reciben quimioterapia por cáncer o aquellos que padecen sida. La mayoría de las infecciones se deben a *C. albicans*, aunque otras especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis* están cada vez más aisladas. Los azoles: ketoconazol, fluconazol e itraconazol han sido un beneficio importante en el tratamiento. Hasta la fecha, la resistencia ha sido principalmente un problema con fluconazol en pacientes con VIH.³⁰

Sachin C. Deorukhkar, Santosh Saini y Stephen Mathew en su artículo “Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile” determinaron los factores de virulencia y el perfil de susceptibilidad antifúngica de 125 *C. tropicalis* aislados de diversas muestras clínicas. Los aislamientos máximos demostraron resistencia al fluconazol. La resistencial al fluconazol fue más común en *C. tropicalis* aislada de hemocultivos. La resistencia antifúngica fue más en aislamientos que poseen la capacidad de producir fosfolipasa y biofilm. *C. tropicalis* presenta un gran grado de variación no solo en su patogenicidad, sino también en su perfil de susceptibilidad antifúngica.³¹

Cotter G, Kavanagh K. en su publicación “Adherence mechanisms of *Candida albicans*” afirman que *Candida albicans* es un patógeno fúngico oportunista que tiene la capacidad de inducir enfermedades superficiales y sistémicas en el huésped inmunodeprimido. Un factor de virulencia es la capacidad que tiene de adherirse al tejido huésped, se considera esencial en las primeras etapas de la colonización y la invasión tisular. La adherencia se logra mediante una combinación de mecanismos específicos y no específicos, que permiten que la levadura se adhiera a una amplia gama de tipos de tejidos y superficies inanimadas. Los métodos convencionales para tratar la enfermedad causada por *C. albicans* se basan en el uso de medicamentos antifúngicos diseñados para matar la levadura o detener su crecimiento. Se presenta un enfoque alternativo, dirigido a interrumpir la adherencia de la levadura al tejido huésped en casos de infección superficial.³²

Costa E, Silva S, Tavaría F, Pintado M. en su estudio titulado “Antimicrobial and antibiofilm activity of chitosan on the oral pathogen *Candida albicans*” se evaluó *in vitro*, la capacidad del quitosano para inhibir el crecimiento de *C. albicans* y la formación de biopelículas. Los resultados obtenidos mostraron que el quitosán es capaz de inhibir el crecimiento planctónico de *C. albicans* (HMW, 1 mg / mL; LMW, 3 mg / mL). Con respecto al crecimiento de biopelículas, el quitosán inhibió la adhesión de *C. albicans* (aprox. 95%), la formación de biopelículas (porcentajes superiores al 90%) y redujo las biopelículas maduras en aprox. 65% y biopelículas de especies duales (*C. albicans* y *S. mutans*) por ca. 70%. Estos resultados muestran el potencial de esta molécula para ser usada como un agente efectivo contra *Candida* capaz de actuar sobre las infecciones por *C. albicans*.³³

Gutiérrez-Martínez MJ, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA et al publicaron “Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD” en el que se evaluó la respuesta in vitro frente a: 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y miconazol de especies de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos del Hospital General de México OD. Las muestras biológicas se recolectaron para diagnosticar candidosis con examen directo, cultivos y tipificación con medios CHROMagar-Candida® y agar Harina de maíz + Tween 80. Se realizaron pruebas de sensibilidad con el equipo comercial FUNGITEST® (BIO-RAD®). Los resultados de susceptibilidad frente a los antimicóticos probados fue variable y, en algunos casos, se comprobó

resistencia adquirida. Se encontraron casos de resistencia intrínseca a 5-fluorocitosina, casi todas las cepas fueron altamente sensibles a anfotericina B y la respuesta frente a los azoles tuvo variaciones entre las diferentes especies de *Candida*.³³

William Mora, Santiago Reinoso, en su publicación “Prevalencia de micosis oral por *Cándida albicans*, bajo tratamiento en el hospital José Carrasco Arteaga (IESS)” estudiaron un grupo de 66 personas que recibieron RT y manifestaron infección por *C. albicans*. Pacientes sometidos a radiaciones comprendidas entre 51-70 Gy fueron 28 individuos, representando el 41.5 % de la muestra estableciéndolo como el grupo con mayor relación. Un grupo 48 personas recibieron QT manifestaron infección por *Candida albicans*; donde destaca el uso del carboplatino en 15 personas representando 31.3 % de la muestra, estableciendo una relación directa del fármaco con la enfermedad fúngica. Se determina que la *Candida albicans* está presente en el 82.7% de los pacientes bajo tratamiento contra el cáncer, afectando mayormente al sexo masculino. Se presenta con más frecuencia en pacientes mayores a 60 años de edad, guarda mayor relación con tratamientos de radiación en dosis entre 51-70 Gy.³⁴

Armas Márquez MB. Muñoz Mora JE, en su artículo titulado “*Candida albicans* en prótesis totales en pacientes portadores de enfermedades crónicas no transmisibles: diabetes mellitus tipo II e hipertensión arterial” se realizó un hisopado de la superficie interna de la prótesis, y con pruebas microscópicas se verificó el desarrollo de *C. albicans*. Se estableció finalmente una relación entre la presencia de *Candida albicans*, existencia de Diabetes mellitus y/o hipertensión arterial, y el género del paciente, así como una relación nula entre el desarrollo de *Candida albicans*, la edad y el tiempo de uso de prótesis del paciente.³⁵

5.- HIPÓTESIS

Por ser un estudio de tipo descriptivo no posee hipótesis.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1.- MARCO METODOLÓGICO

Enfoque: Cuantitativo

Diseño: Descriptivo

Nivel de investigación: Descriptivo

Tipo de investigación:

- **Por el ámbito:** De laboratorio
- **Por la técnica:** Observacional
- **Por la temporalidad:** Prospectiva

2.- POBLACIÓN Y MUESTRA

La población del presente estudio fue de 110 muestras anteriormente tomadas de la cavidad oral, provenientes de niños de 6 a 12 años de la escuela Tupac Yupanqui de la parroquia Oñacpac del cantón Saraguro (ANEXO1). Las levaduras aisladas fueron congeladas a -80°C en el laboratorio de genética y biología molecular de la Unidad de Salud y Bienestar de la Universidad Católica de Cuenca para la confirmación de especie y estudios de susceptibilidad.

2.1.- Criterios de selección: Para la formalización de la población de cepas se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección.

2.1. a.- Criterios de inclusión: Se incluyeron en el estudio cepas aisladas de la cavidad oral identificadas como *Candida spp.*

2.1. b.- Criterios de exclusión: Se excluyeron del estudio las muestras de cepas que no pertenecían al género *Candida*, aquellas que no sobrevivieron a la condición ambiental y los medios de cultivo con ausencia de crecimiento de levadura.

2.2.- Tamaño de la muestra

Luego de cumplir con los criterios de selección, se obtuvo un total de 28 cepas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral. Por lo tanto, el tamaño de muestra fue a conveniencia (ANEXO 2).

3.- OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES³⁶

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	DIMENSIONES	INDICADOR	TIPO ESTADÍSTICO	ESCALA	DATO	INSTRUMENTO
Susceptibilidad antifúngica	Capacidad que tienen las levaduras de soportar los efectos antifúngicos destinados a eliminarlas (resistencia) o la probabilidad que la levadura sea eliminada (sensibilidad).	Grado de tolerancia a una concentración máxima (resistencia) o mínima del fármaco (sensibilidad).	Unidimensional	_____	Cuantitativo	Ordinal	Resistencia Sensibilidad	_____
Especies de <i>Candida</i>	Conjunto de especies del género <i>Candida</i> presentes en la mucosa oral.	Crecimiento en CHROMagar y Sabouraud.	Unidimensional	_____	Cualitativo	Nominal	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> .	_____
Tipo de antifúngico	Sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos hongos.	Disco cargado en concentración ug/ml	Unidimensional	_____	Cualitativo	Nominal	Fluconazol Anfotericina B	_____

4.- INSTRUMENTOS, MATERIALES Y RECURSOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.

4.1.- Instrumentos mecánicos: Cabina de flujo laminar, estufa, nevera, computadora, microscopio. (ANEXO 3)

4.2.- Materiales

Guantes y mascarilla (como medidas de bioseguridad), medios de cultivo (para incubar las cepas aisladas), antifúngico (para determinar la resistencia y sensibilidad de las cepas de *Candida*).

4.3.- Recursos

Para llevar a cabo el estudio se necesitaron recursos institucionales (Laboratorio de genética y biología molecular de la UCACUE) recursos humanos (tutores y tesista) y financieros (tesista, tutora).

5.- PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE DATOS

5.1.- Ubicación espacial: Laboratorios de genética y biología molecular de la Unidad de Salud y Bienestar ubicado en el edificio de la carrera de biofarmacia de la Universidad Católica de Cuenca. Av. de las Américas y Humbolt (área total aproximadamente de 80 m²).

5.2.- Ubicación temporal: La investigación se realizará entre los meses marzo-agosto 2019

5.3.- Procedimientos de la toma de datos

Se inicia con la identificación de cepas de *Candida spp*, para lo cual los aislados conservados a -80°C fueron inoculados en medio CHROMagar *Candida*, preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ANEXO 4). Luego de 48h a 37°C se emplearon las colonias puras para la identificación preliminar y el registro en una base de datos de Excel.

5.3. a.- Método para determinar susceptibilidad

Para el estudio de susceptibilidad antifúngica se empleó el método de difusión en disco, aplicando dos medicamentos antimicóticos; fluconazol y anfotericina B (ANEXO 5). A continuación se describe el procedimiento con cada antifúngico:

5.3. a.1.- Difusión en disco con Fluconazol

Preparación de agar Müller Hinton (MH) en cajas Petri 48 horas antes del procedimiento.

Se realizó el descongelamiento y activación de cepas en cajas Petri con medio de cultivo agar Sabouraud (SBD) 24 horas antes del procedimiento.

Se evaluó el fluconazol (Baten® 2mg/ml solución inyectable), llevándolo a una concentración de 25 ug para la carga de cada disco (papel filtro 6mm de diámetro).

En tubos eppendorf se prepararon los inóculos de turbidez 0.5 en la escala de McFarland a partir del cultivo de 24 horas a 35 °C en SBD.

Con un hisopo estéril se tomó el inóculo de levadura, presionando contra las paredes del tubo eppendorf para retirar excesos. Posteriormente se sembró con la técnica en césped sobre la caja Petri de agar MH.

Con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos sobre la superficie del agar MH de la caja previamente inoculada.

5.3.a.2.- Difusión en disco con Anfotericina B

Preparación de agar Müller Hinton (MH) en cajas Petri 48 horas antes del procedimiento.

Se realizó el descongelamiento y activación de cepas en cajas Petri con medio de cultivo agar Sabouraud (SBD) 24 horas antes del procedimiento.

Se evaluó la Anfotericina B (Vitalis 50mg/ml solución inyectable), llevándolo a una concentración de 10 ug disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) para la carga de cada disco (papel filtro 6mm de diámetro).

En tubos eppendorf se prepararon los inóculos de turbidez 0.5 en la escala de McFarland a partir del cultivo de 24 horas a 35 °C en SBD.

Con un hisopo estéril se tomó el inóculo de levadura, presionando contra las paredes del tubo eppendorf para retirar excesos. Posteriormente se sembró con la técnica en césped sobre la caja Petri de agar MH.

Con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos sobre la superficie del agar MH de la caja previamente inoculada.

Una vez realizada la inoculación de todas las cepas del género *Candida*, sobre las cajas petri con MH, y colocados los discos cargados con fluconazol y anfotericina B; se incubaron las cajas a 35 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo los halos no fueron claramente distinguibles, razón por la cual se prolongó la incubación 24 horas más.

La lectura se realizó usando una regla para medir el diámetro de halo externo de la zona de inhibición de cada disco.

5.3. b.- Criterios de registro de hallazgos

Se utilizó la prueba microbiológica con medio cromogénico diferencial y selectivo para el aislamiento e identificación rápida de *Candida spp* de importancia clínica, según lo descrito en el cuadro 1.

Cuadro 1: Prueba microbiológica CHROMagar *Candida* (ANEXO 6).

MICROORGANISMO	CRECIMIENTO	COLOR
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Bueno	Azul
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Bueno	Verde
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Bueno	Rosa- púrpura
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Bueno	Violeta claro
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	Bueno	Violeta claro

Fuente: <http://www.condalab.com>

Para la determinación de las categorías de susceptibilidad; sensible, sensible dosis dependiente o resistente a los antifúngicos se aplicaron los puntos de corte estandarizados por el CLSI para fluconazol y anfotericina B, detallados en el cuadro 2 y la interpretación de cada categoría se describe en el cuadro 3.

Cuadro 2. Puntos de corte para *Candida spp* según el CLSI 2019

ANTIFÚNGICO	CARGA DE DISCO	DIÁMETRO		
		R	SDD	S
Fluconazol	25 ug	≤ 14 mm	15 – 18 mm	≥ 19 mm
Anfotericina B	10 ug	≤ 9 mm	10 – 14 mm	≥ 15 mm

Fuente: Documento M27-A3 Y M44-A

Cuadro 3: Interpretación de categorías según el CLSI

Sensible (S)	La infección puede tratarse con la dosis recomendada del medicamento.
Sensible Dosis Dependiente (SDD)	Respuesta baja con la dosis recomendada del medicamento.
Resistente (R)	El crecimiento de las cepas no se inhibe con dosificaciones recomendadas.

Fuente: Documento M27-A3 Y M44-A

6.- PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Una vez obtenidos los resultados, se realizó la tabulación de los mismos en el programa informático Excel en el cual se calculó la frecuencia representada en porcentaje de acuerdo a n de datos. Los resultados se presentan en gráficos.

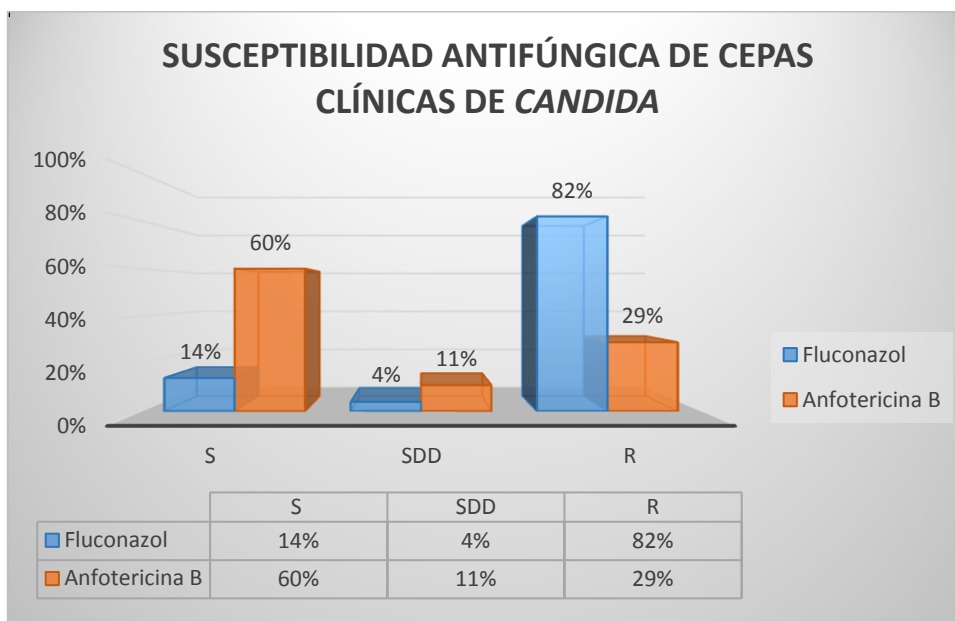
7.- ASPECTOS BIOÉTICOS

La investigación no implicó conflictos bioéticos de ninguna índole, debido a que no hubo intervención alguna sobre los niños.

CAPÍTULO III
RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. RESULTADOS:

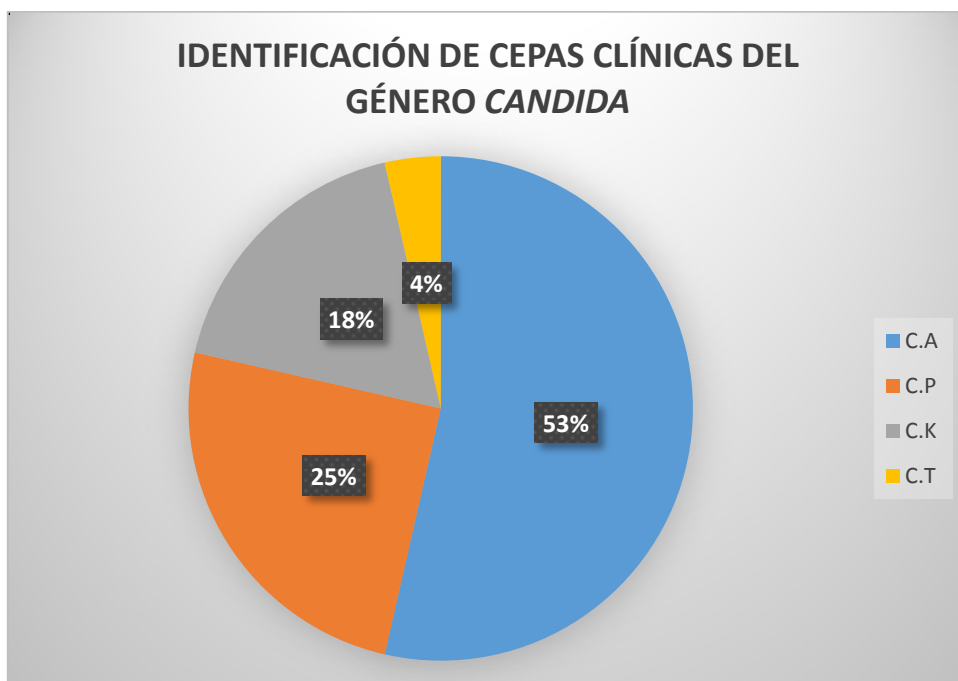
Gráfico N°1: Susceptibilidad antifúngica de cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral.



S = Sensible, SDD = Sensible dosis dependiente, R = Resistente

Interpretación: El gráfico N°1 demuestra que las cepas de *Candida* estudiadas son altamente resistentes a la acción del fluconazol, mientras que para la anfotericina B muestran gran sensibilidad.

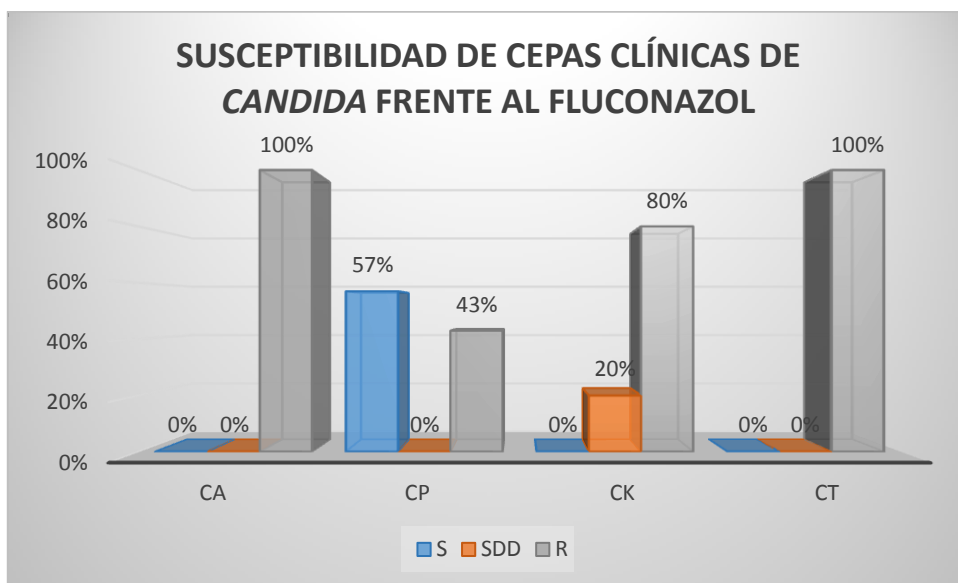
Gráfico N°2: Identificación de cepas clínicas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral.



CA= *C. albicans*, CP= *C. parapsilosis*, CK= *C. krusei*, CT= *C. tropicalis*

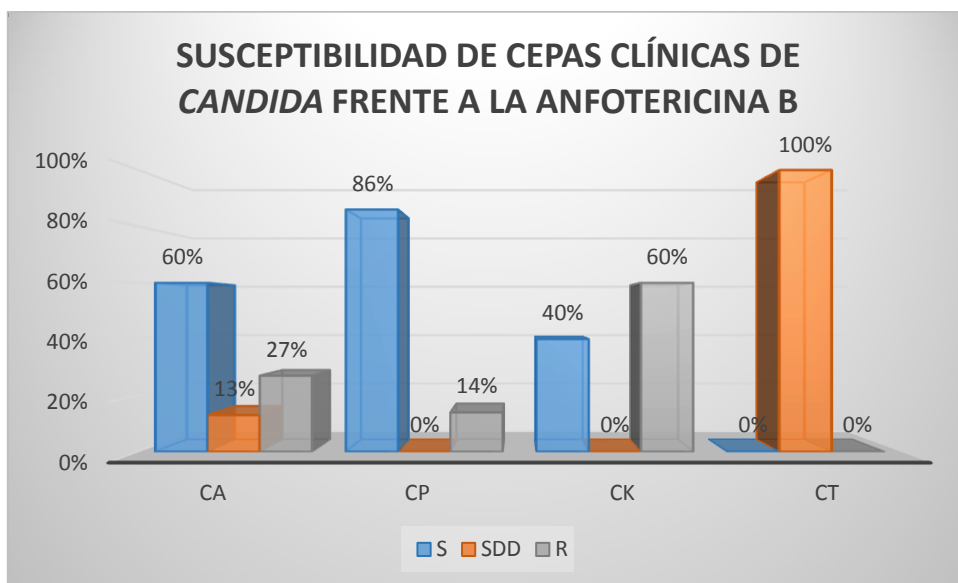
Interpretación: En el gráfico N°2 se puede evidenciar que; de todas las cepas incluidas en el estudio, hubo mayor hallazgo de *Candida albicans*.

Gráfico N° 3: Susceptibilidad antifúngica de cada una de las cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral frente al fluconazol.



Interpretación: El gráfico N°3 indica una resistencia marcada de todas las cepas clínicas del género *Candida* frente a la acción del antifúngico de tipo azol.

Gráfico N° 4: Susceptibilidad antifúngica de cada una de las cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral frente a la Anfotericina B.



Interpretación: En el gráfico N°4 se observa sensibilidad en *C. albicans* y *C. parapsilosis* lo que indica mayor éxito de la acción del antifúngico de tipo polieno.

2. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos no se pueden comparar a nivel local y nacional, debido a que no se encontraron estudios parecidos o similares al presente, y menos aún en comunidades rurales de grupos étnicos del Ecuador.

Por lo que el estudio hasta el momento es inédito, sin embargo se logró comparar con publicaciones internacionales sobre estudios de susceptibilidad.

Sanabria y cols¹⁸ publicaron un perfil de susceptibilidad, en el cual demuestran que diferentes especies de *Candida* presentan baja resistencia al fluconazol resultando un 86% de sensibilidad, sin embargo verificaron una variación en la frecuencia de sensibilidad, observando que un aislado de *C. albicans* pasó de sensible dosis dependiente, a resistente; y un aislado tanto de *C. parapsilosis* como de *C. tropicalis*, de sensibles dosis dependiente pasaron a ser resistentes. Al analizar los resultados demostrados de nuestro trabajo se hallan similitudes debido a que las cepas estudiadas, manifestaron resistencia al antifúngico de tipo azol aplicado.

De las cepas clínicas del género *Candida* incluidas para el estudio, previamente tomadas de la cavidad oral de niños de 6 a 12 del cantón Saraguro, se observó una mayor presencia de la especie *albicans* con un 53%. Los resultados obtenidos tuvieron relación con la investigación de Jerez y cols.,¹⁹ ya que demostraron un gran predominio de la *C. albicans* con un 91.7 % para su estudio de susceptibilidad de *Candida spp*, sin embargo los aislamientos fueron tomados de la cavidad oral de pacientes VIH sida. En cuanto a la susceptibilidad se encontraron diferencias, debido a que el método aplicado por los autores fue el de microdilución con el uso de azoles en los que no se incluyó el fluconazol dando como resultado una elevada sensibilidad.

Esta investigación difiere con el trabajo publicado por Torres y cols,²¹ debido a que en sus resultados reportaron 79% de sensibilidad (S) de aislados de *Candida* de diversas especies, frente a la acción del fluconazol. Mientras que los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran resistencia (R) en un 82% al mismo antifúngico.

Por otra parte los resultados de la publicación por Deepak y cols.,²² son cercanos a los obtenidos en nuestro trabajo realizado, utilizando el mismo método. Se encontró un predominio de cepas sensibles (S) con la aplicación de Anfotericina B en un 74%, mientras que las cepas estudiadas en el presente

trabajo demostraron sensibilidad (S) en un 60% con el mismo antifungico de tipo polieno.

3. CONCLUSIONES

Primera.- Las cepas del género *Candida* aisladas previamente de la cavidad oral, demostraron resistencia al fluconazol 82% y sensibilidad a la anfotericina B en un 60%.

Segunda.- La identificación de cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral, indicó presencia de *C. albicans* con mayor frecuencia 53%, seguido de *C. parapsilosis* con 25%, *C. krusei* 18% y *C. tropicalis* 4%.

Tercera.- La susceptibilidad de las cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral, frente al fluconazol fue: *C. albicans* y *tropicalis* resistentes el 100%, *C. parapsilosis* sensibles el 57% y *C. krusei* resistentes el 80%

Cuarta.- La susceptibilidad de las cepas clínicas del género *Candida* aisladas de la cavidad oral, frente a la anfotericina B fue: *C. albicans*, *parapsilosis* y *krusei* mostraron sensibilidad con 60%, 86% y 40% respectivamente.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Lamont R.J., Hajishengallis G.N. y Jenkinson H.F. Microbiología e inmunología oral. Primera edición. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno; 2015.
2. Alexopoulos, C.J., Introductory micology, New York, Wiley, 1996. Bial-Aristegui. El reino de los hongos. Rev Iberoam de Micol. 2002, pp. 1-4.
3. Philip D.M. y Michael V. M. Microbiología Oral. Quinta edición. Amolca; 2011.
4. Otero Rey E, Peñamaría Mallón M, Rodríguez Piñón M, Martín Biedma B, Blanco Carrión A. Candidiasis oral en el paciente mayor. Avances en Odontoestomatología. Vol. 31 - Núm. 3 - 2015
5. Aveldañez JA, Pérez FH, Herrera EM, Carreón AAR, Guzmán RA. Portadores de Candida en la mucosa oral: Tipificación de 35 cepas con CHROMagar Candida. Med Interna Mex. 2008;24(4):262–6.
6. Katsuji Okuda, Tamaki Okuda, Kazuyuki Ishihara. La verdad de las bacterias orales. "El dios de la plaga que acecha en la cavidad bucal de las personas mayores" Candida albicans. Critica dental japonesa. 2009;69(5):149–51.
7. Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Bascones-Ilundain J. Infecciones orales y endocarditis infecciosa. Med Clin (Barc). 2012;138(7):312–7.
8. Martínez Lasheras MB, Rodríguez Zapata M. Diagnóstico y tratamiento empírico de las infecciones bucales y dentales. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2006;9(53):3495–6.
9. Piovesan C, Batista A, FV F, TM A. Oral health-related quality of life in children: conceptual issues. Rev Odonto Cienc. 2009;24(1):81–5.
10. Buss PM. Reynolds Ranch Forestry Prescriptions Areas 2011. 2011;2011.
11. Eriksen Persson L. Referente a oral o bucal. Rev Odontológica Mex. 2013;17(4):202–3.

12. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo 2010. 2013
13. Estupiñán-Day S, Milner T, Téllez M. La Salud Oral de los Niños de Bajos Ingresos: Procedimientos para el Tratamiento Restaurativo Atraumático. 2006;53.
14. Fernández González C, Núñez Franz L, Díaz Sanzana N. Determinantes de salud oral en población de 12 años. Rev clínica periodoncia, Implantol y Rehab oral. 2011;4(3):117–21.
15. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol. 1994;78(2):189–93.
16. Education LIF. Oral Candidiasis. 2016
17. Jawetz, Melnick, Adelberg. Microbiología médica. Vol 1. 25a.ed. México: McGraw Hill. 2010.
18. Towner WS. On calling people “prophets” in 1970. Interpretation. 1970;24(4):492–509.
19. Shimizu C, Kuriyama T, Williams DW, Karasawa T, Inoue K, Nakagawa K, et al. Association of oral yeast carriage with specific host factors and altered mouth sensation. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2008;105(4):445–51.
20. Yorio P. La cavidad oral de una población de adultos mayores en Uruguay . :8–13.
21. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: Clearance, Colonization, or Candidiasis? J Dent Res. 1995;74(5):1152–61.
22. Olano SM, Intrínsecos F. Factores predisponentes factores intrínsecos. Sabouraudia. 1923;2(58):3745–50.
23. Otero RE, Peñamaría MM, Rodríguez PM, Martín BB, Carrión B. Candidiasis oral en el paciente mayor. Av Odontoestomatol. 2015;31(3):135–48.
24. Prieto Luz M, Illinait M T, Ramos E. Candidiasis oral en pacientes seropositivos al VIH y casos SIDA . Aspectos clínicos , micológicos y terapéuticos. Rev Cubana Med Trop. 2006;58(3):173–80.

25. Aguirre Urizar JM. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol. 2002;19(699):17–21.
26. Scully C. Candida and Oral Candidosis : A Review. 1994;5(2):125–57.
27. Caffarena MP, Olivera LC. Candidiasis bucal Oral candidiasis. Actas Odontológicas. 2004;53–62.
28. Castro RM, García AÁ, Toledo LP, Valdés LS, Soto YT, Suárez CL. Evaluación de la función opsonofagocítica de los neutrófilos en pacientes infectados por el VIH. Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter. 2002;18(1):46–52.
29. Darwazeh AMG, Darwazeh TA. What Makes Oral Candidiasis Recurrent Infection ? A Clinical View. J Mycol. 2014;2014:1–5.
30. Williams DW, Jordan RPC, Wei X-Q, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. J Oral Microbiol. 2013;5(1):22434.
31. Redding SW, Dahiya MC, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Fothergill AW, et al. Candida glabrata is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(1):47–52.
32. Lazarde L, Añez OA. Candidiasis Multifocal bucal. reporte de un caso. Acta Odontológica Venez. 2001;41(2):131–4.
33. Mora NA, Vargas OS, Boni LC, García SA, Cepeda LG. Prevalencia de portadores de especies de Candida en cavidad bucal en una población pediátrica. Rev Odontológica Mex. 2004;8(4):107–11.
34. Brandbyge J, Hannestad S, Haugbølle T, Wong YYY. Neutrinos in non-linear structure formation - The effect on halo properties. J Cosmol Astropart Phys. 2010;2010(9):107–12.
35. Srivastava B, Bhatia HP, Chaudhary V, Aggarwal A, Kumar Singh A, Gupta N. Comparative Evaluation of Oral Candida albicans Carriage in Children with and without Dental Caries: A Microbiological in vivo Study. Int J Clin Pediatr Dent [Internet]. 2012;5(2):108–12.
36. Revista OACTIVA UC Cuenca . Vol. 4, No. 1, pp. 15-20.

5. ANEXOS

ANEXO 1

Fotografías de la escuela Tupac Yupanqui en la parroquia Oñacapac (Saraguro)



ANEXO 2

Cepas del género *Candida* previamente aisladas de la cavidad oral de escolares de Saraguro

**ANEXO 3**

Instrumentos mecánicos

Fotografía 1
Cabina de flujo laminar



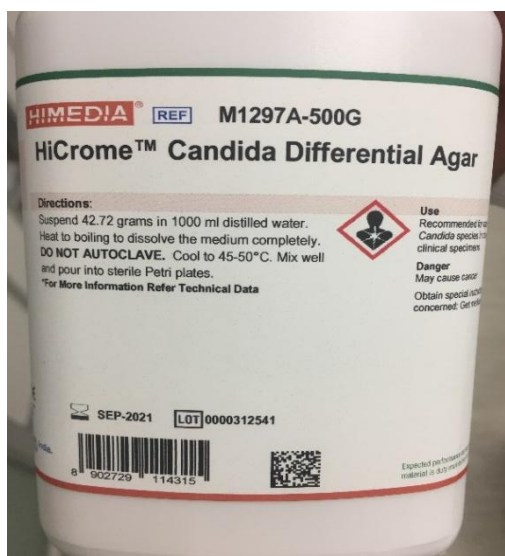
Fotografía 2
Estufa



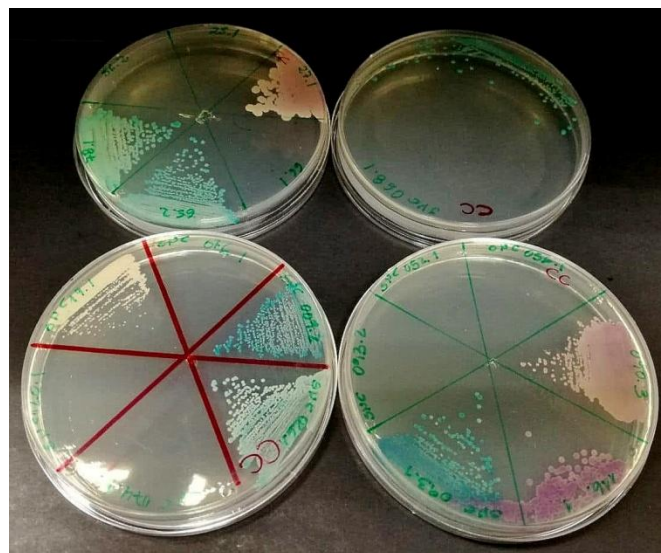
ANEXO 4

Identificación de cepas de *Candida* spp

Fotografía 3
Agar Cromogénico



Fotografía 4
Especies de *Candida*



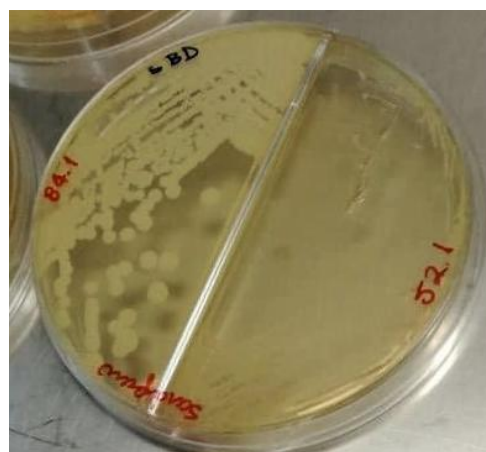
ANEXO 5

Método de difusión en disco (fluconazol y anfotericina B)

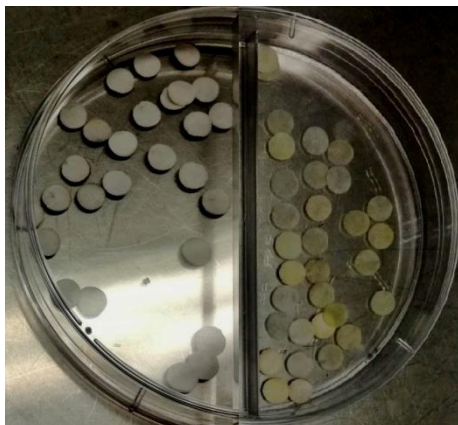
Fotografía 5
Agar Müller Hinton



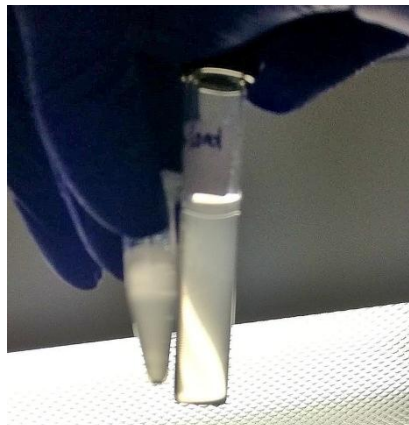
Fotografía 6
Activación de cepas en agar SBD



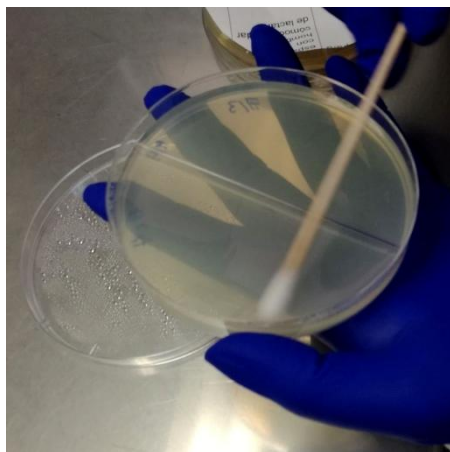
Fotografía 7
Discos cargados con antifúngico



Fotografía 8
Inóculo 0.5 McFarland



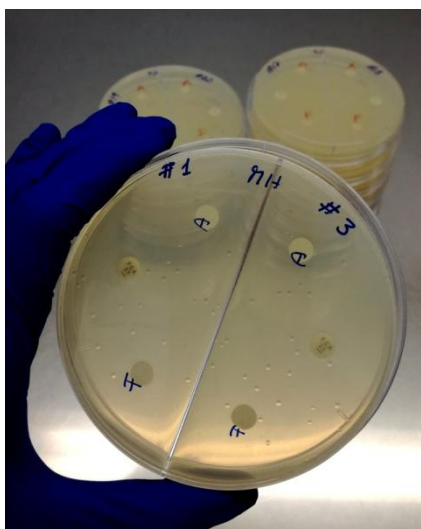
Fotografía 9
Técnica en césped



Fotografía 10
Colocación de discos cargados



Fotografía 11
Discos sobre cajas inoculadas



Fotografía 12
Incubación a 35 °C durante 48 h

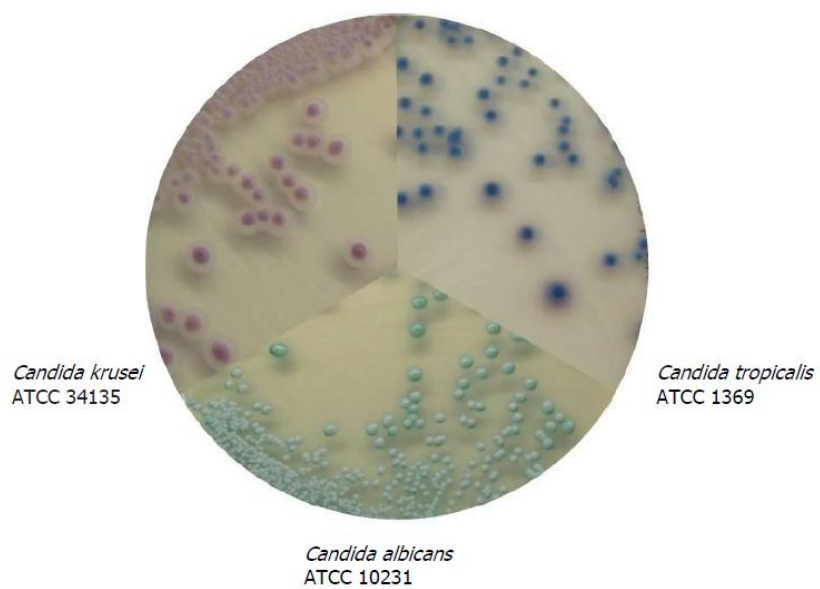


Fotografía 13
Lectura zona de inhibición



ANEXO 6

Prueba microbiológica CHROMagar *Candida*



ANEXO 7

Método de microdilución para susceptibilidad antifúngica (fluconazol)

1. Descongelamiento y activación de cepas en cajas petri con medio de cultivo agar glucosado de Sabouraud (SBD).
2. Preparación de la solución madre del fluconazol, con una concentración de 256 ug/ml.
3. Preparación de las diluciones seriadas del fluconazol a partir de la solución madre. Las concentraciones a estudiar fueron de 64 a 0,12 ug/ml.
4. La preparación del inóculo de levadura se realizó, tocando con el asa estéril, una colonia con crecimiento de 24 horas, tomada de la caja con agar SBD. Luego se transfirió a un tubo de ensayo con solución salina estéril y con ajuste a 0,5 en la escala McFarland, para posteriormente realizar una dilución 1:1000 con reactivo Müller Hinton. Este paso se realizó con cada especie de *Candida* que fue incluida para el estudio.
5. De la dilución 1:1000 del inóculo de levadura se colocó, en cada pocillo de la placa de microtitulación, 100 ul desde el 1 hasta el 11.
6. Se colocó 100 ul de cada dilución del antifúngico en cada pocillo de la placa de microtitulación, desde el 1 (concentración más alta = 64 ug/ml) hasta el 10 (concentración más baja = 0,12 ug/ml).
7. Se aplicó el control positivo en el pocillo 11, que previamente se cargó con 100 ul de levadura, agregando 100 ul más del reactivo (Müller Hinton).
8. Para el control negativo se colocó 200 ul de Müller Hinton en el pocillo 12, sin añadir el antifúngico.
9. Quedó un volumen final de 200 ul en todos los pocillos (del 1 al 12).
10. Posteriormente, se llevaron las placas de microtitulación a la estufa a una temperatura de 35 °C durante 48 horas.
11. Finalmente se detectó la presencia o ausencia de turbidez; indicando la CMI de crecimiento de las levaduras

Fotografía 14

Placa de microtitulación con diluciones de antifúngico e inóculos de levaduras

**Fotografía 15**

Tabulación en Excel indicando la CMI

CÓDIGO	CEPAS	CONCENTRACIÓN DE ANTIFÚNGICO ug/mL												CMI		
		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	C+	C-			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A) 90.3	CP/CG	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	SDD		S= 4
B) 93	CA	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	SDD		SDD= 2
C) 93.1	CT	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	S		R=2
D) 68	CA	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	S		
E) 68.1	CA/CD	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	S		
F) 80	CA	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	S		
G) 90	CK	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	R		
H) 90.2	CP/CG	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	R		

Fotografía 16

Control positivo

**Fotografía 17**

Control negativo

