

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA  
CARRERA BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA  
CLÍNICA**

**CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUCEPTIBILIDAD A VORICONAZOL Y  
ANIDULAFUNGINA EN CEPAS DE CANDIDA ALMACENADAS EN EL  
LABORATORIO DE MICOLOGÍA CLÍNICA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA  
CLÍNICA-PUCE QUITO**

**Autores**

Ruth María Flores Bravo  
María Fernanda Vaca Riofrío

**DIRECTOR**

Mtr. Andrés Esteban Zabala Parreño

**QUITO, 2020**

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, RUTH MARÍA FLORES BRAVO, C.I. 1004005714, autora del trabajo de graduación titulado “CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUCEPTIBILIDAD A VORICONAZOL Y ANIDULAFUNGINA EN CEPAS DE CANDIDA ALMACENADAS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA CLÍNICA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA-PUCE QUITO”, previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad



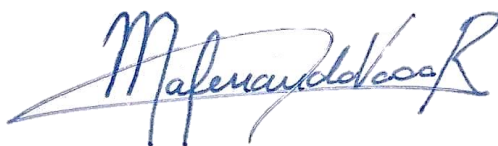
Ruth María Flores Bravo

C.I. 1004005714

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, MARÍA FERNANDA VACA RIOFRÍO, C.I. 1722575196, autora del trabajo de graduación titulado “CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE SUCEPTIBILIDAD A VORICONAZOL Y ANIDULAFUNGINA EN CEPAS DE CANDIDA ALMACENADAS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA CLÍNICA DE LA CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA-PUCE QUITO”, previo a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina-Carrera de Bioquímica:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



María Fernanda Vaca Riofrío

C.I. 1722575196

## **DEDICATORIA**

A mis padres Román y Lucía por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi carrera, que con toda su ayuda y confianza he logrado alcanzar la primera de mis metas en mi vida profesional.

A mis hermanos Juan, Verónica y Santiago que con su cariño me animan a seguir creciendo.  
A Daniel por brindarme el amor más sincero y ser cómplice de todos mis logros.

Y a mis amigos más cercanos por acompañarme y ser parte de esta hermosa etapa en mi vida y a todos los que aportaron para que todo esto sea posible.

**Ruth María Flores Bravo**

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser fuente de fortaleza y permitirme la oportunidad.

A mis Padres Mónica y Roberto, los cuales siempre han sabido guiar mis pasos y apoyarme a que aprenda a recorrer mi camino por mi cuenta.

A mis hermanos Pablo y José Miguel que me han impulsado a lograr excelencia académica con su ejemplo y cariño.

A cada uno de mis sobrinos por alegrarme con sus locuras cada día.

A mi familia completa, por todo el apoyo que he recibido de cada uno para alcanzar mi sueño de ser profesional.

Y a mi novio Joshua por su apoyo y amor incondicional.

**María Fernanda Vaca Riofrío**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por todas las capacidades y bendiciones que nos ha dado a cada una.

A nuestros padres por darnos la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, gracias por depositar su confianza en que lograríamos nuestros objetivos en esta etapa de nuestras vidas. Gracias por abrirnos las puertas y permitirnos a pesar de una pandemia completar nuestros experimentos.

A todos nuestros familiares que nos han animado a continuar y no nos han dejado rendirnos. Gracias por ayudarnos a conseguir lo necesario para continuar y recordarnos lo fuertes que somos para lograr nuestras metas.

A la carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad del Ecuador que nos abrió sus puertas y ha sabido guiarnos en nuestro crecimiento personal como profesionales y personas. Gracias por habernos dado las mejores experiencias, los mejores amigos y recuerdos para la vida, que no solo nos acompañaran para ser mejores profesionales, sino mejores personas.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Medicina por permitirnos completar nuestros estudios en tan prestigiosa universidad y a todos los docentes que alguna vez fueron nuestros profesores, sin esas ideas brindadas en clase nada de esto hubiera sido posible. Gracias por ese apoyo incondicional sentido en consejos, resoluciones de dudas y apoyo que sentimos durante el desarrollo del trabajo.

Al Mtr. Andrés Zabala por darnos la oportunidad de trabajar en este proyecto y vivir de primera mano lo que es sacar un experimento adelante con todos sus altos y bajos. Gracias por esa confianza y paciencia para guiarnos cuando se presentaban eventualidades. Al Dr. Santiago Escalante, por la apertura al uso de las instalaciones y las cepas del laboratorio de Micología de la Universidad, y al Mtr. Eduardo Villacís, por la atención brindada a nuestro tema y los aportes

## RESUMEN

**Introducción:** La candidiasis es una infección causada por cualquier especie de *Candida*. Durante la última década, se ha presentado un incremento de los niveles de resistencia a los antifúngicos comunes, siendo las especies de *Candida no albicans* las que muestran mayores porcentajes de resistencia. Es por eso que el uso de técnicas para el estudio de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* ha tomado un papel importante para la elección de antimicóticos clínicamente efectivos durante el tratamiento. La técnica de microdilución en caldo se considera el *gold standard* y existen guías para su estandarización, como la CLSI M27-A3. Este estudio se centra en la implementación de la técnica descrita en la guía del CLSI con cepas del laboratorio de docencia de Micología Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

**Materiales y métodos:** El experimento se dividió en dos etapas. La primera etapa consistió en la implementación de la técnica para voriconazol y anidulafungina, donde se aplicó la técnica descrita en un procedimiento operativo estándar aplicado a las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019, luego se analizó los resultados para obtener datos estadísticos que demuestren su estabilidad y desempeño. La segunda etapa incorporó el estudio de 40 cepas de *Candida* spp. conservadas en el laboratorio para la obtención de sus perfiles de susceptibilidad para los antifúngicos usados en la implementación.

**Resultados:** Dentro del análisis estadístico para la validación de la técnica, se logró un 100% de los resultados de CMI de las cepas control dentro del intervalo de referencia de CMI de los antifúngicos utilizados. La cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 tiene una mayor precisión, mientras que *C. krusei* ATCC 6258 alcanzó una mayor exactitud en los dos antifúngicos, en tanto a la variabilidad intraoperador los datos mostraron una correlación directa perfecta para los mismos antifúngicos por distintas operadoras. La población de estudio para determinar el perfil de susceptibilidad fue de 40 cepas. Las cepas sensibles a voriconazol fueron: *C. albicans* (17/20), *C. tropicalis* (10/12) y *C. glabrata* (1/5), siendo *C. guilliermondii* la única cepa 100% resistente para este antifúngico. Para anidulafungina se determinaron como 100% sensibles *C. tropicalis* y *C. glabrata*, *C. albicans* (18/20) y *C. guilliermondii* (2/3). El POE se encuentra expuesto en su totalidad en el anexo 2.

**Conclusiones y recomendaciones:** El proceso de validación estadística demostró que la microdilución en caldo para determinar perfiles de susceptibilidad de especies de *Candida* frente a voriconazol y anidulafungina es una técnica con buen desempeño analítico. La caracterización de la susceptibilidad de las cepas de *Candida* spp. almacenadas en el laboratorio de docencia de Micología Clínica de la PUCE incluidas en este estudio demostró que *C. guilliermondii* ha desarrollado una resistencia intrínseca a voriconazol, mientras que *C. tropicalis* y *C. glabrata* mantienen una sensibilidad del 100% frente a anidulafungina por lo que es recomendable delimitar los niveles de sensibilidad y resistencia de la totalidad de cepas viables almacenadas. Como se detalla en el POE es importante prevenir contaminaciones del caldo de cultivo a utilizar por lo que es recomendable esterilizarlo por filtración.

**Palabras Clave:** Estandarización, microdilución, *Candida*, susceptibilidad.

## ABSTRACT

**Introduction:** Candidiasis is an infection caused by any species of candida. During the last decade, there has been an increase in the levels of resistance to common antifungals, being the non albicans species the ones that show higher percentages of resistance. Due to this fact the usage of techniques for the study of *in vitro* antifungal susceptibility has taken a more important role in the election of clinically effective antimycotics for the treatment. The broth microdilution is considered the gold standard and there are guides for its standardization, like CLSI M27-A3. This study is centered in the implementation of the technique described in the CLSI guide with strains from the Clinical Mycology teaching laboratory in the Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

**Materials and Methods:** The experiment was divided into two stages. The first stage consisted of the implementation of the technique for voriconazole and anidulafungin, where the technique described in the standard operating procedure was applied to strains *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019, then the results were analyzed for obtaining statistic data that shows its stability and performance. The second stage incorporated the study of 40 strains of *Candida* spp. conserved in the laboratory to obtain their susceptibility profiles for the antifungals used in the implementation.

**Results:** Within the statistical analysis for the validation of the technique, 100% of the MIC results of the control strains were achieved within the MIC reference interval of the antifungals used. The strain *C. parapsilosis* ATCC 22019 has a higher precision, while *C. krusei* ATCC 6258 achieved greater accuracy in the two antifungals, while the data showed a perfect direct correlation for the same antifungals by different operators regarding intraoperative variability. The study population to determine the susceptibility profile was 40 strains. The voriconazole sensitive strains were: *C. albicans* (17/20), *C. tropicalis* (10/12) and *C. glabrata* (1/5), with *C. guilliermondii* being the only 100% resistant strain for this antifungal. For anidulafungin, *C. tropicalis* and *C. glabrata* were determined as 100% sensitive, *C. albicans* (18/20) and *C. guilliermondii* (2/3). The POE is set out in its entirety in Annex 2.

**Conclusions and Recommendations:** The statistical validation process demonstrated that broth microdilution to determine susceptibility profiles of candida species against voriconazole and anidulafungin is a technique with good analytical performance. The characterization of the susceptibility of the strains of *Candida* spp. stored in the PUCE Clinical Mycology teaching laboratory included in this study showed that *C. guilliermondii* has developed an intrinsic resistance to voriconazole, while *C. tropicalis* and *C. glabrata* maintain a 100% sensitivity against anidulafungin, therefore It is advisable to define the sensitivity and resistance levels of all the viable strains stored. As detailed in the POE, it is important to prevent contamination of the culture medium to be used, so it is advisable to sterilize it by filtration.

**Key words:** Standardization, microdilution, candida, susceptibility.

## TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN .....	II
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	VI
RESUMEN .....	VII
ABSTRACT.....	VIII
TABLA DE CONTENIDOS .....	IX
LISTA DE TABLAS .....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XIII
LISTA DE SIGLAS.....	XIV
CAPÍTULO I .....	1
1.1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
1.4 OBJETIVOS.....	4
1.4.1 Objetivo General .....	4
1.4.2 Objetivo Específicos .....	4
1.4.3 Limitaciones Del Estudio.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	5
2.1.1 Antecedentes .....	5
2.2 MARCO TEÓRICO .....	6
2.2.1 Candidiasis.....	6
2.2.2 Género candida y sus factores de virulencia.....	6
2.2.3 Presentaciones clínicas de alta importancia.....	8
2.2.4 Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	8
2.2.5 Antifúngicos.....	9
2.2.6 Tratamiento de elección.....	11
2.2.7 Métodos de investigación de susceptibilidad.....	11
2.2.8 Resistencia antifúngica identificadas.....	12
2.2.9 Perfiles de susceptibilidad encontrados en candidas.....	12

2.3	MARCO CONCEPTUAL.....	12
CAPÍTULO III.....		14
3.1	MARCO METODOLÓGICO.....	14
3.1.1	Materiales y métodos.....	14
3.2	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	15
3.2.1	Variable Principal.....	15
3.2.2	Variable Secundaria.....	15
3.3	MATERIALES Y PROCESO.....	17
3.3.1	Materiales.....	17
3.3.2	Reactivos.....	17
3.3.3	Equipos.....	17
3.4	PROCEDIMIENTO.....	17
3.4.1	Fase Uno.....	18
3.4.2	Fase Dos.....	18
3.4.3	Fase Tres.....	18
3.4.4	Fase Cuatro.....	20
3.4.5	Fase Cinco.....	20
CAPÍTULO IV.....		22
4.1	RESULTADOS.....	22
4.1.1	Implementación de la técnica de microdilución en caldo para voriconazol y anidulafungina.....	22
4.1.2	Identificación de perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol y anidulafungina de las cepas aisladas <i>Candida spp.</i> almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica.....	27
4.1.3	Elaboración del procedimiento operativo estándar para la determinación del perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina en <i>Candida spp.</i> por la técnica de microdilución en caldo.....	29
CAPÍTULO V.....		30
5.1	DISCUSIÓN.....	30
5.1	CONCLUSIONES.....	33
5.2	RECOMENDACIONES.....	34
5.2	BIBLIOGRAFÍA.....	35
5.3	ANEXOS.....	39

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de las variables.....	16
<b>Tabla 2.</b> Resultados de las lecturas del CMI en la técnica de microdilución en caldo para voriconazol con las cepas <i>C. krusei</i> ATCC 6258 y <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019.....	223
<b>Tabla 3.</b> Resultados de las lecturas del CMI en la técnica de microdilución en caldo para anidulafungina con las cepas <i>C. krusei</i> ATCC 6258 y <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 .....	223
<b>Tabla 4.</b> Validación estadística de la precisión para voriconazol. ....	24
<b>Tabla 5.</b> Validación estadística de la precisión para anidulafungina. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Validación estadística de la exactitud para voriconazol. ....	25
<b>Tabla 7.</b> Validación estadística de la exactitud para anidulafungina. ....	26
<b>Tabla 8.</b> Coeficiente de correlación de Pearson.....	26
<b>Tabla 9.</b> Frecuencia relativa y absoluta en los perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol. .....	28
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia relativa y absoluta en los perfiles de susceptibilidad frente a anidulafungina.....	29

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Familias de los principales antifúngicos y mecanismos de acción. ....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura del voriconazol.....	10
<b>Figura 3.</b> Estructura de la anidulafungina .....	10
<b>Figura 4.</b> Población del cepario usada para la identificación de perfiles de susceptibilidad. .	28
<b>Figura 5.</b> Lectura de resultados microdilución en caldo. ....	56
<b>Figura 6.</b> Fotografía para confirmación de control de crecimiento, se observan levaduras con coloración Gram en lente 40X. ....	56
<b>Figura 7.</b> Fotografía para confirmación de control de esterilidad fallido, se observan bacterias cocobacilos Gram negativas con lente 40X. ....	57

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Respuesta Carta de Solicitud para el uso de cepas <i>Candida</i> spp. almacenadas y conservadas en el Laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....	39
<b>Anexo 2.</b> POE elaborado con el procedimiento de microdilución en caldo.....	40
<b>Anexo 3.</b> Proceso para microdilución en caldo, compendio de la guía M27-A3, M38-A y M44-A.....	55
<b>Anexo 4.</b> Lectura visual de técnica de microdilución en caldo. ....	56

## LISTA DE SIGLAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**CV:** coeficiente de variación

**DMSO:** Ácido Dimetil Sulfóxido

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

**MOPS:** Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

**POE:** Procedimiento Operativo Estándar

**PUCE:** Pontificia Universidad Católica del Ecuador

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SD:** desviación estándar

**SAP:** Proteasa Aspartica Secretada

**SDD:** Sensible dosis dependiente – Susceptible Dose-Dependent

**SIDA:** Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana

## CAPÍTULO I

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una infección causada por cualquier especie de candida, aunque se han registrado más de 150 especies, las especies con mayor reporte a nivel mundial son: el patógeno aislado con frecuencia *Candida albicans*, seguido por especies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. En la última década existe un incremento de los niveles de resistencia a los antifúngicos en las distintas especies de *Candida* spp., a causa del excesivo uso de antimicóticos que, junto con el aumento de inmunosupresión en la población, se convirtió en uno de los problemas emergentes más importantes en el ámbito de la salud (Bilbao, 2018).

Las técnicas para el estudio del perfil de susceptibilidad antifúngica son utilizadas para la identificación y selección de antimicóticos clínicamente efectivos en el tratamiento, frente a una especie específica del patógeno. En el caso de candida no siempre es necesario por la posibilidad de predecirse el comportamiento según su especie, pero por el surgimiento de resistencias y aumento de infecciones por especies resistentes crece la necesidad del uso de estas técnicas (Kirmani, Woeltje, & Babcock, 2014)-. Actualmente, uno de los métodos automatizados validado por el CLSI es *Vitek 2 yeast susceptibility test* para detección de la concentración mínima inhibitoria (CMI) e identificación de levaduriformes. Este es de los más utilizados a nivel de laboratorio clínico y, de gran importancia en el tratamiento de candidemias. Sin embargo, este se limita únicamente al reporte de anfotericina B, caspofungina, fluconazol, flucitosina, micafungina y voriconazol. Es por esta razón que la microdilución en caldo es el método de referencia que permite conocer la CMI de otros antimicóticos, que podrían ser utilizados en el tratamiento, tales como voriconazol y anidulafungina (Ochiuzzi et al., 2014).

La técnica de microdilución en caldo no se encuentra disponible en la mayoría de laboratorios que realizan diagnósticos y seguimiento de microbiología clínica, por lo que la estandarización de este método para antifúngicos empleados para el tratamiento en candidiasis permitirá evaluar la presencia de resistencias en ciertas especies de candida de manera *in vitro* que puedan interferir con la concentración mínima inhibitoria de los antifúngicos durante el tratamiento *in vivo* de las infecciones por *Candia* spp. (Marcos-Zambrano, 2018). Los antifúngicos sugeridos son voriconazol, dentro de la familia de los azoles y anidulafungina de la familia de las equinocandinas; por su uso en el tratamiento de candidiasis.

Además, al implementar esta técnica y el análisis subsecuente del perfil de susceptibilidad de las cepas de *Candida* spp., se podrán plantear estudios para obtener el perfil de resistencia de cepas autóctonas en la ciudad de Quito, y que a su vez permitiría la presentación de mejores y más eficaces opciones terapéuticas, al ampliar el abanico de antifúngicos según especies. Especialmente pensando que *Candidas no albicans* son intrínsecamente resistentes a algunos de los tratamientos de primera línea (Guerrero, 2016).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Las candidiasis son las infecciones micóticas más comunes, siendo enfermedades cosmopolitas que afectan con regularidad a piel, uñas, mucosas de boca y órganos genitales. Inclusive, se reporta que las infecciones por *Candida* spp. son la tercera causa de infecciones en el torrente sanguíneo y una de las principales razones de hospitalización en pacientes inmunodeprimidos (Bilbao, 2018). A esto se suma el cambio del patrón epidemiológico y el aumento de la aparición de resistencias a antifúngicos, ya que debido al uso indiscriminado de agentes antimicóticos se ha incrementado la aparición de diversos mecanismos de resistencia y el desplazamiento de cepas de candida sensibles. En consecuencia, las candidemias por *C. albicans* y *C. tropicalis* sensibles han disminuido mientras que por *C. krusei* y *C. glabrata* están en aumento por sus características de resistencia intrínseca o desarrolladas (Zurita, 2018).

La detección de las resistencias que poseen las especies de *Candida* spp. es importante para instaurar un tratamiento adecuado según el tipo de infección. Las técnicas de difusión en disco y la microdilución en caldo, estandarizados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), son métodos fiables para realizar estudios de susceptibilidad antifúngica (Zurita, 2018). La cuantificación de la actividad antifúngica de manera *in vitro* evalúa la eficacia de un posible tratamiento *in vivo* por medio de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), considerado como *gold estándar*, lo cual genera una interpretación cuantitativa de acuerdo a puntos de corte establecidos por el CLSI permitiendo categorizar los resultados obtenidos como sensible, sensible dependiente de dosis o resistente, que a su vez facilita la elección terapéutica (López-Ávila, Lugo-Caballero, Arias-León, Zavala-Castro, & Dzul-Rosado, 2016).

Mediante la aplicación de las técnicas ya estandarizadas se ha podido probar el estudio de las resistencias y confirmar el aumento de estas. Por ejemplo, el fluconazol dentro del estudio “ARTEMIS” llevado a cabo entre 1997-2005 concluye que en la mayoría de las cepas de candidas han duplicado los porcentajes de resistencia (Zurita, 2018). Además, es importante recalcar que en la literatura se cita a la ausencia de la implementación de técnicas de estudio de la sensibilidad y a la falta de estudios epidemiológicos, como la causa principal para esta emergencia de resistencias. Por lo que es importante la implementación de la técnica de microdilución en caldo, considerando sus limitaciones: ausencia de puntos de corte para algunos fármacos antimicóticos, crecimiento residual que se ha observado con fungistáticos y dificultad de crecimiento de algunas cepas como *C. neoformans* (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012).

Debido a que las investigaciones realizadas referente a resistencia antifúngica son escasas, principalmente en especies de candidas; el propósito de esta investigación es la identificación fenotípica de cepas de *Candida* spp. y la implementación del método de microdilución en caldo para determinar perfiles de resistencia contra voriconazol y anidulafungina con el fin de mejorar las opciones terapéuticas según especies, ya que las *Candidas no albicans* son intrínsecamente más resistentes (Guerrero, 2016).

### 1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la última década, el incremento en el uso de antimicóticos en el ámbito terapéutico y preventivo ha originado el incremento de resistencia lo que requiere una vigilancia terapéutica continua debido al cambio en el patrón etiológico, causando la sustitución de cepas de *Candida* sensibles por otras más resistentes, y la aparición de resistencias secundarias (Zurita, 2018). Por lo que el estudio de susceptibilidad se ha vuelto uno de los puntos más importantes tras la identificación del agente etiológico de una infección, de hecho, su reporte es imprescindible en la instauración de tratamiento terapéutico.

Los métodos recomendados son los establecidos por el CLSI, que contemplan puntos de corte para la determinación de la CMI (Sanabria et al., 2014). El problema se encuentra dentro de la implantación de la microdilución a nivel de laboratorio, y aunque es considerada como el *gold estándar* para la determinación de CMI de antifúngicos, presenta cierta complejidad en el proceso (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012). Teniendo en cuenta que requiere personal capacitado para llevarlo a cabo y que las condiciones del laboratorio eviten su contaminación, pero favorezcan su crecimiento, lo que lleva al uso de otras técnicas que se consideran más simples.

En la mayoría de los laboratorios clínicos, no se lleva a cabo un estudio completo de los agentes etiológicos de las infecciones micóticas. Sin embargo, algunos realizan antifungigramas principalmente por la técnica de difusión en disco como estudio cualitativo o por técnicas semiautomatizadas que permiten obtener un CMI aproximado (Zaragoza & Pemán, 2012). El método de difusión en disco carece de la determinación de CMI además de solo haber sido estandarizado para fluconazol y voriconazol. Por otra parte, los métodos semiautomatizados como el “Vitek 2” con las tarjetas AST-YSO1 o AST-YSO7 para el estudio de *Candida*, con una concordancia con el método de referencia mayor al 90%, se reconoce como útil en el reporte de anfotericina B, caspofungina, fluconazol, flucitosina, micafungina y voriconazol (Ochiuzzi et al., 2014). Si bien estos reportes son útiles, carecen de series de diluciones para otras opciones terapéuticas, como lo es la anidulafungina, por lo que se hace necesaria la ampliación de antifúngicos probados ante los crecientes niveles de resistencia encontrados, por lo tanto, una alternativa es la implementación de la técnica en microdilución en caldo que ayuda a identificar las resistencias en candidiasis. Esta es de gran utilidad para la identificación de resistencias en cepas de *Candida* spp. y, la implementación de distintos antifúngicos, ofrece una ampliación del abanico de posibilidades terapéuticas que pueden ser utilizados en el tratamiento (Ochiuzzi et al., 2014).

**Pregunta del problema:** ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina para las cepas de *Candida* spp? ¿Conservadas y almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador - Quito?

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Objetivo General**

Caracterizar el perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina por técnica de microdilución en caldo de cepas de *Candida* spp. almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Quito.

### **1.4.2 Objetivo Específicos**

- Implementar la técnica de microdilución en caldo para voriconazol y anidulafungina en cepas de *Candida* spp. ATCC.
- Identificar perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol y anidulafungina de las cepas aisladas *Candida* spp. almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica.
- Elaborar el procedimiento operativo estándar para determinación del perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina en *Candida* spp. por la técnica de micro dilución en caldo.

### **1.4.3 Limitaciones Del Estudio**

El estudio está limitado únicamente a la determinación del perfil de susceptibilidad en cepas previamente aisladas e identificadas fenotípicamente de *Candida* spp. enfocándose principalmente en la implementación de la técnica de microdilución en caldo para voriconazol y anidulafungina.

## CAPÍTULO II

### 2.1 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1.1 Antecedentes

En la actualidad, la candidiasis se ha convertido en la presentación clínica más habitual de la infección fúngica, afectando a mucosas orales y genitales, piel y uñas. No obstante, también existen candidemias invasoras con aumento en blastoconios/pseudohifas, variación fenotípica y formación de biopelículas que permite la difusión de candida en el organismo (Bilbao, 2018). Inclusive, en estudios realizados durante años subsecuentes se logró establecer la importancia de la presencia de enfermedades degenerativas del sistema inmune para su desarrollo, por lo que la candidiasis es clasificada como una micosis oportunista (Arenas, 2014).

El tratamiento actual para las candidemias consiste principalmente en el uso de anfotericina B, que, en algunos casos, puede causar daño renal pero que evita el problema de resistencias a azoles que *Candida* spp. ha desarrollado. De acuerdo con las guías terapéuticas otorgadas por *Infectious Diseases Society of America* se establece a las equinocandinas como caspofungina, micafungina y anidulafungina como las mejores alternativas en candidemias invasivas, especialmente en especies resistentes a azoles. Otra de las profilaxis usadas es la combinación de antimicóticos por vía oral, siendo destacados el fluconazol, ketoconazol y voriconazol como sustitutos tras 5-7 días de tratamiento y presentar evidencia de cepas sensibles a los azoles (Pappas et al., 2016).

El problema inminente que permanece en el campo de la salud es el desarrollo de resistencias a los principales antifúngicos de elección para tratamiento. Estudios de este fenómeno han denotado que dentro de los últimos años se ha presenciado un cambio constante del panorama, donde el incremento del uso de antifúngicos terapéuticos y preventivos originan un cambio en el patrón etiológico a *Candidas no albicans*. Esto significa la sustitución de cepas sensibles por otras más resistentes, y a la aparición de resistencias secundarias; lo que causa el incremento de resistencias que requiere una vigilancia continua (Zurita, 2018).

El principal mecanismo de resistencia antifúngica en las especies de candida es la capacidad de adhesión a células hospederas, además del dimorfismo, hidrofobicidad de la superficie celular del hongo, secreción de proteínas y cambio de fenotipo. En cuanto a las características genómicas, se describen mutaciones en los genes que codifican la síntesis de ergosterol y alteraciones en las bombas de exposición de fármacos, principalmente de azoles. Adicionalmente se identifican factores externos que contribuyen a la resistencia de candida tales como los: factores farmacológicos relacionados a la farmacocinética, farmacodinamia e interacciones fármaco-fármaco; y factores relacionados con los mecanismos de evasión del sistema de defensa del huésped (López-Ávila, et. al., 2016).

A la vez se han desarrollado métodos de estudio, semiautomatizados y microdilución en caldo, que permiten la identificación de la cepa tratada y el perfil de susceptibilidad a antifúngicos.

En los últimos años, principalmente los hospitales han popularizado el uso de métodos semiautomatizados como “Vitek 2”, considerado como una de las alternativas eficaces para este fin. Aunque las tarjetas reconocidas para uso en candidas son AST-YSO1 o AST-YO7, únicamente incluyen dentro de su reporte a algunos antimicóticos, excluyendo anidulafungina que pueden ser una buena opción terapéutica (Ochiuzzi et al., 2014).

La microdilución en caldo es el método considerado como *gold standard*, que permite determinar la CMI de los antifúngicos teniendo consideraciones para hongos levaduriformes. El CLSI redactó el primer documento estándar para la microdilución en caldo en 1992, que sería modificado y aprobado en 1997 para uso en microdilución en caldo con el manual M27-A, donde se determinan los puntos de corte para *Candida spp.* (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012).

## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 Candidiasis.**

La candidiasis es una enfermedad que se ha presentado desde la época de Hipócrates, donde se describieron placas blancas en boca de personas debilitadas y recién nacidos. Sin embargo, no fue sino hasta 1841 cuando T. Berg demostró el origen fúngico de estas lesiones y en 1844 logró el aislamiento de lo que hoy se conoce como *Candida albicans*. Demostrándose más tarde que esta especie no es el único agente etiológico de este tipo de enfermedades sino todo el género, descubriendo a *C. dublinensis* en candidiasis orales en 1995, el complejo *C. parapsilosis*, *C. nivariensis* en 2005, y *C. braccanensis* en 2006 (Arenas, 2014).

El término se refiere a la enfermedad micótica causada por las especies pertenecientes al género candida, afectando a piel, mucosas, uñas y órganos internos en casos excepcionales. Se la describe como una enfermedad oportunista ya que el 60% de las infecciones son de origen endógeno, afectando a pacientes como pacientes con SIDA, cáncer, recién nacidos o inmunocomprometidos por otras razones. Además, esta es una enfermedad cosmopolita, ya que es la que se presenta con mayor frecuencia en todo el mundo (Bonifaz, 2012).

### **2.2.2 Género candida y sus factores de virulencia.**

*Candida spp.* es una levadura polimórfica que puede variar desde la forma de levaduras de aspecto redondo a ovalado hasta la formación de pseudohifas, en observaciones in vivo o in vitro. Se reconoce en total la existencia de 20 especies, entre las que se encuentran: *C. guilliermondii*, *C. neoformans*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. krusei*, siendo esta última reconocida por su gran resistencia al tratamiento con antifúngicos. De esta manera se reconoció que, aunque las lesiones eran similares, existen varias especies que se consideran dentro del género candida como patógenos oportunistas en seres humanos (Picazo & Prieto, 2016).

Las cepas de candida presentan una serie de características que le aumentan su capacidad de patogenicidad y colonización, estos son considerados sus factores de virulencia que en algunos

casos están relacionados con una mayor capacidad de resistencia a antifúngicos. Estas pueden variar según el tipo de infección, ubicación anatómica y respuesta inmune del hospedero.

#### 2.2.2.1 *Transición dimórfica.*

Se refiere a la capacidad que posee, principalmente *C. albicans*, para tomar una forma filamentosa al infectar tejidos gracias a la capacidad de formar pseudohifas. Esta es una característica importante ya que tiene influencia en la expresión de otros factores de patogenicidad como los que se citan a continuación (Blanco, 2011).

#### 2.2.2.2 *Capacidad de adhesión.*

Se resalta a este nivel la formación de adhesinas y la alteración de la superficie de la propia pared celular para aumentar su energía negativa y facilitar la unión a plástico o tejidos del huésped. Esta tiene una gran relación con la hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de biocapas (Blanco, 2011).

Las adhesinas son moléculas de proteína, polisacáridos y glucoproteínas responsables de la adhesión por su acoplamiento y unión a receptores específicos de las células del huésped. De ellas resaltan las glucoproteínas denominadas ALS (Agglutinin-like sequence) que además de la adhesión también influyen en la formación de biocapa, con gran dependencia de las condiciones ambientales favorables a su desarrollo (Mitchell, 2010). Su estudio se ha desarrollado más en *C. albicans* que en las cepas de *C. no-albicans*.

De acuerdo con la composición de la superficie celular que presentan todas las especies del género *Candida*, esta es capaz de alterar la hidrofobicidad de las células hospederas y su respuesta inmunitaria (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013). Los estudios relacionados a esta cualidad determinan que a mayor hidrofobicidad mayor es la capacidad de adhesión al plástico, sobre todo en acrílicos (Blanco, 2011).

#### 2.2.2.3 *Formación de biocapas o biofilms.*

La producción de biocapa es un factor importante de virulencia ya que permite la protección de las colonias al sistema inmune y algunos antifúngicos, facilitando las infecciones sistémicas. Para la formación de biofilm el microorganismo debe ser capaz de crear y secretar una matriz extracelular de aspecto gelatinoso compuesta de hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fósforo y ácidos nucleicos en distintas proporciones para cada especie (Blanco, 2011). Esta capacidad es mayormente observada en las especies *C. albicans* y *C. parapsilosis* (Bonifaz, 2012).

#### *2.2.2.4 Producción de enzimas.*

Enzimas aspartilproteinasas secretadas (SAP) son un grupo de 10 enzimas que permiten la degradación de la membrana de las células del tejido infectado e inmunoglobulinas producidas en la respuesta inmune (Mitchell, 2010).

Fosfolipasa (PLB1) es una enzima es secretada tanto a nivel de las pseudohifas como en las levaduras, encargándose de actividad hidrolasa y lisofosfolipasatransacilasa (Mitchell, 2010).

### **2.2.3 Presentaciones clínicas de alta importancia.**

Las formas en las que se puede presentar la infección por el género candida se encuentran las formas cutáneo-mucosas, mucocutánea crónica y sistémica. De entre estas se resalta la importancia de su presentación sistémica por poner en riesgo la vida de pacientes con inmunidad comprometida por la falta de respuesta de su sistema inmune para combatir la infección (Murray, 2018).

#### *2.2.3.1 Candidiasis cutánea y de mucosas.*

Este tipo de candidiasis puede afectar a personas que presenten factores de riesgo como enfermedades autoinmunes o de inmunodeficiencia, y que hayan sido influenciados por algún traumatismo. Las lesiones pseudomembranosas blanquecinas y confluentes afectan en las mucosas bucales y genitales. Otras formas de candidiasis cutánea incluyen; la invasión de la piel, principalmente en zonas húmedas y calientes del cuerpo como axilas e inguinal, y la formación de onicomicosis en el pliegue ungueal (Mitchell, 2010).

#### *2.2.3.2 Candidiasis sistémica.*

Esta patología oportunista se caracteriza por ser un tipo de fungemia, que indica la presencia del microorganismo en el torrente sanguíneo que puede o no tener invasión de otros tejidos como corazón, pulmón, riñón y sistema nervioso central afectando a meninges. La presentación clínica de esta infección tiene gran influencia con un estado de inmunosupresión en el paciente, siendo asociada en una gran parte de casos con la presencia de catéteres o sondas (Picazo & Prieto, 2016).

### **2.2.4 Pruebas diagnósticas de laboratorio.**

Las diferentes especies de candida se pueden identificar utilizando métodos de laboratorio:

#### *2.2.4.1 Examen directo.*

Este método diagnóstico es el más sencillo para la visualización de la presencia o ausencia de formas levaduriformes. Para ello se realiza una suspensión con hidróxido potásico (KOH) de 5 a 20 %, el cual permite purificar los remanentes celulares de las muestras; este estudio

también se lo puede realizar con tinción de azul de lactofenol, permitiendo observar la morfología de las estructuras fúngicas (Arenas, 2014). Se debe resaltar que este no es específico para determinar casos de candidiasis, así como tiene poca sensibilidad para un diagnóstico definitivo por lo que se debe acompañar de otras técnicas de identificación.

#### 2.2.4.2 Cultivo.

Se realiza con el propósito de confirmar la patogenicidad de las levaduras aisladas, las cuales crecen rápidamente a temperatura ambiente y en los siguientes medios de cultivo:

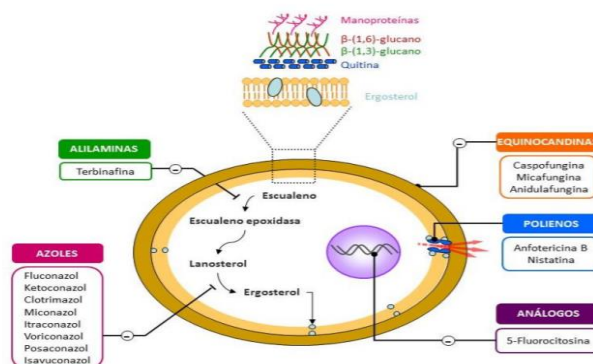
- Agar Sabouraud, es el principal medio de cultivo que se utiliza en micología para aislamiento de hongos, en ocasiones no es el idóneo, la combinación de antibióticos puede establecer un cultivo más puro al impedir el crecimiento bacteriano (Arenas, 2014).
- CHROMOagar, es un medio selectivo para hongos, puesto que se puede utilizar para el aislamiento simultáneo e identificación de especies de candida. Además, al añadir ciertos sustratos permite la detección directa de actividades enzimáticas características de levaduras, como la enzima hexosaminidasa que se encuentra en la estructura de *C. tropicalis* y *C. albicans* (Murray et al., 2013).

#### 2.2.4.3 Serología.

Los métodos inmunológicos permiten la detección de anticuerpos en suero, mediante la técnica de ELISA. Este tipo de ensayos también permiten monitorear el transcurso de la enfermedad y la respuesta del paciente al tratamiento (Murray, 2018).

### 2.2.5 Antifúngicos.

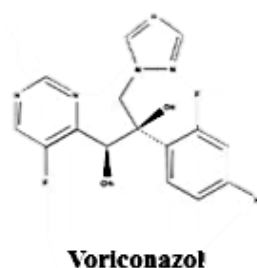
Los antifúngicos son fármacos que se han utilizado en el tratamiento de las infecciones micóticas por su capacidad fungistática o fungicida.



**Figura 1.** Familias de los principales antifúngicos y mecanismos de acción. (Sanchis, 2016)

### 2.2.5.1 Azoles.

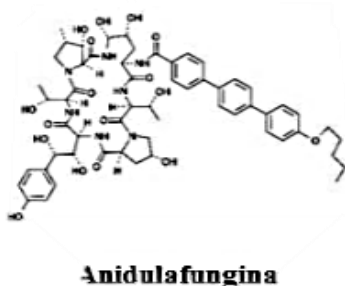
Estos antimicóticos se dividen en dos grupos estructurales imidazoles y triazoles. Ambos grupos actúan inhibiendo la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa dependiente del citocromo P450 fúngico, impidiendo la síntesis de la membrana celular del hongo. Los imidazoles constan de dos moléculas de nitrógeno en el anillo azólico, siendo ketoconazol el único que presenta actividad sistémica. Mientras que el anillo azólico de los triazoles está conformado por tres moléculas de nitrógeno, de los cuales fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol presentan actividad sistémica (Murray et al., 2013).



**Figura 2.** Estructura del voriconazol (Sanchis, 2011)

### 2.2.5.2 Equinocandinas.

Las equinocandinas son una clase de lipopéptidos semisintéticos, capaces de inhibir la síntesis de 1,3- $\beta$ -glucanos, componente de la pared celular del hongo, por lo que presenta una acción fungicida frente a especies de candida, incluidas las resistentes a fluconazol. Actualmente existen tres tipos de equinocandinas: anidulafungina, caspofungina y micafungina; todas con el mismo alcance antimicótico, por lo que son utilizados principalmente en candidiasis invasiva (Pfaller, 2012).



**Figura 3.** Estructura de la anidulafungina (Sanchis, 2011)

### 2.2.5.3 Antimetabolitos.

La principal antimetabolito que actúa como antifúngico es la flucitosina, que ejerce diversas actividades: interfiere en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), en la codificación del ácido ribonucleico (ARN) e inhibe la síntesis de proteínas de la célula fúngica. Su espectro antifúngico se limita al género *Candida* y ciertos hongos dematiáceos (Murray et al., 2013).

### 2.2.5.4 Amilaminas.

La principal actividad de las amilaminas es la inhibición de la enzima esculeno 2-3 epoxidasa, esto interfiere en la etapa inicial de la síntesis de ergosterol, componente esencial de la membrana del hongo, lo que conlleva a la disminución de la concentración de ergosterol y a un incremento de escualeno en la membrana celular del hongo. Este grupo de antifúngico incluye a terbinafina, con actividad sistémica, y a naftifina, compuesto tópico (Murray et al., 2013).

## 2.2.6 Tratamiento de elección.

Las infecciones por *Candida* spp. a nivel de las mucosas o piel tiene un tratamiento simple con el uso de azoles tópicos en la zona afectada, siendo preferidos el itraconazol, fluconazol, voriconazol, entre otros. Por otra parte, las enfermedades sistémicas requieren de un tratamiento más enérgico con el uso de azoles en primera instancia, acompañados de equinocandinas o anfotericina B. En casos de infección por *C. glabrata* y *C. krusei* se utiliza como antifúngicos de primera línea a las equinocandinas como la anidulafungina y caspofungina o la anfotericina B; puesto que son más resistentes intrínsecamente a los azoles (Murray, 2018). Finalmente, se puede resaltar la importancia del reconocimiento de la cepa en cuestión para la elección del mejor tratamiento, ya que el mal uso de los antifúngicos ha generado un problema con la existencia de resistencias.

## 2.2.7 Métodos de investigación de susceptibilidad.

### 2.2.7.1 Método de dilución en caldo.

Considerado como *gold standard* para la determinación del perfil de susceptibilidad en levaduriformes, puesto que mide cuantitativamente la concentración mínima inhibitoria del antifúngico estudiado. Este método fue aprobado en el año 1997 para estudiar la susceptibilidad antifúngica en especies del género *Candida*, y estandarizado por el CLSI en el documento M27-A, aprobado desde 1997 (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012).

### 2.2.7.2 Método de difusión en disco.

Método simple, estandarizado por el CLSI en el documento M44-P para especies de *Candida* en el que se establecen puntos de corte de acuerdo con el diámetro de la zona de inhibición que

presente el disco de sensibilidad específicamente de fluconazol y voriconazol, siendo los únicos antifúngicos disponibles en este método (Pfaller, 2012).

#### 2.2.7.3 Métodos semiautomatizados.

Este método es más comercializado en centros de salud y hospitales, por su facilidad y rapidez en los resultados. *Vitek 2 yeast susceptibility test* es un método automatizado que determina la CMI mediante lecturas espectrofotométricas y permite obtener un resultado estandarizado por el CLSI. Una de las ventajas de este método es la identificación simultánea de levaduras; sin embargo, este se limita únicamente al reporte de anfotericina B, caspofungina, fluconazol, flucytosa, micafungina y voriconazol (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012).

#### 2.2.8 Resistencia antifúngica identificadas.

Según Zurita (2018), este es un problema que se desarrolló principalmente por un uso indiscriminado de los antifúngicos sin consideración de la sensibilidad de que la cepa presente ante el mismo. Esto ha permitido el cambio del patrón etiológico a cepas intrínsecamente más resistentes como la *C. krusei* y la evolución de otros mecanismos para la resistencia como lo son la sobreexpresión de bombas de expulsión o cambios en la composición de la molécula blanco, como las enzimas de síntesis el ergosterol.

#### 2.2.9 Perfiles de susceptibilidad encontrados en candidas.

Si bien hasta el momento no se han alcanzado niveles preocupantes de la presencia de cepas resistentes en otros países de la zona sudamericana y se sugiere aun el uso de fluconazol como tratamiento inicial, se debe notar la existencia de un cierto porcentaje de aislamientos que presentan resistencia a azoles, donde se prefiere el uso de otros antifúngicos. En el estudio de Zurita (2018) en el Perú, se identificó que el 2.6% de las muestras estudiadas presentan resistencia al fluconazol y un 10.7% considerados como sensibles dosis dependiente al antifúngico. Específicamente para estos casos es prudente la correcta identificación de la cepa de *Candida* spp. y su perfil de sensibilidad para elegir el tratamiento correcto.

### 2.3 MARCO CONCEPTUAL

- Antifungigrama: prueba de estudio de la sensibilidad que tienen agentes micóticos hacia los antifúngicos (Sanabria et al., 2014).
- Candidemia: infección sistémica demostrada por el aislamiento de *Candida* spp. en hemocultivo (Arenas, 2014).
- Candidiasis: infección de origen micótico causada por *Candida* spp. en piel, mucosa, órganos internos o estructuras profundas (Arenas, 2014).

- Concentración Mínima Inhibitoria: concentración mínima de antifúngico que disminuye el crecimiento microbiano en comparación del control de crecimiento libre antifúngico (Marcos-Zambrano, 2018).
- Resistencia antifúngica: resistencia es una variación de la sensibilidad o susceptibilidad a un antifúngico, este puede ser medido de manera *in vitro* por métodos de laboratorio (López-Ávila et al., 2016).
- Sensibilidad antifúngica: limitación del crecimiento de un microorganismo por acción de un antimicótico (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012).
- Sensibilidad dependiente de la dosis: la inhibición del desarrollo micótico es dependiente de la concentración del antifúngico (Ochiuzzi et al., 2014).

## CAPÍTULO III

### 3.1 MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1.1 Materiales y métodos

##### 3.1.1.1 Tipo de Estudio

El estudio realizado es de tipo descriptivo, transversal, porque no se interviene en la unidad de análisis (cepas de *Candida spp.* aisladas y conservadas en el laboratorio de Micología Clínica) ya que únicamente se observan las características de sensibilidad o resistencia ante voriconazol y anidulafungina con ayuda de la técnica de microdilución en caldo para la obtención del CMI (concentración mínima inhibitoria), y transversal, porque las mediciones se realizaron una sola vez en el tiempo.

##### 3.1.1.2 Tipo de muestreo

El muestro considerado fue no probabilístico por conveniencia, al seleccionar directa e intencionalmente todas las cepas de *Candida spp.* conservadas y almacenadas en el laboratorio de docencia de Micología Clínica de la PUCE que cumplieran los criterios, siendo de suma importancia que demuestren su viabilidad como punto de partida para la parte práctica.

##### 3.1.1.3 Tamaño de muestra

La unidad de análisis corresponde a cepa de *Candida spp.*, dado que la muestra está conformada por todas las cepas de *Candida spp.* almacenadas en el laboratorio de docencia de Micología Clínica que cumplan con los criterios de inclusión especificados en el estudio.

Finalmente, la muestra estuvo compuesta de 40 cepas que cumplieron con los criterios de aceptación, todas ellas fueron probadas con la técnica de microdilución en caldo para la obtención de su CMI y determinación de perfil de susceptibilidad.

##### 3.1.1.4 Criterios de inclusión

- Cepas identificadas como *Candida spp.*
- Cepas de *Candida spp.* viables, presentan desarrollo en medio de cultivo.

##### 3.1.1.5 Criterios de exclusión

- Cepas mal identificadas o con datos incompletos.
- Viales con cepas contaminadas por otros microorganismos que puedan alterar el estudio.
- Viales con doble población.
- Cepas que no se puedan recuperar mediante cultivo para su desarrollo.

### 3.1.1.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con ayuda de Microsoft Excel, en el que se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de las cepas de *Candida* sensibles y resistentes a los antifúngicos: voriconazol y anidulafungina, las mismas que se presentaron en tablas y gráficos correspondientes.

## 3.2 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

### 3.2.1 Variable Principal

Microdilución en caldo.

### 3.2.2 Variable Secundaria

Perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina de las cepas de *Candida* spp. Almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE.

**Tabla 1.**

*Operacionalización de las variables*

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Categoría	Tipo de variable/ Escala de medición	Indicador	Técnica	Instrumento
Implementar la técnica de microdilución en caldo para voriconazol y anidulafungina en cepas de <i>Candida</i> spp. ATCC.	Microdilución en caldo	Concentración mínima de antibiótico/antifúngico a la que no se observa crecimiento microbiano.	Concentración mínima de antifúngico donde no se evidencia crecimiento de la colonia	Precisión Exactitud Variabilidad intraoperador		Cuantitativa Continua	CV (%) Sesgo Coeficiente de Pearson (r)	Prueba de laboratorio.	Guía M27-A: técnica de microdilución en caldo
Identificar perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol y anidulafungina de las cepas aisladas <i>Candida</i> spp. almacenadas en el laboratorio de investigación de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE	Perfil de Susceptibilidad a voriconazol  Perfil de susceptibilidad a anidulafungina	Estado de sensibilidad o resistencia de un microorganismo a distintos químicos (antibióticos/antifúngicos).	Estado de sensibilidad o resistencia de las cepas de candida estudiadas frente a voriconazol y anidulafungina.	<i>Candida albicans</i>  <i>Candida no albicans:</i> <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. auris</i> <i>C. guilliermondii</i>	Sensible  Resistente	Cualitativa Nominal	# de cepas aisladas de <i>Candida</i> spp. con sensibilidad antifúngica.  # de cepas aisladas de <i>Candida</i> spp. con resistencia antifúngica.	Prueba de laboratorio y observación	Registros de aislamiento y reporte de identificación POE.

Nota: POE = procedimiento operativo estándar

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2019

### **3.3 MATERIALES Y PROCESO**

#### **3.3.1 Materiales**

Resiembra de cepas almacenadas

- Agar Sabouraud con cloranfenicol

Técnica de microdilución en caldo

- Agar RPMI 1640
- Microtest de 96 pocillos fondo plano estériles

Materiales complementarios de laboratorio

- Cajas Petri plásticas
- Placas portaobjetos de vidrio
- Placas cubreobjetos de vidrio
- Mechero de bunsen
- Asas calibradas
- Puntas desechables
- Pipeta 10-100  $\mu\text{L}$
- Pipeta multicanal de 20-200  $\mu\text{L}$
- Pipeta 100-1000  $\mu\text{L}$
- Gradillas

#### **3.3.2 Reactivos**

- Agua destilada
- DMSO
- Voriconazol
- Anidulafungina
- MOPS

#### **3.3.3 Equipos**

- Microscopio óptico
- Incubadora 35 °C
- Ultracongelador -80 °C
- Refrigeradora -20 °C
- Computadora

### **3.4 PROCEDIMIENTO**

Este estudio se realizó con una estructura de cuatro fases:

### **3.4.1 Fase Uno**

#### *3.4.1.1 Solicitudes, autorizaciones y aprobaciones*

Para realizar la investigación se requirió:

- La solicitud a la autoridad el permiso respectivo para el uso de cepas *Candida* spp. almacenadas y conservadas en el Laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo 1).
- La aprobación del estudio por el Subcomité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

### **3.4.2 Fase Dos**

#### *3.4.3.1 Selección de las cepas de candida para estudio*

Se revisaron los registros de las cepas almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica para determinar aquellas que cumplen con los criterios de inclusión y exclusión. Por lo que al final se trabajó con 40 cepas para identificar el perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina.

### **3.4.3 Fase Tres**

Las cepas se encuentran preservadas en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por lo tanto, se procedió a retirar de la congeladora los viales correspondientes a las cepas de interés para procesarlos como se detalla a continuación.

#### *3.4.3.1 Resiembra de cepas almacenadas*

Luego de descongelamiento, las cepas fueron sembradas en agar Sabouraud con cloranfenicol para la obtención de cepas viables y puras, que será observado con ayuda de coloración Gram. La técnica utilizada fue la siembra de placa por agotamiento, con ayuda de un asa calibrada, e incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h para observar el desarrollo.

Para verificar la pureza del crecimiento, se realizó extendidos de la cepa aislada y luego fijación de la placa con coloración Gram y se visualizó el extendido con ayuda del microscopio de campo claro. Los pasos se detallan en el POE de Anexo 2.

#### *3.4.3.2 Técnica de microdilución en caldo*

- El procedimiento se detalla en la guía CLSI M27-A3, en el Anexo 2 se presenta el procedimiento operativo estándar para determinación del perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina en *Candida* spp. por la técnica de micro dilución en caldo. A continuación, se presentan en breve los diferentes pasos que involucra esta técnica.

*a. Preparación de solución madre de antifúngicos*

El voriconazol y la anidulafungina son antifúngicos insolubles en agua por lo que deben ser diluidos con DMSO, con el objetivo de obtener una solución de 1.600 µg/ml o equivalente a 100 veces superior a la concentración más alta a ensayar. La dilución se puede conservar en congelación a -80°C durante 6 meses o a -40°C por 2 meses.

*b. Preparación de diluciones de antifúngicos y llenado de placas.*

Se realizaron diluciones seriadas para concentraciones entre 16 y 0.03 µg/mL, con el uso de DMSO como diluyente. Una vez que las concentraciones de los antifúngicos estuvieron preparadas, se dispensaron 100 µL de solución en las placas Microtest de 96 pocillos fondo plano estériles. Cada dilución específica llena una de las columnas, es decir que la primera dilución del antifúngico va en la segunda columna de las placas y así sucesivamente, considerando que la columna 12 siempre se llena con el control de crecimiento y los pocillos de la columna 1 se llenan con el control de esterilidad.

*c. Preparación del inóculo.*

Desde las cepas aisladas en agar Sabouraud de la segunda siembra de la cepa, se recolecta 5 colonias de aproximadamente,  $\geq 1$  mm con crecimiento de 24 horas, y se diluyeron en solución salina hasta obtener una dilución 0.5 McFarland. Finalmente, se adicionaron al caldo de cultivo en una dilución 1:1000, para obtener una concentración final de  $1-5 \times 10^3$  UFC/mL.

*d. Inoculación de placas e incubación.*

Se dispensaron, en los pocillos 2-12 de la placa de Microtest previamente preparada con las diluciones antifúngicas, 100 µL de la suspensión de la levadura de ensayo. Terminada la inoculación de las placas, se sellaron e incubaron a 35°C durante 24h y 48h según el antifúngico utilizado.

*e. Consideraciones de lectura de resultados.*

La lectura del crecimiento se realizó de manera visual. La CMI es la concentración mínima de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura, comparada con el crecimiento control.

La lectura para anidulafungina se la realizó a las 24 horas y para voriconazol a las 48 horas de incubación. La Guía CLSI recomienda agitar ligeramente la placa para obtener mejores resultados al obtener una solución homogénea.

Se analizaron los resultados obtenidos por comparación con las tablas y puntos de corte determinados para *Candida* spp. en el CLSI M27-A3.

### 3.4.3.3 Control de calidad de los procedimientos de laboratorio

Posterior a la selección de las cepas de *Candida* spp., almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la PUCE que cumplieron con los criterios de aceptación y exclusión de este estudio, se replicaron en Agar Sabouraud con cloranfenicol, se incubaron a 35 °C por 24 horas para después realizar una resiembra de en el mismo medio de cultivo a la misma temperatura de incubación por 24 horas más. Se procedió a realizar una coloración Gram a las cepas de la segunda siembra para así confirmar la viabilidad de estas.

El medio de cultivo para la microdilución se evaluó al colorar 200 µL los pocillos de la columna 1 de la placa Microtest estéril con el caldo RPMI 1640 sin inóculo, determinando que el caldo no tenga ninguna contaminación, y los pocillos de la columna 12 contienen la inoculación de la suspensión de levaduras de cada ensayo con RPMI y DMSO, como control de crecimiento de las cepas.

La Guía CLSI, para esta técnica, recomienda el uso de cepas ATCC para el control de calidad, y la detección de anomalías o desactivación del antifúngicos. Las cepas recomendadas por su estabilidad genética y puntos de corte conocidos de CMI son *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019, las cuales se probaron en 24 repeticiones en cada antifúngico para obtener resultados que se utilizaron en el cálculo estadístico de precisión, exactitud y variación intraoperador, indicadores de nuestra principal variable.

## 3.4.4 Fase Cuatro

### 3.4.4.1 Análisis Estadístico de datos

Para la recolección de la información se empleó una hoja electrónica (Microsoft Excel 2013) en la que constan los reportes de resultados correspondientes, tomando en consideración los puntos de corte propuestos en la guía CLSI M-27 para la obtención de la precisión, exactitud y variabilidad intraoperador necesarios para la implementación de microdilución en caldo para antifúngicos en candida.

El análisis estadístico se realizó con ayuda de Microsoft Excel, en el que se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de las cepas de candida sensibles y resistentes a los antifúngicos: voriconazol y anidulafungina, las mismas que se presentaran en tablas y gráficos correspondientes.

## 3.4.5 Fase Cinco

### 3.4.5.1 Redacción de procedimiento operativo estándar (POE)

Una vez que se hubo implementado la técnica y probado su validez con las cepas de candida, se redactó el POE correspondiente, incluido en el anexo 2. El cual incluye un formato de ficha de proceso, en el que contarán los pasos y consideraciones para llevar a cabo la determinación del CMI mediante la técnica de microdilución en caldo según la guía M-27 del CLSI.

## CAPÍTULO IV

### 4.1 RESULTADOS

Para el presente estudio se utilizó el método indicado por el CLSI en su guía M27-A3. El cual, se desarrolla en el POE que se encuentra en el Anexo 2, donde se sugiere al medio RPMI 1640 con glutamina y 0.2% de glucosa, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS), como el medio de cultivo de elección.

El procedimiento muestra que los antifúngicos son insolubles en agua por tal razón fueron reconstituidos y diluidos en dimetil sulfóxido (DMSO) en conjunto con el medio de cultivo para obtener concentraciones entre 16 - 0,03 ug/mL. Cada dilución del antifúngico se colocó en las placas microtest estériles de fondo redondo en los pocillos de las columnas 2 a la 11 respectivamente. Los pocillos de la columna 1 son llenados únicamente con el medio RPMI sin inocular para actuar como control de esterilidad y los pocillos de la columna 12 son llenados con el medio de cultivo e inoculados para evaluar el crecimiento de las cepas sin antifúngico, siendo llamado control de crecimiento. La lectura de resultados se realizó de forma visual, siendo el CMI el pocillo con una notable disminución del crecimiento microbiano (anexo 4, figura 5).

#### 4.1.1 Implementación de la técnica de microdilución en caldo para voriconazol y anidulafungina.

Al ser la microdilución en caldo una técnica considerada cuantitativa es necesario efectuar la validación estadística. El control de calidad en microbiología define la necesidad de realizar más de 20 repeticiones con cada una de las cepas control en los antifúngicos a analizar. En el caso de este estudio se obtuvieron 24 repeticiones por cada uno de los antifúngicos. Además, estos datos permitieron demostrar que el método posee una gran estabilidad y desempeño.

En la tabla 2 se visualiza el número de concentración mínima inhibitoria obtenidos mediante la técnica de microdilución en caldo para voriconazol con las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 procesado por dos operadores. En la primera cepa control nombrada, el operador 1 adquirió 9/12 repeticiones de CMI en 0.5 ug/mL y 3/12 repeticiones de CMI en 0.25 ug/mL, mientras que el operador 2 logró 12/12 repeticiones de CMI en 0.25 ug/mL (intervalo de CMI establecido por el CLSI para *C. krusei* ATCC 6258 en voriconazol: 0.125-1 ug/mL). Para *C. parapsilosis* ATCC 22019 tanto el operador 1 y 2 consiguieron 12/12 repeticiones de CMI en 0.03 ug/mL (intervalo de CMI establecido por el CLSI para *C. parapsilosis* ATCC 22019 en voriconazol: 0.03-0.125 ug/mL). Esta última cepa control es en la que se consiguió un porcentaje del 100% en repetibilidad y reproducibilidad para voriconazol.

**Tabla 2.**

Resultados de las lecturas del CMI en la técnica de microdilución en caldo para voriconazol con las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019

VORICONAZOL				
Concentración de antifúngico	<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	
	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
<b>16 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>8 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>4 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>2 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>1 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>0.5 ug/MI</b>	9	12	0	0
<b>0.25 ug/MI</b>	3	0	0	0
<b>0.125 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>0.06 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>0.03 ug/MI</b>	0	0	12	12
TOTAL LECTURAS	12	12	12	12
TOTAL REPETICIONES	24		24	

Elaborado por: Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

Los resultados, de los dos operadores, de las lecturas de CMI en la técnica de microdilución en caldo para anidulafungina con las cepas control se resaltan en la tabla 3. Para *C. krusei* ATCC 6258 el operador 1 consiguió 11/12 repeticiones de CMI en 0.06 ug/MI y 1/12 repeticiones de CMI en 0.03 ug/MI, el operador 2 logró 12/12 repeticiones de CMI en 0.06 ug/MI (intervalo de CMI determinado por el CLSI para *C. krusei* ATCC 6258 en anidulafungina: 0.03-0.125 ug/MI). En tanto que para *C. parapsilosis* ATCC 2201 los dos operadores obtuvieron 12/12 repeticiones de CMI en 0.5 ug/MI (intervalo de CMI establecido por el CLSI para *C. parapsilosis* ATCC 22019 en anidulafungina: 0.25-2 ug/MI). Así mismo, en anidulafungina se alcanzó una reproducibilidad y repetitividad de los dos operadores de un 100% en *C. parapsilosis* ATCC 2201.

**Tabla 3.**

Resultados de las lecturas del CMI en la técnica de microdilución en caldo para anidulafungina con las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019

ANIDULAFUNGINA				
Concentración de antifúngico	<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	
	Operador 1	Operador 2	Operador 1	Operador 2
<b>16 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>8 ug/MI</b>	0	0	0	0
<b>4 ug/MI</b>	0	0	0	0

2 ug/MI	0	0	0	0
1 ug/MI	0	0	0	0
0.5 ug/MI	0	0	12	12
0.25 ug/MI	0	0	0	0
0.125 ug/MI	0	0	0	0
0.06 ug/MI	11	12	0	0
0.03 ug/MI	1	0	0	0
TOTAL LECTURAS	12	12	12	12
TOTAL REPETICIONES	24		24	

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

#### 4.1.1.1 Precisión

La precisión es un valor cuantitativo que refiere el grado de discrepancia o de dispersión en una serie de mediciones replicadas, esta se expresa a través de la desviación estándar y por el coeficiente de variación. Una menor desviación estándar implica un menor coeficiente de variación y por lo tanto una mayor precisión del método. En este estudio se realizó un cálculo y análisis de la desviación estándar SD y coeficiente de variación CV, para cada cepa control y antifúngico.

En la tabla 4 se presenta el análisis realizado para la desviación estándar SD y el coeficiente de variación CV de las cepas control utilizadas en voriconazol, como se puede apreciar *C. parapsilosis* ATCC 22019 muestra una menor desviación estándar (1.77203E-17) y coeficiente de variación (0.00%), esto implica que esta cepa control tiene una mayor precisión frente a *C. krusei* ATCC 6258 en este antifúngico.

**Tabla 4.**

*Validación estadística de la precisión para voriconazol.*

VORICONAZOL		
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
MEDIA	0.46875	0.03
Desviación Estándar (SD)	0.084457991	1.77203E-17
Coeficiente de Validación (CV %)	18%	0.00%

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

En la tabla 5 se muestra los resultados conseguidos del análisis de precisión en anidulafungina. Al igual que en voriconazol la cepa control *C. parapsilosis* ATCC 22019 tiene una menor desviación estándar (2.04124E-06) y coeficiente de variación (0.00%), lo que representa que posee mayor precisión frente a *C. krusei* ATCC 6258 en anidulafungina.

**Tabla 5.***Validación estadística de la precisión para anidulafungina.*

ANIDULAFUNGINA		
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
MEDIA	0.05875	0.500009583
Desviación Estándar (SD)	0.006123724	2.04124E-06
Coefficiente de Variación (CV %)	10%	0.00%

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

#### 4.1.1.2 Exactitud

La exactitud demuestra la proximidad de una medida a su valor aceptado y se expresa en términos de error, es decir que está asociada con el valor verdadero del método. Para la validación de esta técnica se determinó el porcentaje de error absoluto, error relativo, y el porcentaje de recuperación. Este último es el cociente entre la cantidad de analito medido y el contenido en la muestra, en mediciones experimentales puede perderse el analito, dando lugar a porcentajes menores. El análisis estadístico específico realizado para cada antifúngico y cepa control probada se encuentra en las tablas 6 y 7, donde se puede resaltar que la cepa *C. krusei* ATCC 6258 alcanzó una exactitud mayor frente a la cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 en los dos antifúngicos.

En la tabla 6 se encuentra la validación estadística de la exactitud para voriconazol, en la que se obtuvo un porcentaje de recuperación del 100% en *C. krusei* ATCC 6258, siendo el método empleado aceptable para esta cepa control; de igual manera, se consiguió un 0.00% en error relativo y error absoluto para esta cepa. Esto indica que en voriconazol se logró mayor exactitud en *C. krusei* ATCC 6258.

**Tabla 6.***Validación estadística de la exactitud para voriconazol.*

VORICONAZOL		
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
% Error Relativo	0.00%	-74.19%
% Recuperación	100%	26%
Error Absoluto	0.00%	8.63%

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

En la tabla 7 se aprecia que en la validación estadística de la exactitud para anidulafungina que *C. krusei* ATCC 6258 mantiene un porcentaje de aceptación más cercano a 100 (82%), así como un menor porcentaje de error relativo (-18%) y error absoluto (1.292%), demostrando que esta cepa logró mayor exactitud en este antifúngico.

**Tabla 7.***Validación estadística de la exactitud para anidulafungina.*

ANIDULAFUNGINA		
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
% Error Relativo	-18.02%	-46.67%
% Recuperación	82%	53%
Error Absoluto	1.292%	43.74%

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

#### 4.1.1.3 Variabilidad Intraoperador

El coeficiente de correlación de Pearson permite medir el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente (variabilidad intraoperador). En la tabla 8 se encuentra el coeficiente de correlación entre las cepas control usadas en cada antifúngico; la interpretación de esta establece que cuando el valor es igual a 1 es una correlación directa perfecta, lo que significa que, si una de las dos variables cambia, la otra cambia exactamente igual; esto se muestra en el caso de la relación entre las mismas cepas control con el mismo antifúngico (*C. Krusei* ATCC 6258 en voriconazol y *C. Krusei* ATCC 6258 en voriconazol); si el valor es igual a 0 no representa una relación como es en el caso de voriconazol, en el que comprueba la misma relación con cualquiera de las cepas control (*C. Krusei* ATCC 6258 en voriconazol y *C. parapsilosis* ATCC 22019 en voriconazol).

Por otro lado; si el valor es entre  $-1$  y  $0$  indica una relación inversa, esto quiere decir que, si una variable cambia, la otra lo hace de forma inversa pero no exacta, esto se presenta en la relación de la misma cepa control con distinto antifúngico (*C. Krusei* ATCC 6258 en voriconazol y *C. Krusei* ATCC 6258 en anidulafungina). Por el contrario, cuando el valor se encuentra entre  $0$  y  $1$  existe una relación directa pero no exacta, en este análisis se visualiza este tipo de relación en diferentes cepas con diferentes antifúngicos (*C. Krusei* ATCC 6258 en voriconazol y *C. parapsilosis* ATCC 22019 en anidulafungina).

**Tabla 8.***Coeficiente de correlación de Pearson.*

	Voriconazol <i>C. krusei</i> ATCC 6258	Voriconazol <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Anidulafungina <i>C. krusei</i> ATCC 6258	Anidulafungina <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Voriconazol <i>C. krusei</i> ATCC 6258	1	0	-0.07881104	0.551677284
Voriconazol	0	1	5.55594E-15	-1.01859E-10

<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019				
Anidulafungina <i>C. krusei</i> ATCC 6258	-0.078811041	5.55594E-15	1	-0.043478261
Anidulafungina <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.551677284	-1.01859E-10	-0.04347826	1

**Nota:**  $r = -1$  correlación inversa perfecta,  $(-1 < r < 0)$  correlación inversa,  $r = 0$  no hay correlación,  $0 < r < 1$  correlación directa,  $r = 1$  correlación directa perfecta.

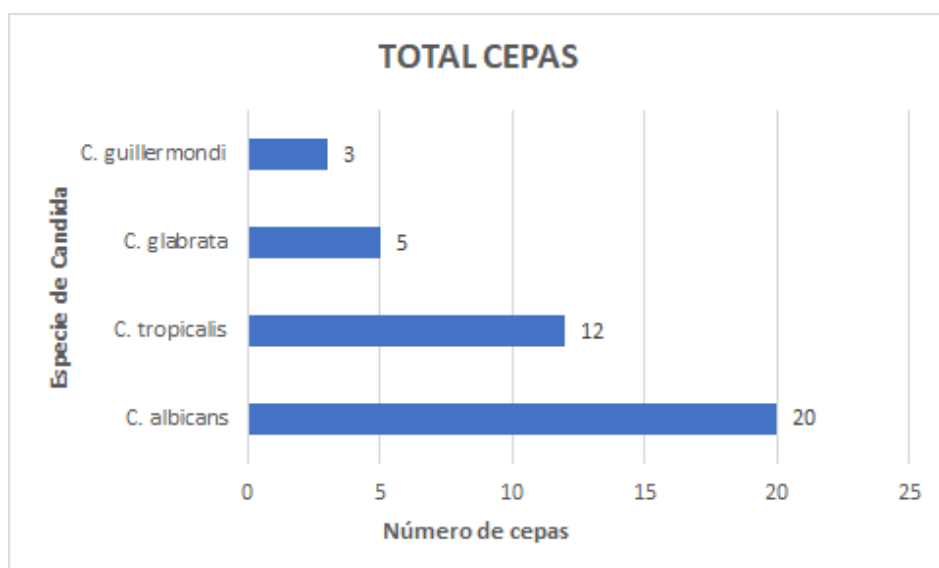
**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

Los datos demuestran una correlación directa perfecta para los mismos antifúngicos probados por distintas operadoras. No hubo correlación en voriconazol entre las distintas cepas, mientras que en anidulafungina hubo una correlación inversa.

#### **4.1.2 Identificación de perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol y anidulafungina de las cepas aisladas *Candida* spp. almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica.**

##### *4.1.2.1 Población del cepario usada para la identificación de perfiles de susceptibilidad.*

Se trabajó con 40 cepas de *Candida* spp. previamente identificadas y conservadas en el laboratorio de docencia de Micología Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La distribución porcentual de la población se visualiza en la Figura 1; señalando que la cepa más frecuente fue *C. albicans* en un 50% (20/40), mientras que para las especies de *Candida* consideradas dentro del grupo de *Candida no albicans* se obtuvo frecuencias de 30% (12/40) para *C. tropicalis*, 12.5% (5/40) para *C. glabrata* y 7.5% (3/40) para *C. guilliermondii*. No se consiguieron cepas viables que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión de este estudio en las especies *C. parapsilosis* y *C. krusei*, a pesar de la existencia de registros de estas en el cepario, razón por la que no se pudieron incluir en este proyecto.



**Figura 4.** Población del cepario usada para la identificación de perfiles de susceptibilidad.

Las cepas descritas fueron sometidas a la técnica de microdilución en caldo frente a voriconazol y anidulafungina siguiendo los lineamientos del POE (anexo 2). Todos los datos presentados fueron obtenidos por duplicado, confirmando de esta forma el resultado. La validación de la correcta aplicación de la técnica se revalidó con los pocillos 1 y 12, que corresponden al control de esterilidad y control de crecimiento respectivamente (anexo 4, figuras 6 y 7). EL CMI conseguido para cada cepa fue comparado con los rangos de la guía M27 para ser clasificados en sensibles, dosis dependiente y resistentes.

#### 4.1.2.2 Frecuencia relativa y absoluta en los perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol.

Los datos del perfil de susceptibilidad frente a voriconazol para cada especie de candida son reflejados en la tabla 9. Entre las cepas analizadas, se encuentra con mayor sensibilidad *C. albicans* y *C. tropicalis* con 85% y 83% respectivamente, seguido de *C. glabrata* con un 20%; *C. guilliermondii* fue la única especie 100% resistente para este antifúngico. Ninguna de las especies estudiadas tuvo sensibilidad dosis dependiente.

**Tabla 9.**

*Frecuencia relativa y absoluta en los perfiles de susceptibilidad frente a voriconazol.*

VORICONAZOL						
Especie de candida	FRECUENCIA ABSOLUTA			FRECUENCIA RELATIVA		
	Sensible	SDD	Resistente	Sensible	SDD	Resistente
<i>C. albicans</i>	17	0	3	85%	0%	15%
<i>C. tropicalis</i>	10	0	2	83%	0%	17%
<i>C. glabrata</i>	1	0	4	20%	0%	80%
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	3	0%	0%	100%

**Nota:** SDD. Sensibilidad dosis dependiente.

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

#### 4.1.2.3 Frecuencia relativa y absoluta en los perfiles de susceptibilidad frente a anidulafungina.

De igual manera, las 40 cepas aisladas fueron estudiadas frente a anidulafungina siguiendo los pasos del protocolo redactado a base de la guía M7-A3. Los resultados conseguidos se encuentran resumidos en la tabla 10. *C. tropicalis* y *C. glabrata* obtuvieron 100% de sensibilidad, seguido de *C. albicans* y *C. guilliermondii* con 90% y 67% respectivamente.

**Tabla 10.**

*Frecuencia relativa y absoluta en los perfiles de susceptibilidad frente a anidulafungina*

ANIDULAFUNGINA				
Especie de candida	FRECUENCIA ABSOLUTA		FRECUENCIA RELATIVA	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
<i>C. albicans</i>	18	2	90%	10%
<i>C. tropicalis</i>	12	0	100%	0%
<i>C. glabrata</i>	5	0	100%	0%
<i>C. guilliermondii</i>	2	1	67%	33%

**Elaborado por:** Ruth Flores y María Fernanda Vaca, 2020

#### 4.1.3 Elaboración del procedimiento operativo estándar para la determinación del perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina en *Candida* spp. por la técnica de microdilución en caldo.

Se redactó un procedimiento operativo estándar para la determinación del perfil de susceptibilidad en *Candida* spp. por la técnica de microdilución en caldo para antifúngicos insolubles en agua, centrándose en voriconazol y anidulafungina. El POE se encuentra expuesto en su totalidad en el Anexo 2.

## CAPÍTULO V

### 5.1 DISCUSIÓN

Los hongos y levaduras se han convertido en principales protagonistas de muchas enfermedades oportunistas, siendo el género *Candida* el más prevalente implicado en infecciones en pacientes inmunodeprimidos o críticamente enfermos. Inclusive, se puede observar que algunas cepas han demostrado resistencias a diferentes antifúngicos utilizados para su tratamiento. Este problema se registra principalmente con azoles y conlleva a una falla terapéutica (Alburquenque et al., 2011).

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos son una herramienta básica para predecir un fracaso terapéutico y tomar la decisión de elección de fármacos óptimos. La técnica de microdilución en caldo se reconoce como la técnica *gold standard* para la determinación del CMI. Existen dos métodos estandarizados desarrollados por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) (Sanchis, 2016). Si bien en ambos métodos se obtiene resultados comparables con concordancias esenciales de un 96.9% para voriconazol y 98.6% para fluconazol en especies de *Candida*. En este proyecto se optó por el uso de la guía de CLSI al permitir el uso de un inóculo menor y un método de lectura más simple al ser visual. Además, cabe resaltar que el método propuesto por el EUCAST consiste en una modificación del CLSI (Zapata-González & Cardona-Castro, 2012).

Según Camaró-Sala et al. (2013) la validación de los métodos debe reflejar las condiciones reales del ensayo utilizando material con propiedades claramente establecidas como son las cepas de control de calidad. En la validación de la técnica de microdilución en caldo para la caracterización de perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina fueron elegidas las cepas control *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 debido al intervalo de CMI para estos antifúngicos reconocido por la guía CLSI M27. Al comparar los valores obtenidos con los que se reportan en la guía publicada por el CLSI, se puede comprobar que el 100% de las mediciones se encontraron dentro del rango esperado. Para *C. krusei* ATCC 6258 la guía CLSI M27-A3 indica que el rango esperado es de 0.03 a 0.12 ug/mL en anidulafungina y de 0.125 a 1 ug/mL en voriconazol, siendo los rangos alcanzados en esta investigación fueron de 0.03 a 0.06 ug/mL y de 0.25 a 0.5 ug/mL para cada antifúngico correspondientemente. En el caso de *C. parapsilosis* ATCC 22019 los rangos esperados son de 0.25 a 2 ug/mL en anidulafungina y de 0.03 a 0.25 ug/mL en voriconazol, que corresponden a resultados de 0.5 ug/mL y 0.03 ug/mL respectivamente, ya que en este caso todas las mediciones correspondieron a la misma concentración. Con esto se puede entender que se logró que el método obtuviera el desempeño esperado, por lo cual se intuye que reflejó el CMI real de las cepas problema tratadas.

El procedimiento de la técnica de microdilución en caldo fue adaptado para este estudio por lo que se continuó a realizar una validación del mismo al examinar el comportamiento frente a los antifúngicos voriconazol y anidulafungina con las cepas control *C. krusei* ATCC 6258 y *C.*

*parapsilosis* ATCC 22019 al obtener 24 resultados de cada cepa control en los dos antifúngicos. Los principales parámetros de validación en pruebas cuantitativas que no han sufrido modificaciones en las concentraciones estandarizadas se debe realizar un análisis de precisión, veracidad y estabilidad (Toledo, 2016); en este caso la estabilidad fue valorada con la variabilidad intraoperador con el coeficiente de correlación de Pearson.

Para el proceso de validación se recomienda que la cuantificación del CMI en cepas control se realice en un mínimo de 20 pruebas consecutivas. Una o dos pueden estar fuera de control, es decir, fuera del rango establecido debido a variaciones aleatorias de la prueba. En el caso de que más de dos pruebas se encuentren fuera del rango de control establecido en la guía M27-A3, se requiere una acción correctiva e iniciar nuevamente las repeticiones de la prueba. Esto no fue necesario, debido a que el control de calidad para la validación de esta técnica obtuvo un 100% de los resultados de CMI de las cepas control dentro del intervalo de referencia de CMI de los antifúngicos utilizados, lo cual conlleva a un análisis estadístico de precisión, exactitud y coeficiente de variación que demuestra una gran estabilidad y desempeño de este método. También, la guía CLSI M27-A3 señala que este control se debe realizar periódicamente para monitorear la viabilidad de los materiales utilizados en la técnica (Cantón et. Al., 2007; EMA,2008).

La concentración mínima inhibitoria se define como la menor concentración del antimicrobiano, en el cual se observa una prominente disminución en la turbidez cuando se realiza lecturas visuales. Esta corresponde a la inhibición del 50% de crecimiento de la cepa. Méndez, J. y Herrera, D (2001) menciona que se evalúa una modificación del método espectrofotométrico como opción para la lectura de CIM en microdilución en caldo debido a que la turbidez es ajustable con un espectrofotómetro de 68 a 82% a 405 nm, aunque el CLSI no lo considera. Sin embargo, se cree que los resultados obtenidos por la técnica reconocida por el CLSI, donde se recomienda la lectura visual, tienen un buen desempeño, ya que se comprobó que variabilidad intraoperador en la lectura es casi insignificante.

Para voriconazol se encontró al leer el CIM<sub>50</sub> que *C. albicans* presenta en un 85% de cepas sensibles, mientras que en *C. tropicalis* 83%, en *C. glabrata* 20% y en *C. guilliermondii* 0%. En ninguna de las cepas se observó resistencia dosis dependiente y en el caso de *C. guilliermondii* se halló un 100% de resistencia. Estos perfiles difieren de trabajos previamente publicados en los que definían porcentajes de sensibilidad mayores, como por ejemplo en la publicación de Ortigoza-Medrano & Arroyo-Espinoza (2014) donde la mayoría de las especies presentan un 100% de sensibilidad exceptuando *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* con 92.8%, 97.4% y 95.2% respectivamente; y el trabajo de Guerrero (2016) donde se muestra en las especies sensibilidad en 100% menos *C. glabrata* donde se presentó 100% de sensibilidad dosis dependiente. La resistencia de casi 80% de cepas de *C. glabrata* se puede ver relacionado con las resistencias intrínsecas presentadas por esta especie, ya que se conoce que es intrínsecamente resistente al fluconazol del que deriva el voriconazol (Alburquenque et al., 2011).

Además, sobresale la inefectividad de voriconazol sobre *C. guilliermondii*, lo que puede significar que podría presentar mecanismos de resistencia adquiridos. Lo cual encaja con lo reportado en la publicación de Zurita (2018), donde describe que se ha identificado persistentemente cepas de *Candidas no albicans*, como *C. guilliermondii* resistentes a fluconazol e indica una sensibilidad de 98% para voriconazol. De esta forma sería importante detectar mediante técnicas de biología molecular posibles genes de patogenicidad y resistencia a este antifúngico.

En el caso de la anidulafungina se presentó un perfil de sensibilidad con CIM<sub>50</sub> de 90% en *C. albicans*, 67% en *C. guilliermondii* y 100% en el caso de *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Al compararlo con investigaciones previas, Guerrero (2016) y Alburquenque et al (2010), resaltan la posible existencia de resistencias emergentes encontradas en *C. albicans* y *C. guilliermondii*, dado a que la bibliografía encontrada presenta perfiles donde se encuentra un 100% de sensibilidad en todas las especies, como lo ocurrido para este experimento con las cepas *C. glabrata* y *C. tropicalis*. Una posible explicación a esta discrepancia se puede encontrar en la población que fue estudiada ya que en el caso de Alburquenque (2010) la cronología ubica al estudio previo a la introducción de anidulafungina como opción terapéutica en Chile. Otro punto por resaltar es que de ninguna forma los ensayos corresponden a la misma población por lo cual se podría explicar la diferencia de las resistencias presentadas. Además, en base al análisis de estos perfiles de susceptibilidad se puede figurar que en el tiempo transcurrido entre estas publicaciones y el presente ha podido llevar al descubrimiento de más problemas de resistencias adquiridas.

Finalmente, se debe tomar en cuenta que, aunque existe una gran utilidad clínica de la técnica para orientar al tratamiento, identificar resistencias y mejorar la pauta de dosificación, no siempre se encuentra una buena correlación entre la actividad *in vitro* e *in vivo*. En esto cumplen un papel importante las interacciones de farmacocinética y farmacodinamia (Sanchis, 2016). Por lo cual es necesario una indagación de fármaco-vigilancia que permita generar una guía de tratamiento propia para el país, considerando que su desempeño dependerá del desarrollo de los pacientes.

## 5.1 CONCLUSIONES

La técnica de microdilución en caldo desarrollada por el CLSI en su guía M27-A3 es considerada por la bibliografía como el *gold* estándar para la obtención de perfiles de susceptibilidad en levaduras. Se consiguió la adaptación de esta guía a un procedimiento operativo estándar, siendo el producto de esta investigación.

La estandarización de la técnica de microdilución en caldo se realizó con la validación estadística, estudiando la precisión, exactitud y coeficiente de correlación de variables como la variabilidad intraoperador mostradas al aplicarse. Según las recomendaciones para control de calidad de métodos cuantitativos se procedió a identificar el CMI de *C. Krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 en voriconazol y anidulafungina con un total de 24 repeticiones por cepa y 48 repeticiones por antifúngico. Los resultados se encuentran en un 100% dentro del rango determinado como normal para las cepas de control.

Por otra parte, el análisis estadístico permite observar una buena precisión para *C. parapsilosis* ATCC 22019 donde se encuentra un CV de 0.00% y una mayor exactitud para *C. Krusei* ATCC 6258 con errores absolutos cercanos a 0 %. En tanto al coeficiente de correlación de las variables se obtuvieron relaciones de tipo directa, inversa, directa perfecta e incluso sin relación alguna lo que es aceptable para este tipo de estudio.

En cuanto a las cepas de *Candida* spp. almacenadas en el laboratorio de docencia de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Quito utilizadas en la caracterización del perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina, se encontró que difieren de los perfiles presentados con anterioridad en la bibliografía. Resaltando la resistencia al 100% de cepas de *C. guilliermondii* frente a voriconazol. De esta forma lleva a concluir que se han desarrollado resistencias a los antifúngicos probados.

## 5.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda delimitar los niveles de sensibilidad y resistencia de la totalidad de cepas viables conservadas en el laboratorio de docencia de Micología Clínica, dado a las limitaciones que presento esta investigación al solamente poder aplicar la técnica a un número reducido de cepas, tras la implementación. De igual manera, se invita a utilizar distintos antifúngicos y la estandarización de la técnica en caso de que estos sean solubles en agua.

En cuanto a la estandarización de un método cuantitativo como es la técnica de microdilución en caldo, es preciso contar con materiales control como son las cepas ATCC que tengan intervalos de CMI conocidos por guías internacionales como son el CLSI y EUCAST, además de los insumos necesarios para completar el número de repeticiones requeridas para un correcto análisis estadístico, tanto para determinar la precisión, exactitud, y en este caso, variabilidad intraoperador.

Como se detalla en el Protocolo Operativo Estándar, es importante prevenir contaminaciones del caldo de cultivo a utilizar en la técnica de microdilución en caldo, por lo que es recomendable esterilizarlo por filtración (usando filtros de membrana o cualquier otro material que no absorba o retenga el medio) y preparar alícuotas para su almacenamiento en congelación a temperaturas menores a  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de su uso.

Debido al gran problema emergente que demuestra ser el desarrollo de resistencias a los principales tratamientos clínicos en las micosis por candida se considera también importante realizar registros de fármaco-vigilancia epidemiológica con cepas de aislados obtenidos en casas de salud del país, para obtener un registro de la realidad ecuatoriana y poder compararla con la realidad de la zona geográfica.

En cuanto a recomendaciones logísticas se sugiere tomar en cuenta las limitaciones de tiempo que pueden existir en la importación de reactivos y verificar que sean mayor a las cantidades necesarias, dado su insuficiencia o problemas con aduanas pueden generar atrasos importantes en el inicio de la parte experimental.

## 5.2 BIBLIOGRAFÍA

- Alburquenque, C., Silva, V., & Fuentes, M. (2011). Susceptibilidad in vitro a anidulafungina en 100 cepas de especies de candida aisladas previo a la introducción de esta equinocandinas en Chile. *Revista chilena de infectología*, 28(5), 399–403. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182011000600001>
- Araújo, A., Shinobu, C., Estivalet, T., & Pires, M. (2013). Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical*, 46(3), 335–339. Recuperado de <https://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v46n3/0037-8682-rsbmt-46-03-335.pdf>
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada* (5th ed.). México: Mc Graw Hill Interamericana Editores.
- Bilbao, N. (2018). *Estado actual de las resistencias de candida a los fármacos antifúngicos y estudio de los mecanismos implicados*. (Tesis de Grado). Recuperado de <https://addi.ehu.es/handle/10810/30830>
- Blanco, M. T. (2011). *Etioepidemiología y factores de virulencia en Candida spp. aisladas de hemocultivos*. (Tesis doctoral). Recuperado de <http://dehesa.unex.es/xmlui/handle/10662/1684>
- Bonifaz, A. (2012) *Micología Médica Básica* (4ta edición) McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Camaró-Sala, M., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. & Gimeno-Cardona, C. (2013) *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Cantón, E., Martín, E., & Espinel-Igoff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*. Recuperado de <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
- Díaz, M. C., Araya, I., Cerda, A., & Santander, M. P. (2016). Original breve de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina, 29(3), 151–154.
- EMA, & CENAM. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.
- López-Ávila, K., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J., Zavala-Castro, J., & Dzul-Rosado, K. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una

revisión. *Biomédica*, 27, 127–136. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=67960>

Guerrero, J. E. (2016). *Identificación, susceptibilidad y distribución de especies de *Candida* obtenidas de muestras clínicas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), de enero 2007 a abril 2016*. (Tesis de grado). Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12484>

Kirmani, N., Woeltje, K., & Babcock, H. (2014). *Manual Washington de Especialidades Clínicas - Enfermedades infecciosas* (2nd ed.). Wolters Kluwer Health España S.A.

Marcos-Zambrano, L. (2018) *Caracterización de levaduras causantes de fungemia: identificación y sensibilidad antifúngica, epidemiológica molecular y factores de patogenicidad*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Mendez, J. & Herrera, M. (2001) *Métodos de susceptibilidad antifúngica*. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. Costa Rica, Vol. 36, N. 1-2.

Mitchell, T. G. (2010). Micológia médica. En *Jawletz, Melnick y Adelberg, Microbiología Médica* (25<sup>a</sup> ed., pp. 647–649). México: Mc Graw Hill Interamericana Editores

Montagna, M. T., Lovero, G., Coretti, C., Martinelli, D., Giglio, O. De, Iatta, R., Caggiano, G. (2015). Susceptibility to echinocandins of *Candida* spp. strains isolated in Italy assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0442-4>

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Microbiología médica* (7<sup>a</sup> ed.). España: Elsevier.

Murray, P. (2018). *Microbiología médica básica*. España: Elsevier.

Ochiuzzi, M. E., Arechavala, A., Guelfand, L., Maldonado, I., Soloaga, R., & Red de Micológia CABA. (2014). Evaluación de las tarjetas AST-YSO1 del sistema Vitek 2 para determinar la sensibilidad a antifúngicos de levaduras del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 111–118. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(14\)70058-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0325-7541(14)70058-6)

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Procedimiento operativo estandarizado - POE-*. Recuperado de [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/1\\_Taller\\_POE\\_00.pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/1_Taller_POE_00.pdf)


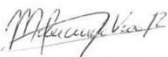
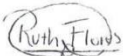

Ortigoza-medrano, E., & Arroyo-espinoza, D. I. (2014). Susceptibilidad in vitro de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de Especialidades del Centro

- Médico Nacional de Occidente. *Medicina Interna de México*, 30, 373–380. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2014/mim144c.pdf>
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., ... Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016. *Infectious Diseases Society of America. – IDSA Guideline*, 62, e1–e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
- Pfaller, M. A. (2012). Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1), S3–S13. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
- Picazo, J., & Prieto, J. (2016). *Compendio de Microbiología* (2ª ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Sanabria, R., Samudio, M., Fariña, N., Laspina, F., Figueredo, L., Aguilar, G., & Espíndola, C. (2014). Perfil de susceptibilidad a anti fúngicos de aislados de *Candida* spp por el método de microdilución . Nuevos puntos de cortes para fluconazol. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 12(1), 33–40. Recuperado de <http://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/33>
- Sanchis Talón, M. (2016). *Evaluación experimental de terapias antifúngicas frente a hongos oportunistas emergentes* Marta Sanchis Talón. (Tesis doctoral). Recuperado de: [https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/396316/TESIS\\_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/396316/TESIS_FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Santos, E., Dal Forno, C., Hernández, M., Kubiça, T., Venturini, T., Chassot, F., ... Alves, S. (2014). SUSCEPTIBILITY OF *Candida* spp. ISOLATED FROM BLOOD CULTURES AS EVALUATED USING THE M27-A3 AND NEW M27-S4 APPROVED BREAKPOINTS. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(6), 477–482. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600004>
- Toledo, A. (2016) *Evaluación de las guías EP10-A2 y EP15-A2 de la CLSI para verificar el desempeño analítico de métodos cuantitativos*. Trabajo de titulación: Universidad de Guayas. Ecuador.
- Villacrés, I., Alcocer, I., Zurita, J., & Rodríguez Riglos, M. (2017). Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de virulencia en aislados clínicos de *Shigella* spp. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 36(1–2), 67. <https://doi.org/10.26807/remcb.v36i1-2.266>
- Zapata-González, F., & Cardona-Castro, N. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista CES Medicina*, 26(1), 71–83. Recuperado de <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/2067>


- Zaragoza, R., & Pemán, J. (2012). Opciones terapéuticas para el tratamiento antifúngico en el paciente crítico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(2), 108–113.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.009>
- Zurita, J., Denning, D. W., Solís, M. B., & Arias, L. M. (2017). Serious fungal infections in Ecuador. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36, 975–981. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2928-5>
- Zurita, S. (2018). Situación de la resistencia antifúngica de especies del género candida en Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 126–131.  
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3563.126>

## 5.3 ANEXOS

**Anexo 1.** *Respuesta Carta de Solicitud para el uso de cepas Candida spp. almacenadas y conservadas en el Laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.*

<p><b>Pontificia Universidad Católica del Ecuador</b> Facultad de Medicina Carrera de Bioquímica Clínica</p>	
<p>Quito, 21 de junio de 2019</p>	
<p>Doctor Santiago Escalante Vanoni Director de Carrera de Bioquímica Clínica Facultad de Medicina-PUCE Presente.-</p>	
<p>De nuestra consideración:</p>	
<p>Nosotras, Ma. Fernanda Vaca Riofrio con CI 1722575196 y Ruth María Flores Bravo con CI 1004005714, estudiantes de la carrera de Bioquímica Clínica de la Facultad de Medicina, por medio de la presente solicitamos de la manera más comedida autorice a quien corresponde se nos permita el uso de las cepas de Candida spp de la colección de hongos y levaduras del laboratorio de docencia de Micología 012 de la carrera de Bioquímica Clínica, para desarrollar el proyecto de investigación "Caracterización del perfil de susceptibilidad a voriconazol y anidulafungina en cepas de candida almacenadas en el laboratorio de Micología Clínica de la Carrera de Bioquímica Clínica -PUCE Quito".</p>	
<p>Por la atención que se sirva dar a la presente, anticipamos nuestro agradecimiento.</p>	
<p>Atentamente,</p>	
	
<p>Ma. Fernanda Vaca Riofrio Correo: mafervaca@gmail.com Teléfono: 0984658155</p>	
	
<p>Ruth María Flores Bravo Correo: ruthf094@gmail.com Teléfono: 0980087746</p>	
	<p><i>16/06/2019</i> <i>26/06/19</i></p> <p><i>2019.06.21</i> <i>[Signature]</i></p>

**Anexo 2. POE elaborado con el procedimiento de microdilución en caldo.**

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO: RF-MV-2019</b>
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha: 09-11-2019</b> <b>Revisión: 10-11-2019</b>

**Tabla de Contenidos de Protocolo de Trabajo para la Técnica de Microdilución en caldo**

**1. PROCEDIMIENTOS DE TRABAJO**

- 1.1. Preparación de medio de cultivo
- 1.2. Preparación solución madre de antifúngico – Antifúngicos insolubles en agua
- 1.3. Preparación de diluciones antifúngicas - Antifúngicos insolubles en agua
- 1.4. Prueba de validación de cepas y preparación del inóculo
- 1.5. Control de calidad de la técnica de microdilución en caldo

**2. PRUEBAS DE MICRODILUCIÓN EN CALDO**

- 2.1. Proceso de llenado de placas
- 2.2. Preparación del inoculación de las placas
- 2.3. Proceso de incubación y lectura de resultados


**3. FORMATO DE RESULTADOS**

**4. ANEXOS**

**5. COMENTARIOS**

**FUENTES BIBLIOGRÁFICAS**


<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

## 1. PROCEDIMIENTOS DE TRABAJO

1. Preparación del medio de cultivo		
<b>Objetivo:</b> Obtención de 1000 mL medio de cultivo RPMI 1640 para la técnica de microcultivo.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.	
<b>ENTRADA:</b> medio de cultivo en polvo, tampón MOPS (ácido morfolino propano sulfónico a 0.164 M con pH de 7± y 0.2 % de glucosa) y agua destilada. <b>Comienza:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Disolver en 900 mL de agua destilada 10,40 g de medio de cultivo (RPMI 1640) y 34,53 g de tampón MOPS.</li> </ol> <b>Incluye:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Medir que el pH se encuentre entre 6,9 y 7,1, corregir con NaOH 1M.</li> <li>Añadir agua destilada hasta completar 1000 mL de solución.</li> </ol> <b>Termina:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Filtrar estérilmente con ayuda de filtros de membrana y mantener en refrigeración (4-8°C hasta 6 meses).</li> </ol> <b>SALIDA:</b> 1000 mL de medio de cultivo RPMI 1640 en refrigeración.		
<b>COMENTARIO:</b>		
* Se recomienda leer la etiqueta del medio o el manual de uso para identificar si el método de preparación difiere del presente.		
Seguimiento del proceso		
<b>VARIABLES:</b> volúmenes pH	<b>ESTANDAR:</b> 1000 mL de solución final pH entre 6.9 y 7.1	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, material de vidrio, mechero, filtros, equipo de protección personal.		<b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.


Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

## 2. Preparación de solución madre de antifúngico - Antifungicos insolubles en agua

<b>Objetivo:</b> Obtención de alícuotas de solución madre de los antifúngicos escogidos para el experimento de microdilución en caldo.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
<b>ENTRADA:</b> antifúngicos de elección (ej: Voriconazol y Anidulafungina) y dimetil sulfoxido (DMSO). <b>Comienza:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Preparar una solución madre del antifúngico con una concentración de 1.600 µg/mL, según peso obtenido desde las especificaciones del antifúngico a utilizar y la cantidad necesaria de DMSO.</li> </ol> <b>Termina:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Almacenar en alícuotas de 1,1 mL y conservar en a -70°C por hasta 6 meses o -40°C por 2 meses.</li> </ol> <b>SALIDA:</b> Alícuotas de 1.1 mL con la solución madre en congelador.	
<b>COMENTARIO:</b> * Se debe preparar por separado cada antifúngico a utilizar, y se debe variar el procedimiento según las especificaciones de cada uno. **Proceso realizado para antifúngicos insolubles al agua. *** Ejemplo de cálculos en anexo 1.	
<b>Consideraciones.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Concentraciones más altas del antifúngico no se disuelven bien.</li> <li>La solución madre no requiere esterilización; en caso de hacerlo, es recomendable que se realice mediante filtros de membrana.</li> <li>El tratamiento de antifungicos solubles en agua requiere un proceso diferente.</li> </ul>	
<b>Seguimiento del proceso</b>	
<b>VARIABLES:</b> volúmenes temperatura	<b>ESTANDAR:</b> Depende del antifungico utilizado.
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, material de vidrio, mechero, filtros, equipo de protección personal.	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general <b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	<b>Fecha:</b> 09-11-2019
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Revisión:</b> 10-11-2019

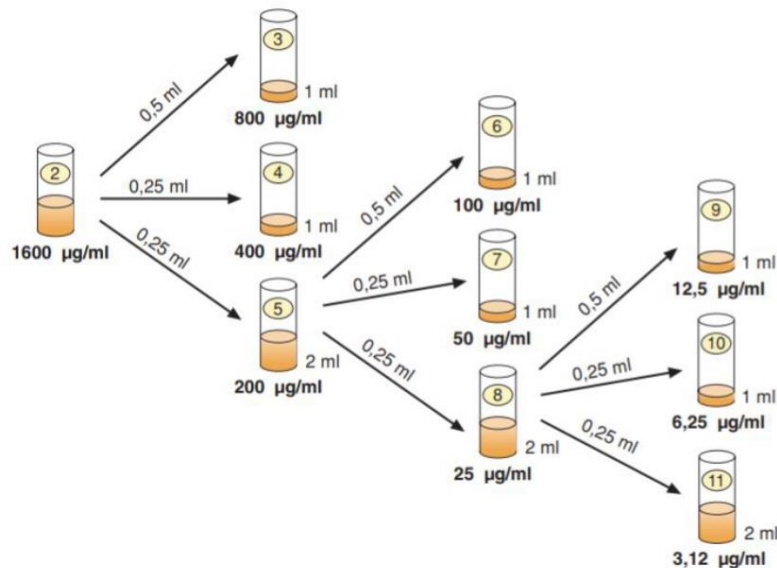
### 3. Preparación de diluciones de antifúngico

<b>Objetivo:</b> Obtención de diluciones seriadas de antifúngico para la microdilución en caldo.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
---	--

**ENTRADA:** medio de cultivo RPMI 1640 y solución madre.


**Proceso:**

1. Seguir el esquema de pipeteo detallado en la ilustración 1.
  - a. Dispensar en los distintos tubos cantidad suficiente de DMSO (500,750 y 1750  $\mu$ L) para obtener los volúmenes finales indicados al lado de cada tubo.
  - b. En el tubo #2 se dispensa 2 ml de solución madre.



*Ilustración 1.* Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua.

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

2. Realizar una dilución de 1:50 con las 10 diluciones resultantes y el medio de cultivo RPMI 1640
- Para un volumen final de 2mL se considera la proporción de 40 µL de solución antifúngico con 1960 µL de medio RPMI 1640.
  - Para el tubo #12 se debe sustituir la solución antifúngico por 40 µL de DMSO para control de crecimiento.

**SALIDA:** 11 tubos con diluciones de volumen de 2 mL en el rango de concentración 32-0.06 µg/mL.

**Consideraciones:**

- El tratamiento de antifungicos solubles en agua requiere un proceso diferente.

**Seguimiento del proceso**

<b>VARIABLES:</b> volúmenes	<b>ESTANDAR:</b> concentraciones de 32-0.06 µg/mL.	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, material de vidrio, equipo de protección personal.	<b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.	

<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	



<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>
Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

**4. Prueba de viabilidad de las cepas y preparación del inoculo**

<b>Objetivo:</b> Demostrar la viabilidad de cepas conservadas en congelación por medio de cultivos y preparar el inoculo de la microdilución en caldo.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
---	--

**ENTRADA:** Cepas conservadas en congelación, agar Sabouraud y medio RPMI 1640.

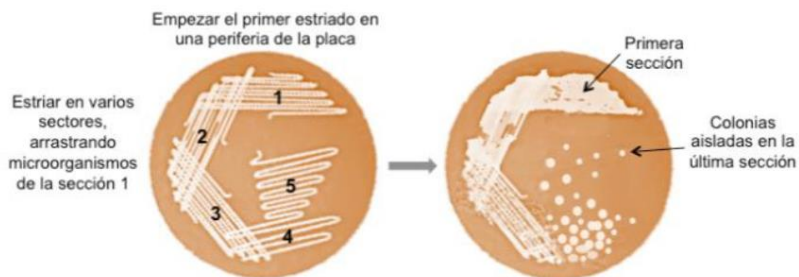
**Comienza:** Descongelamiento de las cepas a utilizarse.

**Incluye:**

1. *Técnica de siembra de placa por agotamiento.*


- a. Instalar el área de trabajo con los materiales a utilizarse y un mechero encendido.
- b. Esterilizar el asa de siembra en la flama de manera perpendicular y dejar enfriar unos segundos.
- c. Retirar el tapón del vial, flamear la boca e introducir el asa de siembra y cerrar el vial.
- d. Crear un inoculo en un cuarto de la placa de agar, y continuar desde la periferia formando estrías con patrón definido en 3 sectores del agar como se observa en la ilustración 2.
- e. Esterilizar el asa y dejar enfriar, antes de estriar los distintos sectores.
- f. Incubar a 35°C y observar el crecimiento a las 24-48 horas.

Ilustración referencial de las estrías formadas en técnica de aislamiento por agotamiento.



*Ilustración 2. Técnica de siembra por agotamiento.*

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

2. *Coloración Gram.* con el fin de poder identificar los aislados puros de las cepas de *Candida* spp. almacenadas.\*

- Realizar un frotis de la cepa aislada, fijar al calor y llevar a un soporte para teñirlo.
- Cubrir la placa con cristal violeta por un minuto, enjuagar con agua corriente.
- Aplicar lugol por un minuto y enjuagar.
- Decolorar con alcohol cetona (1:1) por 10 segundos y enjuagar.
- Cubrir la placa con safranina por 45 segundos y enjuagar.
- Dejar secar y observar al microscopio con lente de 100x y aceite de inmersión, para confirmar la morfología de cepas puras.

**Termina:**

3. *Preparación del inóculo.*

- Seleccionar con un asa colonias puras de  $\geq 1$  mm en crecimiento puro en agar Sabouraud, mínimo de 24 horas.
- Diluir las colonias en 0.5 mL de solución salina al 0.85% y determinar una densidad óptica de 0.5 McFarland. *Nota:* corregir el volumen de solución salina de ser necesario (concentración aproximada de  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  UFC/mL).
- Preparar una dilución de 1:1000 con 10  $\mu$ L de dilución 0.5 McFarland en 10mL de medio RPMI 1640. Obteniendo una concentración final de  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  UFC/mL.

**SALIDA:** Inóculo de concentración  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  UFC/mL con *Candida* spp.

**COMENTARIO:**

El inóculo preparado debe ser para su uso inmediato, no se puede conservar.

Se recomienda para la pureza de la colonia utilizar una colonia pura de una resiembra de 24 h.

\* La coloración Gram permitirá la identificación de contaminantes, como bacterias, en el medio de cultivo.

**Seguimiento del proceso**

<b>VARIABLES:</b> volúmenes concentraciones	<b>ESTANDAR:</b> Inoculo de concentración $1 \times 10^3$ - $5 \times 10^3$ UFC/mL	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, material de vidrio, equipo de protección personal.	<b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.	

<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador

<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
<b>PROCESO</b>	<b>Fecha:</b> 09-11-2019
Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Revisión:</b> 10-11-2019

### 5. Protocolo de control de calidad de la técnica de microdilución en caldo

<b>Objetivo:</b> Controlar el procedimiento de microdilución en caldo por medio de cepas ATCC.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
---	--

**ENTRADA:** Cepas ATCC 22019 de *C. parapsilosis* y ATCC 6258 de *C. krusei*, placas de microdilución, medios de cultivo y antifúngicos.

**Procedimiento:**

Se realiza una corrida completa de la microdilución en caldo con las cepas determinadas para los antifúngicos a probar (Ver parte 2 del presente formato).

**SALIDA:** Resultados de las cepas ATCC, analizados según la tabla 1.

Antifúngico	Intervalos de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. krusei</i> ATCC 6258	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Anfotericina B	0,25 - 2	0,5 - 4	0,5 - 2	1 - 4
Anidulafungina	0,25 - 2	0,5 - 2	0,03 - 0,12	0,03 - 0,12
Caspofungina	0,25 - 1	0,5 - 4	0,12 - 1	0,25 - 1
Micafungina	0,25 - 2	0,5 - 4	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Fluconazol	0,5 - 4	1 - 4	8 - 64	16 - 128
Itraconazol	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Ketoconazol	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1	0,25 - 1
Posaconazol	0,06 - 0,25	0,06 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
Ravuconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,25 - 1
Voriconazol	0,016 - 0,12	0,03 - 0,25	0,06 - 0,5	0,12 - 1
5-fluorocitosina	0,06 - 0,25	0,12 - 0,5	4 - 16	8,0 - 32

Tabla 1. Intervalo de la CMI de los antifúngicos para las cepas ATCC, obtenidas por el método de microdilución según CLSI M27-A3.


**RECOMENDACIONES:**

Las cepas citadas son cepas con estabilidad genética y puntos de corte definidos repetitivamente que permiten encontrar las irregularidades o desactivaciones del antifúngico, repetir si no cumple meta

**Seguimiento del proceso**

<b>VARIABLES:</b> CMI de las cepas	<b>ESTANDAR:</b> Objetivos de cada uno de los antifúngicos en la tabla 1.	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general, formato de resultados
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, material de laboratorio, estufa, equipo de protección personal.		<b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.


<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

## 2. PRUEBAS DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

1. Proceso de llenado de placas		
<b>Objetivo:</b> Obtener placas con las diluciones de antifúngicos y medio de cultivo RPMI 1640.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.	
<p><b>ENTRADA:</b> placas microtiter de base redonda estériles con 98 pocillos, las soluciones de los antifúngicos en distintas concentraciones (tubos n°2-n°11, previamente preparados en paso 1.3), control de esterilidad (5 ml de RPMI sin inoculación) y control de crecimiento (4.9 mL de RPMI con 100 µL de DMSO).</p> <p><b>Comienza:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Con el uso de una pipeta multicanal: Verter el contenido en un contenedor estéril, pipetear 100µL de la solución con una pipeta multicanal (8 canales) y distribuir en los pocillos de la columna correspondiente de la placa.</li> </ol> <p>Repetir el procedimiento con los distintos tubos en cada columna: el tubo n°2 en la columna n°2, el tubo n°3 en la columna n°3, y así sucesivamente hasta la columna n°11.</p> <p><b>Incluye:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Llenar los pocillos de la columna n°12 con 100 µL de RPMI + DMSO.</li> <li>Llenar los pocillos de la columna n°1 con 200 µL de RPMI como control estéril.</li> </ol> <p><b>Termina:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Congelar a de -40°C, -70°C o usar inmediatamente al prepararlas.</li> </ol> <p><b>SALIDA:</b> placas con diluciones de antifúngicos congeladas, listas para su uso en la técnica de microdilución en caldo.</p>		
<b>COMENTARIO:</b>		
La fecha de caducidad es a partir de la preparación de la solución madre de los antifúngicos y no la del día de preparación de las placas.		
<b>Seguimiento del proceso</b>		
<b>VARIABLES:</b> Volumen, ubicación en los pocillos, concentraciones	<b>ESTANDAR:</b> pocillos de 1-12 concentraciones distintas.	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, pipetas, pipeta multicanal, equipo de protección personal.	<b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.	


Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

## 2. Proceso de inoculación de las placas

<b>Objetivo:</b> Inocular las placas de microdilución en caldo con las cepas a probar.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
<b>ENTRADA:</b> placas con el medio de cultivo y antifúngicos, inoculo de cepas a probar. <b>Comienza:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Descongelar la placa, dejando está a temperatura ambiente.</li> </ol> <b>Termina:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Inocular con 100 µL de suspensión de levadura en los pocillos, se sugiere empezar desde el pocillo #12 y avanzar hasta el pocillo #2</li> </ol>	
<b>SALIDA:</b> Placas de microdilución listas para la incubación.	
<b>COMENTARIOS:</b> Considerar que las concentraciones obtenidas serán ½ de las concentraciones de antifúngico dispensadas previamente (16-0.03 µg/mL).	
<b>Seguimiento del proceso</b>	
<b>VARIABLES:</b> Volumen	<b>ESTANDAR:</b> 100 µL de inoculo.
<b>RECURSOS:</b> laboratorio, pipetas, pipeta multicanal, equipo de protección personal.	<b>FORMATOS Y REGISTROS:</b> Cuaderno de trabajo general <b>INSPECCIÓN:</b> final del producto.

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

### 3. Proceso de incubación y lectura de resultados

<b>Objetivo:</b> Obtener resultados de la interpretación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antifúngicos.	<b>Responsable:</b> Laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
---	--

**ENTRADA:** placas inoculadas (proceso 2.2) e incubadora a 35°C.

**Proceso:**

Las placas para todas las especies de *Candida* spp. deben ser incubadas por 48 horas, y anotar los resultados.

- a. A las 24h revisar la CMI para equinocandinas (Anidulafungina).
- b. A las 48h revisar la CMI para azoles (Voriconazol).

La CMI para antifúngicos fungiestáticos se mide con un espejo invertido como la concentración más baja que produce una reducción aparente y crecimiento de la levadura, un  $\geq 50\%$  comparada con el crecimiento control.

Se sugiere el uso de una cámara húmeda para evitar la evaporación.

**SALIDA:** Resultados de CMI anotados en el formato de resultados.

**COMENTARIOS:**

- *C. albicans* y *C. tropicalis* pueden presentar “cola de crecimiento” ya que mantiene crecimiento sobre la CMI con azoles; por lo que puede existir una variabilidad intraoperador y requiere entrenamiento del personal para su correcta identificación.


- La interpretación de los resultados se debe comparar con los puntos de corte del CLSI identificados en la tabla 2.

Antifúngico	Intervalos de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Sensible	S-DD	Intermedio	Resistente
Fluconazol	$\leq 8$	16 - 32	-	$\geq 64$
Itraconazol	$\leq 0,12$	0,25 - 0,5	-	$\geq 1$
Voriconazol	$\leq 1$	2	-	$\geq 4$
5-fluorocitosina	$\leq 4$	-	8 - 16	32
Caspofungina*	$\leq 2$	-	-	$> 2$
Micafungina*	$\leq 2$	-	-	$> 2$
Anidulafungina*	$\leq 2$	-	-	$> 2$

\*No sensible.

Tabla 2. Puntos de corte de los antifúngicos según CLSI.

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	


 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

- La categoría sensible no predice la categoría de intermedio, solo se usa en el caso de emplear 5-fluorocitosina, ya que en este rango existe inhabilidad de decisión sobre el tratamiento.

**Seguimiento del proceso**

<u>VARIABLES:</u> CMI	<u>ESTANDAR:</u> Los criterios de evaluación se determinan en la tabla 2	<u>FORMATOS Y REGISTROS:</u> Cuaderno de trabajo general, formato de resultados
<u>RECURSOS:</u> laboratorio, equipo de protección personal.		<u>INSPECCIÓN:</u> final del producto.

<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	<b>Fecha:</b> 09-11-2019
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Revisión:</b> 10-11-2019

### 3. FORMATO DE RESULTADOS:


<b>FORMULARIO REGISTRO DE RESULTADOS</b>	<b>ELABORADO POR:</b>	Ruth Flores Fernanda Vaca
	<b>REVISADO/APROVADO POR:</b>	Mtr. Andrés Zabala
	<b>VERSIÓN N°:</b>	1
<b>TÉCNICA DE MICRODILUCION EN CALDO</b>	<b>Página: 1 de 1</b>	

RESPONSABLE DE REGISTRO: \_\_\_\_\_

FECHA DE INICIO: \_\_\_\_\_ FECHA DE FIN: \_\_\_\_\_

N°	Fecha	Cepa probada	# Pocillo	Concentración	CMI	Análisis CLSI	Observaciones
<i>24 horas para anidulafungina</i>							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
<i>48 horas para voriconazol</i>							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							

Elaborado por	Revisado por	Aprobado por
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Fecha:</b> 09-11-2019 <b>Revisión:</b> 10-11-2019

#### 4. ANEXOS:

**Anexo 1** Ejemplo de cálculo de preparación de solución madre de antifúngicos.

#### PREPARACIÓN DE SOLUCION MADRE DE VORICONAZOL

Fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen (ml)} * \text{Concnetración (ug/ml)}}{\text{Potencia (ug/mg)}}$$

Datos del antifúngico:

<b>LOTE:</b> 030M4705V	<b>CASA COMERCIAL:</b> Sigma-Aldrich
<b>SOLVENTE:</b> DMSO (99.9% puro)	<b>ALMACENAMIENTO:</b> Temperatura ambiente
<b>PUREZA:</b> 99.6% (HPLC)	
<b>POTENCIA:</b> 996 ug/mg	<b>PESO:</b> 5mg

**Concentración esperada:** 1600 ug/ml

$$\text{Peso voriconazol (mg)} = \frac{\text{volumen DMSO (ml)} * \text{Concnetración (ug/ml)}}{\text{Potencia (ug/mg)}}$$


$$5 \text{ mg} = \frac{\text{volumen DMSO (ml)} * 1600 \text{ ug/ml}}{996 \text{ ug/mg}}$$

$$\text{volumen DMSO (ml)} = \frac{5 \text{ mg} * 996 \text{ ug/mg}}{1600 \text{ ug/ml}}$$

$$\text{volumen DMSO (ml)} = 3.1125 \text{ ml}$$

Se debe disolver 5 mg de antifúngico + 3.1125 ml de DMSO.

<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador	<b>Ficha de Procesos Operativos</b>	<b>CODIGO:</b> RF-MV-2019
	<b>PROCESO</b>	<b>Fecha:</b> 09-11-2019
	Protocolo de microdilución en caldo para <i>Candida</i> spp	<b>Revisión:</b> 10-11-2019

#### 5. COMENTARIOS:

El texto es una adaptación desde la lectura interpretativa de la guía M27-A3 y algunos artículos a consideración, todas las fuentes se encuentran en la bibliografía.

Protocolo aún sujeto a cambios si se comprueba en la práctica la necesidad de adicionar notas o aclaraciones correspondientes.

El presente protocolo se desarrolló basándose en trabajo con antifúngicos insolubles en agua, por lo cual no contempla la solución madre o diluciones de antifúngicos solubles en agua. Se recomienda referirse a la guía M27-A3 en caso de trabajo con antifúngicos diferentes.

#### FUENTE BIBLIOGRÁFICA DE LAS IMÁGENES Y TABLAS:

Bonilla, M. et al. (2016). Manual de prácticas de microbiología básica. México. Recuperado de: [http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/librosec/23Manual%20de%20microbiologia\\_09diciembre2016.pdf](http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/librosec/23Manual%20de%20microbiologia_09diciembre2016.pdf)

Cantón, E., Martín, E., & Espinel-Igloff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología. Recuperado de:

<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>

<b>Elaborado por</b>	<b>Revisado por</b>	<b>Aprobado por</b>
María Fernanda Vaca Ruth Flores (09-11-2019)	Andrés Zabala (10-09-2019)	

**Anexo 3.** *Proceso para microdilución en caldo, compendio de la guía M27-A3, M38-A y M44-A.*



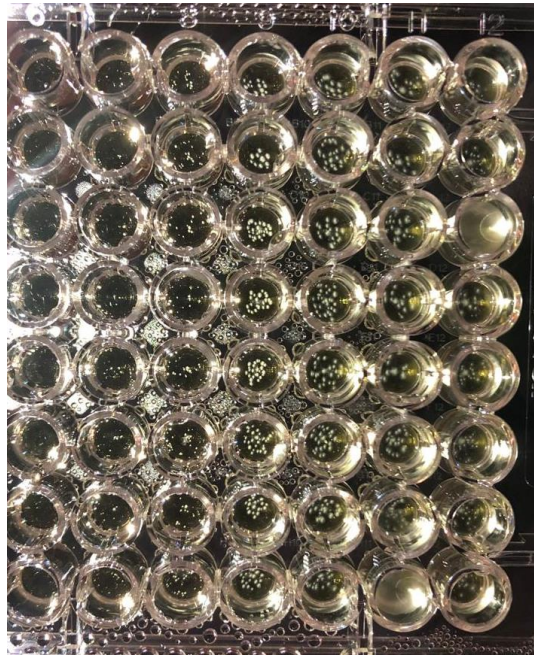
Emilia Cantón Lacasa  
Estrella Martín Mazuelos  
Ana Espinel-Ingroff

Acceso al documento completo en PDF, en el siguiente enlace:

<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>

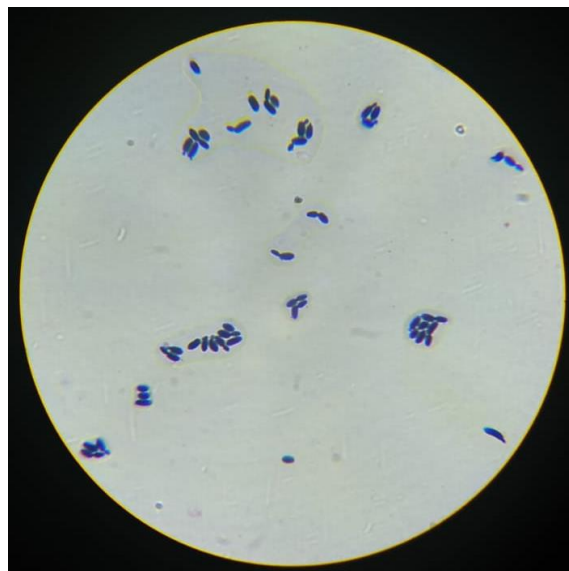
Fuente: Cantón, E., Martín, E., & Espinel-Igroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*. Recuperado de <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>

**Anexo 4.** *Lectura visual de técnica de microdilución en caldo.*



**Figura 5.** Lectura de resultados microdilución en caldo.

**Autores:** Ruth Flores y Fernanda Vaca



**Figura 6.** Fotografía para confirmación de control de crecimiento, se observan levaduras con coloración Gram en lente 40X.

**Autores:** Ruth Flores y Fernanda Vaca



**Figura 7.** Fotografía para confirmación de control de esterilidad fallido, se observan bacterias cocobacilos Gram negativas con lente 40X.

**Autores:** Ruth Flores y Fernanda Vaca