



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

AUTORES:

Br. Nelson Fredy Berrios Estela

Br. Rosa Jhaqueline Chapoñan Coronado

ASESORA:

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

LAMBAYEQUE, PERÚ

2021

**Perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas
en *Candida albicans* y no *albicans*. Hospital Regional
Lambayeque, 2017**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO (A) EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

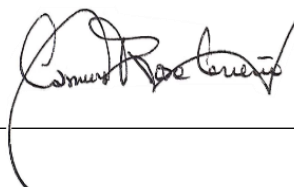
APROBADA POR:

Dr. Eduardo Tejada Sánchez



PRESIDENTE

Dra. Carmen Carreño Farfán



SECRETARIA

Lic. Julio Cesar Silva Estela



VOCAL

Dra. Gianina Llontop Barandiarán



ASESORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2021

La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.

Louis Pasteur.

DEDICATORIA

A Dios por brindarnos la fortaleza, la vida y la sabiduría
para tomar las mejores decisiones.

A nuestros padres por estar siempre con nosotros alentándonos para seguir
adelante, gracias por todo su amor y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por darnos la vida y fortaleza en cada momento.

Nuestro sincero agradecimiento a nuestra asesora Dra. Gianina Llontop Barandiaran por su amabilidad, paciencia y constante apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

Al Mg. Sc. Blgo. Roberto Ventura Flores por su apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

Al jurado por las exigencias requeridas en el presente trabajo de investigación.

A nuestros familiares por su confianza, apoyo y ánimos lo cual hizo posible la realización de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	4
	2.1 Antecedentes.....	4
	2.2 Base teórica.....	11
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
	3.1 Materiales.....	15
	3.1.1 Material biológico.....	15
	3.1.2 Población y muestra.....	15
	3.2 Métodos.....	15
	3.2.1 Variable independiente.....	15
	3.2.2 Variable dependiente.....	15
	3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	15
	3.2.4 Identificación de las levaduras <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i>	16
	3.2.5 Prueba de susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i>	19
	3.2.6 Producción de Fosfolipasas	20
	3.2.7 Análisis estadístico de los datos.....	23
IV.	RESULTADOS.....	24
	4.1 Identificación de las <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i>	24
	4.2 Susceptibilidad de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	26
	4.3 Producción de fosfolipasas en <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	29
	4.4 Susceptibilidad y producción de fosfolipasas en <i>Candida albicans</i> y <i>Candida no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	34
V.	DISCUSIÓN.....	36
VI.	CONCLUSIONES.....	39
VII.	RECOMENDACIONES.....	40
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Inoculación de <i>Candida</i> spp. en agar almidón arroz para la estimulación de la producción de clamidosporas(Método Dalmau).	17
Figura 2.	Incorporación de una laminilla para generar de un ambiente con poco oxígeno (Método Dalmau).....	17
Figura 3.	Observación de las Clamidosporas 40x de <i>Candida albicans</i>	18
Figura 4.	Identificación de especies de <i>Candida</i> en CHROM agar <i>Candida</i>	19
Figura 5.	Prueba de susceptibilidad antifúngica en agar Muller Hinton....	20
Figura 6.	Separación de la yema de huevo para preparación del medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo.....	22
Figura 7.	Medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo.....	22
Figura 8.	Inoculación de la suspensión de los cultivos puros de <i>Candida</i> spp. en el medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo.....	23
Figura 9.	Distribución de <i>Candida albicans</i> y <i>C. no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	25
Figura 10.	Observación de la susceptibilidad antifúngica en especies del género <i>Candida</i>	28
Figura 11.	Actividad de la fosfolipasa a los 8 días(vista anterior)	32
Figura 12.	Actividad de la fosfolipasa a los 8 días (vista posterior).....	32
Figura 13.	Actividad de la fosfolipasa a los 8 días. Observación de una colonia con la zona hidrolizada definida.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Frecuencia de los cultivos puros de <i>Candida albicans</i> y <i>C. no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	24
Tabla 2	Distribución de especies de <i>Candida albicans</i> y <i>C. no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	25
Tabla 3.	Distribución Susceptibilidad al fluconazol y voriconazol en cultivos puros de <i>Candida albicans</i> y <i>C. no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017	27
Tabla 4.	Distribución de la producción de fosfolipasas en <i>Candida albicans</i> y <i>C. no albicans</i> . Hospital Regional Lambayeque, 2017.....	30
Tabla 5.	Distribución de los valores de Pz entre los aislados de <i>Candida albicans</i> y <i>C. no albicans</i>	31
Tabla 6.	Relación entre la susceptibilidad al fluconazol y la producción de fosfolipasas en las <i>Candida albicans</i>	34
Tabla 7.	Relación entre la susceptibilidad al fluconazol y la producción de fosfolipasas en las <i>Candida no albicans</i>	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Preparación del medio Agar Almidón Arroz.....	49
Anexo 2.	Puntos de corte, CLSI* para <i>Candida</i> , CIM (microdilución en caldo) y diámetro de inhibición (difusión en disco).....	50
Anexo 3.	Procedimiento en la preparación del medio Agar Sabouraud Dextrosa – yema de huevo.....	51
Anexo 4.	Clasificación del índice de actividad enzimática (Pz).....	52
Anexo 5.	Mezcla de la yema huevo con el medio Agar Sabouraud Dextrosa.....	52
Anexo 6.	Cultivo puro de <i>Candida</i> productora de fosfolipasa a las 48h de incubación	53
Anexo 7.	Medida de la colonia y halo de especies de <i>Candida</i> productoras de fosfolipasa a los 8 días de incubación.....	53

RESUMEN

Se identificó y se determinó la susceptibilidad en *Candida albicans* y no *albicans*, estableciendo si existe relación con la producción de fosfolipasas. Se realizó un estudio descriptivo observacional de temporalidad transversal, siendo la muestra 60 cultivos puros del género *Candida* recolectadas en el área de Micología del laboratorio de investigación del hospital Regional Lambayeque. La producción de fosfolipasas se determinó empleando el método semicuantitativo en placa de agar Sabouraud dextrosa suplementado con yema de huevo; y la susceptibilidad se realizó mediante disco difusión (M44–A2) con fluconazol y voriconazol. Se identificaron 60 cultivos puros; 22 (36,7%) de *Candida albicans* y 38 (63,3%) de *Candida* no *albicans*, de las cuales 21 fueron de *C. tropicalis*, 7 de *C. glabrata*, 4 de *C. parapsilosis*, 4 de *C. krusei* y 2 de *C. famata*. En el estudio de susceptibilidad frente al fluconazol, 53 (88,3%) fueron sensible (S), 6 (10,0%) resistentes (R), y solo una (1,7%) sensible dependiente de la dosis (SDD); mientras que, para el voriconazol 59 (98,3%) fueron susceptibles y solo una (1,7%) resistente. Sobre la producción de fosfolipasas el 40,0% (24) de los aislamientos presentaron actividad enzimática (Pz) muy baja, 6,7% (4) baja, el 21,7% (13) moderada y el 31,7% (19) alta. La prueba de susceptibilidad revela que, a pesar de la resistencia, la alta sensibilidad al fluconazol sugiere que sigue siendo la alternativa de tratamiento; en tanto que en la relación entre la resistencia y la producción fosfolipasas, no se encontraron diferencias significativas.

Palabras claves: *Candida albicans* y no *albicans*, fosfolipasas, fluconazol, voriconazol.

ABSTRACT

Susceptibility was identified and determined in *Candida albicans* and non-*albicans*, establishing whether there is a relationship with the production of phospholipases. An observational descriptive study of transverse temporality was carried out, the sample being 60 strains of the genus *Candida* collected in the Mycology area of the Lambayeque Regional hospital research laboratory. Phospholipase production was determined using the semiquantitative method on Sabouraud dextrose agar plate supplemented with egg yolk; and susceptibility was made by diffusion disk (M44-A2) with fluconazole and voriconazole. 60 strains were identified; 22 (36.7%) of *Candida albicans* and 38 (63.3%) of *Candida no albicans*, of which 21 were from *C. tropicalis*, 7 from *C. glabrata*, 4 from *C. parapsilosis*, 4 from *C. krusei* and 2 of *C. famata*. In the fluconazole susceptibility study, 53 (88.3%) were sensitive (S), 6 (10.0%) resistant (R), and only one (1.7%) dose-dependent (SDD); while, for voriconazole 59 (98.3%) they were Susceptible and only one (1.7%) resistant. On the production of Phospholipases, 40.0% (24) of the isolates showed very low enzyme activity (Pz), 6.7% (4) low, 21.7% (13) moderate and 31.7% (19) high. The susceptibility test reveals that, despite resistance, high sensitivity to fluconazole suggests that it remains the treatment alternative; while in the relationship of resistance and phospholipase production, no significant differences were found.

Keywords: *Candida albicans* and non *albicans*, phospholipases, fluconazole, Voriconazole.

I. INTRODUCCIÓN

Las Candidosis, infecciones fúngicas causadas por diversas especies del género *Candida* (Muñoz, 2015; Panizo et al., 2005), están incrementado de forma dramática, convirtiéndose en un grave problema de salud pública (Cornistein et al., 2013; Jiménez & Varón, 2012; Torres et al., 2014), que afecta frecuentemente a individuos inmunodeprimidos y pacientes internados en las unidades de cuidados intensivos (UCI) (Jiang et al., 2013; Zuluaga et al., 2010).

Estas infecciones, lejos de desaparecer se han incrementado debido al oportunismo y factores predisponentes del individuo que en su gran mayoría se origina como una complicación endógena atribuible al desequilibrio de la microbiota o procesos que influyen en la respuesta inmune (Tobar et al., 2011), a la condición de la levadura de ser comensal en piel y mucosas, a la capacidad de resistencia intrínseca al fluconazol por parte de *Candida krusei* (Bonifaz, 2012) y de elevada resistencia a este fármaco por parte de *Candida glabrata* (Tobar et al., 2011; Zurita, 2018), en otras ocasiones el origen puede ser exógeno tras la colonización de catéteres, dispositivos intravasculares o debido a la transmisión cruzada (Galán, 2014; Torres et al., 2014).

La especie más frecuentemente aislada es *Candida albicans*, sin embargo su prevalencia ha disminuido drásticamente en las últimas dos décadas, observándose un aumento de las *Candida* no *albicans*, las cuales generan dificultades terapéuticas, debido al surgimiento de cultivos resistentes a los antifúngicos, asociadas a la automedicación y tratamiento continuo e incompleto con azoles como el fluconazol y voriconazol (Villanueva & Arenas, 2007), lo que genera la aparición de cambios en la epidemiología de *Candida* y en la sensibilidad de algunas especies (Perozo et al., 2011). Además, se han estudiado genes de resistencia específicos, que a través de un conjunto de mutaciones se expresan y contribuyen a evitar, eliminar o desactivar las drogas lo

que puede ser un factor determinante en el incremento del índice de mortalidad (Muñoz, 2015).

Las estructuras fúngicas oportunistas son responsables del 80% de las infecciones intrahospitalarias (IIH) por hongos (Zurita, 2018), aumentando el riesgo de muerte cuando producen infecciones al torrente sanguíneo (candidemia), causando del 10 % al 15 % de las sepsis nosocomiales, con una prolongación de estadía hospitalaria de 34 días a más en áreas críticas, estimándose los costos asociados con un episodio de candidemia hasta 45.000 dólares, lo que acarrea una carga financiera para los deudos y para el sistema de salud (Salavert, et al., 2006, Villalobos et al., 2016).

En los Estados Unidos el número anual de casos por etiología fúngica entre 1979 y 2000 fue superior a 200% (Zurita, 2018), y en algunas instituciones se ha comunicado el incremento de hasta el 487%, siendo el género *Candida* el principal agente etiológico, convirtiéndose en la tercera causa de infecciones del torrente circulatorio en UCI (Ajenjo et al., 2010).

En Perú son pocos los estudios realizados en candidemia, uno realizado en nueve hospitales de Lima, durante el 2009 y 2011, reportó 153 especies de *Candida* que causaron candidemia, otro estudio realizado durante el 2013 y 2015, en tres hospitales de Lima y Callao, reportaron que por cada mil ingresos existían entre 1 y 2,6 casos de candidemia. Así mismo, se ha reportado un aumento superior al 60% de especies de *C. no albicans*, donde predominan especies como *Candida parapsilosis*, *C. glabrata* y *Candida guilliermondii*; no obstante, estas cifras pueden estar muy por debajo de la realidad, al no ser, en muchos casos, de notificación obligatoria, aunado con la poca o casi nula vigilancia epidemiológica. (Zurita, 2018).

Candida, al igual que los otros microbios, ha desarrollado una serie de factores fisiológicos y genéticos para mantenerse en el huésped, invadirlo y causar infección cuando se presenten las condiciones adecuadas (Cornisteis et al., 2013; Castrillón, Palma & Padilla, 2005), entre ellos está la producción de diversos factores de patogenicidad que contribuyen a su virulencia; como la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico, los factores de adhesión, la formación de biopelículas y enzimas hidrolíticas. (D' Eca et al., 2011; Castrillón et al., 2005).

Entre los principales factores de virulencia tenemos a las enzimas hidrolíticas, fosfolipasas, las cuales favorecen la invasión al tejido del huésped, existiendo una expresión activa de estas enzimas en las levaduras y en las hifas de *C. albicans*, y en especies emergentes de importancia clínica incluyendo *C. glabrata* y *C. krusei* (Campos, 2015). Estas enzimas hidrolizan los fosfolípidos de las membranas celulares, y su producción puede ser determinante para producir infecciones invasoras en determinados grupos como los inmunocomprometidos (Echevarría et al., 2002).

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el área de Micología del laboratorio de investigación del Hospital Regional Lambayeque, con el fin de determinar el perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans* y con ello analizar la relación del perfil de sensibilidad y resistencia versus la producción enzimática de las fosfolipasas. En este contexto se planteó la siguiente investigación cuyo problema fue: ¿Cuál es el perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017? La hipótesis planteada fue: Existen cultivos puros susceptibles y resistentes, que producen fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar el perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017. Los objetivos específicos fueron: Identificar *Candida albicans* y *Candida* no *albicans*, determinar la susceptibilidad de *Candida albicans* y *Candida* no *albicans*; determinar la producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y *Candida* no *albicans* y determinar si existe relación entre susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y *Candida* no *albicans*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Candida es un hongo patógeno oportunista de distribución mundial (Muñoz, 2015), encontrándose como microbiota habitual genitourinaria, mucocutánea y gastrointestinal de individuos sanos, viviendo como comensal sin causar molestias (Castrillón et al., 2005; Hernández et al., 2014), comprende más de 200 especies diferentes (Campos, 2015, Jimenez & Varón, 2012), de las cuales al menos 10 de ellas están asociadas a cuadros clínicos; donde la más patógena y relacionada con cuadros graves e incluso mortales es *C. albicans* (Salas et al., 2000).

Las especies del género *Candida* son los agentes causales más importantes de infecciones micóticas particularmente en los inmunocomprometidos (Jiang et al., 2013), siendo los individuos con mayor riesgo los pacientes de cuidados intensivos y postquirúrgicos, pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes con neoplasias hematológicas, ancianos y bebés prematuros, entre otros (Sachin et al., 2012). La enfermedad se manifiesta en el paciente si el equilibrio de la microbiota normal se interrumpe o las defensas inmunológicas se ven comprometidas (D' Eca et al., 2011), manifestándose desde las micosis superficiales hasta infecciones mortales diseminadas (García et al., 2012; Alfonso et al., 2010).

Las especies de *C. no albicans* van en aumento, produciendo alta morbilidad y mortalidad (Reyna et al., 2007; Ajenjo et al., 2010). Debido a su baja incidencia y escasa gravedad, tiempo atrás tenía poca importancia; no obstante, en los últimos 30 años la incidencia ha aumentado de forma dramática (Cornistein et al., 2013; Jiménez & Varón, 2012; Torres et al., 2014) y se le asocia frecuentemente con el estado inmunodeprimido del huésped, sin embargo, no hay que dejar de lado las características propias de la levadura, pues no todo hongo saprófito tiene la capacidad de causar infección, aunque el estado del huésped sea crítico (Jiang et al., 2013).

La incidencia de *C. albicans* en los años 70 era de un 90%, con el transcurrir del tiempo se ha observado un descenso del 50% o menos en la actualidad, favoreciendo el aumento de las *C. no albicans*, (Villalobos et al., 2016). Así, estudios realizados en *Candida* aisladas de pacientes provenientes de UCI en Medellín, Colombia (2001–2007) de 337 aislados, 147 correspondieron a *C. albicans*, 79 *Candida tropicalis*, 47 *C. parapsilosis*, 32 *C. glabrata*, 12 *C. guilliermondii*, 11 *C. krusei* y 9 a diferentes especies (Zuluaga et al., 2010). En otro estudio realizado en India, de 38 aislados de *Candida* obtenidas de la cavidad oral, 22 (58%) fueron de *C. albicans*, 9 (24%) *C. tropicalis*, 6 (16%) *C. krusei* y 1(2%) *C. glabrata* (Deepa et al., 2015).

Además, un estudio realizado por el Departamento de Microbiología del hospital estatal Duzce Ataturk (Turquia) de 122 aislados obtenidos de varios sitios anatómicamente distintos en adultos sanos, el 66.4% fueron *C. albicans*, y de las no *albicans*; *C. glabrata* (7,3%), *C. tropicalis* (6,3%) y *Candida kefyr* (4.9%) fueron las más frecuentes (Oksuz et al., 2007). Resultado similar al obtenido en 2139 aislamientos de *Candida* provenientes de pacientes atendidos en centros asistenciales de Colombia, Ecuador y Venezuela donde también *C. albicans* (62%) demostró su prevalencia, seguido a distancia por *C. parapsilosis* (11%), *C. tropicalis* (8,5 %), *C. glabrata* (3,5%) y *C. krusei* (2,2%) (De Bedout et al., 2003).

Actualmente, varios estudios reportan el aumento de las *C. no albicans*, entre ellos el realizado en Epidemiología de la candidemia en el Hospital México de la Caja Costarricense de Seguro Social, en San José, Costa Rica donde el 62% de las levaduras aisladas en los episodios de candidemia fueron *C. no albicans*, siendo la más frecuentemente aislada *C. parapsilosis* (41%), seguida de *C. tropicalis* (12%), *C. glabrata* (6%) y otras (3%) (Villalobos et al., 2016), resultado semejante al obtenido en España donde de 203 episodios de fungemia (UCI) en niños, la más predominante fue *C. parapsilosis* (46,8%), seguida de *C. tropicalis* (5,9%), *C. glabrata* (3,9%), y *C. guilliermondii* (2.5%) (Pemán et al., 2011).

En el Perú, el estudio realizado en el H.N. Guillermo Almenara I. de alta complejidad de Lima (2004-2006), encontró en 11,6% de los hemocultivos de pacientes UCI, a especies del género *Candida*, siendo el 61% no *albicans*. Otro realizado en tres hospitales de Lima y Callao (2013-2015) obtuvo 158 aislamientos de *Candida* de los cuales el 71% fueron *C. no albicans*, con una incidencia de candidemia

por centro entre 1 y 2,6 casos por 1000 ingresos (Zurita, 2018) y uno realizado en nueve hospitales de Lima (2009 -2011) reporto a 153 especies causantes de candidemia con un predominio de *C. albicans* del 60,1%.

En el estudio de vigilancia de resistencia Artemis Disco Global Antifúngica (1997 -2007), uno de los programas de vigilancia de hongos más completo y de larga duración, al comparar los periodos de tiempo entre 1997 - 2000 y 2005 -2007, se obtuvo a *C. albicans* como la especie predominante, aunque se observó una disminución en su tasa de aislamientos cuando los 3 primeros años del estudio fueron comparados con los años posteriores, en contraste con lo observado, hubo un aumento de las tasas de aislamiento en las especies de *C. glabrata* 10.2% a 11.7%, *C. tropicalis* 5,4% a 8,0%, y *C. parapsilosis* 4,8% a 5,6% (Pfaller et al., 2010).

Diversos factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad de *C. albicans* (D' Eca et al., 2011) y a su habilidad para sobrevivir como comensal; incluye la capacidad de adherirse a células epiteliales y biomateriales del hospedero, factores de adhesión, que le permiten iniciar el proceso de formación de biopelículas (Castrillón et al., 2005; Gokce, Cerikcioglu & Yagci, 2007), la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como las fosfolipasas (PL) y la aspartil proteasas (SAP), la producción de hemolisina y la morfogénesis (Hernández et al., 2014; Sachin et al., 2012); cada uno de los cuales es importante en cada etapa de la infección (De la Calle et al., 2012).

La producción de enzimas hidrolíticas extracelulares, contribuyen a la adhesión, invasión y destrucción de las membranas celulares (Campos, 2015), favoreciendo el crecimiento excesivo de *Candida*, lo que facilita la adherencia y la penetración al tejido, y por tanto la invasión al huésped (Sachin et al., 2012).

Varios autores consideran que las fosfolipasas desempeñan un papel importante en la capacidad para producir infecciones invasoras, estas enzimas hidrolizan los fosfolípidos de las membranas celulares, y su producción puede ser determinante para producir infecciones invasoras en determinados grupos como los inmunocomprometidos (Echevarría et al., 2002). Tanto levaduras e hifas especialmente de *C. albicans*, y de especies emergentes de importancia clínica incluyendo *C. glabrata* y *C. krusei* tienen una expresión activa de estas enzimas (Campos, 2015).

La secreción de las fosfolipasas por *C. albicans* se informó por primera vez en la década de 1960 por Costa *et al.*, y Werner en el crecimiento de la levadura en medio sólido que contiene yema de huevo o lecitina y el análisis de los productos de degradación de lípidos. La observación de que *C. albicans* segrega fosfolipasa la llevó Pugh y Cawson al desarrollar un método citoquímico basado en lecitina para detectar esta enzima. Estos autores utilizaron este método en relación con un modelo de la membrana corioalantoidea de pollo para evaluar los detalles ultraestructurales de la invasión por *Candida* y para determinar el sitio de la producción de fosfolipasa.

La invasión se inició mediante la colocación de blastosporas en fase estacionaria de *C. albicans* en la membrana, lo que estimuló cambios celulares en las blastosporas, muchas de las cuales desarrollaron hifas con actividad fosfolipasa concentrado en la punta de crecimiento. La actividad fue más alta en las hifas estaban en contacto directo con la membrana. Basándose en estos resultados, los investigadores propusieron que las fosfolipasas extracelulares eran importantes en la invasión de tejido por *C. albicans* (Mahmoud, 2000).

Estudios posteriores fueron dirigidos al desarrollo de métodos sencillos para detectar fosfolipasas, Price *et al.* describieron un método en placa para la detección de actividad de la fosfolipasa en *C. albicans*, a base de agar Sabouraud dextrosa y yema de huevo. Cuando se cultiva en este medio, las fosfolipasas positivas producen una zona distintiva bien definida, y una precipitación denso blanco alrededor de la colonia (Mahmoud, 2000).

Así, al evaluar la producción de la fosfolipasa utilizando el método en placa Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo (Ramos *et al.*, 2015; Oksuz *et al.*, 2007; Sachin *et al.*, 2012; Panizo *et al.*, 2005), la producción de *Candida* en orden decreciente resultó: *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis* > *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. guilliermondii* > *Candida sake* > *C. lipolytica* (Panizo *et al.*, 2005), no obstante, la actividad enzimática de la fosfolipasa fue muy alta en los aislamientos de *C. albicans* (97%), *C. tropicalis* (100%), *C. glabrata* (97%) y en menor porcentaje en *C. parapsilosis* (27%) (Campos, 2015). Así mismo, al estudiar 68 aislados de *C. albicans* y 31 de *C. no albicans*, 41 (60,3%) cultivos de *C. albicans* produjeron esta enzima y todas las *C. no albicans* no la produjeron (Gokse *et al.*, 2007).

En el Departamento de Micología del I. N. de Higiene, Venezuela, al evaluar 95 cepas de *Candida*, 90 (95%) produjeron la fosfolipasa. Todas las *C. albicans* presentaron dicha actividad y de las *C. no albicans*: *C. lipolytica* y sólo algunas cepas de *C. sake*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* no la presentaron (Panizo et al., 2005). Sin embargo, en otro estudio de 122 cepas, 50(40,9%) presentaron la actividad, siendo mayor en *C. albicans* 43 (53,08%) (Oksuz et al., 2007). Así mismo, la actividad se encontró en 67 (60,9%) de 110 cepas, siendo máxima producción en 92,3% de *C. albicans*, y en las *C. no albicans*, *C. tropicalis* (76%) seguido de *Candida dubliniensis* (40%). (Sachin et al., 2012).

Al evaluar 95 aislados de especies de *Candida* ensayadas en el medio Agar Sabouraud dextrosa yema de huevo, los valores de índice de actividad enzimática de fosfolipasas obtuvo un mínimo valor en *C. albicans* de Pz de 0,248 y el máximo 0,852. En *C. no albicans*, el mínimo valor Pz fue 0,256 correspondiente a una cepa de *C. tropicalis* y el máximo valor 1,00 de la cepa de *C. lipolytica*, una de *C. glabrata* y tres de *C. tropicalis* (Panizo et al., 2005).

Los aislados de *Candida* pueden ser obtenidos de sitios anatómicamente distintos, así la mayoría de los aislados positivos para fosfolipasas fueron de secreción traqueal (86,7%) y de orina (76,9%) (D' Eca et al., 2011), en la cavidad oral (59,0%) y en heces (42,8%) (Oksuz et al., 2007), en muestras como sangre, hisopado vaginal, hisopados orales y orina, observándose una máxima producción de fosfolipasas en *C. albicans* (92,3%) y en las *C. no albicans* la máxima actividad fue en *C. tropicalis* (76%) y *C. dubliniensis* (40%) (Sachin et al., 2012). Así mismo, los aislamientos provenientes de lesiones cutáneas en producen fosfolipasas, tanto en *C. albicans* (100%) como en *C. no albicans* (49%) (Ramos et al., 2015).

En *C. albicans* provenientes de secreciones vaginales, a un pH $\leq 4,5$ el 92,3% presentaron dicha actividad de la fosfolipasa, siendo alta o muy alta en el 91,6% y a un pH $> 4,5$ el 96,2% mostraron la actividad y todos en alto o muy alto grado (Ombrella et al., 2008). Sin embargo, en 41 aislados de *Candida* provenientes de cavidad oral, 79% de *C. albicans* produjeron fosfolipasa mientras que las *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* no la produjeron (Samaranayake et al., 1984).

La resistencia antimicótica se está convirtiendo en un problema grave para el tratamiento de infecciones (Jiang et al., 2013). La profilaxis o tratamiento con

antifúngicos ha generado cambios en la epidemiología de *Candida* y en la sensibilidad de algunas especies señaladas como agentes etiológicos de dicha infección (Perozo et al., 2011). Con la introducción del fluconazol, en los años ochenta, las candidemias por *C. albicans* y *C. tropicalis* disminuyeron, sin embargo, experimentaron un aumento significativo *C. krusei* por poseer resistencia intrínseca y *C. glabrata* debido a su elevada resistencia a este fármaco (Zurita, 2018; Hernández et al., 2009).

Aunque el fluconazol sigue siendo el antifúngico de primera elección y el más utilizado (Malani & Kauffman, 2007), para el tratamiento de infecciones fúngicas, con excepción de *C. krusei* y *C. glabrata* especies con resistencia o sensibilidad disminuida a este fármaco (García et al., 2012). Con el tiempo se ha visto un aumento de la resistencia en *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *C. krusei* adquiriendo mayor importancia (Zuluaga et al., 2010), y entre las nuevas especies con resistencia a este antifúngico se conocen a *C. inconspicua* (53,2%), *Candida rugosa* (41,8%), y *C. norvegensis* (40,7%) (Pfaller et al., 2010).

Alternativas terapéuticas como el antifúngico voriconazol, es un nuevo y eficaz tratamiento contra micosis invasoras (Gómez et al., 2013), su resistencia es poco frecuente; sin embargo, se ha observado una tendencia hacia el aumento de la resistencia para *C. famata* (1,1% a 5,7%), *C. norvegensis* (0,0% a 6,9%), *C. lipolytica* (0,0% a 11,1%), y *C. pelliculosa* (14,3% a 16,7%). (Pfaller et al., 2010).

Muchas cepas de *C. glabrata* han adquirido resistencia a los antifúngicos azólicos, convirtiéndose en un reto terapéutico, debido a que estudios in vitro revelan su baja sensibilidad al fluconazol, el empleo terapéutico del Voriconazol ha demostrado resultados alentadores (Gómez et al., 2013). Sin embargo, existe preocupación por la aparición de resistencia a los hongos adquirida y de las subespecies con *Candida* resistentes a fluconazol de forma nativa (NFR), principalmente *C. glabrata* y *C. krusei* (Elewa et al., 2015).

Ante la aparición de resistencia a los antimicóticos, así como la selección de especies diferentes a *C. albicans*, se ha hecho necesaria la estandarización de pruebas de susceptibilidad in vitro (De Bedout et al., 2003). Las pruebas de sensibilidad antifúngica de *Candida* se han estandarizado y perfeccionado, ahora, la demanda de pruebas de susceptibilidad ha estado creciendo (Pfaller & Diekema, 2012), desarrollándose el método de disco difusión para *Candida* spp., y ha sido

estandarizado por The Clínica and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Pfaller et al., 2005).

De 337 cepas de *Candida* spp. remitidos a la Corporación para Investigaciones Biológicas, en Medellín, Colombia (2001–2007), frente al fluconazol, el 78,3% fue sensible, el 11,9% SDD y el 9,8% resistente y frente al voriconazol, el 94% fue sensible, el 2,4% SDD y el 3,6% fue resistente. De todas las especies fueron sensibles al fluconazol: *C. albicans* (95,2%), *C. tropicalis* (86%), *C. glabrata* (65,6%) y *C. parapsilosis* (59,6%) . Con el voriconazol, fueron sensibles, la totalidad de *C. albicans* (100%), *C. tropicalis* (96,2%), *C. parapsilosis* (93,2%) y *C. glabrata* (84,4%). Además, se observó disminución de la sensibilidad al voriconazol en el 54,6% de las cepas de *C. krusei* (36,4% SDD y el 18,2% R) (Zuluaga et al., 2010).

Sin embargo, frente a 28 aislados de *C. glabrata* y 15 de *C. krusei*, en el hospital de tercer nivel de Cruces (España), se obtuvo que en *C. glabrata*: 24 (85,7%) fueron sensibles al fluconazol, 2 (7.1%) SDD y 2(7.1%) resistentes. Todos los *C. krusei* fueron resistentes al fluconazol, en cuanto al voriconazol se observó resistencia en *C. glabrata* (3,6%) y *C. krusei* (6,7%) y un aislamiento de cada especie fue SDD, además el Voriconazol fue muy activo in vitro contra *C. glabrata* y *C. krusei* (Quindós et al., 2007). En tanto en el estudio de vigilancia nacional de fungemia en Dinamarca 2004 - 2009 de 250.000 aislamientos de 41 países, se encontró resistencia a fluconazol en el 2% de *C. albicans*, un 3,9% de *C. dubliniensis*, 9% de *C. tropicalis* , y el 6,8% de *C. parapsilosis* (Arendrup et al., 2011).

2.2. Base teórica

2.2.1. Invasión fúngica

Las levaduras del género *Candida*, al igual que los otros microbios, han desarrollado una serie de factores fisiológicos y genéticos para mantenerse en el huésped, invadirlo y causar infección cuando se presentan las condiciones adecuadas (Cornistein et al., 2013; Castrillón et al., 2005). Todas las membranas de las células huésped están constituidos principalmente por fosfolípidos y proteínas; y una invasión celular implica daño de la membrana, es donde la levadura sintetiza

enzimas como las fosfolipasas y proteasas, para favorecer el proceso químico de invasión, hidrolizando los fosfolípidos y proteínas (Mahmoud, 2000).

Las infecciones causadas por hongos han ido incrementando durante las tres últimas décadas, el aumento de pacientes inmunodeprimidos, la agresividad de las técnicas diagnósticas y terapéuticas, son algunas de las características que predisponen a la población susceptible de sufrir una micosis invasiva. Ante tal incremento de estas infecciones fúngicas y la aparición de su resistencia, especialmente a derivados azólicos, es cada vez más necesarios los estudios de susceptibilidad in vitro para que esa manera el diagnóstico etiológico correcto y precoz sea imprescindible para instaurar el tratamiento adecuado y, de esta forma, mejorar el pronóstico del paciente (Gadela & Cuenca, 2004).

2.2.2. Factores patogénicos de las levaduras

La patogenicidad de *Candida* se debe a diversos factores de virulencia, como la capacidad para adherirse a células epiteliales y biomateriales, el cambio fenotípico, la producción de hemolisinas, la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares (aspartil proteinasas secretorias (Saps) y las fosfolipasas (PL)) (Hernández et al., 2014). Tanto las proteinasas aspárticas secretadas y las fosfolipasas cumplen un papel preponderante en la disrupción de las membranas de las células del epitelio, facilitando la penetración de la fase hifa a las mismas (Ombrellana et al., 2008).

Las enzimas se encargan indirectamente de proporcionar nutrientes, debido la degradación de polímeros, además de inactivar algunas moléculas del sistema de defensa del individuo (D' Eca et al., 2011). Dentro de éstas enzimas degradativas secretadas, se encuentra la familia de las proteasas y de las fosfolipasas que contribuyen a la virulencia y patogenicidad de *Candida*, ya que son moléculas multifuncionales que participan directamente en el proceso infeccioso de los hongos (De la Calle et al., 2012); por lo cual, producir éstas enzimas puede determinar la capacidad que tienen las levaduras de producir infecciones en inmunocomprometidos (Echevarria et al., 2002).

2.2.3. Hifas y levaduras

Las hifas desempeñan un papel importante en la patogénesis de *Candida*, participando activamente en las células y epitelios endoteliales, permitiendo la adherencia y penetración de los mismos; por lo cual los responsables de la invasión celular, son las hifas; mientras que la forma de levadura, facilita la diseminación del hongo a otras partes de cuerpo a través de los líquidos corporales, como la sangre. (De la Calle et al., 2012).

Durante la colonización de la mucosa en el huésped sano predominan las levaduras, más las hifas emerge cuando las defensas de éste declinan. Mientras que en el estado temprano de la colonización se producen las hifas, las levaduras se observan comúnmente durante la enfermedad o en el tejido necrótico, justo cuando el crecimiento de la hifa se revierte por el suero a la forma de levadura. (Castrillón et al., 2005)

2.2.4. Fosfolipasas

Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de enzimas, que hidrolizan uno o más enlaces éster de los fosfolípidos, favoreciendo la invasión al tejido del huésped al hidrolizar los fosfolípidos de las membranas celulares (Campos, 2015), siendo su producción determinante para producir infecciones invasoras en determinados grupos como los inmunocomprometidos (Echevarría et al., 2002).

La literatura muestra opiniones contradictorias en cuanto al número y tipos de fosfolipasas secretadas por *C. albicans*, pero coinciden que las principales son cuatro fosfolipasas hasta el momento PLA, PLB, PLC y PLD, donde la principal actividad de la fosfolipasa se debe a la expresión del gen PLB1 en el que se ha demostrado que se requiere para la virulencia en un modelo animal de la candidiasis (Oksuz et al., 2007).

La expresión del gen PLB1 está regulada por factores nutricionales, medioambientales como la temperatura y pH; y la fase de crecimiento de la levadura. La expresión de genes PLB1 estaría regulada por los mismos factores que regulan su morfología (Ombrella et al., 2008). Además, es importante destacar

que estudios de microscopía electrónica de inmunomarcaje mostraron que *C. albicans* segrega esta enzima durante el proceso infeccioso, estos datos indican que la fosfolipasa B es esencial para la virulencia por *Candida*. Aunque el mecanismo (s) a través del cual la fosfolipasa modula virulencia fúngica está todavía en investigaciones, los primeros datos sugieren que el daño de la célula huésped y la lisis directa son los principales mecanismos que contribuyen a la virulencia del hongo (Mahmoud, 2000).

2.2.5. Disco difusión

Las pruebas de susceptibilidad de disco difusión se utiliza ampliamente para compuestos antibacterianos en laboratorios de microbiología clínica de rutina, este concepto también es atractivo para las pruebas de susceptibilidad antifúngica. El método de difusión en disco para *Candida* spp. ha sido desarrollado y estandarizado por The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Arendrup et al., 2011), en el 2003, documento M44-P, y aprobado definitivamente el 2004 en el documento M44-A. En agosto del 2009, el CLSI publicó su segunda edición en el documento M44-A2, donde se reafirman e incluyen puntos de corte, entre otros para fluconazol y voriconazol.

El método se desarrolló con el fin de proporcionar una técnica simple, barata y reproducible en diversos laboratorios del mundo. Además, en estudios comparativos han demostrado que el nivel de acuerdo entre la prueba de difusión en disco y difusión en caldo presentan una similitud de 94.1% en laboratorios de América latina, Europa, África, Asia y 99.0% en el laboratorio de referencia de la universidad de Iowa, EE.UU. (Pfaller et al., 2005), lo cual hace del método CLSI M44-A2 sea el de elección en la mayoría de laboratorios con fines clínicos del mundo, sin mostrar diferencias relevantes.

Los puntos de corte de difusión del disco se han establecido en base a la mejor correlación posible resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la clasificación de la susceptibilidad obtenidos por el método de microdilución del CLSI M27-A3 (Arendrup et al., 2011).

El método de difusión en disco de agar puede ser útil para la selección de terapias más eficaces, no tóxicos y menos caros (Pfaller et al., 2010). Su eficacia

en la confirmación de la susceptibilidad o en la detección de la resistencia al fluconazol se ha evaluado en diversos estudios multicéntricos internacionales (Pfaller et al., 2005).

2.2.6. Fluconazol

El Fluconazol es un triazol con demostrada eficacia para el tratamiento de las infecciones por levaduras, es el antifúngico de primera elección y el más utilizado como tratamiento inicial en casos de candidemia, sin embargo, si se identifica al cultivo causante como resistente a este antifúngico, se aconseja un cambio de terapia como en el caso de *C. krusei* debido a su resistencia intrínseca y *C. glabrata* con resistencia o sensibilidad disminuida a este fármaco (Malani & Kauffman, 2007).

2.2.7. Voriconazol

Dada la necesidad creciente de nuevos y eficaces tratamientos contra micosis invasoras, el voriconazol es una alternativa desarrollada y autorizada en candidiasis invasivas graves resistentes a fluconazol, las *aspergilosis* invasoras y en infecciones fúngicas graves por *Scedosporium*. También se está planteando como una alternativa terapéutica en estomatitis candidiasicas por *C. glabrata* resistente a fluconazol (Gómez, et al., 2013), aunque también es el tratamiento de elección para infecciones causadas por *C. krusei*, estudios realizados en Latinoamérica han descrito que aislamientos de esta especie presentan variaciones notables en su sensibilidad en comparación con las de Norteamérica. (Zuluaga et al., 2016).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1 Material biológico

- Cultivos puros de *Candida albicans* y *Candida no albicans*.
- Suero humano

3.1.2 Población y muestra

Se realizó un estudio descriptivo, constituyendo a la población 60 muestras de cultivos puros del género *Candida* recolectadas en el área de Micología del laboratorio de investigación del hospital Regional Lambayeque durante agosto-diciembre del 2017 y enero - agosto del 2018. 15 cultivos fueron recolectados por los autores y 45 por el personal de la institución.

3.2. Métodos

3.2.1 Variable independiente: Producción de Fosfolipasas

3.2.2 Variables dependientes: Suceptibilidad de *Candida albicans* y *Candida no albicans*.

3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

Se realizó un estudio descriptivo observacional, contrastándose con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (Hernández, Fernández y Baptista, 2014). En las 60 muestras de cultivos puros de *Candida* spp. se incluyó a una cepa control de *C. albicans* ATCC- 90028.

3.2.4 Identificación de las levaduras *Candida albicans* y *Candida no albicans*.

Durante el periodo de estudio, se trabajó con un total de 60 cultivos puros de levaduras del género *Candida*, proporcionadas por el área de Micología del laboratorio de investigación, Hospital Regional Lambayeque. La identificación de las realizó en función de sus características morfofisiológicas, donde se les confirmó el género y la especie aplicando técnicas de producción de tubo germinativo, producción de clamidosporas, y de tamizaje en medio CHROMagar *candida*.

a. Prueba de filamentación

En crioviales con 0,5 ml de suero, se inoculó una asada de cada uno de los cultivos puros de *Candida* spp previamente reactivados, y se incubaron a 37 °C por 3 horas. Luego se tomó una gota de suspensión, y se colocó en una lámina con su respectivo cubre objeto y se observó al microscopio a 10X y 40X.

Se consideraron como muestras positivas a aquellas que mostraron una prolongación sin constricciones, denominado como tubo germinal, cuyo tamaño es de 2 a más veces el diámetro del cuerpo de la levadura (Duarte et al., 2009)

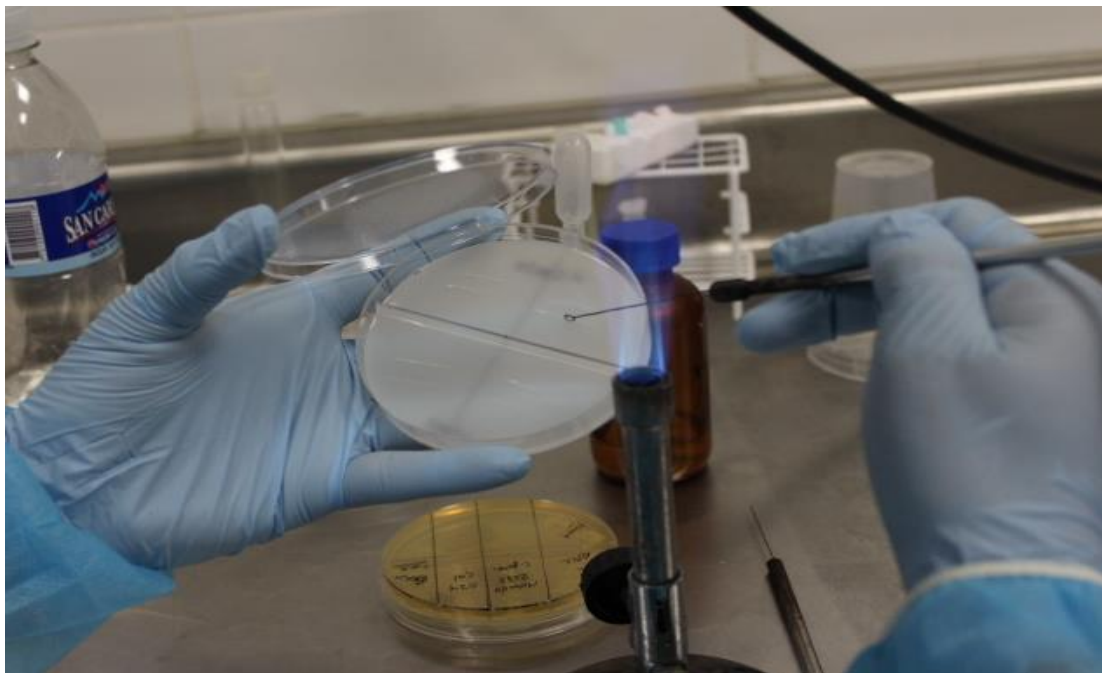
b. Estimulación de producción de Clamidosporas

Se realizó utilizando la técnica de microcultivo en placa de Dalmau. Con el asa en anillo se tocó ligeramente cada una de las colonias de *Candida* spp previamente reactivadas en medio Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) a 37°C por 24 horas, y se inoculó en el medio agar almidón arroz haciendo dos surcos de aproximadamente 1,5 cm cada uno a 1,0 cm de distancia; luego se cubrió con una laminilla y se incubó a 26°C en cámara húmeda y oscuridad por 48 horas. Se examinaron retirando las cubiertas de las placas y se observó al microscopio con un aumento de 10X y 40X.

Los cultivos positivos se tiñeron también con azul algodón lactofenol, levantando suavemente la lámina cubre objeto, las que resultaron negativas, se incubó hasta 5 días, descartando falsos negativos. Todos los cultivos puros se inocularon por duplicado en placas de 90 mm de diámetro divididas en cuatro cuadrantes y conteniendo 25 ml de agar arroz (Kumar & Menon, 2005)

Figura 1

Inoculación de Candida spp. en agar almidón arroz para la estimulación de la producción de clamidosporas (Método Dalmau).

**Figura 2**

Incorporación de una laminilla para generar de un ambiente con poco oxígeno. (Método Dalmau).

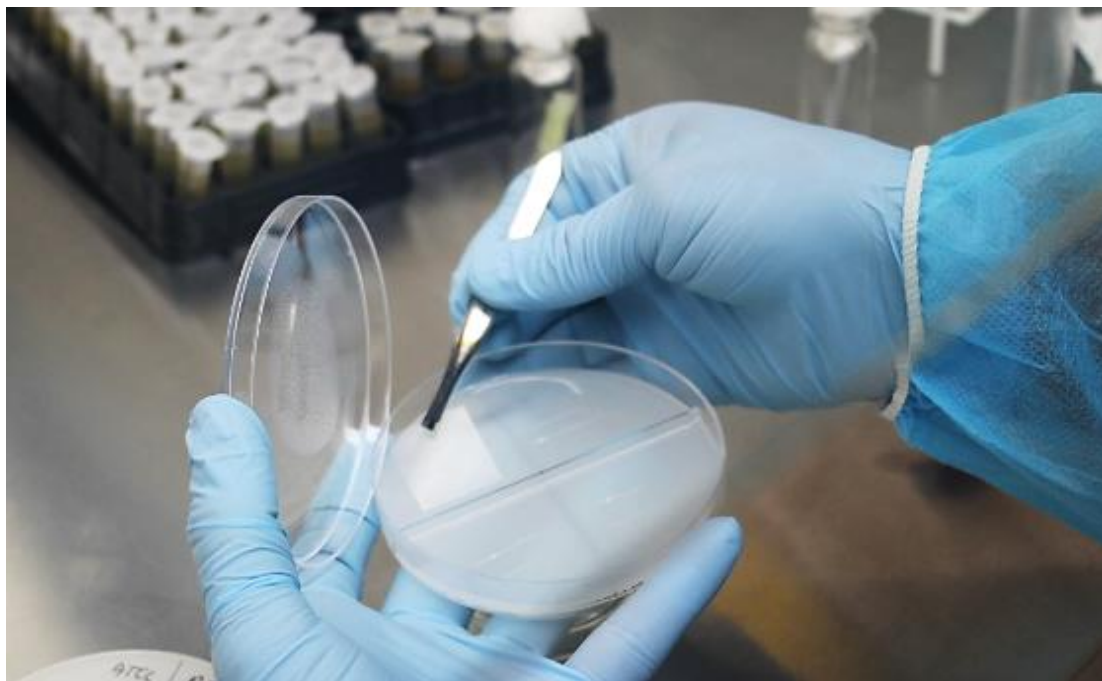
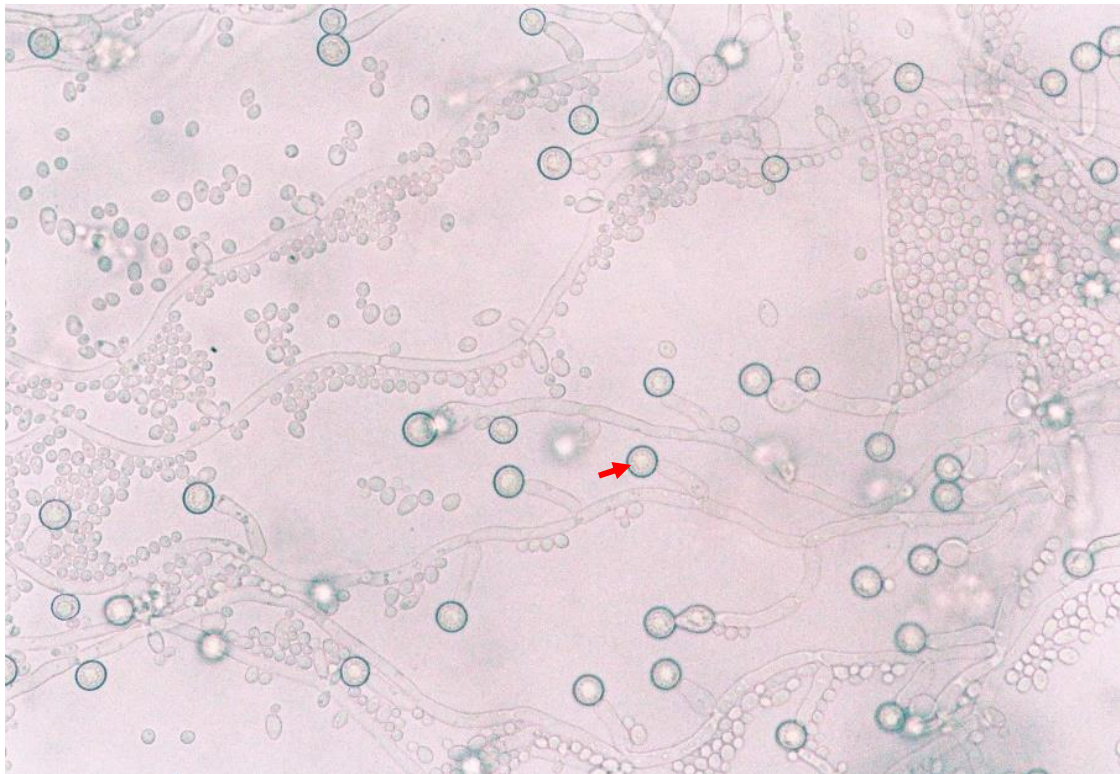


Figura 3

Observación de las Clamidosporas 40x de *Candida albicans*

**c. Siembra en Chrom Agar *Candida***

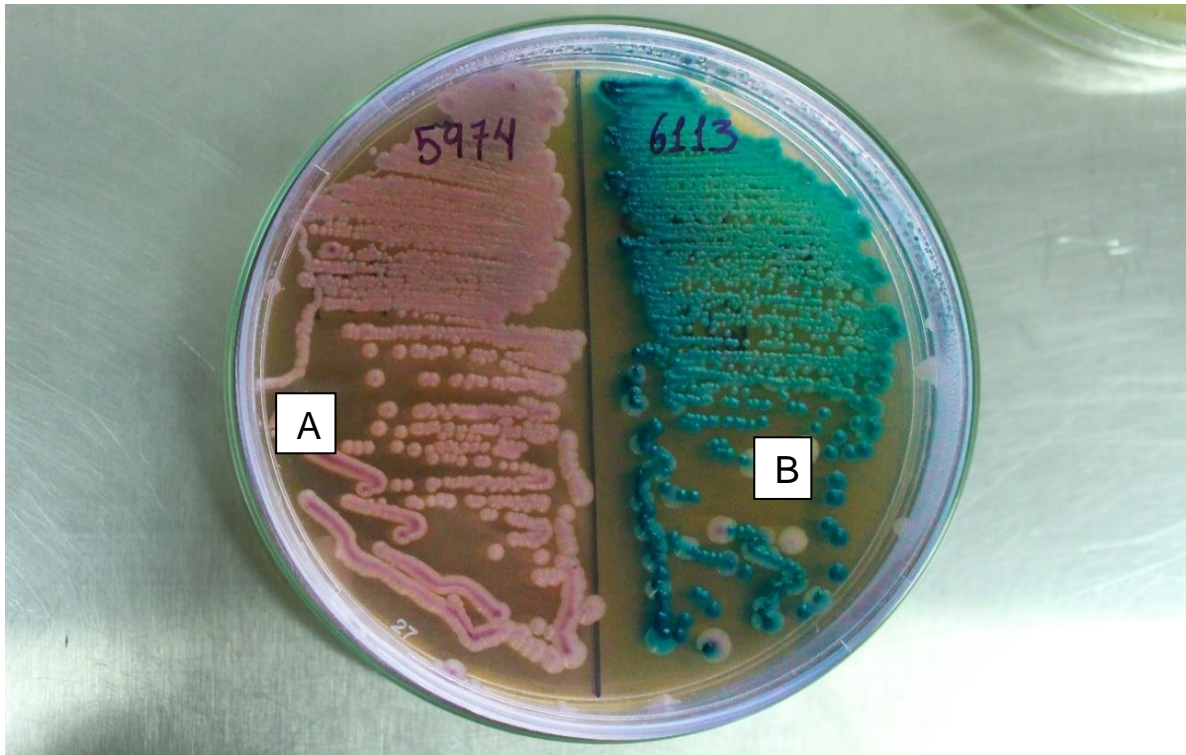
En las placas solidificadas de Chrom Agar *Candida* (CHROMagar Company, Francia), se inoculó cada uno de los cultivos reactivados en Agar Sabouraud Dextrosa (ASD), con la ayuda de un asa bacteriológica y seguidamente se incubó a 37°C por 48 horas.

Las placas se examinaron entre las 24 y 72 horas, observándose el color y las características de las colonias, según la pigmentación. *C. albicans* presentan colonias lisas de color verde esmeralda, *C. dubliniensis* de color verde oscuro, *C. tropicalis* de color azul oscuro con halo púrpura-marrón y *C. krusei* de colonia rugosa de color rosado en el centro y borde blanco (Giusiano & Mangiaterra, 1998).

Figura 4

Identificación de especies de Candida en CHROM agar Candida.

A) Candida glabrata (rosa - malva). B) Candida albicans (verde esmeralda)



3.2.5 Prueba de susceptibilidad de *Candida albicans* y *Candida no albicans*

Según la metodología descrita en el documento M44-A2 publicado por el CLSI en el 2009, se utilizaron placas de 90 mm de diámetro, conteniendo agar Mueller-Hinton suplementado con 2% de glucosa, a una profundidad de 4,0 mm.

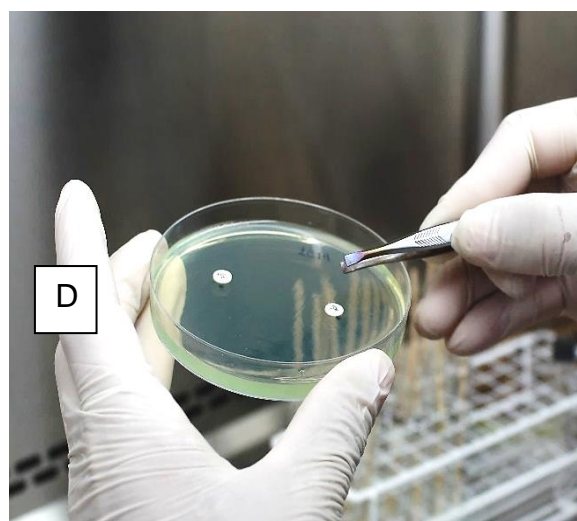
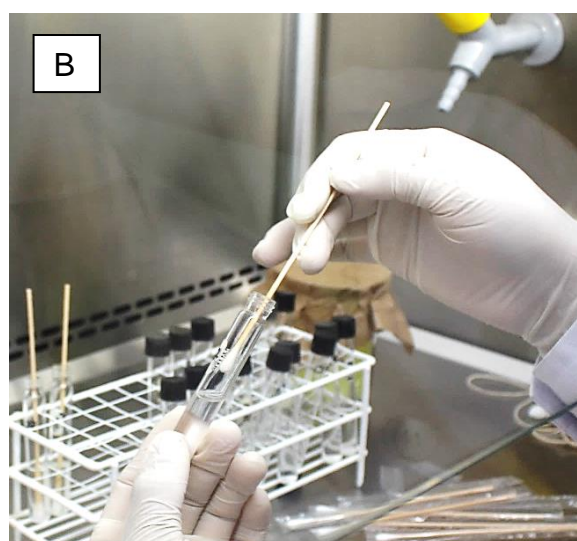
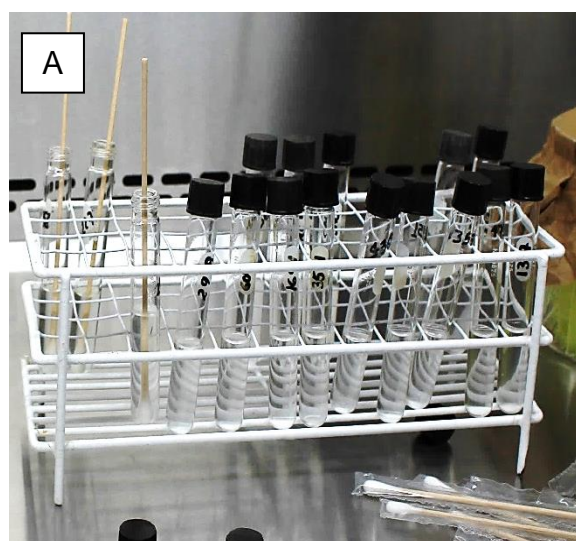
El proceso se inició a partir de un cultivo de 24 horas de incubación, el cual se resuspendió en 5mL de una solución salina y se ajustó a la turbidez del tubo 0,5 en la escala de McFarland. Luego se humedeció un hisopo esterilizado rotándolo contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.

Se sembró cuidadosamente en una placa conteniendo Mueller Hinton modificado en 3 direcciones, para obtener crecimiento uniforme colocando la placa hacia arriba durante 10 a 15 minutos. Se usaron discos antifúngicos con 25 µg de fluconazol y 1 µg de voriconazol los que se colocaron sobre la superficie de las placas

inoculadas, a una distancia de 4 cm. Luego las placas se incubaron las placas a 37° durante 24 horas. Después se realizó la lectura considerando los respectivos puntos de corte para *Candida* Spp. consignado por el documento M44-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), tal como se muestra el anexo 2 (Pfaller et al., 2005).

Figura 5

Prueba de susceptibilidad antifúngica en agar Muller Hinton a) Preparación del inóculo ajustó a la turbidez 0,5 de Mc. Farland b) Toma de la suspensión con hisopo estéril c) Inoculación en placa d) Aplicación de los discos de fluconazol y voriconazol



3.2.6 Producción de Fosfolipasas

La actividad de fosfolipasas se determinó por el método semicuantitativo en placa, cada uno de los cultivos de *Candida* spp. fueron inoculados en medio agar Sabouraud dextrosa (ASD) suplementado con yema de huevo, y luego del crecimiento se procedió a medir la zona densa y blanca del hidrolizado bien definido, a manera de precipitado (Price et al., 1982; Samaranayake et al., 1984; D'Eça et al., 2011).

El medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo estuvo constituido por 13,0 g de ASD; 11,7g de NaCl; 0,11g de CaCl₂; 184 mL de agua destilada y 10% de yema de huevo estéril (Sachin et al., 2012; Tsang et al., 2007). En la preparación del medio se disolvieron y esterilizaron todos los componentes sin la yema de huevo, luego se dejó enfriar hasta una temperatura de 50° y luego se agregó 20 ml de la yema de huevo. Los 20 ml de la yema de huevo se obtuvieron del sobrenadante del centrifugado a 500g x 10 min de la yema de huevo. Posteriormente se realizó suspensiones en solución salina de aproximadamente 10⁶ células (10 ul) de cada uno de los cultivos puros proveniente de la siembra en agar Sabouraud por 24 h; esto se inoculo por triplicado en la superficie del medio ASD- yema de huevo (Ramos et al., 2015; Sachin et al., 2012), luego se incubo a 37° C por 3 a 8 días (Oksuz et al., 2007)

La lectura de la fosfolipasa se realizó por el método descrito por Price et al., 1982 y por Oksuz et al., 2007, donde el índice de actividad enzimática (Pz) está cuantificado por el diámetro de la colonia dividido por el tamaño de la zona hidrolizada alrededor de la colonia(precipitado), cuyo resultados son clasificados en cuatro rangos, de modo que cuando el índice Pz se acerca a cero indica una mayor actividad enzimática, mientras que valores cercanos a la unidad sugiere menor actividad enzimática. Los rangos de Pz están así, de 0.900 a 1.000, de 0.800 a 0.899, de 0.700 a 0.799, y de valores menores a 0.699 hasta 0.699, que indican muy baja o nulo, baja, alta y muy alta actividad enzimática respectivamente (Panizo et al., 2005; Oksuz et al., 2015; Ramos et al., 2015).

$Pz = \frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la zona de producción enzimática}}$	$0.699 \leq - 0.699 = \text{Muy alta actividad enzimática (++++)}$ $0.700 - 0.799 = \text{Alta actividad enzimática (++++)}$ $0.800 - 0.899 = \text{Baja actividad enzimática (++)}$ $0.900 - 1.000 = \text{Muy baja actividad enzimática (+)}$
--	--

Figura 6

Separación de la yema de huevo para preparación del medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo.



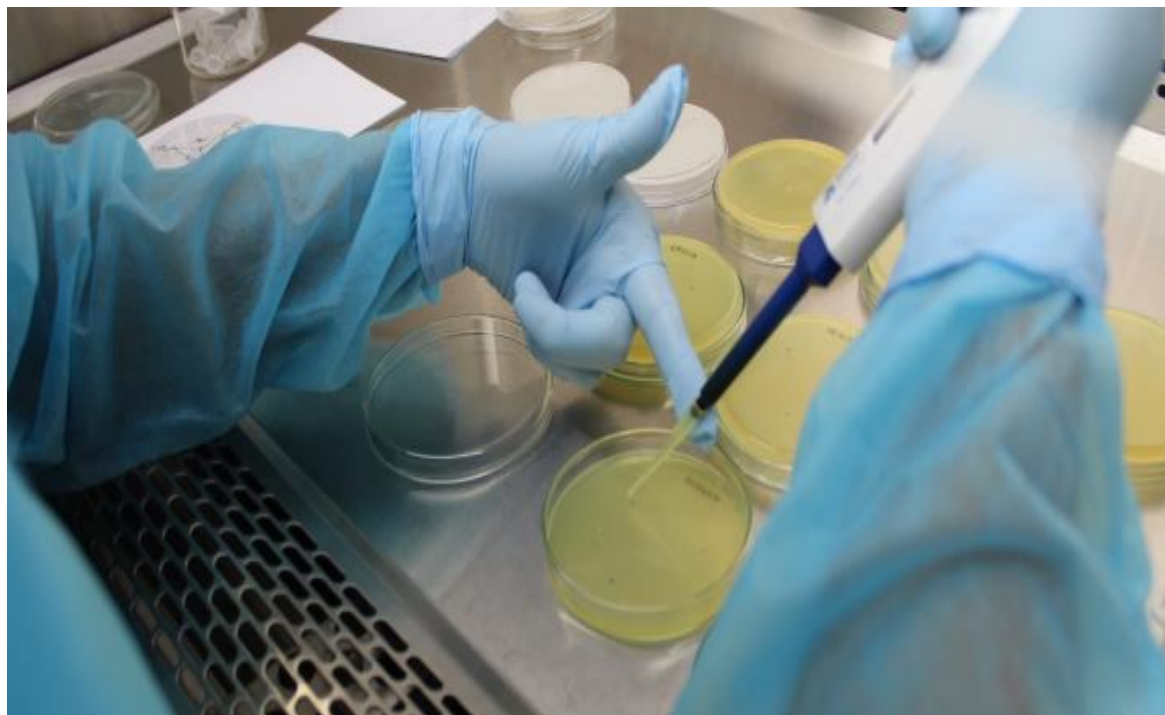
Figura 7

Medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo



Figura 8

Inoculación de la suspensión de los cultivos puros de Candida spp. en el medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo.

**3.2.7 Análisis estadístico de datos**

Una vez obtenido los datos de las variables, fueron ordenados en tablas y figuras, y se procedió a su descripción utilizando porcentajes y medidas de tendencia central como promedios, adicionalmente la prueba de chi cuadrado ($P < 0,05$) con lo que se determinó que no existe diferencias significativas entre la sensibilidad y producción de fosfolipasas en cepas de *C. albicans* y *C. no albicans*. Se utilizaron los programas de Microsoft Office Word y Excel versión 2010.

IV RESULTADOS

4.1. Identificación de las *Candida albicans* y *Candida no albicans*

A partir de los datos obtenidos del estudio de los 60 cultivos puros, se determinó que 22(36,7%) correspondían a *Candida albicans* y 38 (63,3%) a *C. no albicans* (Tabla 1), agrupando este último las especies de *C. tropicalis* con 21 (35,0%), *C. glabrata* con 7 (11,7%), *C. parapsilosis* y *C. krusei* ambas con 4 (6,7%) y *C. famata* con 2 (3,3%). (tabla 2, figura 9).

Las especies más frecuentemente identificadas fueron *Candida albicans* y *C. tropicalis* con 22 y 21 cultivos respectivamente; la menos frecuente fue *C. famata* solo con 2 cultivos.

Tabla 1

Frecuencia de los cultivos puros de Candida albicans y C. no albicans.

Hospital Regional Lambayeque, 2017.

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>C. albicans</i>	22	36, 7%
<i>C. no albicans</i>	38	63,3%
Total	60	100%

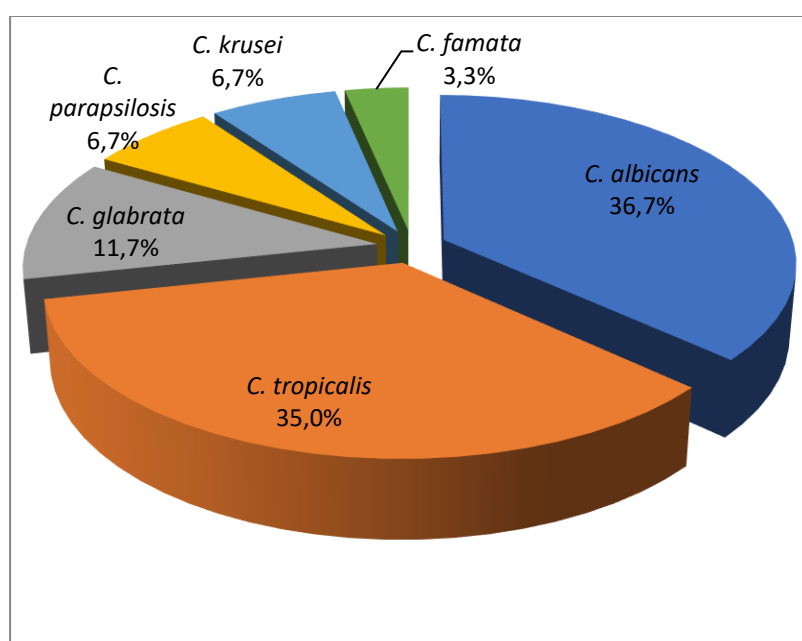
Tabla 2

Distribución de especies Candida albicans y C. no albicans. Hospital Regional Lambayeque, 2017.

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>C. albicans</i>	22	36,7%
<i>C. no albicans</i>		
<i>C. tropicalis</i>	21	35,0%
<i>C. glabrata</i>	7	11,7%
<i>C. parapsilosis</i>	4	6,7%
<i>C. krusei</i>	4	6,7%
<i>C. famata</i>	2	3,3%
Total	60	100%

Figura 9.

Distribución de especies Candida albicans y C. no albicans. Hospital Regional Lambayeque, 2017



4.2 Susceptibilidad de *Candida albicans* y *Candida no albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017.

El estudio de sensibilidad frente al fluconazol mostró que de los 60 cultivos *candida* estudiados el 88,3% (53) fue susceptible (S), el 10,0% (6) fue resistente (R) y solo el 1,7% (1) fue sensibles dependientes de la dosis (SDD). De las 22 (100,0%) *C. albicans*, 21(95,5%) fueron susceptibles, 1 (4,5%) resistente y ninguna SDD. De las 38(100%) *C. no albicans* estudiadas, resultaron ser susceptibles todas las cepas *C. flamata* (2) y *C. parapsilosis* (4), 20 (95,2%) de *C. tropicalis*, 6 (85,7%) de *C. glabrata* y solo una cepa de *C. tropicalis* (4,8%) fue SDD. Las cepas resistentes fueron una de *C. glabrata* y el 100%(4) de *C. krusei*, cuya especie es intrínsecamente resistente al fluconazol (Tabla 3).

En tanto, el estudio de sensibilidad frente al voriconazol mostró que del total de especies de *candida* estudiados, el 98,3% (59) fue susceptible y el 1,7% fue resistente. De las 22(100%) *C. albicans*, 21(95,5%) resultaron ser susceptibles, solo una (4,5%) resistente y ninguna SDD. En tanto que, de las 38(100%) *C. no albicans* todas resultaron ser susceptibles, ninguna cepa fue SDD o resistente (Tabla 4).

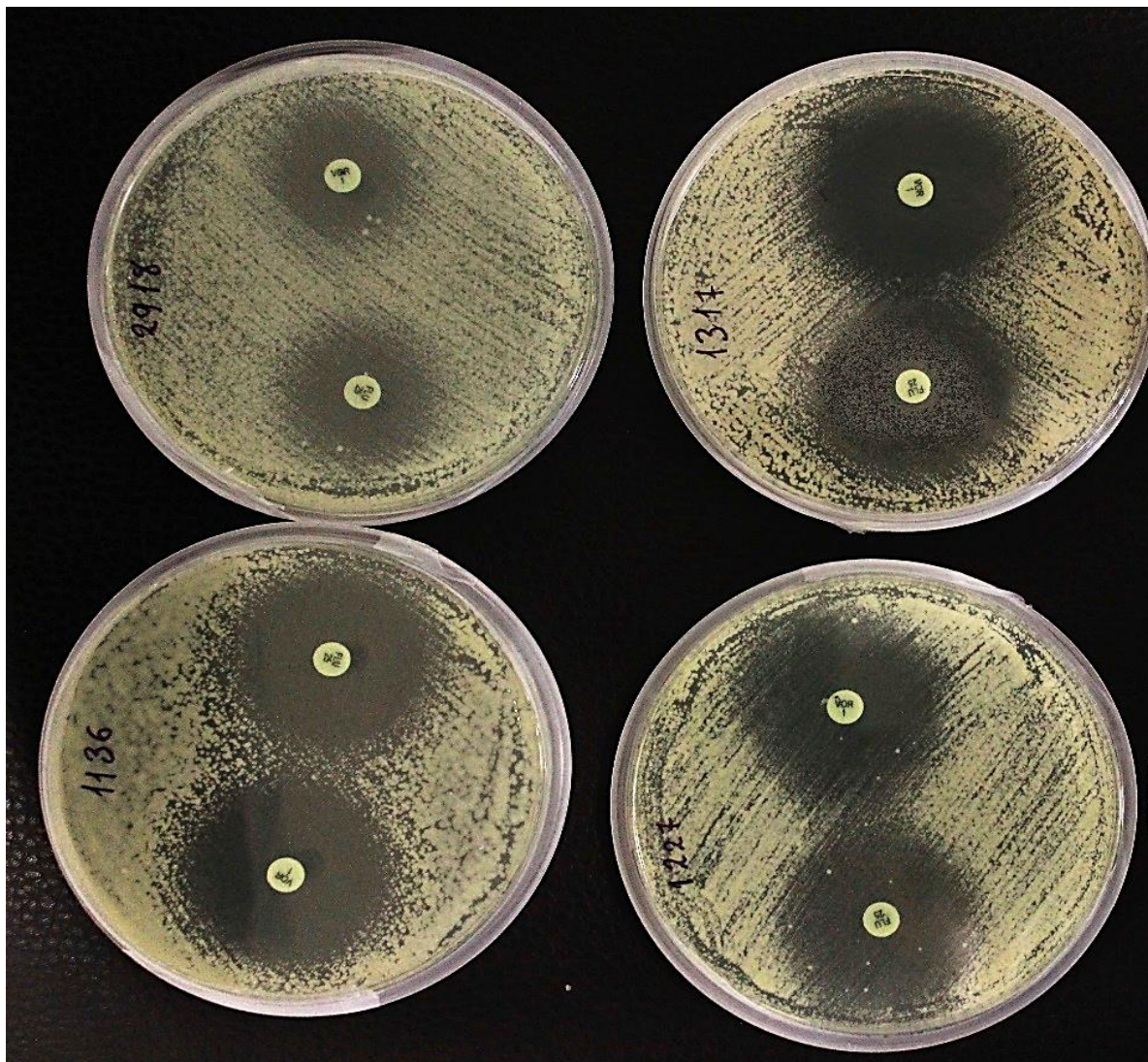
Tabla 3.

Distribución de la susceptibilidad al fluconazol y al voriconazol en cultivos puros de Candida albicans y C. no albicans. Hospital Regional Lambayeque, 2017.

Especie	Fluconazol n (%)			Voriconazol n (%)		
	Sensible	SDD	Resistente	Sensible	SDD	Resistente
<i>C. albicans</i>	21 (95,5)	0 (0)	1 (4,5)	21 (95,5)	0 (0)	1 (4,5)
<i>C. famata</i>	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. krusei</i>	0(0)	0 (0)	4 (100)	4(100,0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. tropicalis</i>	20 (95,2)	1 (4,8)	0 (0)	21 (100,0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. glabrata</i>	6 (85,7)	0 (0)	1 (14,3)	7(100,0)	0 (0)	0 (0)
<i>C. parapsilosis</i>	4(100,0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Total general	53 (88,3)	1 (1,7)	6 (10,0)	59 (98,3)	0 (0)	1(1,7)

Figura 10.

Observación de la susceptibilidad antifúngica en especies del género Candida.



4.3 Producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y *Candida no albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017

De las 60 especies estudiadas, 19 (31,7%) tuvieron una actividad enzimática muy alta (++++), 13 (21,7%) alta (+++), 4 (6,7%) baja (++) y solo 24 (40,0%) tuvieron muy baja o nula actividad enzimática (+).

Los 22 cultivos de *C. albicans* produjeron fosfolipasas, de las cuales 14(23,3%) produjeron una actividad enzimática (Pz) muy alta, y 8 (13,3%) un Pz alta; en tanto que de 38 cultivos de *C. no albicans*, 5(8,3%) tuvieron un Pz muy alto, 5(8,3%) alto, 24 (40,0%) muy bajo, 4(6,7%) bajo.

De la producción enzimática de fosfolipasa por especie, resultaron producir un Pz muy alto: el 100%(2) de *C. famata*, el 63,6%(14) de *C. albicans*, el 25,0%(1) de *C. krusei*, el 25,0% (1) de *C. parapsilosis* y el 4,8%(1) de *C. tropicalis*; un Pz alto : el 50,0(2)% de *C. krusei*, el 36,4%(8) de *C. albicans*, y el 14,3(3)% de *C. tropicalis*; Un Pz bajo: el 25,0%(1) de *C. krusei*, el 14%(1) de *C. glabrata* y el 9,5%(2) de *C. tropicalis*; y un Pz muy bajo el 85,7% (6) de las *C. glabrata*, el 75,0%(3) de *C. parapsilosis* y un 71,4%(15) de *C. tropicalis* (tabla 4).

Los valores más cercanos a cero indicaron una alta actividad enzimática y lo cercanos a 1 una baja o nula actividad; de tal modo que los valores de Pz para *C. albicans* ubicado en 0,477 el mínimo y el 0,791 en el máximo; no obstante, los valores Pz para las *Candida no albicans*, se ubicaron el valor mínimo 0,518 correspondiente a *C. famata* y el Pz máximo de 1,00 correspondiente a 15 cultivos *C. tropicalis*, 6 de *C. glabrata* y 3 de *C. parapsilosis*. (Tabla 5).

Tabla 4.

Distribución de la producción de fosfolipasas en Candida albicans y C. no albicans. Hospital Regional Lambayeque, 2017

Especies	Muy Baja		Baja		Alta		Muy alta		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>-C. albicans</i>	0	0,0	0	0,0	8	36,4	14	63,6	22	100,0
<i>-C. no albicans</i>	24	40,0	4	6,7	5	8,3	5	8,3	38	63,3
<i>C. famata</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	100,0	2	100,0
<i>C. krusei</i>	0	0,0	1	25,0	2	50,0	1	25,0	4	100,0
<i>C. tropicalis</i>	15	71,4	2	9,5	3	14,3	1	4,8	21	100,0
<i>C. glabrata</i>	6	85,7	1	14,3	0	0,0	0	0,0	7	100,0
<i>C.parapsilosis</i>	3	75,0	0	0,0	0	0,0	1	25,0	4	100,0
Total general	24	40,0%	4	6,7%	13	21,7%	19	31,7%	60	100,0%

n: número de cultivos

Tabla 5.

Distribución de los valores de Pz entre los aislados de Candida albicans y C. no albicans.

Pz*	Clase**	<i>C. albicans</i>		<i>C. no albicans</i>	
		n	%	n	%
1,00	1+	0	0,0%	24	63,16%
0,90 - 0,99	1+	0	0,0%	0	0,00%
0,80 - 0,89	2++	0	0,0%	4	10,53%
0,70 - 0,79	3+++	8	36,36%	5	13,16%
0,60 - 0,69	4++++	7	31,82%	2	5,26%
0,50 - 0,59	4++++	5	22,73%	3	7,89%
0,00 - 0,49	4++++	2	9,09%	0	0,00%
Total		22	100,0%	38	100,0%

* Pz : Índice de actividad de la fosfolipasa

**0,90 – 1,00: 1+; 0,80 – 0,89: 2+; 0,70 – 0,79: 3+; < 0,69: 4+.

Figura 11.

Actividad de la fosfolipasa a los 8 días.(vista anterior)
Observación de la zona hidrolizada (precipitado blanquesino)
alrededor de la colonia

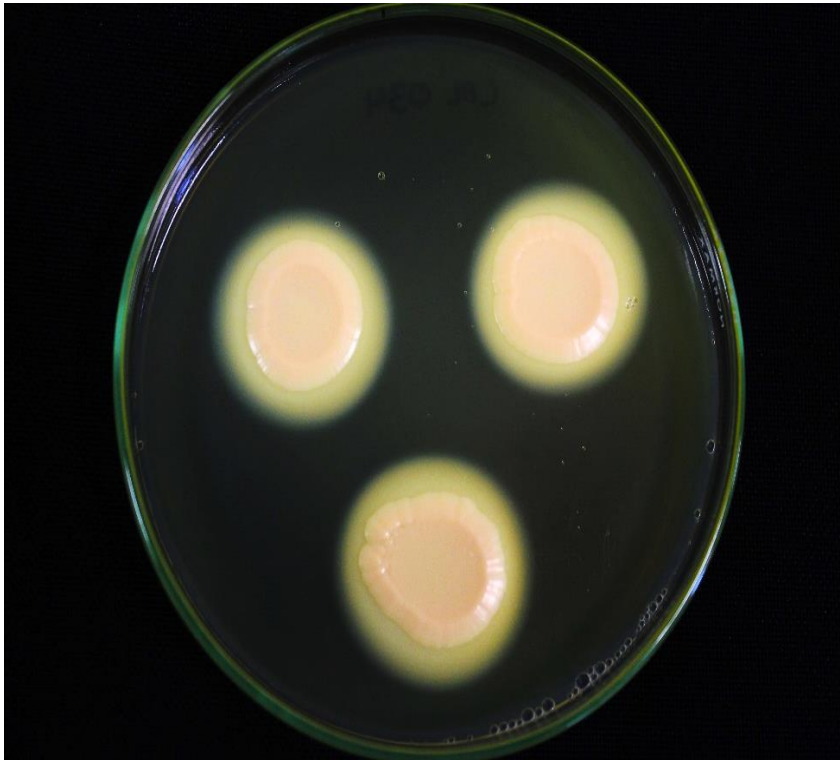


Figura 12.

Actividad de la fosfolipasa a los 8 días (vista posterior)
Observación de la zona hidrolizada (precipitado blanquesino)
alrededor de la colonia

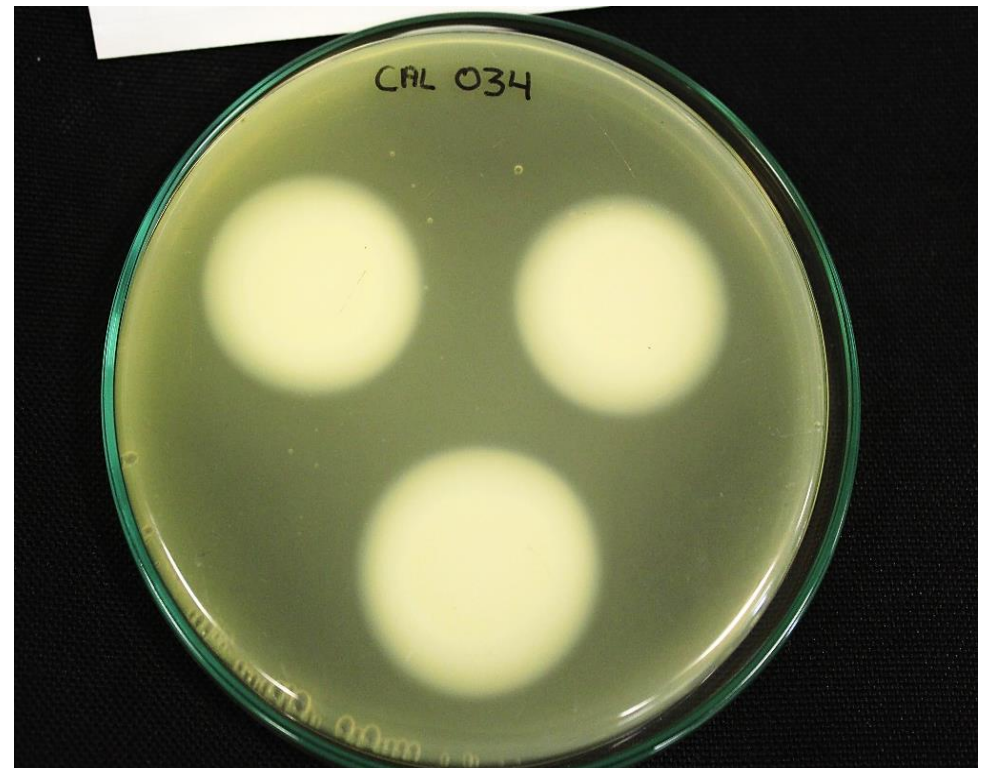
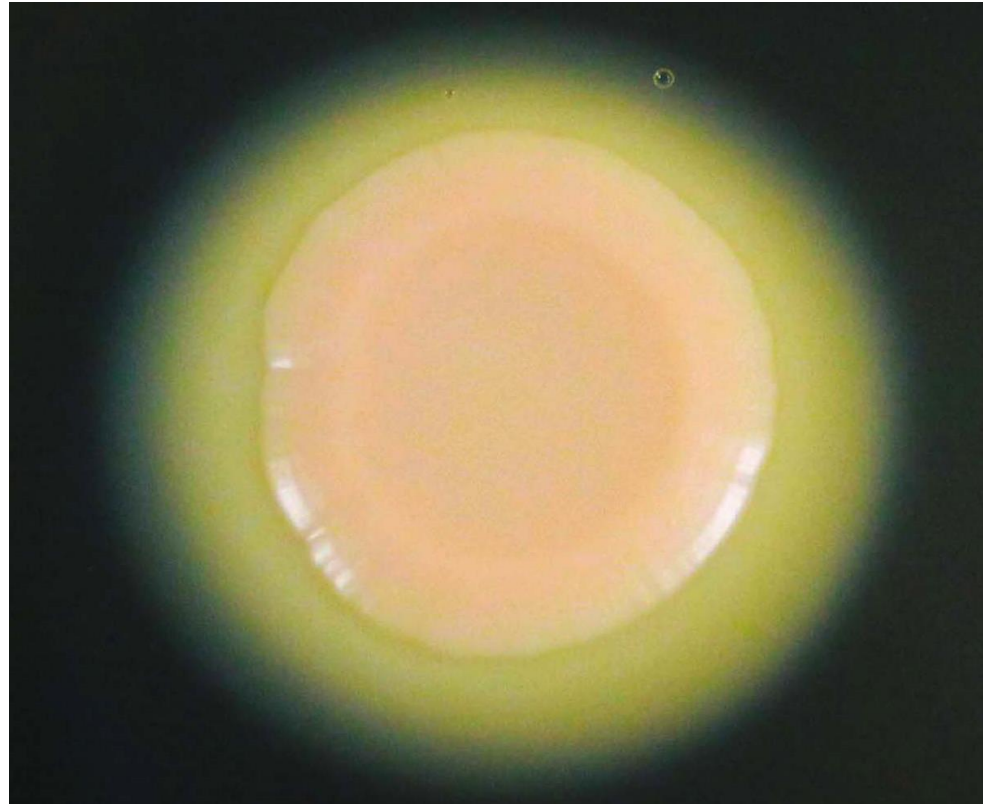


Figura 13.

Actividad de la fosfolipasa a los 8 días. Observación de una colonia con la zona hidrolizada definida.



4.4 Relación entre Susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y *Candida no albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017.

Aplicando la prueba de chi cuadrado, con un 95% de confianza ($P=0,005$) se determinó que no existe diferencias significativas entre la sensibilidad y producción de fosfolipasas, por lo cual no podemos determinar si existe alguna relación, tal como se demuestra en la tabla 6 y 7.

Tabla 6.

Relación entre la susceptibilidad al fluconazol y la producción de fosfolipasas en Candida albicans

Prueba de tabla de contingencia chi-cuadrado para la independencia				
		Alta	Muy alta	Total
Sensible	Observado	8	13	21
	% de fila	36,4%	63,6%	100,0%
	% de columna	100,0%	92,9%	95,2%
Resistente	Observado	0	1	1
	% de fila	0,00%	100,0%	100,0%
	% de columna	0,00%	7,1%	4,8%
Total	Observado	8	14	22
	% de fila	33,3%	66,7%	100,0%
	% de columna	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 7.

Relación entre la susceptibilidad al fluconazol y la producción de fosfolipasas en Candida no albicans

Prueba de tabla de contingencia chi-cuadrado						
		Muy baja	Baja	Alta	Muy alta	Total
Sensible	Observado	22	3	3	4	32
	% de fila	68,8%	9,4%	9,4%	12,5%	100,0%
	% de columna	91,7%	75,0%	60,0%	80,0%	84,2%
SDD	Observado	1	0	0	0	1
	% de fila	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
	% de columna	4,2%	0,0%	0,0%	0,0%	2,6%
Resistente	Observado	1	1	2	1	5
	% de fila	20,0%	20,0%	40,0%	20,0%	100,0%
	% de columna	4,2%	25,0%	40,0%	20,0%	13,2%
Total	Observado	24	4	5	5	38
	% de fila	64,9%	10,8%	10,8%	13,5%	100,0%
	% de columna	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

V DISCUSIÓN

Años atrás, los hongos se consideraban sin ningún potencial patogénico, sin embargo, las especies *Candida*, se están convirtiendo en una causa cada vez más frecuente de infecciones nosocomiales, sobre todo en personas inmunodeprimidas (Sachin et al., 2012). Esta capacidad lo convierte en un patógeno oportunista, ya que en condiciones normales no causaría ninguna dificultad, incluso forman parte de la microbiota habitual.

En el estudio de susceptibilidad se encontró que a pesar del frecuente uso profiláctico del fluconazol, los cultivos de *Candida spp* continúan conservando alta sensibilidad, sin embargo, Pfaller et al., 2010, sugieren que la resistencia a fluconazol está en aumento, sobre todo en cepas de *C. no albicans* que se han convertido en las más frecuentemente aisladas. En el presente estudio el 88,3% (53) de los cultivos fueron susceptibles (S) al fluconazol, similar al realizado por Zuluaga et al., 2010, quien encontró una sensibilidad del 78,3% de un total de 337 aislamientos.

En cuanto al voriconazol, la resistencia es poco frecuente, así se demuestra en nuestros resultados donde solamente 1 de 60 cultivos perteneciente a *C. albicans* fue resistente; sin embargo, en otro estudio realizado por Quindos et al., observaron resistencia en *C. glabrata* (3,6%) y *C. krusei* (6,7%), más aún Zuluaga et al., en el 2016, observaron esta resistencia a parte de *C. glabrata* y *C. krusei*, en aislados de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. lipolytica*.

Se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la actividad de la fosfolipasa, en el presente se encontró que el 60% (31,7% muy alta, 21,7% alta y

6,6% baja) del total de aislamientos produjeron esta enzima, resultados similares a los obtenidos por Sachin et al., (2012) cuya incidencia fue 60,9%. A diferencia de Panizo et al., (2005) quienes la reportaron en mayor porcentaje, 95%. Estas discrepancias en los resultados porcentuales se relacionan probablemente con las diferentes especies, número de aislados y metodologías usadas en los estudios.

Varios estudios han demostrado que la actividad de las fosfolipasas se observa en un alto porcentaje en *C. albicans*, como lo reportaron Ramos et al., (2015) y Deepa et al., (2015) en un 100%, Campos (2015) en un 97%, Sachin et al., (2012) en un 92,3% lo cual coincide con este estudio donde el 100% de *C. albicans* produjo la fosfolipasa.

C. albicans es la especie más frecuentemente aislada de casos clínicos y considerada la especie más patógena del género, a la cual se le atribuye el mayor número de muertes debidas a infecciones micóticas, sin embargo, hay una tendencia hacia un aumento de *C. no albicans*, como como se demuestra en este estudio donde su incidencia fue del 63,3%, lo que confirma el aumento de nuevos patógenos emergentes que hace unas décadas su incidencia era muy inferior al 50% o por debajo de *C. albicans*.

Estos resultados guardan relación con lo descrito por Pfaller et al., (2010), en el programa de vigilancia global de ARTEMIS (1997 al 2007), donde predominó *C. albicans* (65,3%) en la cual se observó disminución en su tasa de aislamientos, mientras que en las *C. no albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) sus aislamientos aumentaron; y también coinciden con Villanueva & Arenas (2007), al reportar que *C. albicans* ha disminuido drásticamente desde un 90% en los años 70 a menos del 50% en la actualidad. Pero no guarda relación con lo descrito por Villalobos et al., y Pemán et al., (2011) quienes reportaron a *C. parapsilosis* como la especie más frecuentemente aislada.

C. tropicalis es un patógeno conocido por ser importante en infecciones nosocomiales, y en los últimos años su incidencia ha aumentado considerablemente, sin embargo, en el presentes estudio, su producción de fosfolipasas se considera

débil o media (promedio $P_z = 0,83$), por lo que no podemos llegar a una conclusión real de que existe una relación real de, si existe relación entre la susceptibilidad y la producción de fosfolipasa.

Se ha utilizado el método semicuantitativo en placa, Agar Saboraud Dextrosa yema de huevo, para medir la actividad enzimática de las fosfolipasas, obteniendo alta actividad enzimática, un aislado de *C. albicans* (0,477) y uno de *C. famata* (0,518). Panizo *et al.*, (2005) obtuvieron más alta la actividad enzimática de fosfolipasas en *C. albicans* (0,248) y un cultivo de *C. tropicalis* (0,256) por lo tanto *C. albicans* como en las *C. no albicans* producen la fosfolipasa, las cuales son importantes para entender la correlación entre las especies y la infección.

VI CONCLUSIONES

- 6.1 Se identificaron 22(36,7%) cultivos de *Candida albicans* y 38 (63,3%) de *Candida* no *albicans*, de esta última se identificaron: 21 (35%) cepas de *C. tropicalis*, 7 (11,7%) de *C. glabrata*, 4 (6,7%) de *C. parapsilosis*, 4 (6,7%) de *C. krusei*, y 2(3,3%) de *C. famata*.
- 6.2 En el estudio de susceptibilidad frente al fluconazol, el 88,3% (53) de los cultivos puros fueron sensibles (S), el 1,7%(1) fue sensibles dependientes de la dosis (SDD) y el 10,0% (6) fue resistente (R); mientras que frente al voriconazol el 98,3% (59) de los aislamientos fueron sensibles y el 1,7 % (1) fue resistente, perteneciendo este a *C. albicans*.
- 6.3 En el estudio de la producción de Fosfolipasas mostró que el 31,7 % (19) de los cultivos presentaron actividad enzimática (Pz) muy alta, el 21,7 % (13) alta, el 6,9% (4) baja y el 40,0 % (24) muy baja.
- 6.4 Aplicando la prueba de chi cuadrado y con un 95% de confianza ($P=0,05$) se determinó que no existe diferencias significativas en la relación entre la sensibilidad del fluconazol y voriconazol con la producción de fosfolipasas.

VII RECOMENDACIONES

- Para la identificación de especies de *Candida*, se puede utilizar adicionalmente las pruebas de fermentación de carbohidratos, entre los que tenemos Auxacolor, Uni-Yest Tek, API 20 CAUX, API *Candida*, entre otros.
- Al evaluar la susceptibilidad a los antimicóticos: fluconazol y voriconazol se debe considerar siempre a las especies de *Candida* no *albicans*, pues algunas presentan resistencia innata como *C. krusei* al fluconazol, y otras cuya resistencia aunque baja aún, está en aumento por diferentes factores.
- Las investigaciones posteriores deberían realizarse con un mayor número de cepas de *Candida ssp*, lo que permitirá obtener valores estadísticos más exactos, pues al aumentar el número de muestra, también aumentarán las cepas consideradas resistentes, con lo cual se podrían obtener valores significativos al comparar la resistencia con la susceptibilidad que en el presente trabajo no se logró comprobar.
- Realizar investigaciones específicas sobre los tipos de fosfolipasas abordando los lugares donde actúan y relacionándolo con diferentes sitios anatómicos, con el fin de aclarar su contribución a la virulencia fúngica.
- Dada la importancia de las fosfolipasas en la virulencia de hongos, se deben continuar con los estudios de otros factores, como son las proteinasas, el cambio fenotípico, la adherencia, su dimorfismo, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biopelículas.
- Adicionalmente al uso de medios de cultivo para producción de fosfolipasas, se puede hacer una cuantificación con métodos más especializados, para obtener datos más precisos.
- Con respecto al tiempo de incubación del medio Agar Sabouraud Dextrosa yema de huevo, se recomienda hacer la lectura entre los días 5 - 8; ya que al realizar la lectura a las 48h o 72 h como lo sugieren algunos autores, se observa solamente una leve formación del precipitado blanquecino, que puede llevar a falsos negativos.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajenjo, C., Aquevedo, A., Guzmán, A., Poggi, H., Calvo, M., Castillo, C., León E., Andresen, M. & Labarca, J. (2010). Perfil epidemiológico de la candidiasis invasora de pacientes críticos en un hospital universitario. *Rev. Chilena Infectol*, 28(2), 118-22. <https://europepmc.org/article/med/21720690>
- Alfonso, C., Lopez, M., Arechavala, A., Perrone, M., Guelfand, L., Bianchi, M. (2010). Investigación presuntiva de *Candida* spp. Y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de brillante candida agar. *Rev. Iberoam Micol*, 27(2), 90-93. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140610000161>
- Arendrup, M., Bruun, B., Christensen, J., Fursted, K., Johansen, H., Kjældgaard, P., Knudsen, J., Kristensen, L., Møller, J., Nielsen, L., Rosenvinge, F., Røder, B., Schønheyder, H., Thomsen, M. & Truberg, K. (2011). La vigilancia nacional de fungemia en Dinamarca (2004 a 2009). *J. Clin. Microbiol*, 49 (1), 325-334.
- Bonifaz, J. (2012). *Micología médica básica*. Cuarta edición. Introducción y generalidades, Levaduras Capítulo 6, pags: 86–87.
- Castrillón, L., Palma, A. & Padilla, C. (2005). Factores de virulencia de *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana* 49, 12-27. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen>.
- Campos, L. (2015). “Estudio del papel de las fosfolipasas fúngicas en la inducción de trampas extracelulares de neutrófilos (nets) por especies del género *candida*”. Tesis para optar el Grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica. Universidad Autónoma de Nuevo León, España.
- Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., Capparellic, F. & Del Castillo, M. (2013). *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*.

- EnfermInfecc Microbiol Clin*, 31(6), 380-384. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X12003229>
- D'Eça, J., Silva, F., Rosa, C., Monteiro, G., Silva, P & Monteiro, C. (2011). *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44(3),334-338.
- De Bedout, C., Ayabaca, J., Vega, R., Méndez, M., Santiago, R., Pabón, M., Tabares, A., Arango, M., Restrepo, A. & Newell, V. (2003). Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica*, 23:31-7. doi: 0120-4157
- De la Calle, N., Santa, C., Cardona N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *C. albicans* y hongos dermatofitos. *Rev CES Med* 2012; 26(1): 43-55.
- Deepa, K., Jeevitha T. & Michael A. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolate from oral cavity. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 7(3): 28-32 doi: 10.5897/JMA2015.0337
- Duarte, A., Márquez, A., Araujo, C. & Pérez, C. (2009). Modalidades de la Prueba del Tubo Germinal. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1):66-68. doi: 1317-973X
- Elewa, H., El-Mekaty, E., El-Bardissy, A., Ensom, H. & Wilby, J. (2015). Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in the Management of Invasive Fungal Infections: A Critical Review. *Clin Pharmacokinet*, 54 (12), 1223-1235. doi: 10.1007 / 40262-015-0297-8
- Echevarria, A., Durante, A., Arechavala, A. & Negroni, R. (2002). Estudio de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *C. albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam Micol*, 19, 95-98. https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_Negroni/publication/242127305
- Fraisse, T., Lachaud, L., Sotto, A., Lavigne, J., Cariou, G., Boiteux, J., Escaravage, L., Coloby, P., Bruyère, F.; CIAFU. (2011). Recommendations of the Infectious Disease Committee of the French Association of Urology. Diagnosis, treatment

- and monitoring candiduria. *Prog Urol*, 21(5):314-21. Recuperado de: <https://europepmc.org/article/med/21514533>
- Gadela, I. & Cuenca M. (2004). Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(1): 32-39. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X04730281>
- Galán, M (2014). Factores de Patogenicidad en *Candida Tropicalis*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Extremadura, España.
- García-Vargas, M., Casado M., Mirc, N. & Barrietac, J. (2012). Análisis de tres candidinas en el tratamiento de la candidiasis invasora en pacientes adultos no neutropénicos en España. *Farm Hosp*, 36(4), 207-215 doi:10.1016/j.farma.2011.03.007
- Giusiano, G. & Mangiaterra, M. (1998). Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con medio CHROM-agar Candida. *Revista Argentina de Microbiología*, 30, 100 -103. doi: 0235-7541
- Gokce, G., Cerikcioglu, N. & Yagci A. (2007). Proteinasa ácida, fosfolipasa, y la producción de biopelículas de *Candida* especies aisladas de los hemocultivos. *Med Mycol Open Access*. 164(6):265-9.
- Gómez, E., Cid, A., Fernández, M., Lova, M., Vera. A. & Crespo, V. (2013). Eficacia Terapeutica del voriconazol en candidiasis vulvovaginal crónica por *Candida glabrata*. *Rev. Iberoam Micol*, 2013;30(1):31-33. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S113014061200085X>
- Hernández, B., Prieto, M., Curiel, E., Muñoz, J., Quesada, G. & Arias, M. (2009). Perfil clínico-epidemiológico y taxonómico de la candidiasis sistémica en una unidad de cuidados intensivos. *Med Intensiva*, 33(3):144-147. Recuperado de: <http://scielo.isciii.es/pdf/medinte/v33n3/nota.pdf>
- Hernández, S., Rueda, F. & Rojas, R. (2014). Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos,

- con candidiasis oral y sujetos sanos. *Rev Iberoam Micol*, 31(2),137–140. doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.003.
- Jiang, C., Dong,D., Yu, B., Cuadrilla, C., Wang, X., Ji, Y. & Peng, Y.(2013). Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J. Antimicrob. Chemother*, 68 (4) 778-785.doi: 10.1093/jac/dks481
- Jimenez, L. & Varón M. (2012). Prevalencia de candidemia por *Candida albicans* y no *albicans* en el hospital universitario de la Samaritana 2008-2011. Posgrado de medicina interna la Sabana
- Mahmoud, A.G. (2000) Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin. Microbiol*, 13(1),122-143. doi: 10.1128/CMR.13.1.122-143.2000
- Malani, N. & Kauffman, A (2007). *Candida* infecciones del tracto urinario: tratamiento opciones. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5, 77-84. DOI: 10.1586 / 14787210.5.2.277
- Muñoz, G. (2015). *Candida glabrata* un patógeno emergente. Biociencias. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Libre Seccional Barranquilla 10(1), 89-102. doi: 2390-0512
- Oksuz, S., Sahin, I., Yildirim, M., Gulcan, A., Yavuz, T., Kaya, D.& Koc, A. (2007). Fosfolipasa actividades y proteinasa en diferentes *Candida* especies aisladas de sitios anatómicamente distintos de los adultos sanos. *Med Mycol Open Access* , 60(5),280-283. doi: 10.1007/s11046-007-9053-4
- Ombrella, A., Racca, L., Ramos, L. (2008). Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de Ph. *Rev Iberoam Micol*; 25: 12-16. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140608700044>
- Panizo, M., Reviákina, V., Flores, Y., Montes, W., González, G. (2005). Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 25:88-95. doi: 1317-973X

- Pemán, J., Cantón, E., Linares-Sicilia, M., Roselló, E., Borrell, N., Ruiz-Pérez-de-Pipaon, M., García-García, I. (2011). Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Pediatric Patients: a Spanish Multicenter Prospective Survey . *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4158–4163. <http://doi.org/10.1128/JCM.05474-11>
- Perozo, A., Calvo, B., Mesa, L., Pineda, M. (2011). Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol por el método de difusión, de cepas de *Candida*, aisladas de hemocultivos en Maracaibo. *Venezuela.Kasmera*, 39(2): 114 – 122. <https://sites.google.com/view/revistakasmera/vol%C3%BAmenes/2011-2015-vols-39-43/2011-v-39-n-2/114-122>
- Pfaller, M., Boyken, M., Messer, S., Tendolkar, S., Hollis, Diekema, D. (2005). Comparison of Results of Voriconazole Disk Diffusion Testing for *Candida* Species with Results from a Central Reference Laboratory in the Artemis Global Antifungal Surveillance Program. *J Clin Microbiol*, 43(10), 5208–5213. doi: 10.1128/JCM.43.10.5208-5213.2005
- Pfaller, M., Diekema, D., Gibbs, V., Newell, D., Ellis, V., Tullio, A., Rodloff, W., Fu, T. (2010). Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *J. Clin. Microbiol*, 48, 1366-1377. Recuperado de: <https://jcm.asm.org/content/48/4/1366.short>
- Pfaller, M. & Diekema, D. (2012). El progreso en antifúngica pruebas de sensibilidad de *Candida* spp. por uso de clínicas y de laboratorio Standards Institute caldo método de microdilución, 2010-2012. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/handle/10803/396316#page=169>
- Pieralli, F., Bazzini, C., Vannucchi, V., Mancini, A., Nozzoli, C. (2014). A case of *Candida glabrata* severe urinary sepsis successfully treated with micafungin. *Med Mycol*, 5:1-3. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211753914000128>

- Price, M.F., Wilkinson, I.D., Gentry, L.O. (1982). Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20 (1): 7-14. doi:10.1080/00362178285380031
- Quindós, G., Sánchez, L., Villar, M., Eraso, E., Alkorta, M., Hernández, J. (2008). Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3):266–271. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857907004827>
- Ramos, L., Barbedo, L.S., Braga-Silva, L.A., Dos Santos, A.L., Pinto, M.R., Sgarbi, D.B. (2015). Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol*, 32(2), 122–125. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140614000412>
- Reyna, J., Fragoso, A., Ortiz, F., Soriano, M., Guadalupe, Q. & Plazola, N. (2007). Epidemiología hospitalaria de candidiasis neonatal en el Instituto Neonatal de Perinatología en un periodo de cinco años. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(4), 110-113.
- Reynaud, A. (2007). Infecciones vaginales por *Candida*: Diagnostico y tratamiento. *RevPer Ginecol Obstet*, 53(3), 159-166.
- Sachin, C.D., Ruchi, K., Santosh, S. (2012). *In vitro* evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *Int J Med Res Biomed*. 1 (2): 153-157. Recuperado de: <https://www.ajol.info/index.php/ijmbr/article/view/91862>
- Salas, I., García, J. & Miranda, K. (2000). Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. *Revista Costarricense de Ciencias Medicas*, 21, 1-2.
- Salavert, M., Jarque, I. & Pemám, J. (2006). Aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus aplicaciones clínico-terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24(1), 36-45. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X06738988>

- Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida species* in vitro. *Sabouraudia*. 1984; 22(3):201-7. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6379916>
- Tobar, E., Silva, F., Olivares, R., Gaete, P. & Luppi, M. (2011). Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev. Chilena Infectol*, 28(1), 41-49. Recuperado de: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/124239>
- Torres, E., Vásquez, E., Arenas, R (2014). Infecciones por *Candida spp* en un hospital de segundo nivel: datos clínico-epidemiológicos y tipificación. *Medipiel*, 12(1), 18-23. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm141d.pdf>
- Tsang, CS., Chu FC., Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*, 56:1393–1398. doi: 10.1099/jmm.0.47303-0
- Villalobos, J., Castro, J., Avilés, A., Peláez, M., Somogyi, T. & Sandoval, L. (2016). Epidemiología de la candidemia en el Hospital México. *Acta Médica Costarricense*, 58 (1), 15-21. ISSN 0001-6012/2016/58/1/15-21
- Villanueva, J. & Arenas, R. (2007). Candidiasis mucocutánea. Una revisión. *Revista mexicana de Micología*, 25, 91-104. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2014/dcm141d.pdf>
- Zuluaga, A., De Bedout, C., Agudelo, C., Hurtado, H., Arango, M., Restrepo, A., y González, A. (2010). Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín Colombia (2001–2007). *Rev Iberoam Micol.* ;27(3):125–129. doi:10.1016/j.riam.2010.04.001
- Zurita, S. (2018). Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.35(1):126-31. doi: 10.17843/rpmesp.2018.351.3563.
- Zurita, S., Ursia, F. & Navarro, F. (2007). Preparación de soluciones, medios y coloraciones. *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico* (pág. 81). Lince - Lima - Perú: SOLVIMA GRAF S.A.C.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación del medio Agar Almidón Arroz

Formula en gramos por Litro		Instrucciones
Arroz	200g	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hervir el arroz en agua destilada por 5 min. ➤ Filtrar en doble gasa o papel Whatman N.º 2 (papel filtro), adicionar el agar y hervir hasta disolver completamente el agar. ➤ Aforar a un litro. ➤ Esterilizar a 121 °C por 15 min. ➤ Repartir en placa estéril. ➤ Conservar en refrigeración a 4°C.
Agar	18g	
Agua destilada	1000 mL	

Tomado del Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico
 - Instituto Nacional de Salud, 2017 (zurita *et al.*, 2017)

Anexo 2

Puntos de corte, CLSI* para *Candida*, CIM (microdilución en caldo) y diámetro de inhibición (difusión en disco)

Antimicótico	CMI, µg/ml		
Punto de corte CMI en µg/ml (zona de inhibición en mm).			
	Sensible	SDD**	Resistente
Fluconazol	≤ 8 (≥ 19)	16-32 (15-18)	≥ 64 (≤ 14)
Voriconazol	≤ 1 (≥ 17)	2 (14 - 18)	≥ 4 (≤ 13)

Tomado de NCCLS M44-A (Zuluaga *et al.*, 2010)

*Clinical and Laboratory Standards Institute.

**SDD: Sensible dependiente de la dosis

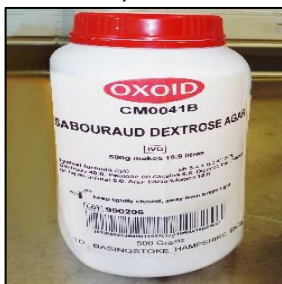
Anexo 3

Procedimiento en la preparación del medio Agar Sabouraud Dextrosa – yema de huevo

- a) Preparación del ASD
- b) Separación y centrifugado de la yema de huevo
- c) Mezcla del ASD con el sobrenadante de la yema de huevo.

EL procedimiento se realizó utilizando una cámara de flujo laminar.

a)



Medio ASD



Dilución y preparación del ASD junto al NaCl, CaCl_2 y agua destilada.



Autoclavado del medio



Dejar reposar hasta 50 °C

b)



Limpiar la superficie con antiséptico



Extracción y separación de la yema de huevo



Pasar a los tubos de centrifuga



Centrifugar a 500g x 15 min
Aprox. 800-1000 rpm

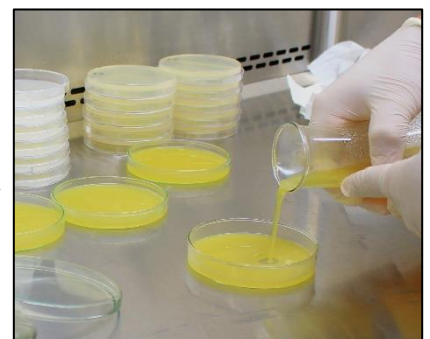
c)



Extracción del sobrenadante (20ml)



Mezclar homogenizar 20 ml de huevo con el medio



Servir 10 ml en placas Petri de 10 cm

Anexo 4

Clasificación del índice de actividad enzimática (Pz)

Pz = $\frac{\text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la zona de producción enzimática}}$	1.00 - 0.900 =Muy baja actividad enzimática (+)
	0.899-0.800 = Baja actividad enzimática (++)
	0.799 -0.700= Moderada actividad enzimática (+++)
	0.699 - ≤0.699 = Alta actividad enzimática (++++)

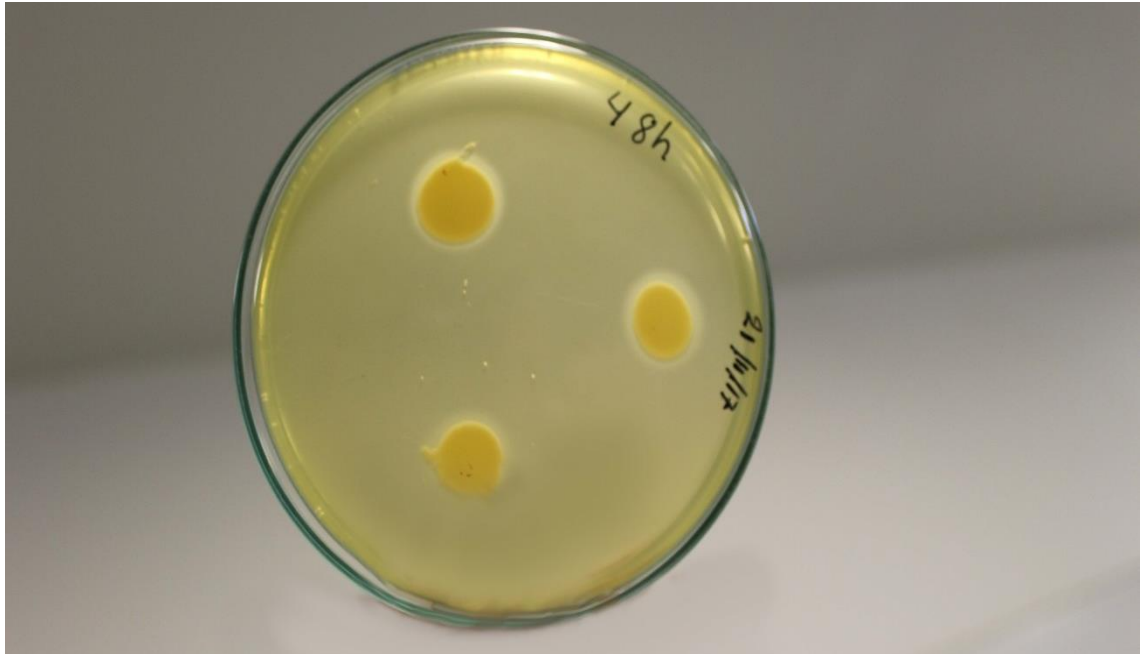
Anexo 5

Mezcla de la yema huevo con el medio Agar Sabouraud Dextrosa.



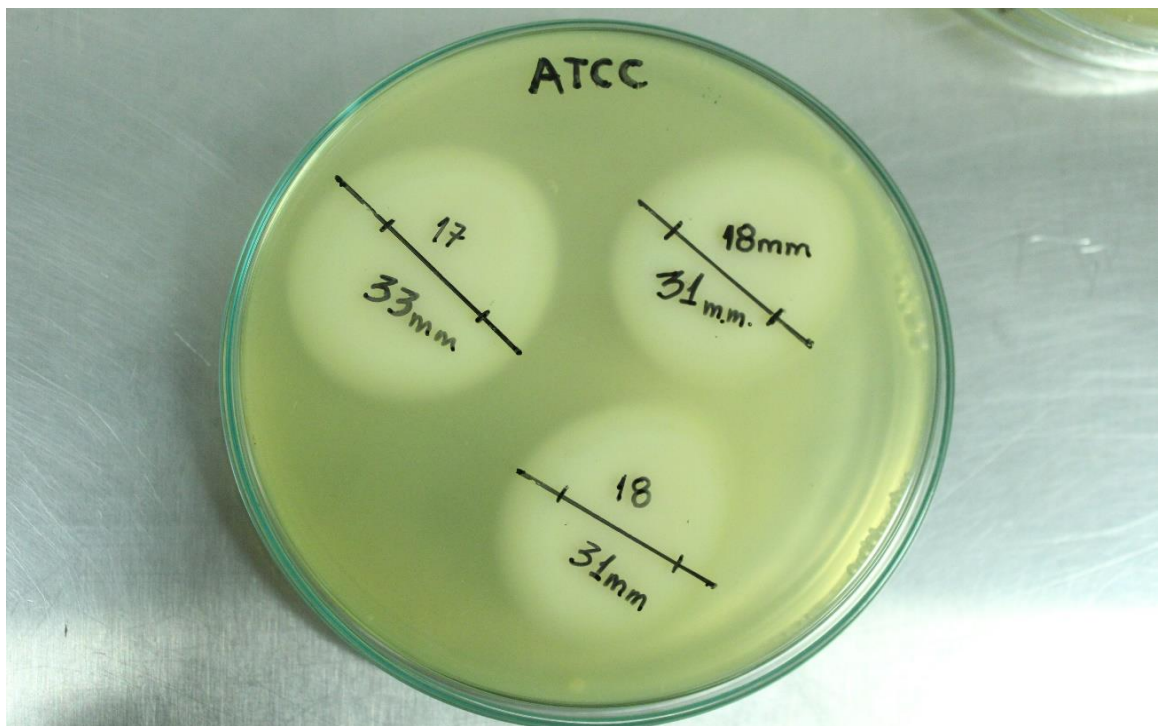
Anexo 6

Especie *Candida* productora de fosfolipasa a 48h de incubación



Anexo 7

Medida de la colonia y del halo de especies *Candida* productoras de fosfolipasa a los 8 días de incubación



CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Gianina Llontop Barandiaran, Asesora de Tesis de los bachilleres, Nelson Fredy Berrios Estela y Rosa Jhaqueline Chapoñan Coronado titulada: **“Perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en Candida albicans y no albicans. Hospital Regional Lambayeque, 2017”**, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 11% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

Los suscritos analizaron dicho reporte y concluyeron que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque 14 de octubre del 2021



Gianina Llontop Barandiaran
DNI: 17526418
ASESOR

Perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en *Candida albicans* y no *albicans*. Hospital Regional Lambayeque, 2017

INFORME DE ORIGINALIDAD

11 %	11 %	6 %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.reviberoammicol.com	1 %
	Fuente de Internet	
2	repositorio.unprg.edu.pe	1 %
	Fuente de Internet	
3	www.medigraphic.com	1 %
	Fuente de Internet	
4	rpmesp.ins.gob.pe	1 %
	Fuente de Internet	
5	appswl.elsevier.es	1 %
	Fuente de Internet	
6	www.researchgate.net	1 %
	Fuente de Internet	
7	1library.co	1 %
	Fuente de Internet	
8	doaj.org	<1 %
	Fuente de Internet	

9	www.scielo.sa.cr Fuente de Internet	<1 %
10	ri.uaemex.mx Fuente de Internet	<1 %
11	www.elsevier.es Fuente de Internet	<1 %
12	studylib.es Fuente de Internet	<1 %
13	Alejandra Zuluaga Rodríguez, Catalina de Bedout Gómez, Carlos Andrés Agudelo Restrepo, Hans Hurtado Parra et al. "Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de Candida aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007)", Revista Iberoamericana de Micología, 2010 Publicación	<1 %
14	revistainfectio.org Fuente de Internet	<1 %
15	www.pubmedcentral.nih.gov Fuente de Internet	<1 %
16	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
17	digital.library.adelaide.edu.au Fuente de Internet	<1 %

18	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
19	www.scielo.br Fuente de Internet	<1 %
20	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
21	www.smeo.org.mx Fuente de Internet	<1 %
22	archive.org Fuente de Internet	<1 %
23	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
24	www.dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
25	"Posters", Clinical Microbiology and Infection, 4/2007 Publicación	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Nelson Fredy Berrios Estela Rosa Jhaqueline Chapoñan Coro...
Assignment title: TESIS PREGRADO
Submission title: Perfil de susceptibilidad y producción de fosfolipasas en Ca...
File name: Informe__Tesis.docx
File size: 16.68M
Page count: 43
Word count: 9,350
Character count: 48,830
Submission date: 13-Oct-2021 07:39PM (UTC-0500)
Submission ID: 1673280740

