



UNIVERSIDAD ANDINA SIMÓN BOLÍVAR
SEDE CENTRAL
Sucre-Bolivia

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
“ANÁLISIS CLÍNICOS Y MICROBIOLOGÍA”

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A LA
RESISTENCIA DE LA *Cándida spp* A FLUCONAZOL, EN RESIDENTES DE
LOS HOGARES “25 DE MAYO” Y “SANTA RITA”. SUCRE 2017.

Tesis presentada para obtener el
Grado Académico de Magister en
“Análisis Clínicos y
Microbiología”

MAESTRANTE: GLADYS BARRIOS FLORES

SUCRE - BOLIVIA
2019



UNIVERSIDAD ANDINA SIMÓN BOLÍVAR
SEDE CENTRAL
Sucre-Bolivia

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
“ANÁLISIS CLÍNICOS Y MICROBIOLOGÍA”

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A LA
RESISTENCIA DE LA *Cándida spp* A FLUCONAZOL, EN RESIDENTES DE
LOS HOGAR “25 DE MAYO” Y “SANTA RITA”. SUCRE 2017.

Tesis presentada para obtener el
Grado Académico de Magister en
“Análisis Clínicos y
Microbiología”

MAESTRANTE: GLADYS BARRIOS FLORES

TUTORA: Dra. MARÍA LUISA DE LA CRUZ CLAURE

SUCRE- BOLIVIA
2019

DEDICATORIA

A DIOS POR SER MI LUZ Y MI GUÍA.

**A MIS PADRES POR DARMER LA VIDA, SER MI APOYO, MI RAZÓN DE
SEGUIR ADELANTE.**

A MIS HERMANOS POR EL APOYO INCONDICIONAL.

**A MI PADRE FÉLIX POR HACER QUE MIS SUEÑOS SE HAGAN
REALIDAD**

AGRADECIMIENTOS

SOBRE TODO A DIOS POR HABERME BRINDADO TODO LO NECESARIO PARA LLEGAR A ESTA ETAPA DE MI CAMINO.

A MIS PADRES PORQUE SIEMPRE ME DIERON SU APOYO.

A LA DRA. MARÍA LUISA DE LA CRUZ, POR SU APOYO Y ORIENTACIÓN EN LA EJECUCIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

RESUMEN

La candidiasis oral es una enfermedad frecuente en tejido bucal, causada por distintas especies del género *Cándida spp* y está asociada a personas inmunocomprometidas, adultos mayores y otros factores predisponentes. ⁽¹⁾

Los factores de virulencia según estudios podrían, asociarse a la resistencia a fluconazol cambiando su papel de saprófitos a patógenos oportunistas en los adultos mayores. ⁽²⁾

Considerando lo mencionado, se planteó la interrogante ¿Cuáles son los factores de virulencia asociados a la resistencia de la *Cándida spp.* a Fluconazol, en residentes del “Hogar 25 de Mayo y Hogar Santa Rita”. Sucre 2017?. Por lo cual, se planteó como objetivo “Determinar los factores de virulencia asociados a la resistencia de la *Cándida spp.* a fluconazol”

El estudio tuvo un enfoque cuantitativo y de tipo descriptivo, transversal y analítico, en el que participaron 132 residentes de los Hogares de acogida “Hogar 25 de Mayo” y “Hogar Santa Rita” de la ciudad de Sucre, previa aceptación del consentimiento informado, de los cuales se aislaron 86 cepas de *Cándida spp.* siendo este el universo. Se empleó el método de difusión agar CLSI M44-A2 destinado a determinar el perfil de resistencia y por otro lado identificar los factores de virulencia, para ello se aplicó las siguientes técnicas: el tubo germinativo (formación de pseudohifas), el agar Sabouraud suplementado con 5% de sangre de cordero (producción de betahemólisis), test de DNAsa (identificación de las desoxirribonucleasas), y Test O¹TOOLE y KOLTER (formación de Biopelículas y adherencia).

La prevalencia de portadores de *Cándida spp* es del 65 % en los hogares de acogida “25 de Mayo” y “Santa Rita”, frecuentemente por *C. albicans* con 42 %. La *C. glabrata* y *C. krusei* son las especies con mayor resistencia a fluconazol y *C. tropicalis* y *C. krusei* son formadoras de biopelículas. Existe asociación entre resistencia de ***Cándida spp*** a fluconazol con la formación de biopelículas y adherencia a las 24 horas siendo estadísticamente significativo.

SUMMARY

Oral candidiasis is a common disease in oral tissue, caused by different species of the genus *Candida* spp. It is associated with immunocompromised people, older adults and other predisposing factors. (one)

Virulence factors according to studies could be associated with resistance to fluconazole changing its role as saprophytes to opportunistic pathogens in older adults. (two)

Considering the aforementioned, the question arose: What are the virulence factors associated with the resistance of *Candida* spp. to Fluconazole, in residents of "Hogar 25 de Mayo and Hogar Santa Rita". Sucre 2017?. Therefore, the objective was "To determine the virulence factors associated with the resistance of *Candida* spp. to fluconazole".

The study had a quantitative and descriptive, cross-sectional and analytical approach, in which 132 residents of the host homes "Hogar 25 de Mayo" and "Hogar Santa Rita" of the city of Sucre participated, after accepting the informed consent, of which 86 strains of *Candida* spp. being this the universe. The CLSI M44-A2 agar diffusion method was used to determine the resistance profile and, on the other hand, to identify the virulence factors, for which the following techniques were applied: the germinative tube (formation of pseudohyphae), the Sabouraud agar supplemented with 5% lamb blood (production of beta-hemolysis), DNase test (identification of deoxyribonucleases), and OITOOLE and KOLTER test (biofilm formation and adhesion).

The prevalence of *Candida* spp. Carriers is 65% in the foster homes "25 de Mayo" and "Santa Rita", frequently by *C. albicans* with 42%. *C. glabrata* and *C. krusei* are the species with greater resistance to fluconazole and *C. tropicalis* and *C. krusei* are biofilm-forming. There is an association between resistance of *Candida* spp to fluconazole with the formation of biofilms and adherence at 24 hours, being statistically significant.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	<i>i</i>
SUMMARY	<i>ii</i>
ÍNDICE GENERAL	<i>iii</i>
ÍNDICE	<i>iii</i>
ÍNDICE DE CUADROS.....	<i>vi</i>
ÍNDICE DE TABLAS.....	<i>vi</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>vii</i>

ÍNDICE

CAPITULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes del tema de investigación.	1
1.2. Planteamiento del problema.	2
1.3. Formulación del problema.....	3
1.4. Justificación y uso de los resultados.....	4
1.5. Objetivos de la investigación.....	7
1.5.1. Objetivo General.	7
1.5.2. Objetivos Específicos.....	7
CAPITULO II MARCO TEÓRICO Y CONTEXTUAL.....	8
2.1. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1.1. Concepto de Candidiasis.	8
2.1.2. Historia de Candidiasis.....	8
2.1.3. Clasificación de Candidiasis:.....	8
2.1.4. Epidemiología de candidiasis.	9

2.1.5. Vías de infección de Candidiasis	10
2.1.6. Patogenia de Candidiasis.....	10
2.1.7. Formas clínicas de candidiasis	11
2.1.7.1. Candidiasis Oral.....	11
2.1.7.2. Síntomas de candidiasis oral.....	12
2.1.7.3. Predisposición de candidiasis oral.	12
2.1.7.4. Clasificación de candidiasis oral.	13
2.1.7.5. Agente etiológico de candidiasis oral.....	17
2.1.7.6. Factores de Virulencia de Cándida spp	18
2.1.7.7. Diagnóstico de Candidiasis oral	27
2.1.7.8. Tratamiento	31
2.2. Hipótesis.....	34
2.3. Marco contextual.....	35
2.3.1. Historia del “Hogar 25 de Mayo”	35
2.3.2. Infraestructura.....	38
2.3.3. Servicios que oferta.....	39
2.3.4. Condiciones de Salud de los Internos del “Hogar 25 de Mayo”	39
2.3.5. Personal del “Hogar 25 de Mayo”	40
CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO	41
3.1. Enfoque, Tipo y Diseño de investigación.....	41
3.1.1. Enfoque de la investigación	41
3.1.2. Tipo y diseño de la investigación	41
3.2. Universo o población de estudio, selección y tamaño de muestra	41
3.2.1. Universo.....	41
3.3. Unidad de estudio.....	42
3.4. Variables de Estudio	42
3.4.1. Variable dependiente:.....	42
3.4.2. Variable independiente.....	42

3.4.3. Diagrama de variables.....	43
3.5. Criterios de inclusión y exclusión.....	47
3.5.1. Criterios de inclusión	47
3.5.2. Criterios de exclusión	47
3.6. Procedimientos destinado a la recolección de información, fuentes, métodos y técnicas, instrumentos utilizados y métodos para el control de calidad de los datos	47
3.6.1. Fuente primaria.....	47
3.6.2. Métodos y técnicas.....	47
3.6.3. Descripción de los instrumentos de recojo de información	60
3.6.4. Métodos para el control de calidad de los datos	60
3.6.5. Consentimiento Informado y normas bioéticas.....	61
3.7. Fijación de límites: Espacio y tiempo.....	61
3.7.1 Espacio	61
3.7.2. Tiempo.....	61
3.8. Plan de análisis de los datos	61
CAPÍTULO IV RESULTADOS DE LA INVESTIGACION.....	62
4.1 Resultados descriptivos	62
4.2 Resultados analíticos	70
4.3 DISCUSIÓN.....	73
4.4. CONCLUSIONES.....	77
4.5. RECOMENDACIONES	78
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	79
ANEXOS	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1 Formas clínicas de candidiasis	11
Cuadro N° 2 Puntos de corte para Fluconazol y equivalencia diámetro CIM para <i>Cándida spp</i> CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute)	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Frecuencia de portadores de <i>Cándida spp.</i> en los residentes de los hogares “ 25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017	61
Tabla N° 2 Cepas de <i>Cándida spp.</i> aislados de los tejidos bucales de los residentes del “Hogar 25 de Mayo” y “Hogar Santa Rita”. 2017.....	62
Tabla N° 3 Resistencia de <i>Cándida spp</i> al fluconazol, en residentes portadores de los hogar” 25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017	63
Tabla N° 4 Cepas de <i>Cándida spp</i> formadoras de biopelículas aisladas de residentes de los hogares “ 25 de Mayo y “Santa Rita”. 2017.....	64
Tabla N° 5 Adherencia a las 24 hrs. de las cepas de <i>Cándida spp.</i> en los residentes de los hogares “25 de Mayo y “Santa Rita”. 2017	65
Tabla N° 6 Dimorfismo de las cepas de <i>Cándida spp.</i> en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017	66
Tabla N° 7 Hemolisis de las cepas de <i>Cándida spp.</i> en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017	67
Tabla N° 8 DNAsa de las cepas de <i>Cándida spp.</i> en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017	68
Tabla N° 9 Estudio de asociación entre resistencia al fluconazol de <i>Cándida spp</i> y formación de Biopelículas	69

Tabla N° 10 Estudio de asociación entre resistencia al fluconazol de <i>Cándida spp</i> y adherencias a las 24 horas	70
Tabla N° 11 Estudio de asociación entre resistencia al fluconazol de <i>Cándida spp</i> y dimorfismo.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1 Candidiasis pseudomembranosa	13
Figura N° 2 Candidiasis eritematosa crónica	14
Figura N° 3 Candidiasis hiperplásica crónica	15
Figura N° 4 Queilitis angular	16
Figura N° 5 Glositis romboidal media.....	16
Figura N° 6 Representación esquemática del desarrollo de la Biopelículas de <i>C. albicans</i>	22
Figura N° 7 Cultivo de <i>Cándida spp</i> en medio DNAsa	27
Figura N° 8 Frontis del “Hogar 25 de mayo”	38
Figura N° 9 Pasillo principal del “Hogar 25 de mayo”	38
Figura N° 10 Toma de muestra de candidiasis oral.....	47
Figura N° 11 Desarrollo de colonias en medio Sabouraud.....	47
Figura N° 12 Crecimiento de <i>C. albicans</i> en CHROMagar	48
Figura N° 13 Crecimiento de <i>C. parapsilosis</i> en CHROMagar	48
Figura N° 14 Crecimiento de <i>C. glabrata</i> en CHROMagar	49
Figura N° 15 Crecimiento de <i>C. tropicalis</i> en CHROMagar	49
Figura N° 16 Crecimiento de <i>C. krusei</i> en CHROMagar.....	49

Figura N° 17 Test de tubo germinativo en <i>Cándida spp</i>	50
Figura N° 18 Observación microscópica de <i>Cándida visto spp</i>	51
Figura N° 19 Pruebas de identificación bioquímicas con API <i>Cándida spp</i>	51
Figura N° 20 Fungigrama de las diferentes especies de <i>Cándida spp</i>	52
Figura N° 21 Prueba de DNAsa en cepas de <i>Cándida spp</i>	54
Figura N° 22 Prueba de hemólisis en cepas de <i>Cándida spp</i>	54
Figura N° 23 Prueba de Biopelículas en cepas de <i>Cándida spp</i>	55
Figura N° 24 Lectura de la prueba de Biopelículas en cepas de <i>Cándida spp</i>	56
Figura N° 25 Prueba de adherencia en cepas de <i>Cándida spp</i>	56
Figura N° 26 Siembra de las colonias obtenidas del Sabouraud en Agar leche con Tween 80	58
Figura N° 27 Microcultivo de <i>C. glabrata</i> visto al microscopio	58
Figura N° 28 Microcultivo de <i>C. albicans</i> visto al microscopio.....	58
Figura N° 29 Microcultivo de <i>C. tropicalis</i> visto al microscopio.....	59
Figura N° 30 Microcultivo de <i>C. krusei</i> visto al microscopio	59
Figura N° 31 Microcultivo de <i>C. parapsilosis</i> visto al microscopio	59

CAPITULO I INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes del tema de investigación.

“La candidiasis es un tipo de micosis oportunista que se presenta con frecuencia en los seres humanos y se manifiesta de forma habitual como enfermedad leve de la mucosa oral”.⁽²⁾

Esta micosis puede ser aguda, sub-aguda o crónica, logrando localizarse en el tejido cutáneo, mucosas, uñas, pulmones y sistémico. El agente etiológico para este grupo es el hongo del género *Cándida spp.*⁽³⁾

En los últimos 30 años la incidencia de las candidiasis se ha elevado, entre las micosis representa el 7,45% y constituye 25% de las micosis superficiales. Este tipo de micosis afecta a individuos de cualquier edad, raza o sexo, no tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el nivel socioeconómico. De tal modo, la candidiasis oral predomina en mayor de 60 años.⁽⁴⁾

La *Cándida spp* tiene propiedades de virulencia para colonizar el hospedero de esta forma ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo. Los factores de virulencia pueden variar según el tipo, sitio y la naturaleza de las defensas del hospedero. Los factores de virulencia de la *Cándida spp.* Llegan a producir invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y dificultan el tratamiento contra este grupo de hongos.⁽⁵⁾

1.2. Planteamiento del problema.

El origen de las candidiasis es endógeno. Las infecciones por *Cándida spp.* constituyen una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales del torrente circulatorio, y es el cuarto microorganismo aislado de hemocultivos positivos en Estados Unidos, con una incidencia hospitalaria anual que se incrementó entre 2 y 5 veces durante la década de 1980. En el año 2013 en una publicación se obtuvieron los siguientes datos Latinoamericanos, una incidencia de 1,18 casos por 1000 admisiones. En cuanto a la distribución de las especies que producen candidiasis invasoras, *C. albicans* continua siendo la especie más frecuente (37,6%) seguida por: *C. parapsilosis* (26,5), *C. tropicalis* (17,6%), *C. guilliermondii* (6,5%), *C. glabrata* (6,3) y *C. krusei* (2,7%).⁽¹⁾

La frecuencia de estas infecciones varía de acuerdo con el grupo etario, la manifestación clínica y los factores de riesgo del paciente. Paralelamente, se han venido observando cambios en la epidemiología de las especies de *Cándida spp.*, variaciones en su prevalencia y en la resistencia a los antimicóticos.⁽⁶⁾

La candidiasis es la infección micótica más frecuente de los tejidos bucales y es causada por el género *Cándida spp.* Dentro de la población geriátrica la candidiasis oral es uno de los tres principales motivos de consulta en odontología, junto con la sospecha de lesiones pre malignas y cáncer e inflamaciones orales vesículo erosivas. La *C. albicans* es la especie que se asocia frecuentemente a lesiones de la mucosa bucal, sin embargo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. dubliniensis* también se han identificado como causantes de candidiasis oral.⁽⁷⁾

Los factores predisponentes locales son los que modificando las condiciones de la cavidad oral de esta forma favorecen el desarrollo de la candidiasis oral, los cuales son: Barrera mucosa (cambios epiteliales exógenos, traumas, maceración), cambios epiteliales endógenos (atrofia, hiperplasia, displasia),

saliva (cambios cuantitativos, radioterapia, terapia citotóxica, pH, concentración de glucosa), flora comensal y una dieta rica en hidratos de carbono. ⁽⁸⁾

Clínicamente se tiene candidiasis pseudomembranosa aguda, candidiasis atrófica o eritematosa, candidiasis hiperplásica crónica; pudiendo asociarse de forma secundaria a la queilitis angular. La estomatitis por dentadura es un tipo de candidiasis asociada al uso de prótesis dentales, cobra especial importancia porque este tipo de candidiasis puede evitarse mediante la higiene y el uso adecuados de las prótesis. ⁽⁷⁾

En un estudio realizado en Uruguay en el año 2009 se determina que la prevalencia de *Cándida spp* en el total de las 48 muestras fue de 77% de *C. albicans*; 28% de *C. tropicalis*; 23% de *C. glabrata*; 7,8% de *C. dubliniensis*; 2,6% de *C. krusei* y 2,6% de *C. parapsilosis*. ⁽⁹⁾

En otro estudio realizado, en el cual se determinó la frecuencia de candidiasis oral en portadores de prótesis dental; se obtuvo que del 100% de los pacientes el 20% presentaron candidiasis oral, de los cuales el 80% pertenecían a *C albicans*. ⁽¹⁰⁾

Las principales preocupaciones en la actualidad son el cambio en la epidemiología de *Cándida spp*. en especies menos susceptibles a fluconazol. Recientemente, Mitchell demostró que también en *Cándida albicans* los β -1,3-glucanos contribuyen a la resistencia a los azoles. ⁽¹¹⁾

Por lo expuesto nos planteamos el siguiente problema

1.3. Formulación del problema.

¿Cuáles son los factores de virulencia asociados a la resistencia de la *Cándida spp*. a fluconazol, en residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. Sucre 2017?

1.4. Justificación y Uso de los resultados.

Comprenden el 25 - 50% las especies de *Cándida spp.*, de la microbiota de la cavidad oral de personas sanas; las cuales pueden llegar a formar Biopelículas en prótesis y catéteres, comprenden casi un 80% de los microorganismos de la mucosa oral de los portadores de prótesis. *C. albicans* está comúnmente asociada al uso de prótesis en un 77,9%, aunque pueden encontrarse otras especies de *Cándida spp* tales como: *C. glabrata* en un 44,1% y *C. tropicalis* en un 19,1%.⁽¹²⁾

Debido al incremento en la incidencia de las infecciones causadas por levaduras del género *Cándida spp*, hay un gran interés en la investigación de los factores de virulencia, con la finalidad de establecer una relación entre los factores de virulencia y la resistencia al fluconazol, diseñar estrategias de control y prevención de la candidiasis, así como desarrollar nuevos agentes terapéuticos con estos factores como posibles blancos de acción. Cada día se está observando el aumento de infecciones causadas por levaduras del género *Cándida spp*, que ahora son catalogadas como patógenos emergentes. Tal es el caso de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* entre otras. Un gran número de estudios ha demostrado que los factores de virulencia intervienen en los procesos de colonización e infección de *C. albicans*.⁽¹³⁾

Las cepas de *Cándida spp* tienen la capacidad de adherirse a células epiteliales del hospedero con avidez. Como es el caso de *C. glabrata* que posee una gran familia de genes subteloméricos que codifican proteínas de pared celular mediante la adherencia. La expresión de estos genes está controlada por una regulación negativa que depende de la estructura de la cromatina llamada silenciamiento. *C. albicans* también posee varias proteínas de pared celular (adhesinas), pero su regulación es diferente al silenciamiento subtelomérico. *C. albicans* como *C. glabrata* tienen la capacidad de formar biopelículas, y de llevar a cabo cambios morfo genéticos que se manifiestan como colonias de diferentes formas bajo ciertas condiciones, se induce la formación

de hifas y tubos germinales que les permita adaptarse rápidamente a los cambios dentro del hospedero y comportarse como patógenos oportunistas. ⁽¹⁴⁾

Los factores de virulencia están controlados por diferentes genes que se expresan en un número determinado y momento concreto, que determinan el fenotipo y virulencia de cada cepa, entre los genes asociados a la virulencia se encuentra el gen de la hexosaminidasa (HEX1), también se encuentran genes de proteínas aspárticas (SAP1, .SAP2, SAP3, SAP4) y fosfolipasas. ⁽¹³⁾

En el caso de *C. glabrata* tiene capacidad para adherirse con avidez a células epiteliales de mamíferos in vitro. Esta capacidad depende del gen, EPA1 (Epithelial Adhesin 1), que codifica para una proteína de pared celular. Ahora se sabe que el genoma de *C. glabrata* tiene más de 20 genes homólogos a EPA1, algunos de los cuales se ha demostrado que codifican para adhesinas. La mayoría de estos genes se encuentran localizados en regiones subteloméricas del genoma. De igual forma, *C. glabrata* presenta una alta capacidad de formar biofilms en superficies de plástico, y la adhesina más importante para este fenómeno es EPA6. Así mismo, mutaciones en SIR4 (que afectan silenciamiento), forman biofilms con una mayor eficiencia, debido a la sobreexpresión de EPA6. ⁽¹⁴⁾

La resistencia de *Cándida spp.* al fluconazol representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones que se caracterizan, a su vez, por una alta morbimortalidad. ⁽¹⁵⁾

El fluconazol también induce reordenamientos genómicos que dan lugar a la amplificación de genes y la pérdida de la heterocigosidad por mutaciones, lo que aumenta aún más la resistencia. Estas alteraciones del genoma pueden afectar regiones cromosómicas extendidas y tienen consecuencias fenotípicas adicionales. La comprensión de la resistencia a nivel molecular es esencial para el desarrollo de estrategias para hacerle frente y diseñar nuevos anti fúngicos con enfoques moleculares. ⁽¹⁶⁾

La población a la que beneficia la investigación: Son los adultos mayores, los cuales son un grupo de riesgo para adquirir esta patología. En este sentido se

realizó el estudio de los factores de virulencia asociados a la resistencia de la *Cándida spp* a fluconazol.

Importancia práctica: Orienta a los profesionales odontólogos, sobre la resistencia de las especies de *Cándida spp*. a fluconazol asociados a factores de virulencia en candidiasis oral, ello le brindara una pauta en la selección y uso adecuado de este antimicótico azólico.

Aporte: se dará información actualizada de la resistencia de las *Cándida spp* y la asociación a factores de virulencia.

Impacto del trabajo. Los factores de virulencia y resistencia de las cepas de *Cándida spp*. son responsables de mortalidad intrahospitalaria hasta en 40%. La candidiasis invasiva afecta a más de 250.000 personas por año en todo el mundo y provoca más de 50.000 muertes. Es el cuarto microorganismo más frecuente del torrente sanguíneo.

Por otro lado, los resultados de susceptibilidad obtenidos fueron entregados al odontólogo y medico de los hogares, y se realizó actividades de extensión para la remoción de biopelículas durante la higienización de cavidad bucal en los residentes de los hogares de acogida.

Por lo expuesto, es importante determinar los factores de virulencia de la *Cándida spp*. con la finalidad de conocer su asociación de riesgo con la resistencia al fluconazol, y dar al paciente una terapia farmacológica pronta y eficaz.

1.5. Objetivos de la investigación.

1.5.1. Objetivo General.

Determinar los factores de virulencia asociados a la resistencia de la *Cándida spp.* a fluconazol, en residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. Sucre 2017.

1.5.2. Objetivos Específicos.

- Determinar la prevalencia de colonización de *Cándida spp* en residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”.
- Determinar la resistencia de *Cándida spp.* a fluconazol, aislada de tejidos bucales de residentes de los hogares “25 de Mayo y Santa Rita”.
- Identificar las especies de *Cándida spp* aisladas de tejidos bucales en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita” según factor de virulencia.
- Asociar la resistencia de fluconazol de las cepas de *Cándida spp* a los factores de virulencia como formación de biopelículas, adherencia a las 24 horas , dimorfismo, producción de hemólisis y presencia DNAsa,

CAPITULO II MARCO TEÓRICO Y CONTEXTUAL

2.1. Marco teórico.

2.1.1. Concepto de Candidiasis.

“Es un infección que puede ser aguda, sub-aguda o crónica pudiendo localizarse en el tejido cutáneo, mucosas, uñas, pulmones, riñones, causados por distintas especies del género *Cándida*.”^{(1), (2)}

Este hongo levaduriforme forma parte de la flora normal de piel y mucosas, el cual se considera oportunista que produce la enfermedad en personas inmunocomprometidas o con ciertos factores predisponentes, como ruptura de barreras anatómicas, antibioticoterapia, mala higiene, diabetes, entre otros.⁽¹⁾

2.1.2. Historia de Candidiasis

El género *Cándida spp* y especie *C. albicans* fueron descritos por la botánica Christine Marie Berkhout en su tesis doctoral en la Universidad de Utrecht en 1923.⁽¹⁷⁾

“Desde la época de Hipócrates y Galeno se han encontrado descripciones de lesiones orales compatibles con candidiasis en mucosas. En 1842, Gruby describió este hongo, lo presentó ante la Academia de Ciencias de París, como el verdadero agente del muguet de los niños, el cuál postuló la transmisión intrauterina y comunicó la primera candidiasis. En 1877, Grawitz describió el carácter dimórfico de esta levadura en el mismo año se describió la morfología de *C. albicans*. En el año 1954, en el VIII Congreso de Botánica, se aceptó oficialmente en género *Cándida*. A partir de 1940, con el uso de los antibióticos, la incidencia de prácticamente todas las formas clínicas de candidiasis aumentó abruptamente, hasta ser el cuarto microorganismo encontrado en hemocultivos en pacientes hospitalizados”.⁽¹⁾

2.1.3. Clasificación de Candidiasis:

“Tomando en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras, se las incluye en las subdivisiones *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* y *Deuteromycotina* cuando no se conoce la reproducción sexuada.

Dominio: *Eucarya*.

Reino: *Fungi*

División: *Eumycota*

Subdivisión: *Deuteromycotina*

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococaceae*

Género: *Cándida*

Especies: *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. krusei*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*.

Algunas de las especies mencionadas se les conoce su teleomorfo (forma sexuada): *C. famata*: *Debaryomyces hansenii*; *C. krusei*: *Issatchenkia orientalis*; *C. lusitaniae*: *Clavispora lusitaniae*^{*(18)}

2.1.4. Epidemiología de candidiasis.

En la población normal el índice de colonización varía entre el 20% y 80%. Se han estudiado unas 150 especies, de las cuales aproximadamente 20 fueron descritas como productoras de enfermedad en el hombre. Cada especie tiene un sitio de colonización el cual varía según las diferentes especies. *C. albicans* predomina en tubo digestivo y vaginal; *C. parapsilosis* aislada con mayor frecuencia de la piel lo que explica su alto aislamiento asociado con el mal manejo de catéteres vasculares y el desarrollo de infecciones vasculares, *C. tropicalis* puede aislarse de la piel y tracto digestivo en personas sanas y *C. glabrata* es un microorganismo comensal de las regiones mucosas del ser humano. El nicho ecológico de *C. krusei* incluye el suelo, agua, plantas y otras fuentes naturales.⁽¹⁾

Un 25-50% de las personas sin enfermedad subyacentes están colonizadas por *C. albicans*, que forma parte de su microbiota oral. Esta colonización se produce desde los primeros días de vida y es mayor en las edades extremas como lactantes, niños y ancianos. En los adultos, la colonización candidiásica

se ve favorecida por el uso de prótesis dentales removibles, en las que se forman biopelículas de difícil erradicación o por la presencia de alteraciones orales, como hipo salivación, leucoplasia y liquen. La alteración del equilibrio entre *Cándida spp* y el hospedero por un daño en las barreras anatómicas y fisicoquímicas facilita la infección candidiásica, habitualmente superficial, como son la mucosa oral. ⁽²⁾

2.1.5. Vías de infección de Candidiasis

Una gran mayoría de las infecciones son de origen **endógeno** a partir de los reservorios mucocutáneos o cutáneos, introducidos a partir de catéteres u otros dispositivos de uso médico, que interrumpen la barrera cutánea, aunque también pueden ser **exógenas**, por ejemplo en los hospitales, donde las levaduras pueden ser transmitidas a lactantes a partir de mamaderas mal esterilizadas, a pacientes trasplantados o inmunosuprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal descontaminados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en unidades de cuidados intensivos (UCI), sin la debida protección. ⁽¹⁸⁾

2.1.6. Patogenia de Candidiasis

El género *Cándida*, específicamente *C. albicans* son comensales normales del ser humano. La capacidad de estos microorganismos para convertirse en patógeno se relaciona con el estado inmunológico del hospedero, depende de la interacción de ciertos factores: ⁽¹⁹⁾

Factores predisponentes.- Los factores desencadenantes de la enfermedad son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del hospedero, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del hospedero. Las causas predisponentes se pueden agrupar en:

- Locales: maceración, contacto con agua, mala higiene.

- Fisiológicas: recién nacidos, vejez y embarazo.
 - Endocrinas: diabetes, hipotiroidismo.
 - Alteración de la flora normal: por uso de antibióticos (ATB).
 - Enfermedades hematológicas: linfomas, leucemias, anemia aplásica, agranulocitosis, neutropenia, hipo y gamaglobulinemia.
 - Factores iatrogénicos: uso prolongado de corticoides, quimioterápicos, inmunosupresores, agentes citotóxicos, alimentación parenteral, trasplantes, cirugía abdominal, utilización de sondas y catéteres, radioterapia, prótesis, hemodiálisis, cateterismo.
 - Enfermedades debilitantes: neoplasias, infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), inanición, quemaduras graves y extensas, drogadicción, tuberculosis y otras enfermedades infecciosas.
- (18)

2.1.7. Formas clínicas de candidiasis

Cuadro N° 1 Formas clínicas de Candidiasis

Mucocutánea	Mucosa oral: muguet, glositis, queilitis
	Mucosa genital: vaginitis y balanitis
	Mucosa digestiva: esofagitis, gastritis, enteritis y lesiones perianales
	Mucosa bronquial
	Candidiasis mucocutánea crónica
Cutánea	Grandes y pequeños pliegues
	Uñas: Onixis blastomicética
	Granuloma candidiásico
Candidiasis invasiva	Candidemia: Transitoria o persistente
	Candidiasis Localizada (en diferentes órganos)
	Candidiasis Sistémica o Diseminada: aguda y crónica”.

Fuente: Dra Biasoli M 2017. ⁽¹⁸⁾

2.1.7.1. Candidiasis Oral.

Es una infección oportunista de la mucosa de la cavidad oral que es ocasionada por hongos del género *Cándida spp*, el cual es parte de la flora

bucal en un 25 a 50% de los individuos sanos. Esta presencia se lo denomina colonización asintomática.⁽²⁰⁾

En un estudio realizado el año 2015 en la ciudad de sucre se reportó un 84% de prevalencia de candidiasis bucal y una resistencia de 13% al fluconazol.⁽²¹⁾

El hongo más frecuente es *C. Albicans* que aparece bajo determinadas circunstancias; se vuelve patógeno para el hombre con comportamiento aerobio. *C. Albicans* se encuentra en una de cada dos personas en portadores de prótesis dentales casi regularmente como saprófito inofensiva en la cavidad oral. La candidiasis puede no provocar molestias. Aparece en forma de manchas blancas que podemos desprender quedando una superficie más o menos sangrante o rojiza. Es posible que aparezca también por el uso frecuente de inhaladores bucales.⁽²²⁾

2.1.7.2. Síntomas de candidiasis oral.: Los signos y síntomas son:

- “Lesiones blancas cremosas en la lengua, mejillas internas y, a veces, en el techo de la boca, encías y amígdalas.
- Lesiones ligeramente elevadas con aspecto similar al requesón.
- Enrojecimiento, ardor o inflamación que pueden ser lo suficientemente graves como para provocar dificultad para comer o tragar.
- Sangrado leve si las lesiones se frotan o rascan.
- Agrietamiento y enrojecimiento en las comisuras de la boca.
- Sensación algodonosa en la boca.
- Sensación de quemazón en la boca y en la garganta
- Pérdida del gusto.
- Enrojecimiento, irritación y dolor debajo de las prótesis dentales (estomatitis protésica”.⁽²³⁾

2.1.7.3. Predisposición de candidiasis oral.: Las personas más vulnerables para contraer candidiasis oral son.

- “Los niños recién nacidos.
- Los portadores de prótesis dentales.
- Los adultos con diabetes u otras enfermedades metabólicas.

- Las personas que reciben antibióticos o citostáticos.
- Los adictos a las drogas.
- Las personas desnutridas.
- Las personas con inmunodeficiencias”.⁽²⁴⁾

2.1.7.4. Clasificación de candidiasis oral.

La candidiasis oral es un claro ejemplo de infección oportunista y está asociada con la alteración de los mecanismos de defensa local y sistémico del hospedero.⁽²²⁾

La candidiasis pseudomembranosa.

Este grupo de candidiasis se caracteriza por la presencia de placas blancas como lesiones en la mucosa oral y se ha encontrado tradicionalmente de manera frecuente en los tejidos bucales de recién nacidos y en los ancianos, las pseudomembranas ocurren en la superficie de la mucosa labial y bucal, paladar duro y blando, y en la lengua. Las lesiones se pueden remover por raspado suave para revelar la mucosa eritematosa subyacente y esta es una característica clínica del diagnóstico de la infección. Se los describe como una “afta oral” y generalmente se considera como una infección aguda que resulta de una predisposición subyacente del huésped.⁽²⁵⁾

Figura N° 1 Candidiasis pseudomembranosa



Fuente: Meriñan Alberto. 2010

La candidiasis eritematosa aguda.

También llamado atrófica, se caracteriza por una lesión eritematosa erosiva, de tamaño variable, que puede sangrar espontáneamente ubicado en el dorso lingual o en la mucosa palatina. La sintomatología indica que la boca tiene la sensación de quemadura, como si hubiera bebido algo muy caliente que lo quemó. Esto se acompaña con pérdida difusa de las papilas filiformes. Al examen clínico, se observa la lengua depapilada y enrojecida. Se puede observar en pacientes que reciben inmunosupresores o en los que han recibido antibióticos de amplio espectro, donde se denomina lengua dolorosa antibiótica.⁽²⁰⁾

La candidiasis eritematosa crónica.

Se manifiesta con la aparición de unas áreas enrojecidas sobre la mucosa oral, sobre todo a nivel de la mucosa yugal, el paladar y la lengua, donde se manifiesta con áreas de depapilación. Son lesiones eritematosas bien delimitadas y dolorosas al contacto con alimentos. Esta infección presenta un enrojecimiento de la mucosa debajo de la superficie adaptada de una prótesis. Hasta 65 % de portadores de prótesis tienen signos clínicos de esta condición, aunque el enfermo sea generalmente inconsciente de la infección. Esta condición puede desarrollarse debajo de cualquier prótesis de acrílico o aplicación intra oral, pero es casi invariablemente vista en el paladar más que en la mucosa de la mandíbula. La higiene oral adecuada o la presencia de una prótesis mal adaptada están fuertemente asociadas con la candidiasis eritematosa crónica.⁽¹³⁾

Figura N° 2 Candidiasis eritematosa crónica



Fuente: Meriñan Alberto. 2010

La candidiasis hiperplásica crónica.

La CHC es una forma rara de candidiasis oral con un predominio más alto en hombres de mediana edad que son fumadores de tabaco. La condición es generalmente asintomática y si algunos casos permanecen sin tratamiento exhiben displasia y desarrollo subsecuente de cáncer oral en el sitio de la lesión. La CHC se caracteriza por la invasión del epitelio oral por las formas hifales de la *Cándida*, la condición puede ocurrir en cualquier sitio en la mucosa oral pero más frecuentemente se encuentra como zonas blandas bilaterales en las regiones bucales de la comisura. Las lesiones no se pueden remover por raspado suave sin el sangrado y se han descrito dos tipos de lesiones basadas en el aspecto clínico. Las lesiones homogéneas son lisas y blancas en contraste con las lesiones heterogéneas donde las áreas del eritema se pueden ver dando un aspecto nodular o manchado en el sitio infectado. ⁽²⁵⁾

Figura N° 3 Candidiasis hiperplásica crónica



Fuente: Meriñan Alberto. 2010

Otras formas secundarias de candidiasis oral.

Estas candidiasis incluyen condiciones tales como la queilitis angular, glositis romboidal media y candidiasis mucocutánea crónica.

- **La queilitis angular.**

Es un intertrigo de la comisura labial. La lesión es bilateral, presenta una forma erosiva, de color rojo vivo, recubierta por una costra y acompañada de sintomatología subjetiva de dolor, sensibilidad anormal al tacto y a la

compresión. Es una lesión que se observa con frecuencia en pacientes con pérdida de la altura facial vertical por la ausencia de sus piezas dentales. En el paciente desdentado, la comisura bucal está en contacto con la saliva y se convierte en un buen medio de crecimiento del hongo. ⁽²⁰⁾

Figura N° 4 Queilitis angular.



Fuente: Meriñan Alberto. 2010

- **La glositis romboidal media.**

Se considera como un área simétrica en la línea media del dorso de la lengua. La condición es crónica y presenta la atrofia de las papilas filiformes. La recuperación de la *cándida* de esta área es alta, y la condición parecería estar asociada al fumar y al uso de esteroides inhalados. ⁽²⁵⁾

Figura N° 5 Glositis romboidal media



Fuente: Meriñan Alberto. 2010

2.1.7.5. Agente etiológico de candidiasis oral.

“El principal agente es *C. albicans*, pero pueden estar implicadas otras especies de *Cándida spp*, como, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. krusei*; *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*”.⁽¹⁸⁾

Características de las especies de *Cándida spp*.

***C. albicans*:**

Es un hongo dimorfo saprófito y diploide que normalmente se encuentra en la cavidad oral, microflora de la piel, tracto gastrointestinal y respiratorio, sistema genitourinaria. No presenta reproducción sexual.⁽²⁶⁾

***C. parapsilosis*:**

Las candidemias por *C. parapsilosis* son frecuentes, se asocia con el 25% de las infecciones por este grupo de hongos, en los hospitales europeos, siendo actualmente la segunda especie del género *Cándida spp*.⁽²⁷⁾

En el entorno clínico, esta levadura oportunista se ha asociado con las manos de trabajadores del área de salud, y es particularmente frecuente en infecciones sistémicas en neonatos prematuros de bajo peso, pacientes cateterizados, además de sujetos bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa.⁽²⁸⁾

***C. tropicalis*:**

Las infecciones por *C. tropicalis* son consideradas emergentes, dando origen a candidemia nosocomiales. Las candidemias por *C. tropicalis* se suelen asociar a pacientes con cáncer, con cateterismo prolongados o tratamientos previos con antimicrobianos de amplio espectro. Esta especie presenta características similares a *C. albicans* recientemente descritas como la capacidad de filamentación y la capacidad de conjugación.⁽²²⁾

C. glabrata:

Es una levadura haploide. Las infecciones por *C. glabrata* han aumentado notablemente en la última década, constituyendo en la actualidad una causa importante de morbi-mortalidad. Esta especie es muy generalizada en la cavidad oral, vagina, piel y otras áreas anatómicas de sujetos sanos. Es una levadura que se aísla con mayor frecuencia en infecciones sistémicas graves en enfermos críticos, inmunodeprimidos y neoplásicos. ⁽²⁷⁾

Las infecciones producidas por esta levadura suelen ser de origen externo y son difíciles de tratar ya que la *C. glabrata* presenta resistencia a fármacos azólicos. ⁽²⁹⁾

C. krusei:

Esta especie es intrínsecamente resistente al fluconazol y se ve un aumento en la frecuencia de esta especie en pacientes tratados preventivamente con este antimicótico. Es una levadura oportunista multirresistente que cada vez con mayor frecuencia se aísla en hemocultivos de pacientes con leucemia, en pacientes adultos neutropénicos con cáncer y en trasplantados de médula ósea. Esto posee una importancia relevante clínica y terapéutica, dada su resistencia intrínseca a fluconazol, en algunos casos combinada con una disminución de la sensibilidad a 5- fluorocitosina y anfotericina B. ⁽²⁷⁾

2.1.7.6. Factores de virulencia de *Cándida spp.*

Las *Cándidas spp.* poseen una serie de factores de virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección. Los principales factores de virulencia, que han sido estudiados en profundidad para *C. albicans* (aunque algunos de ellos han encontrados en otras especies) son: ⁽¹²⁾

- Capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies: es una interacción fuerte entre una adhesina de la levadura y un receptor de la célula del hospedero.

- Producción de enzimas extracelulares: son proteinasas y fosfolipasas específicas de cada cepa. Se han detectado en *C. albicans* una familia de 10 isoenzimas con actividad proteinasa conocidas como Sap (secreted aspartic proteinase), de las cuales Sap 1-3 son cruciales para la infección superficial y Sap 4-6 serían importantes en la candidiasis invasiva.
- Producción de hifas y pseudohifas: Aumenta de la capacidad invasiva de la levadura, la capacidad de adherencia, aumenta la resistencia a la fagocitosis, aumenta el poder killer sobre las células del hospedero
- “Switching” o variabilidad fenotípica y antigénica: Es un cambio espontáneo, frecuente y reversible entre diferentes fenotipos distinguibles por la morfología de la colonia o por la morfología celular. ⁽¹⁸⁾

Los factores de virulencia constituyen los mecanismos utilizados por el hongo para evitar las defensas del hospedero. ⁽³⁰⁾

La transición de la *Cándida* de un comensal inofensivo a un organismo patógeno es compleja y puede relacionarse con los cambios ambientales sutiles que llevan a la expresión de una gama de factores de virulencia. Es probable que sea el efecto combinado del huésped y de los factores de la *Cándida* que contribuyen en última instancia al desarrollo de la candidiasis oral. ⁽²⁵⁾

La *Cándida spp.* como agente etiológico de candidiasis oral, debe estar asociado a un factor de riesgo. Para favorecer la patogenicidad se requiere de unos factores de virulencia, los cuales le permiten colonizar, infectar, evadir el sistema inmune y causar la infección en el hospedero. Dentro de los cuales se encuentran las proteínas, importantes para la adhesión e invasión en las células epiteliales, estas proteínas se encuentran en la capa externa de la pared celular, predominando los tipos mananos. También se encuentra una capa interna compuesta por quitina, β -1,3 glucano y β -1,6 glucano, componentes importantes de la pared celular, trascendental para que *Cándida spp.* emplee unas estrategias claves para evadir el sistema inmune. ⁽³¹⁾

Dentro de los factores de virulencia tenemos: hemólisis, formación de biopelículas, capacidad de adherencia, hidrofobicidad de la superficie celular, transición dimórfica, producción de enzimas hidrolíticas, DNAsa. De las cuales se describen los siguientes.

Hemólisis: La hemólisis según la especie de *Cándida spp* se puede diferenciar una hemolisis; tipo beta presente en *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* y *C. tropicalis* y en menor grado en *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*; hemólisis alfa en *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* y *C. utilis*, mientras que *C. parapsilosis* no produce ningún tipo de hemolisis. Indican que la actividad hemolítica debe ser estudiada por una posible utilidad diagnóstica. ⁽³²⁾

Actividad hemolítica se determinó en placas de agar con dextrosa Sabouraud que contenían 3% de glucosa y 7% de eritrocitos de oveja. La actividad hemolítica es evidenciada por el halo translúcido con bordes definidos alrededor de las colonias. ⁽³³⁾

Formación de biopelículas: Las Biopelículas son comunidades de células embebidas en una matriz extracelular altamente hidratada que están atravesadas por canales de agua. Estas comunidades pueden estar adheridas a superficies tanto celulares como abióticas (catéteres y prótesis). En *C. albicans*, la capacidad de formación de biopelículas está íntimamente relacionada con su capacidad de filamentación y varios genes, como HWP1, ALS3, ECE1 y RBT1, se expresan en las células sésiles en contacto con células orales y con biomateriales. La producción de la matriz extracelular está controlada por el factor de transcripción dependiente de Zinc (Zap1), que regula de forma inhibitoria el 1,3-β-D-glucano, componente esencial de la matriz. Las glucamilasas (Gca 1 Gca 2), las glucanotranferasas (Bg12 y Phr 1) y la exoglucanasa Xog 1 también regulan la producción de 1,3-β-D-glucano. ⁽²⁾

Las células sésiles de las biopelículas son más resistentes que las planetónicas o libres a los mecanismos de defensa inespecíficos y a la respuesta inmunitaria, ya que la biopelícula limita la penetración de los anticuerpos y de los linfocitos T, y confiere protección contra los mecanismos oxidantes de los

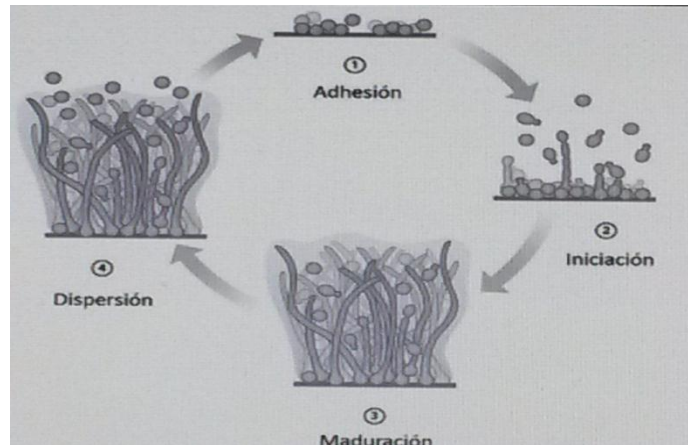
neutrófilos. Asimismo, las células sésiles también se vuelven resistentes a muchos de los antisépticos y anti fúngicos utilizados. La formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis y otros dispositivos biomédicos se asocia con infecciones subagudas, crónicas o recalcitrantes al tratamiento que obligan, casi siempre, a retirar el dispositivo sobre el que se han desarrollado.⁽²⁾

La capacidad de formación de biopelícula de los microorganismos se considera un importante factor de virulencia, ya que los capacita para dar lugar a infecciones asociadas a dispositivos médicos (catéteres, prótesis, marcapasos, sondas.), responsables de complicaciones severas y de difícil erradicación al ofrecer una mayor resistencia a antimicrobianos y permitir la persistencia de células viables dentro de la bicapa después del tratamiento. Es un mecanismo de patogenicidad complejo en el que intervienen factores como adhesión, crecimiento y variaciones morfológicas. La formación de biocapas sobre superficies mucosas así como sobre la superficie de implantes, prótesis y catéteres es un proceso que va a facilitar infecciones sistémicas, ya que los depósitos en la superficie de catéteres venosos centrales, favorecen la rápida diseminación de la infección.⁽³²⁾

Las biocapas están formadas por los microorganismos adheridos a las superficies, embebidos en una matriz extracelular. Esta matriz está formada por hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fosforo y ácido nucleicos, está altamente hidratada y confiere a la biopelícula un aspecto gelatinoso. La matriz es el soporte principal de la biopelícula y su producción aumenta con el tiempo de maduración. Su composición varía según la especie: así, en las biopelículas de *C. albicans* está presente de forma mayoritaria la glucosa (32%), mientras que en las *C. tropicalis* abunda la hexosamina (27%).⁽²⁶⁾

La *Cándida spp*; es capaz de adherirse y desarrollar una Biopelículas sobre un gran número de superficie, tanto materiales inertes como tejidos vivos. La forma de esta comunidad biológica comprende cuatro principales estadios temporales que guardan similitud con los que acontecen de la biopelícula bacteriana.⁽³¹⁾

Figura N° 6 Representación esquemática del desarrollo de la biopelículas de *C. albicans*.



Fuente: Fernández RM. 2017

“En una primera fase, las blastosporas de *Cándida spp.* contactan con una superficie y se adhiere a ella, reclutando nuevas células planetónicas hacia la superficie recién colonizada e iniciando un proceso de proliferación celular desde las capas basales inicialmente adheridas. Estudios previos con modelos *in vitro* en agitación han observado que la duración de esta primera parte comprende un periodo de aproximadamente 12 horas, tras las cuales se pueden observar agregados celulares sobre la superficie colonizada. En una segunda fase, comienza el desarrollo de pseudohifas e hifas verdaderas acompañado de un intenso proceso de biosíntesis de la matriz polimérica extracelular rica en carbohidratos y proteínas cuya composición varía según las especies. De esta forma, alrededor de 20 a 24 horas después de la adhesión de las primeras células se obtiene una Biopelículas madura, que continuará sintetizando nueva matriz extracelular y dispersando células planetónicas que intentarán colonizar nuevas superficies”.⁽³¹⁾

Crecimiento y maduración de la biopelícula de *Cándida spp.*:

El desarrollo de la biopelícula de *Cándida spp.* con lleva un intenso proceso de biosíntesis de una matriz extracelular rica en carbohidratos y proteínas. Estudios previos han observado que la matriz extracelular de *C. albicans* está compuesta principalmente de carbohidratos (39,6%), especialmente glucosa

(32,2%) aunque también es posible encontrar pequeñas cantidades de proteínas (5%), hexosaminas (3,3%), fósforo (0,5%) y ácido urónico (0,1%). Las moléculas de glucosa se encuentran formando principalmente β -1,3-glucano, el cual es no solo el componente fundamental de la pared celular sino también el carbohidrato más abundante de la matriz extracelular. ⁽³¹⁾

Por lo general, *C. glabrata* muestra una biopelícula formada exclusivamente por blastosporas que se constituyen en capas de varias células de profundidad, íntimamente unidas, formando agregados. Las especies, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* muestran una biopelícula bifásica, con capas basales de blastosporas que pueden estar ausentes en algunos aislados e hifas en mayor o menor proporción que se muestran en forma de largos filamentos. ⁽³¹⁾

Activación de la resistencia de la biopelícula de *Cándida spp.* a los antifúngicos

La resistencia antifúngicos de la biopelícula de *Cándida spp.* es de origen multifactorial y puede ser explicada por diversos mecanismos según la especie, el antifúngico implicado y la fase de maduración de la biopelículas. En la actualidad, se consideran como principales mecanismos de resistencia.

- La presencia de persistencia o células en estado latente con actividad metabólica reducida.
- La respuesta adaptativa frente a un estrés ambiental mediante bombas de expulsión activa o mecanismos de impermeabilidad.
- El efecto inóculo fruto de la elevada densidad celular en el interior de la biopelícula.
- La limitada difusión de los antifúngicos a través de la matriz extracelular.

(26)

Capacidad de adherencia: Uno de los factores de virulencia más importantes de la *Cándida spp.* es la capacidad de adherirse a las superficies del huésped. En la cavidad oral esto permite que el organismo impida la remoción a través de los efectos del flujo salival y del tragado. La adherencia puede ser al tejido epitelial oral o a los biomateriales de dispositivos protésicos tales como las

prótesis, que han sido introducidos en la boca. Las moléculas de la superficie de la célula en la *Cándida* que están implicadas en su adherencia específica se describen como adhesinas. Una amplia gama de adhesinas se ha identificado para la *C. albicans* e incluye las manoproteínas, las adhesinas fibrilares que se unen a los receptores de complemento en las células hospedero. ⁽²⁵⁾

La *Cándida spp.* dispone de mecanismo específico de adherencia que le permiten el anclaje a receptores orgánicos e inorgánicos presentes en el sustrato. Se han descrito múltiples adhesinas implicadas en la adherencia de *C. albicans* como puede ser las proteínas con secuencia tipo aglutinina Als1 y Als3, las cuales poseen dominios hidrófobos ricos en aminoácidos serina-treonina y forman agregados que favorecen la aglutinación de las células fúngicas. También se han descrito otras adhesinas como la proteína asociada a la pared de la hifa Hwp1, la proteína de adherencia aumenta a poliestireno Eap1 y la proteína relacionada con la hidrofobicidad celular superficial Csh1". ⁽²⁶⁾

Un atributo de *C. albicans* corresponde a su capacidad adherente a las células del hospedero asociado a la patogenicidad. Las cepas adherentes de *C. albicans* son más patógenas que las que tienen fenotipo menos adherente. Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del hospedero o a sus ligandos específicos. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Cándida spp*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p. ⁽³⁴⁾

Dimorfismo: Estos cambios morfológicos pueden ser completos, de micelio a levadura o viceversa. La capacidad del hongo para desarrollar diferentes morfologías conlleva un cambio antigénico o de composición bioquímica que favorece su adaptación a los tejidos y facilita la evasión de las defensas del hospedador. La transformación de micelio a levadura, favorece la evasión tanto de la fagocitosis como de las respuestas inmunitarias adaptativas celular y humoral. ⁽²⁾

En *C. albicans* el dimorfismo está modulado por el ambiente metabólico y, en menor medida, por la temperatura. Cuando coloniza las mucosas se desarrolla fundamentalmente como levadura, mientras que cuando invade los tejidos se observan levaduras e hifas, predominando estas últimas. La proteína Hyr1p (hyphally regulated 1 protein) se expresa durante el desarrollo de las hifas y se considera un factor de virulencia importante al estar implicada en la resistencia a la destrucción intrafagocítica y asociarse a una mayor concentración fúngica en los tejidos. Las hifas de *C. albicans* facilitan no solo la adhesión a las células del hospedador, sino también la penetración en los tejidos gracias a su tigmotropismo; son más difíciles de fagocitar y pueden romper la membrana citoplasmática de los fagocitos. Además, el cambio antigénico facilita la evasión de las respuestas adaptativas celular y humoral. ⁽²⁾

La *Cándida spp* es dimórfica, ya que se presenta bajo las formas de levadura o como filamentos (pseudohifa o hifa). ⁽³⁵⁾

La transición entre la forma de crecimiento de levadura a hifa es importante para desarrollar su patogenicidad, las hifas tan solo se reproducen en el momento de la invasión a los tejidos, existiendo numerosos estímulos ambientales que desencadenan o bloquean su conversión; por ejemplo, a un pH bajo inferior a 6 este microorganismo crece en la forma de levadura mientras que en un pH alto superior a 7 crece en forma de hifa. ⁽³⁶⁾

Dimorfismo fenotípico: El fenómeno del dimorfismo de alta frecuencia de la *Cándida* se relaciona con la morfología celular y es reflejado in vitro como cambios reversibles en la morfología in vitro como cambios reversibles en la morfología de la colonia inducida por la exposición a varios estímulos ambientales. El dimorfismo tiene efectos múltiples en las células de la *Cándida* y se asocia a la expresión alterada del gen que afecta a la superficie de antigenicidad, adherencia, susceptibilidad a la droga y a la resistencia a la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares. ⁽²⁵⁾

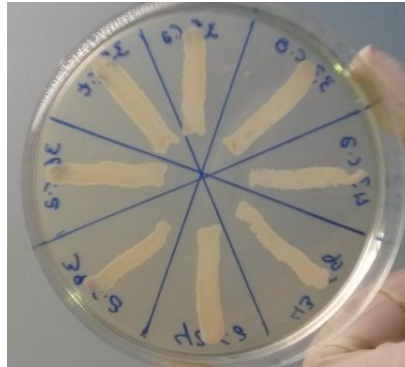
DNAsa: La DNAsa en hongos fue informada por Cazin y Sánchez en el 2003.

La implicación de DNasa extracelular como factor de virulencia para hongos aún no se ha definido. Las hipótesis son que DNasa contribuye a la evasión del sistema inmune, prevenir la muerte de la levadura que puede ser causada por neutrófilos. La DNasa puede ser importante en combinación con otras exoenzimas para degradar el ADN de otros microorganismos en microambiente, especialmente bacterias, facilitando el sitio de colonización mediante la reducción de la competencia microbiana.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado el papel de la extracelular DNasa producida por *C. albicans* para mantener la integridad de la Biopelícula y en la disminución de la susceptibilidad a los fármacos antimicóticos. Sin embargo, futuros estudios deben llevarse a cabo con el fin de verificar la importancia de DNasa para *Cándida spp*, su asociación con otros factores de virulencia, especialmente con adhesinas, y su implicación en virulencia, patogenicidad y resistencia antifúngica.⁽³⁶⁾

El DNasa Test Agar, la triptona proporciona nutrientes para el crecimiento. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico. El alto nivel de ácido desoxirribonucleico molecular hace posible la detección de la desoxirribonucleasa (DNasa) que despolimeriza el ADN. Después de la incubación del medio con la cepa de prueba, la placa se inunda con ácido clorhídrico, que causa la precipitación del ADN polimerizado y hace al medio opaco. Los organismos que degradan el ADN producen una zona transparente alrededor del área de crecimiento. Este medio se utiliza principalmente en la identificación de los *Staphylococcus aureus*, pero también puede usarse para la detección de la actividad de la DNasa en otros microorganismos.⁽³⁶⁾

Figura N° 7 Cultivo de *Cándida spp* en medio DNAsa



Fuente: Registros de laboratorio

2.1.7.7. Diagnóstico de Candidiasis oral

Las infecciones orales generalmente son diagnosticadas por la apariencia y los síntomas.⁽³⁷⁾

El diagnóstico de la candidiasis oral se puede hacer a menudo observando la naturaleza de las características clínicas presentes, aunque si es posible deben ser tomados especímenes microbiológicos para identificar cualquier *Cándida spp.* que puede estar presente y proporcionar los aislantes para la prueba de la sensibilidad de los antimicóticos. La identificación de cepas infectantes es importante puesto que la aparición de especies con sensibilidad reducida a los antimicóticos administrados con frecuencia se está poniendo cada vez mas de manifiesto.⁽²⁵⁾

Aislamiento de la *Cándida spp* de la cavidad oral.

Las muestras orales para la detección de la *Cándida spp* generalmente cultivadas en el agar de la dextrosa de Sabouraud (ADS) que apoyará el crecimiento de toda las especies orales de la *Cándida spp* con el beneficio agregado de suprimir el crecimiento bacteriano debido a su pH relativamente bajo. En años recientes, se han desarrollado otros medios diferenciales de *Cándida*, como CHROmagar, que permite la identificación de ciertas especies de *Cándida spp* basada en aspecto de la colonia y del color que sigue al cultivo primario. La ventaja de tales medios es que la presencia de múltiples especies de *Cándida spp* en una sola infección puede ser determinada, por lo cual

puede ser importante en la selección de opciones del tratamiento subsecuente.
(25)

-Identificación de la *Cándida spp* de la cavidad oral.

La identificación presunta de las levaduras en base a medios de cultivo primarios se puede confirmar a través de una variedad de pruebas suplementarias basadas tradicionalmente en las características morfológicas y fisiológicas de los aislados.

La identificación bioquímica de la especie de la *Cándida spp* se basa en gran parte en la utilización del carbohidrato. La identificación del aislado es determinada por el perfil de los carbohidratos que se pueden utilizar por el organismo de la prueba. Los sistemas comerciales tales como el sistema del API 32C se basan en el mismo principio pero los carbohidratos de la prueba son contenidos en los pozos plásticos situados en una tira de prueba. El crecimiento en cada uno es leído por los cambios en la turbiedad o cambios de color en ciertos sistemas del kit. Los códigos numéricos obtenidos de los resultados de la prueba se utilizan para identificar el organismo de la prueba basado en la comparación de la base de datos. (25)

Los métodos basados en la identificación molecular se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como abordajes para la identificación de la *Cándida*. Se han reportados varios genes para la discriminación de las especies de *Cándida*, constituyendo las más utilizados las secuencia del operón ribosomal del RNA. La identificación se puede obtener en base al tamaño de los productos de PCR obtenidos después de la resolución de la electroforesis en geles, o con la variación de la secuencia de los productos de PCR determinados ya sea por secuencia directa o con el uso del análisis del fragmento de la restricción después del corte de la secuencia de PCR con restricción de las endonucleasas. La tecnología molecular se puede también utilizar para identificar las especies de *Cándida* a través del uso de técnicas tales como campo de electroforesis del gel pulsado (PFGE), análisis polimórfico amplificado al azar del DNA (RAPD) y repetición de la amplificación de

secuencia (REP). PCR es en gran parte reservada para las investigaciones epidemiológicas en los estudios de la candidiasis oral. ⁽²⁵⁾

Tinción de Gram: en las que se observa hifas y pseudohifas.

Las muestras fueron examinadas coloreándose con tinción de Gram, en infecciones causadas por hongos del género *C. albicans*, se confirma la presencia de hongos si en ella se observa abundante cantidad de leucocitos, células epiteliales, piocitos, levadura y pseudohifas de tipo *Cándida*. ⁽³⁸⁾

Pruebas de identificación: estos criterios tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en medios de cultivo; el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos añadidos, es el aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras, puesto que es el medio en el cual las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisas o rugosas, con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas a medida que envejecen. ⁽¹³⁾

Cultivo de *C. albicans*: en SDA, blancas a color crema suave, glabra, cremosas.

Cultivo de *C. glabrata*: en SDA, blancas a color crema, glabras, cremosas.

Cultivo de *C. krusei*: en SDA, blancas a color crema, glabras o rugosas hasta cerebriformes, de aspecto opaco o seco

Cultivo de *C. parapsilosis*: en SDA, luego de 3-5 días de crecimiento a 28°C-35°C se presentan colonias blancas a color crema suave, glabras, cremosas.

Cultivo de *C. tropicalis*: en SDA, se presentan colonias blancas a color crema suave, glabras, cremosas. ⁽³⁹⁾

Criterios Bioquímicos: Medios Cromogénicos: Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Cándida spp.* tras su incubación a 30-37 °C durante 24-48 horas. El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por

parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima; una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente cultivos mixtos. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales. ⁽¹³⁾

CHROMagar *Candida*: permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kruzei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* en función de los colores que desarrollan en este medio. ⁽¹³⁾

Prueba del tubo germinal: Es la extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a las tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Cándida spp.* ⁽⁴⁰⁾

Microcultivo: La técnica de microcultivo sobre portaobjetos es convencional para visualizar estructuras delicadas, sin manipulación que las pudiera alterar. Estos microcultivo se preparan extendiendo una capa fina del medio de agar adecuado, asépticamente, sobre un portaobjetos estéril, e inoculado en su punto central, cuando se ha solidificado, con una suspensión de esporas el hongo en estudio. A continuación, se incuba asépticamente (en el interior de una placa de Petri estéril) en condiciones idóneas para cada caso. ⁽⁴¹⁾

Sistema semiautomáticos: En la actualidad, se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación.

API: La galería se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de

utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático. ⁽¹³⁾

2.1.7.8. Tratamiento

A pesar de que *C. albicans* ha mantenido un bajo nivel de resistencia antifúngica, se ha descrito un aumento significativo de especies no-*albicans*, que exhiben resistencia a azoles; por esta razón surgió la necesidad de utilizar antimicóticos como polienos, flucitosina, imidazoles y triazoles (fluconazol e itraconazol), para profilaxis o terapia antifúngica o para la terapia empírica, sin embargo, estas prácticas terapéuticas han generado cambios epidemiológicos entre los que se destacan la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos. ⁽¹³⁾

Polienos

Anfotericina B. Su mecanismo de acción se basa en la unión al ergosterol de las membranas plasmática, originando poros que aumentan la permeabilidad y producen la destrucción celular. Presenta un gran número de efectos secundarios. La resistencia a la anfotericina B de las diferentes especies de *Cándida spp* es extraordinariamente rara.

C. lusitaniae y *C. guilliermondii* presentan la capacidad de desarrollar resistencia a anfotericina B. ⁽³²⁾

Azoles: Este grupo interfiere en la síntesis del ergosterol al inhibir la enzima c4- alfa- desmetilasa, encargada de transformar lanosterol en ergosterol. En este grupo se incluyen fluconazol, itraconazol y voriconazol, para tratamiento de micosis sistémicas. Su efecto es fungistático.

- **Fluconazol:** El fluconazol inhibe el citocromo P450 fúngico de la enzima 14 α -demetilasa. La actividad de la demetilasa mamífera es menos sensible al fluconazol que la demetilasa fúngica. Esta inhibición previene la conversión

de lanosterol a ergosterol, componente esencial de la membrana citoplasmática, y subsecuente acumulación de esteroides 14 α -metil. ⁽⁴²⁾

Elección de anti fúngico en una Candidemia

En una Candidemia el tratamiento de elección cuando aún no está identificada puede hacerse con una equinocandina. Si la infección es leve, no existe neutropenia ni afección primaria o metastásica de un órgano y el paciente no ha recibido un azol durante el último mes, ni tiene antecedentes de colonización por *C. krusei* o *C. glabrata*, en lugar de la equinocandina el tratamiento puede iniciarse con fluconazol. La infección de *C. krusei* debe tratarse con una equinocandina, con voriconazol o con una forma lipídica de anfotericina B.

Para el estudio de sensibilidad existen actualmente dos patrones diferentes, ambos basados en métodos de micro dilución. Uno de ellos elaborado por el "European Committee on Antibiotic Susceptibility testing" (EUCAST) y el otro elaborado por el "Clinical Laboratory Standard Institute in the U.S.". (CLSI, former NCCLS). ⁽³²⁾

Mecanismo de resistencia a los azoles en *Cándida spp.*

El uso de los anti fúngicos en las últimas décadas, ha conducido a la aparición de la resistencia antifúngica. Las especies de *Cándida spp* más relevantes que causan infecciones son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*; solo estas dos especies *C. krusei* y *C. glabrata* se han reportado resistencia intrínseca y adquirida a los azoles y otros antifúngicos de uso común. *C. glabrata* posee un genoma diploide por lo que esto hace que se adapte y exprese resistencia a diferentes antifúngicos, *C. glabrata* sobresale de las otras *Cándida spp*. porque no forma pseudohifas a 37° C, ni secretan hidrolasas que es un factor de virulencia importante para la invasión de tejidos, otro aspecto muy importante es la capacidad que tiene de evadir el sistema inmune y la capacidad de sobrevivir replicándose dentro de los macrófagos . En los azoles la diana es el citocromo P-450 el cual es llamado Erg11p siendo este sintetizado por el gen ERG11, los azoles se unen al hierro del grupo hemo

del Erg11P y de esta manera se bloquea la síntesis de ergosterol, impidiendo el crecimiento del hongo.⁽⁷⁾

Hay varios mecanismos de resistencia hasta ahora estudiados, la expresión de las bombas de expulsión que poseen dos sistemas: la súper familia facilitadores principal (MFS) y la súper familia de proteínas con casete de unión al ATP (ATP- binding- cassette (ABC)) siendo las responsables de la acumulación intracelular del medicamento. Los transportadores ABC codifican la expresión CDR1 y/o CDR2, para MFS que codifica el gen BEN también llamado MDR1 y la sobreexpresión del gen MDR1 que es específica para el fluconazol, mientras que para CDR1 y/o CDR2 es resistente a todo los azoles. El primer mecanismo de resistencia es la modificación de la diana, que ocurre cuando la 14 alfa demetilasa modifica la cantidad y calidad presentándose mutaciones en los genes Erg11 de tal manera que la interacción de la diana con el antifúngico se da ineficientemente. Los genes del citocromo del P-450 (CYP) del cual se ha secuenciado la CYP 51 que codifica la proteína que cataliza la 14 alfa demetilasa, el segundo mecanismo de resistencia descrito es el aumento en el número de copias de la enzima 14 alfa demetilasa (CYP51) durante la interacción con los azoles, el cual se debe a la respuesta debido a la reducción de ergosterol o la acumulación de esteroides tóxicos.⁽⁴³⁾

Métodos de estudio de susceptibilidad de antifúngicos del CLSI

La CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) creó un subcomité para estandarizar las pruebas a los antifúngicos, para *Cándida spp.* en el cual se aprobó el método M27-A, que tiene los puntos de corte de fluconazol, itraconazol, 5 fluorocitosina y las CMI para las cepas de control de calidad. Los métodos para levaduras son M27A-3 y M44-A, para hongos filamentosos el M-38A, se basan en la cuantificación y la inhibición del crecimiento producida por el antifúngico, comparada con el crecimiento de la levadura, pero sin antifúngico. El método de microdilución para levaduras M27A3, se realiza para antifúngicos solubles. La técnica de microdilución M27A3 es la prueba gold estándar, presentándose alta reproducibilidad intra e inter laboratorio, considerada el método de referencia.⁽³¹⁾

2.2. Hipótesis

El factor de virulencia asociado a la resistencia de la *Cándida spp* a Fluconazol, en residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita” es la formación de Biopelículas.

2.3. Marco contextual

2.3.1. Historia del “Hogar 25 de Mayo”

La congregación “Siervas de María Ministras de los Enfermos” nace en Madrid, España el 15 de mayo de 1851 en un barrio de la periferia, en la iglesia de Chamberí. El sacerdote Don Miguel Martínez y Sanz, tuvo la inspiración de fundar una asociación de mujeres piadosas para el cuidado de los enfermos en sus mismos domicilios, es así que va surgiendo la congregación de las Siervas de María Ministras de los Enfermos. Con el transcurso del tiempo, viendo que la fundación no iba a tener sostén, en 1856 el Padre Miguel deja la obra y se va como misionero a Fernando Póo. Es así como Santa María Soledad Torres Acosta. Se constituye fundadora de tan maravillosa obra apostólica, siendo los pioneros con el carisma de asistencia esmerada y gratuita a los enfermos en sus domicilios, tomando la consigna evangélica “ESTUVE ENFERMO Y ME VISITASTE”. A pesar de tantas dificultades, problemas, tropiezos la fe inquebrantable de Madre Soledad hace que la Congregación se convierte en árbol frondoso donde posteriormente fue creciendo y expandiéndose la Institución atravesando ultra mar, llegando a América. (Archivos de hogar 25 de mayo).

La Madre fundadora falleció el 11 de octubre de 1887, la iglesia reconoció el heroísmo de sus virtudes, Madre Soledad fue Beatificada por Pío XII el 5 de febrero de 1950 y canonizada por Pablo VI el 25 de enero de 1970.

El 21 de enero de 1899 llega a Sucre la primera expedición de las hermanas “Siervas de María” para hacerse cargo del Hospital “Santa Bárbara”, el matrimonio de los esposos sucrenses Don Pedro Lazúrtegui y Doña Isabel Urriolagoitia fueron quienes tramitaron la venida de las Hermanas con la Superiora General Josefa Díaz, obteniendo el consentimiento y la del Monseñor Miguel de los Santos Taborga, llevando a cabo el trámite con la Sociedad Humanitaria de San Vicente de Paul, que tiene a su cargo en esa fecha el Hospital y el Manicomio.

Esta primera casa era un centro plurifuncional donde aparte del funcionamiento del Hospital se encontraba el Manicomio Pacheco tanto sección varones y mujeres y un local que se asignaba con el nombre de asilo de ancianos.

El “Hogar 25 de Mayo”, tuvo su origen en el Hospital Santa Bárbara, en sus archivos consta que tuvo anexos con un asilo de ancianos, el número de pacientes enfermos ancianos era muy elevado ya que los enfermos después de restablecerse no tenían un hogar donde ir por circunstancias de abandono y extrema pobreza, alojados en una parte del pabellón de maternidad del Hospital. Los historiadores relatan que un hombre de oficio zapatero cocinaba comida en una olla todos los días para los ancianos, estos comían con sus manos en condiciones precarias, para luego descansar y quedar dormidos sobre unos cueros en el suelo húmedo. Posteriormente la Sociedad Humanitaria de San Vicente de Paul les pasa una Subvención.

El 25 de abril de 1900 arriban a Sucre la segunda expedición compuesta por seis religiosas. En el grupo llega la Madre Alejandrina Cuevas nombrada Maestra de Novicias del Noviciado Regional Sucre.

Tanto era el número de ancianos que vivían en un solo cuarto entre hombres y mujeres, el Hospicio no podía continuar en la forma que fue recibido por las hermanas con esa promiscuidad y un local inadecuado del que Madre Alejandra Cuevas, Superiora del Hospital Santa Bárbara; hizo presente a la Honorable Alcaldía Municipal los cuales se interesaron y cedieron el local actual, que era un cuartel del ejército, haciéndose cargo con carácter propietario la H.A.M.(Honorable Alcaldía Municipal) bajo la custodia y administración de las Hermanas “Siervas de María Ministras de los Enfermos”

En febrero de 1905, tomaron posesión del nuevo edificio ubicado en calle Camargo, que tampoco era un modelo de Hogar, por las piezas pequeñas, sucias, pisos de tierra, etc. La junta de beneficencia dispuso la erección de este establecimiento, poniendo al cuidado de las “Siervas de María” encargándose al efecto cuatro de ellas; Sor Eduvigis Imaz, Sor Gloria Machín, Sor Jesús Amezaga y Sor Trinidad Urdiminea. Grandes esfuerzos y sacrificios costó a las

hermanas adaptarlo para el fin que estaba destinado, gracias a las donaciones de las familias sucrenses se pudieron ir habilitando y adaptando los espacios; y distribuirlos en sección varones y mujeres.

La primera Madre Superiora del “Hospicio 25 de Mayo” fue la Madre Mercedes Posada que llegó de España en la segunda expedición de las “Siervas de María” el año 1900 en un principio el Hogar fue llamado “Asilo de Mendigos”, después “Hospicio de Asilados”, luego “Hogar de Ancianos” y en la actualidad “Hogar 25 de Mayo”. En un principio este hogar albergaba enfermos incurables, subnormales, epilépticos, sordomudos, invidentes, saben a qué atenerse, deseosas de mantenerse en su puesto a pesar de la dificultad. El 24 de enero de 1911 Madre Dolores Serrano Superiora General del aquel entonces pide voluntarias para fortalecer las dos casas de Sucre.

Se supera esta crisis y dieciséis hermanas, jóvenes todas ellas llegan a Buenos Aires, además que otra Hermana de la Comunidad de Buenos Aires fue añadida a la expedición y así fueron. La Municipalidad mandó por dos veces una comisión del Municipio para rogarlas que volvieran a hacerse cargo del “Hospicio 25 de mayo” ya que las 3 hermanas que allí había, se bajaron al hospital, en medio de lágrimas y sollozos de los pobres asilados. Al saber con seguridad que la tercera expedición de las “Siervas de María” estaba en camino y que arribarían al puerto de Buenos Aires el 24 de julio de 1911, las mismas tres hermanas volvieron a hacerse cargo del “Hospicio”. El acto oficial de entrega lo hizo el señor presidente de la Municipalidad Sr. Rene Rodriguez acompañados de los miembros de la comisión y fue firmado por la Superiora Sor. Eduvigis Imaz y el presidente el día 1 de junio de 1911.

El tercer grupo llegó a Sucre el 18 de agosto de 1911 sin novedad, saliendo a su espera Sor. Eduvigis con otra hermana y el capellán a cinco leguas de Sucre. Fue una entrada muy hermosa todas las señoras de la aristocracia de Sucre como pocas veces visto fueron a recibirlas, venían las hermanas repartidas en los coches de caballos de las señoras que se porfiaban para traer en el suyo aunque fuera una. El refuerzo fue eficaz y la congregación arraigó definitivamente en el suelo boliviano.

Figura N° 8 Frontis del “Hogar 25 de mayo”



Fuente: Registros de laboratorios

2.3.2. Infraestructura

Su infraestructura está dividida en 4 sectores denominándose. Sector hombres alto y bajo, mujeres alto y bajo, existen 3 consultorios de atención de salud del adulto mayor conformada por fisioterapia, odontología y medicina; a ellas se integran las áreas de enfermería en cada una de los sectores regentadas por Hermanas de la Congregación de Siervas de María y de profesión enfermeras. La disposición de la infraestructura consiste en 4 patios, 3 comedores (hombres- sector bajo hombres y mujeres- sector bajo mujeres y hombres con impedimento en las piernas- sector alto varones), la cocina, oficina de dirección y una portería. Actualmente el “Hogar 25 de Mayo” está situado en calle Camargo N°103

Figura N° 9 Pasillo principal del “Hogar 25 de mayo”



Fuente: Registros de laboratorio

2.3.3. Servicios que oferta

Los servicios que ofertan son cuidados al adulto mayor.

Los internos que residen en el hogar ingresaron a este minoritariamente por voluntad propia, la mayoría de ellos fueron dejados o abandonados por sus familiares, el gobierno nacional se ocupa su manutención y alimentación. Por otro lado, la ayuda recibida por voluntarios en forma de donativos externos es bien recibida por los internos y la regencia de las hermanas de la Congregación Siervas de María. Existen ancianos que proceden de la ciudad de La Paz, Oruro, Santa Cruz y frecuentemente son Chuquisaqueños; sus edades están comprendidas mayoritariamente entre 60 a 90 años de edad, existiendo algunos casos de menores de 60 con patologías como Alzheimer. La mayoría de ellos tienen como lengua materna el quechua y el resto castellano.

2.3.4. Condiciones de Salud de los Internos del “Hogar 25 de Mayo”

Las condiciones generales de salud con la que ingresan los pacientes están relacionadas con su edad, son problemas de salud como hipertensión, diabetes, gastritis y úlceras, artritis reumatoides, dérmicas, oftálmicas y auditivas y algunos casos de neoplásicas. Muchos de los internos que ingresan manifiestan algún grado de desnutrición y problemas respiratorios de tipo infeccioso. Tras una valoración médica previa muchos de ellos reciben la medicación especialmente para los diabéticos e hipertensos, sin embargo, existen necesidades no cubiertas para el tratamiento de otras patologías, por el costo elevado. Los médicos que regentan son el Médico general, el cirujano internista, el fisioterapeuta y personal de enfermería.

Las condiciones de salud oral en aquellos que ingresan al Hogar no son buenas, observándose presencia de restos radiculares, caries en distintos grados, lesión periodontal, abscesos, halitosis y presencia de cálculos supra y subgingivales. Son escasos, los casos de ancianos que ingresaron al hogar portando prótesis total removible. Los tratamientos que reciben en el consultorio dental incluyen mayoritariamente exodoncias, cálculos gingivales, obturaciones de primer y segundo grado, instalación de prótesis removible total y parcial, tratamientos de profilaxis y tratamiento farmacológico antibiótico,

analgésico, antimicótico y antiviral. El tratamiento odontológico en pacientes geriátricos es realizado por un odontólogo, cuyo profesionalismo es relevante, admirable y de sensibilidad.

2.3.5. Personal del “Hogar 25 de Mayo”

El “Hogar 25 de mayo” en la gestión 2016 está conformado por la Directora a cargo que pertenece a la congregación de María y cuentan con 8 profesionales en el área de salud compuesta por 2 médicos, 1 fisioterapeuta, 1 odontóloga y 4 enfermeras, a ellos se suman 7 manuales que prestan servicios para el cuidado de 110 adultos de la tercera edad; las cuales trabajan en dos turnos; turno nocturno y turno diurno.

CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque, Tipo y Diseño de investigación

3.1.1. Enfoque de la investigación: El estudio se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo que permitió determinar la resistencia de *Cándida spp* a fluconazol en asociación a los factores de virulencia, aislados de los tejidos bucales de los residentes del “Hogar 25 de Mayo y del Hogar Santa Rita” de la ciudad de Sucre, la cual fue expresadas en valores y unidades numéricas.

3.1.2. Tipo y diseño de la investigación

-Observacional: Se puntualizó las variables: formación de biopelículas, adherencia, dimorfismo, hemólisis, y DNAsa. Sin manipular su comportamiento y expresión fenotípica.

-Transversal: Se obtuvo la información en un período comprendido entre los meses agosto de 2017 a junio de 2018, la identificación de los factores de virulencia de *Cándida spp* y la resistencia al fluconazol.

- Descriptiva: Se detalló el comportamiento de los factores de virulencia y la resistencia a fluconazol de *Cándida spp.* aislada de los tejidos bucales de los adultos mayores.

- Analítica: Se asoció la resistencia de *Cándida spp* al fluconazol con los factores de virulencia como formación de biopelículas, adherencia, dimorfismo hemólisis y DNAsa, estimada a determinar su significación estadística.

3.2. Universo o población de estudio, selección y tamaño de muestra

3.2.1. Universo: En el estudio participaron 132 residentes de los hogares de acogida de la ciudad de Sucre, de los cuales correspondientes a 90 del “Hogar 25 de Mayo” y 42 del “Hogar Santa Rita” en la gestión 2017.

Se aislaron 86 cepas de *Cándida spp.* siendo este el universo, en el que se estudió los factores de virulencia. Por lo tanto no se incluyó una muestra según técnica de muestreo.

3.3. Unidad de estudio

Está comprendido por cepas de *Cándida spp.* resistentes a fluconazol aislados de la cavidad bucal de los residentes del “Hogar 25 de mayo” y el “Hogar Santa Rita”.

3.4. Variables de Estudio

3.4.1. Variable dependiente:

Resistencia de *Cándida spp* al fluconazol

3.4.2. Variable independiente:

- Formación de Biopelículas.
- Adherencia a las 24 horas.
- Dimorfismo.
- Hemólisis.
- DNAsa.

3.4.3. Diagrama de variables

Objetivo específico	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	categoría	Tipo de variable	Instrumentación
Determinar la <u>prevalencia</u> de colonización de <i>Cándida spp.</i> en los residentes de los hogares “25 de mayo” y “Santa Rita”.	Colonización de <i>Cándida spp.</i>	Se refiere a una invasión ocasionada por el hongo del género <i>Cándida spp.</i> ⁽⁴⁴⁾	Presencia de ulcera, películas blancas, mucosa eritematosa, presencia de dolor y despapilación.	Colonizado No colonizado	Cuantitativo, transversal	Registros de Laboratorio
Determinar la resistencia de <i>Cándida spp.</i> a fluconazol, aislada de tejidos bucales de residentes de los hogares “25 de	Resistencia a fluconazol	Crecimiento del microorganismo infectante o el patógeno es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano	Se observó un crecimiento de <i>Cándidas spp</i> valorada por método Difusión agar	Sensible, Resistente	Cuantitativo, transversal	Registros de Laboratorio

Mayo y “Santa Rita”.		más alta que el rango observado para cepas silvestres. ⁽⁴⁵⁾				
Identificar las especies frecuentes de cepas de <i>Cándida spp</i> aisladas de tejidos bucales de los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. según factores de virulencia y resistencia	Especie de <i>Cándida spp</i>	Es la unidad básica de la clasificación biológica del género <i>Cándida spp.</i> ⁽⁴⁴⁾	Según criterios bioquímicos y morfológicos (microcultivo)	<i>C. albican</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> .	Cuantitativo, transversal	Registros de Laboratorio
Asociar la	Formación	Es un proceso	Se observa la	Formadore	Cuantitativo,	Registros de

<p>resistencia de fluconazol de las cepas de <i>Cándida spp</i> a los factores de virulencia como formación de biopelículas, adherencia a las 24 horas, dimorfismo producción de</p>	<p>de biopelículas</p>	<p>que se inicia con la adherencia sobre una superficie abiótica, un tejido o en la interfase aire-líquido. ⁽²⁶⁾</p>	<p>capacidad para dar lugar a infecciones en la cavidad bucal</p>	<p>s, No formadores</p>	<p>descriptivo, transversal, analítico.</p>	<p>Laboratorio</p>
<p>hemólisis y DNAsa.</p>	<p>Adherencia a las 24 horas</p>	<p>Es la unión física que resulta de haberse pegado una cosa con otra. ⁽⁴⁶⁾</p>	<p>La adherencia puede ser al tejido epitelial oral o a los biomateriales de dispositivos protésicos tales como las prótesis,</p>	<p>Positivo Negativo</p>	<p>Cuantitativo, descriptivo, transversal, analítico.</p>	<p>Registros de Laboratorio</p>

			que han sido introducidos en la boca.			
	Dimorfismo	Presencia de diferentes formas y tamaño. ³³	Se observó las diferentes formas en las cepas de <i>Cándida spp</i>	Positivo Negativo	Cuantitativo, descriptivo, transversal, analítico.	Registros de Laboratorio
	Hemólisis	Destrucción de los glóbulos rojos de la sangre que va acompañado de Hemoglobina. (47)	Se observó la formación de hemólisis en las colonias de la especie de <i>Cándida</i>	Positivo , Negativo	Cuantitativo, descriptivo, transversal, analítico	Registros de Laboratorio
	Presencia DNAsa	Enzima que cataliza la rotura de los enlaces fosfodiéster en el DNA. ⁽⁴⁸⁾	Se observó la presencia de DNA en las diferentes especies de <i>Cándida</i> .	Positivo, Negativo	Cuantitativo, descriptivo, transversal, analítico	Registros de Laboratorio

3.5. Criterios de inclusión y exclusión.

3.5.1. Criterios de inclusión:

- Residentes colonizados con las cepas de *Cándida spp* en tejidos orales.
- Residentes que dieron consentimiento para realizar el estudio.

3.5.2. Criterios de exclusión:

- ✓ Residentes colonizados bajo tratamiento farmacológico con antifúngicos y antibióticos.
- ✓ Residentes colonizados con tratamiento tópico antiséptico en tejidos de la cavidad oral.
- ✓ Residentes colonizados con enfermedad degenerativa que el médico no autorizó su participación.
- ✓ Residentes colonizados por hongos filamentosos.

3.6. Procedimientos destinados a la recolección de información, fuentes, métodos y técnicas, instrumentos utilizados y métodos para el control de calidad de los datos.

3.6.1. Fuente primaria: Se recogió directamente la información de los registros de laboratorio.

3.6.2. Métodos y técnicas: Se emplearon técnicas microbiológicas destinadas al aislamiento, identificación y susceptibilidad antimicótica, las mismas se describen a continuación.

Toma de muestra de cavidad bucal: Se tomó las muestras de los tejidos bucales con hisopo estéril de los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita” y se transportó en viales para su procesamiento inmediato.

Figura N°10 Toma de muestra de candidiasis oral

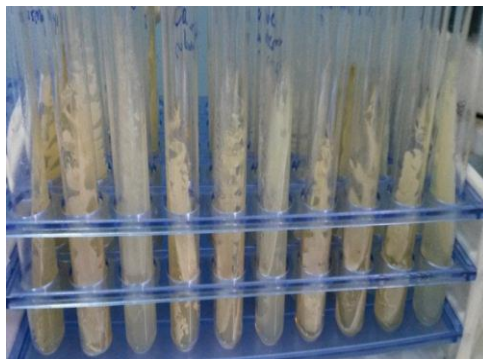


Fuente: Registro de Laboratorio

Aislamiento de cepas de *Cándida spp*

Se empleó el agar **Sabouraud glucosado**, Este medio sólido nos permitió el aislamiento de hongos levaduriformes como *Cándida spp*. El cual contuvo peptona, la tripteina, glucosa y se suplementó con cloranfenicol para aislar los cultivos puros de la muestra con flora mixta. La técnica que se aplicó es la siembra por estrías con el hisopo que contenía la muestra, en el medio de cultivo que se encontraba en el tubo. Se extendió la muestra; con el hisopo desde el fondo y en progresión ascendente se deslizó en movimiento de zig-zag. Se incubo durante 48 a 72 horas a 30-35° C. ⁽⁴⁹⁾

Figura N° 11 Desarrollo de colonias en medio Sabouraud

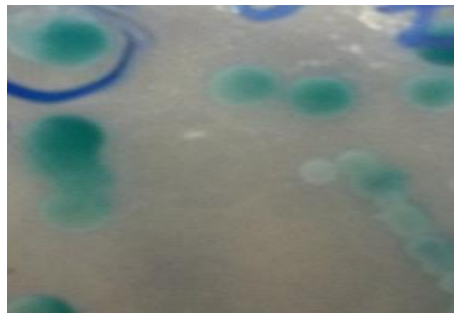


Fuente: Registros de laboratorio

Identificación de especies de *Cándida spp*

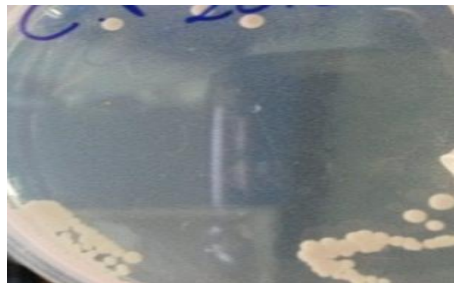
Una vez desarrolladas las colonias, se realizó la identificación de las especies de *Cándida spp* en **CHROMOagar** medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de especies de *Cándida spp*, debido a que contiene sustratos cromógenos. Las colonias de *C. albicans* presentaron un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco y aspecto seco. Se empleó el siguiente procedimiento; se extendió la muestra en la superficie del medio para aislamiento, se incubó las placas a 35 ± 2 °C durante 24 – 48 horas en posición invertida y se observó el crecimiento. ⁽⁵⁰⁾

Figura N° 12 Crecimiento de *C. albicans* en CHROMagar



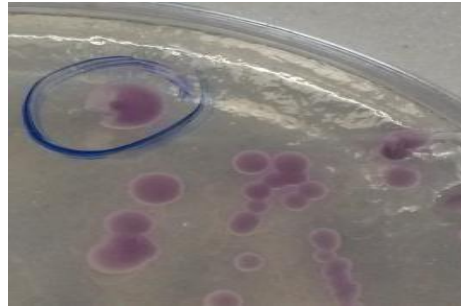
Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 13 Crecimiento de *C. parapsilosis* en CHROMagar



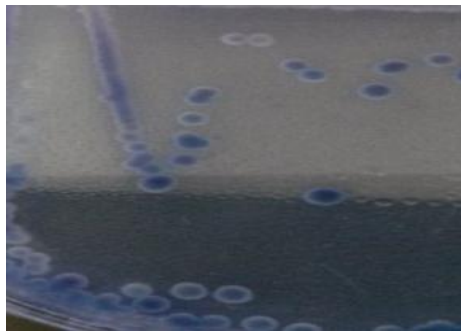
Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 14 Crecimiento de *C. glabrata* en CHROMagar



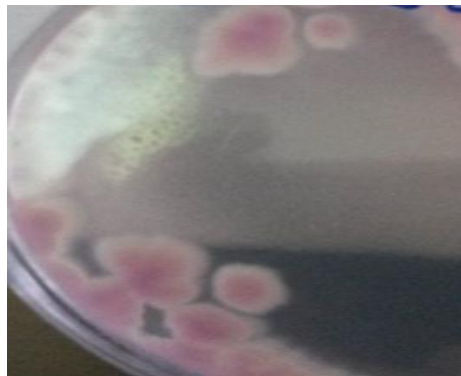
Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 15 Crecimiento de *C. tropicalis* en CHROMagar



Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 16 Crecimiento de *C. krusei* en CHROMagar



Fuente: Registros de Laboratorio

Una vez desarrolladas las colonias en CHROMagar e identificados por la coloración se realizó la diferenciación de las *C. albicans* de las no *albicans*, con la **prueba del tubo germinativo**; que es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la

célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a las tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Cándida spp.* ⁽¹³⁾

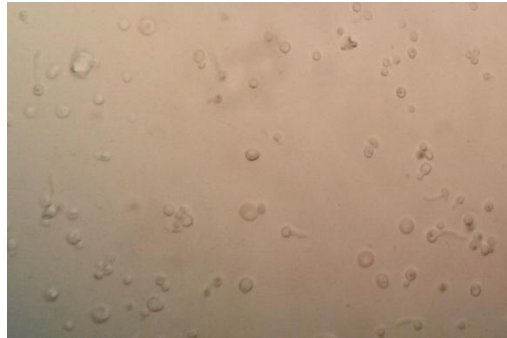
Se re suspendió un inóculo de la cepa pura de *Cándida spp* con 24 horas de desarrollo en 0,5 ml de suero humano. Se incubó a 35 – 37 °C por 2 horas y 30 min. Se puso 2 ó 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y se cubrió con cubre objeto y finalmente, se observó al microscopio con objetivo de 40X. La prueba fue positiva al visualizar una estructura alargada que se originó a partir de la levadura. ⁽⁵¹⁾

Figura N° 17 Test de tubo germinativo en *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 18 Observación microscópica de *Cándida albicans*.



Fuente: Registros de Laboratorio

Para verificar algunas especies de *Cándida spp* se hizo uso del API: La galería contiene 10 cúpulas con sustratos deshidratados que permitieron realizar pruebas de asimilación y fermentación. Las cúpulas se inocularon con un medio vehículo líquido de Cl Na 0.85% (2ml) y las levaduras se reproducen si tenían dichas enzimas específicas. Ello permitió identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hizo por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtuvo, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico.⁽¹³⁾

Figura N° 19 Pruebas de identificación bioquímicas con API *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio

Pruebas de susceptibilidad

A partir de cepas tipificadas por especies se realizó el **antibiograma** en medio de Mueller Hinton. Se empleó el siguiente procedimiento y se empleó agar Mueller-Hinton 2% glucosa más azul de metileno. El antibiograma disco-placa consistió en estandarizar el inóculo a la escala 0,5 de Mc Farland empleando un turbidímetro de la línea BioMierux. En el inóculo estandarizado se introdujo

un hisopo dentro de la suspensión y se rotó varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Se procedió a sembrar en masa las placas de Mueller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consiguió deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Se dejó reposar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos. Se colocó el disco de fluconazol con pinzas estériles al centro de la placa, y se distribuyó de forma que no se produjo superposición de los halos de inhibición. Se incubó las placas invertidas (agar en la parte superior), en grupos no superiores a 5 placas, a 35°C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos. ⁽⁵²⁾

Figura N° 20 Fungigráma de las diferentes especies de *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio.

La interpretación se realizó después de 24 horas de incubación hacer la lectura del diámetro de las zonas de completa inhibición con una regla y compararlos con los puntos de corte establecidos por la CLSI para el fluconazol.

Para la interpretación existen tres categorías: Sensible, Sensible Dosis Dependiente y Resistente. Cortes de la CLSI enunciados a continuación.

Cuadro N ° 2 Puntos de corte para Fluconazol y equivalencia diámetro CIM para *Cándida spp* CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute)

Antimicótico	Carga del disco	Diámetro (mm)			CIM (ug/ml)		
		S	SDD	R	S	SDD	R
Fluconazol	25 ug	19	15-18	14	8	16-32	64
R: Resistente		SDD: Sensible Dosis Dependiente			S: Sensible		

Fuente: Documento CLSI M44-A2 Vol 29.

Técnicas destinadas a identificar los *factores de virulencia*:

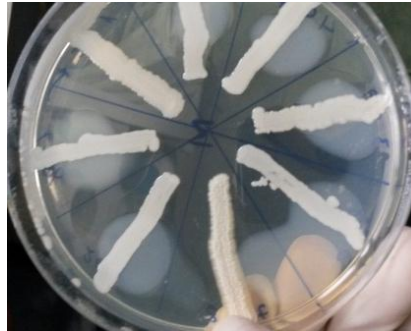
Medio DNAsa:

Se empleó el medio de cultivo DNAsa para la detección de enzimas desoxirribonucleasas. En el cual, la tripteina es la fuente de nitrógeno, aminoácido y aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. El ácido desoxirribonucleico (DNA), se encuentra en grado altamente polimerizado y es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. ⁽⁴⁹⁾

El procedimiento sembrando la colonia de *Cándida spp* en la superficie del medio DNAsa y se incubo durante 24 horas a 37°.

Este medio de cultivo, permitió observar que las levaduras aisladas de tejidos bucales no poseen la enzima desoxirribonucleasa. La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N dentro de los primeros 5 min. El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo. Como sucedió con las levaduras de *Cándida spp*. ⁽⁴⁹⁾

Figura N° 21 Prueba de DNAsa en cepas de *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio

Hemólisis: La actividad hemolítica se determinó en placas de agar con dextrosa Sabouraud que contenían 2% de glucosa y 5% de eritrocitos de oveja.

La actividad hemolítica se evidencio por el halo translúcido con bordes definidos alrededor de las colonias a las 24 horas.⁽³⁰⁾

Figura N° 22 Prueba de hemólisis en cepas de *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio.

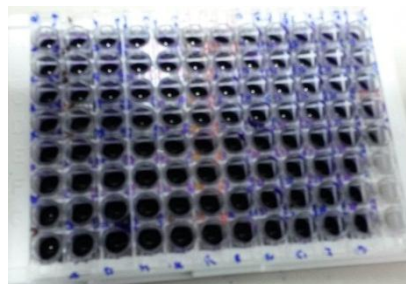
Formación de Biopelículas: este método permitió cuantificar la producción de Biopelículas lo cual se consigue mediante la medición de la densidad óptica del biofilm, ya que ésta es variable dependiendo de las características intrínsecas de Biopelículas

Se empleó la técnica adaptada del método de O'TOOLE y KOLTER:

- Se preparó 6 blancos, que contenían caldo Sabouraud sin muestras.

- Se acondicionó las cepas clínicas. Se resembró en SDB (caldo sabouraud), el cual fue estandarizado 0,5 en la escala de Mc Farland en el turbidímetro de Mc Densi Cheese plus
- Brevemente, se pre-trató las placas con FBS (suero bovino fetal) al 50% en SDB a 37 °C durante 30 minutos y se lavó con PBS 10 M (PH 7,2) dos veces.
- A continuación, una suspensión de células levaduriformes en SDB, se sembró en placas y se incubaron a 37°C durante 48 horas sin agitación para permitir la adherencia a las células en la superficie (200ul).
- Después de la incubación, las células no adheridas se eliminaron lavando los pocillos con PBS estéril.
- A continuación, las placas se secaron al aire durante 24 h antes de la tinción con violeta de genciana CV (cristal violeta 1% p/v).
- Las biopelículas adherentes se lavaron con agua para eliminar tinte sin unir.
- Finalmente, el CV se extrajo con la solución de blanqueo (0,2 ml): etanol – acetona.⁽⁵³⁾

Figura N° 23 Prueba de Biopelículas en cepas de *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio

Interpretación de los resultados: La interpretación de los resultados requiere definir un punto de corte que separe a las cepas no formadoras de Biopelículas de aquellas que sí son formadoras.

Para medir la capacidad de formación, la densidad óptica (DO) se determinó a 630 nm utilizando un lector de microplacas. La DO media de la cepa se

comparó con la DO_b media de los pocillos blancos, tanto reportados como medias +/- desviaciones estándar. Las cepas fueron clasificadas. Según su capacidad para formar biopelículas siguiendo estos criterios: $OD \leq OD_b$ = no productor de biopelículas; $OD_b < OD < (2 \times OD_b)$ = productor de biofilm. ⁽⁵³⁾

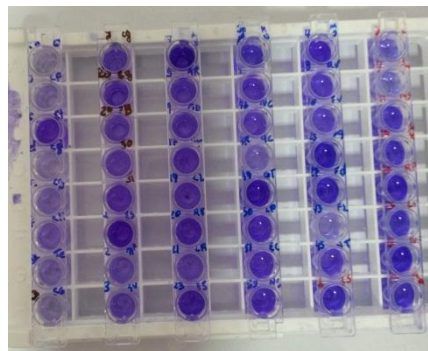
Figura N° 24 Lectura de la prueba de biopelículas en cepas de *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio

Capacidad de adherencia: Las muestras fueron colocadas en placas de cultivo celular de 92 pozos con 200 ul de la suspensión de *Cándida spp*. Se incubaron durante los siguientes tiempos: 24 horas a 37 °C. Transcurridos estos tiempos las muestras se lavaron con PBS, se tiñeron con azul de metileno y se hizo la lectura en el espectro de 630 nm. En la interpretación se consideró la lectura de los blancos. ⁽⁵³⁾

Figura N° 25 Prueba de adherencia en cepas de *Cándida spp*



Fuente: Registros de Laboratorio

Dimorfismo: Se identificó mediante el microcultivo, el cual nos permitió la observación e identificación de las estructuras microscópicas de hongos filamentosos que se distinguieron con facilidad sin distorsión, alteración o rompimiento de las mismas. Esto pasa cuando el hongo se desarrolla directamente bajo el portaobjeto. ⁽⁵⁴⁾

Pasos:

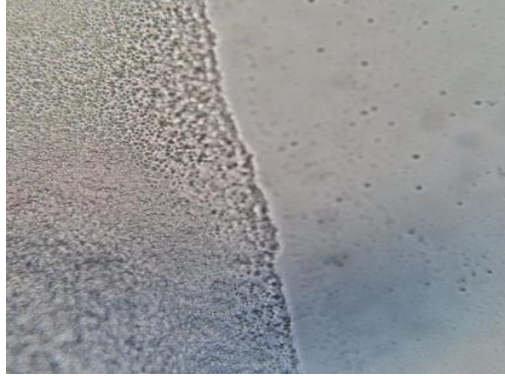
- Se utilizó una caja Petri de vidrio y se cubrió el fondo con un círculo de papel de filtro.
- Se ubicó una varilla de vidrio en forma de V sobre el papel de filtro.
- Se puso portaobjetos sobre la varilla de vidrio y se tapó la placa.
- Para luego cortar con un sacabocados de 6-9 mm de diámetro, un bloque de agar leche con TWEN 80% de una placa Petri. Transferir cada uno, a un extremo del portaobjetos, de las cepas en estudio, se inoculó con un ansa cada bloque de agar, en dos lados opuestos.
- Se puso un cubre objetos previamente flameado, sobre el bloque de agar inoculado.
- Se agregó de 2 a 3 ml de agua estéril en el fondo de la placa, para mantener el cultivo en una cámara húmeda.
- Finalmente se incubó a 28° C durante 24 -48 hr.
- Se observó la morfología en microscopio óptico. ⁽⁵⁵⁾

Figura N° 26 Siembra de las colonias obtenidas del Sabouraud en Agar leche con Tween 80



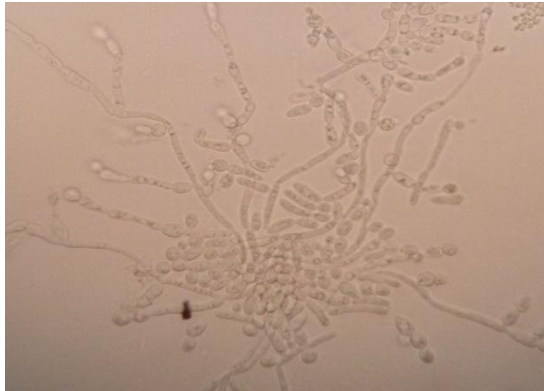
Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 27 Microcultivo de *C. glabrata* visto al microscopio



Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 28 Microcultivo de *C. albicans* visto al microscopio



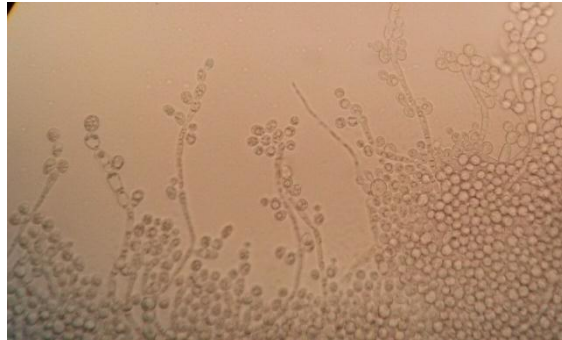
Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 29 Microcultivo de *C. tropicalis* visto al microscopio



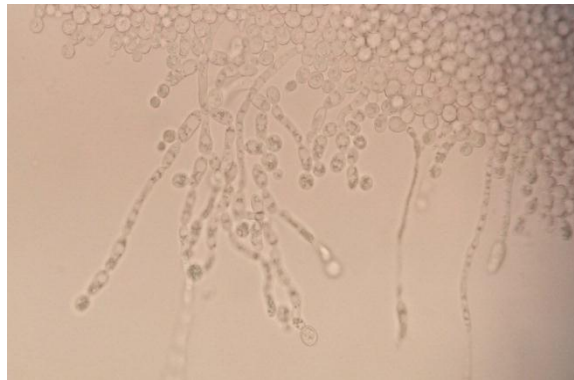
Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 30 Microcultivo de *C. krusei* visto al microscopio



Fuente: Registros de Laboratorio

Figura N° 31 Microcultivo de *C. parapsilosis* visto al microscopio



Fuente: Registros de Laboratorio

3.6.3. Descripción de los instrumentos de recojo de información.

Se hizo uso de Registros de Laboratorio para recoger los datos personales de los hospederos, así como de los resultados de los factores de virulencia y resistencia de la *Cándida spp* a fluconazol.

3.6.4. Métodos para el control de calidad de los datos

Se empleó cepas ATCC; de *C albicans*, *C parapsilosis*, *C glabrata* y *C krusei*. Las cuales se obtuvieron del banco de cepas de la Universidad de Buenos Aires (UBA) Facultad de Medicina, con las cuales se realizaron las corridas de las muestras laboratoriales descritas con anterioridad.

3.6.5. Consentimiento Informado y normas bioéticas

En los estudios realizados se pidió el consentimiento informado de los residentes, y de la madre superiora tutora de los Hogares de acogida, y se guardó la adecuada confidencialidad de la información obtenida. El protocolo de recogida de datos fue archivado, y a cada residente se le asignó un código de tal modo que no pueda relacionarse la muestra e información obtenida con la identidad del sujeto.

3.7. Fijación de límites: Espacio y tiempo

3.7.1 Espacio:

La presente investigación se realizó en los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”, la ejecución de las pruebas laboratoriales se realizó en la Facultad de Ciencias de Enfermería y Obstetricia.

3.7.2. Tiempo

La investigación se llevó a cabo entre los meses de agosto de 2017 a junio de 2018.

3.8. Plan de análisis de los datos

Se obtuvo la base de datos, a partir de los cuales se empleó programas estadísticos como el Epidat 3.1. Se relacionó resistencia del fluconazol con los factores de virulencia como formación de biopelículas, adherencia, dimorfismo, hemólisis y DNAasa.

Procedimientos que garantizan aspectos éticos de la investigación.

Se mantuvo la confidencialidad de los datos obtenidos y no se divulgaron los nombres/apellidos de los residentes de los hogares en estudio.

CAPÍTULO IV RESULTADOS DE LA INVESTIGACION

4.1 Resultados descriptivos

Tabla N° 1

Prevalencia de portadores de *Cándida spp.* en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017

<i>Cándida spp</i>	N	%
Presencia	86	65.00
Ausencia	46	35.00
Total	132	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

La prevalencia de portadores de *Cándida spp* es del 65 % en los hogares de acogida “25 de Mayo” y “Santa Rita”.

Tabla N° 2

Cepas de *Cándida spp.* aisladas de los tejidos bucales de los residentes de los “ 25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017

<i>Cándida spp</i>	N	%
<i>C. albicans</i>	36	42.00
<i>C. glabrata</i>	31	36.00
<i>C. tropicalis</i>	4	5.00
<i>C. parapsilosis</i>	9	10.00
<i>C. krusei</i>	4	5.00
Otras	2	2.00
Total	86	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

La cepa de mayor frecuencia que coloniza a los residentes de hogares de acogida es la *C. albicans* en un 42 %.

Tabla N° 3

Resistencia de *Cándida spp* al fluconazol, en residentes portadores de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017

Susceptibilidad	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicales</i>		Otros		total	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Resistencia	5	14.00	31	100.00	2	22.00	4	100.00	3	75.00	0	0.00	45	52.00
Sensible	31	86.00	0	0.00	7	78.00	0	0.00	1	25.00	2	100.00	41	48.00
Total	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00

*otras *C. lusitania* y *C. guilliermondi*

Fuente: Registros de laboratorio

Las cepas de *Cándida spp* presentaron una resistencia al fluconazol del 52%. Se observó que la *C. glabrata* y *C. krusei* son las especies con mayor resistencia y *C. albicans* sensible a fluconazol.

Tabla N° 4

**Cepas de *Cándida spp* formadoras de biopelículas aisladas de residentes
de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017**

Biopelículas	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		Otros		totales	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Formadoras	26	72.00	28	90.00	5	56.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	69	80.00
No formadoras	10	28.00	3	10.00	4	44.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	17	20.00
Total	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

Las cepas de *Cándida spp* formadoras de biopelículas correspondieron al 80%. De las cuales todas las cepas de *C. krusei* y *C. tropicalis*. son formadoras de biopelículas seguida de *C. glabrata* y *C. albicans*.

Tabla Nº 5

Adherencia a las 24 horas. de las cepas de *Cándida spp.* en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017

Adherencia	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		Otros		tot ale s	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Adherente	14	39.00	16	52.00	3	33.00	3	75.00	4	100.00	2	100.00	42	49.00
No adherente	22	61.00	15	48.00	6	67.00	1	25.00	0	0.00	0	0.00	44	51.00
Total	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

La adherencia de cepas *Cándida spp* correspondió al 49%. De las cuales, la *C. tropicalis* es la especie con mayor frecuencia para adherencia a las 24 horas, seguida de *C krusei*.

Tabla Nº 6

**Dimorfismo de las cepas de *Cándida spp.* en los residentes de los hogares
“25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017**

Dimorfismo	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		Otros		totales	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Positivo	30	83.00	2	6.00	9	100.00	3	75.00	4	100.00	0	0.00	48	56.00
Negativo	6	17.00	29	94.00	0	0.00	1	25.00	0	0.00	2	100.00	38	44.00
Total	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

Se identificó un 56% de dimorfismo en las cepas de *Candida spp.* de las cuales la *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* suelen presentar el factor de dimorfismo.

Tabla N° 7

**Hemólisis de las cepas de *Cándida spp.* en los residentes de los hogares
“25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017**

Hemolisis	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		Otros		Totales	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Positivo	35	97.00	24	77.00	8	89.00	2	50.00	4	100.00	2	100.00	75	87.00
Negativo	1	3.00	7	23.00	1	11.00	2	50.00	0	0.00	0	0.00	11	13.00
Total	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

El 87 % de cepas de *Cándida spp.* son productoras de hemólisis, de las cuales la *C. albicans* y *C. tropicalis* son las especies que expresaron mayor frecuencia en la expresión fenotípica de este factor.

Tabla Nº 8

**DNAsa de las cepas de *Cándida spp.* en los residentes de los hogares
“25 de Mayo” y “Santa Rita”. 2017**

DNAsa	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		Otros		to tal	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Positivo	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Negativo	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00
Total	36	100.00	31	100.00	9	100.00	4	100.00	4	100.00	2	100.00	86	100.00

Fuente: Registros de laboratorio

Se observó que todas las especies de *Cándida spp* que colonizan los tejidos bucales de los residentes no son productoras de las desoxirribonucleasas.

4.2 Resultados analíticos

Tabla Nº 9

Estudio de asociación entre Resistencia al fluconazol de *Cándida spp* y formación de biopelículas.

Biopelículas	Resistencia al fluconazol		Total
	Resistente	Sensible	
(Expuesto)	40	29	69
(No expuesto)	5	12	17
Total	45	41	86

Biopelículas	Prev.	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	Prueba asociación	Valor p
				Chi cuadrado	
(Expuesto)	0,579710	3,310345	1,050728- 10,429320	4,4596	0,0347
(No expuesto)	0,294118				

Se observó asociación entre resistencia a Fluconazol y biopelículas ya que se obtuvo un Chi cuadrado de 4,45 con un p -valor de 0,03. Al obtener un Odds Ratio de 3,31 (IC95 1,05 a 10,42), con lo cual la formación de biopelículas es un factor de riesgo en aquellos residentes portadores de *Cándida spp*. Por lo tanto, el estar colonizados por cepas formadoras de biopelículas tienen un factor de riesgo entre 3 veces más de desarrollar resistencia al fluconazol.

La tendencia de la población en estudio está asociada a la formación de biopelículas debido a que la mayoría de los expuestos (69) utilizan prótesis dental y poseen hábitos higiénicos deficientes, en relación a los no expuestos (17).

Tabla N° 10

Estudio de asociación entre resistencia al fluconazol de *Cándida spp* y adherencias a las 24 horas.

Adherencia	Resistencia al fluconazol		Total
	Resistente	Sensible	
(Expuesto)	27	13	40
(No expuesto)	18	28	46
Total	45	41	86

Adherencia	Prev.	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	Prueba asociación	Valor p
				Chi cuadrado	
(Expuesto)	0,675	3,230769	1,329511-7,850909	6,9028	0,008
(No expuesto)	0,391				

Se observó asociación entre resistencia a Fluconazol y adherencia ya que se obtiene un Chi cuadrado de 6.90 con un p -valor de 0,008. Al obtener un Odds Ratio de 3,23 (IC95 1,32 a 7,85), con lo cual la adherencia es un factor de riesgo en aquellos residentes portadores de *Cándida spp*. Por lo tanto, el estar colonizados por cepas adherente a las 24 horas tienen un factor de riesgo entre 3 veces más de desarrollar resistencia al fluconazol.

Cuadro Nº 11

Estudio de asociación entre resistencia al fluconazol de *Cándida spp* y dimorfismo.

Dimorfismo	Resistencia al fluconazol		Total
	Enfermo	Sano	
(Expuesto)	12	36	48
(No expuesto)	33	5	38
Total	45	41	86

Dimorfismo	Prev.	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%	Prueba asociación	Valor p
				Chi cuadrado	
(Expuesto)	0,266667	0,050505	0,016068- 0,158744	32,5159	0,000
(No expuesto)	0,874049				

No se observa asociación entre resistencia al fluconazol y dimorfismo a pesar que se obtuvo un Chi cuadrado de 32,51 con un p -valor de 0,000. El Odds Ratio de 0,05 (IC95 0,016 a 0,15), al tomar la unidad no existe asociación entre ambas variables.

4.3 DISCUSIÓN

La candidiasis oral es una infección oportunista de hongos en la cavidad oral, se destaca la importancia de los factores de virulencia del agente causal, en el desarrollo de la candidiasis oral; la clínica se presenta como superficies blancas cremosas en la lengua, mejillas internas a veces en el techo de la boca y encías, que se desprenden al raspar. Este tipo de enfermedad afecta a ambos sexos y diferentes edades, aunque son más frecuentes en las edades extremas de la vida. La incidencia de cepas resistentes invasoras ha aumentado en forma importante en las últimas décadas como consecuencia del aumento de poblaciones de mayor riesgo como son las personas de la tercera edad. ⁽³⁸⁾

La **prevalencia de candidiasis oral** en portadores de *Cándida spp* de los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita” correspondió al 65%, en comparación a los resultados señalados por los autores Atalaya Reina y Morales Luz en un estudio realizado en pacientes de la tercera edad que asistieron a consulta médica al “hospital Jaime Mendoza” de la ciudad de Sucre en el año 2009, correspondió a 61 %. Ello podría deberse a que los adultos mayores tienen un sistema inmunodeficiente, son portadores de prótesis dental, algunos adultos mayores son diabéticos, tienen desnutrición y tienen una mala higiene bucal. ⁽³⁸⁾

La colonización de levaduras en cavidad oral de los residentes correspondió a las **especies** de *C. albicans* 42%, *C. glabrata* 36%, *C. parapsilosis* 10%, *C. tropicalis* 5%, *C. krusei* 5% y otras especies de *Cándida spp* 2%. con respecto a otros estudios de “Frecuencia de portadores de *Cándida spp* en cavidad oral de pacientes diabéticos de Medellín” realizado en el año 2012 en Colombia, en el cual se aislaron las siguientes especies *C. albicans* 95.4%, *C. guilliermondii* 2.3% y *C. parapsilosis* 2.3%.⁴⁶ Y el “Estudio comparativo in vitro de la actividad antimicótica del extracto acuoso de ajo morado y el fluconazol frente a cepas de *Cándida spp* aisladas de la cavidad bucal de adultos mayores del hogar Mercedes” realizado en la ciudad de Sucre el 2015, en el cual se aislaron las siguientes especies *C. albicans* 39%, *C. tropicalis* 21,7%, *C. glabrata* 21,7%, *C. parapsilosis* 8,8% y *C. krusei* 8,8%. ⁽²¹⁾ La frecuencia de colonización de *C.*

albicans según menciona ShanNg, T. et se debería a los sensores SNF3 (Sucrose Non Fermeting 3) es una proteína de membrana que rige la concentración de glucosa y la virulencia de la levadura favoreciendo la supervivencia de la levadura en interacción competitiva frente a otras especies.⁴⁶ Sin embargo, la población de adultos mayores incluidos en este estudio, es similar porque la *Cándida albicans* es de mayor frecuencia seguido de *Cándida glabrata* a diferencia de los anteriores estudios.⁽⁵⁶⁾

En el presente estudio se detectò un 52% (45) de **resistencia al fluconazol** en relación al estudio de Gutierrez et al 2016, cuya resistencia en cepas de cavidad oral en paciente VIH positivos fue del 20,8%, resistentes.⁽⁵⁷⁾ Otro estudio realizado por Barrios FG en la ciudad de Sucre el año 2015 reporto una resistencia del 13%.⁽²¹⁾ El valor elevado de resistencia observado se debería a la formación de biopelículas en el que se activan los genes de resistencia a fluconazol relacionados durante la desmetilación de la enzima 14 alfa desmetilasa durante el metabolismo del ergosterol en la membrana de la célula levaduriforme. Por otro lado la *C. glabrata* frecuentemente coloniza la cavidad oral de los adultos mayores, la cual presenta resistencia al fluconazol, siendo este el motivo el valor elevado de resistencia en este estudio.⁽⁵⁷⁾

La **expresión fenotípica de resistencia** que evidencian cepas clínicas colonizadoras de tejidos bucales están relacionadas con mutaciones en los genes que codifican para la síntesis de ergosterol de la membrana plasmática relacionados con el gen MDR(resistencia a fluconazol), o bien con la sobreexpresión de genes que codifican para bombas de expulsión de fármacos fuera del microorganismo (ATP-binding cassette ABC) y facilitadores mayores (MF), según describe Ibrahim et al. y Lopez, et al.⁽⁵⁶⁾

Los azoles son fungistáticos que actúan en especies de *Cándida spp.*, específicamente, en la 1,4 alfa-demetilasa, que es codificada por ERG1 y su mecanismo es bloquear la biosíntesis del ergosterol, lo que ocasiona la eliminación de este esteroide en las membranas generando acumulación de intermediarios tóxicos que inhiben el crecimiento del hongo.⁽⁵⁶⁾

Los mecanismos primarios que llevan a la resistencia a los azoles de *C. albicans* dependen del aumento del eflujo de los antibióticos, mediados por las bombas de eflujo dependientes de ATP, codificados por los genes CDR y los transportadores de la superfamilia de facilitadores mayores.

En relación a los **factores de virulencia** en este estudio la cepas de *Cándida spp* formadoras de biopelículas corresponde al 80%, las cepas adheribles a las 24 horas son 49 %, las cepas que son dimórficas corresponde al 56%, las cepas que produjeron hemólisis positiva son 87 % y el 100% son DNAsa negativos.

Por tanto se observó asociación entre resistencia a Fluconazol y biopelículas ya que se obtiene un Chi cuadrado de 4,45 con un p -valor de 0,03. Al obtener un Odds Ratio de 3,31 (IC95 1,05 a 10,42), con lo cual la formación de biopelículas es un factor de riesgo en aquellos residentes portadores de *Candida spp*. Por lo tanto, el estar colonizados por cepas formadoras de biopelículas tienen un factor de riesgo entre 3 veces más de desarrollar resistencia al fluconazol.

Asimismo se observó asociación entre resistencia a Fluconazol y adherencia con un Chi cuadrado de 6.90 con un p -valor de 0,008. Al obtener un Odds Ratio de 3,23 (IC95 1,32 a 7,85), con lo cual la adherencia es un factor de riesgo en aquellos residentes portadores de *Candida spp*. Por lo tanto, el estar colonizados por cepas adherente a las 24 horas tienen un factor de riesgo entre 3 veces más de desarrollar resistencia al fluconazol.

La formación de biopelículas de *Cándida spp* tiene un proceso, se inicia con la adherencia de la levadura a la superficie tisular y las biopelículas, se forman como etapa temprana (8-11 horas), intermedia (12-30 horas) y madura (38-72 horas). En el lapso de 38 a 72 horas se forma una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, recubiertas por una matriz extracelular y frecuentemente asociada con bacterias. La producción de la matriz extracelular aumenta con la edad de la biopelícula, su composición varía; en *C. albicans*, el azúcar principal es glucosa, en *C. tropicalis* es hexosamina, lo que explica que esta composición sea la causa de una penetración diferente de los antifúngicos, por lo que resulta más lenta la difusión de 5-fluorocitosina y del fluconazol en las

biopelículas de *C. tropicalis* y *C.parapsilosis*. Uno de los principales componentes en *C. albicans* es el beta 1,3-glucano, que tiene la capacidad de secuestrar a los azoles y les confiere resistencia en las biopelículas. ⁽⁵⁶⁾

Las características para la adquisición de estos mecanismos, son el intercambio genético de biopelícula mediado por ADN extracelular y aunque se detectó ADN extracelular en biopelícula de *C albicans*, el mecanismo principal de intercambio implica apareamiento y fusión celular (a/a o a/a) con fenotipo de colonias blancas a opacas por la liberación de feromonas, que inducen una respuesta de apareamiento y ocasionan un fenotipo adhesivo. Los factores transcripcionales que regulan la formación de biopelícula, son Bcr 1, que es requerido por *C. parapsilosis*, y factor Ace 2 para *C. albicans*. Estos factores son necesarios para la adherencia y formación de hifas. El factor Egf1 es un regulador de la expresión de proteínas de superficie y también participa en la formación de hifas. En *C. albicans* y *C. dubliniensis* poseen dos tipos diferentes de bombas de eflujo: transportadores casete de unión de adenosín-trifosfato, codificados por los genes CDR (CDR1 y CDR2), y los facilitadores mayores, codificados por los genes MDR, se expresan durante el crecimiento como biopelícula. La producción de matriz extracelular es un componente esencial para la maduración de una biopelícula, por lo que se requiere la síntesis del beta glucano, que depende de la enzima b-(1,3) d-glucano sintetasa, que en su estructura tiene dos subunidades: Rho1p y Fskp, con funciones catalítica y reguladora. ⁽⁵⁶⁾

4.4 CONCLUSIONES

Se determinó que la colonización de *Cándida spp* de los tejidos bucales en los residentes de los hogares “25 de Mayo” y “Santa Rita” correspondió a un 65%.

La prevalencia de resistencia de *Cándida spp* a fluconazol correspondió a un 52% y las especies frecuentes son la *C. glabrata* y *C. krusei*.

Se identificó a la *C. krusei* y *C. tropicalis* son las especies que mayoritariamente forman biopelículas a las 48 horas, la *C. tropicalis* se adhirió a las 24 horas; *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son las especies que presentaron dimorfismo y hemólisis.

La resistencia de la ***Cándida spp*** aislada de los tejidos bucales se asocia a la formación de biopelículas y adherencia a las 24 horas con un valor de $p < 0.05$ siendo estadísticamente significativo.

4.5 RECOMENDACIONES

Identificar los genes que codifican las proteínas adhesinas y de resistencia en pacientes con candidiasis oral según especie.

Se sugiere realizar estudios de las enzimas hidrolíticas como el Aspartil proteasa (SAP), fosfolipasas (FL) y verificar si son factores de virulencia asociados a resistencia a fluconazol.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Landaburu MF MMIC. Micología Medica: una vision actual. 1st ed. Buenos Aires: Eudeba; 2016.
2. Quindós AG AJRBOAEBZC. Micologia Clinica. 1st ed. España; 2015.
3. ML. S. Micologia Bases para el Diagnostico Laboratorisl de Micosis. 1st ed. Sucre; 2010.
4. GR. A. Micologia Médica Ilustrada. 2nd ed. México: McGraw Hill; 2004.
5. Castrillon Rivera LE PRAPDC. Factores de virulencia en Cándida spp. [Online].; 2005 [cited 2017 Diciembre 15. Available from: <https://es.slideshare.net/iltaitDes/articulo-de-divulgacin-cientfica-factores-de-virulencia-en-candida-sp>.
6. De Bedout C GB. Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. [Online].; 2010 [cited 2017 Junio 20. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a08.pdf>.
7. Ibáñez Mancera NG RBCAY. Frecuencia de candidiasis oral asociada al uso de prótesis dentales en pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad Anáhuac Norte. [Online].; 2017 [cited 2018 Noviembre 10. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2017/od172e.pdf>.
8. Beiro Fuentes R VGIVGMOPJ. Fcatores predisponentes locales de laa candidiasis. [Online].; 2002 [cited 2017 Octubre 10. Available from: <http://www.mgyfsemg.org/medicinageneral/enero2002/24-27.pdf>.
9. Papone Yorio V MG. Prevalencia de Candida spp en la cavidad oral de una población de adultos mayores en Uruguay. [Online].; 2009 [cited 2018 Enero 29. Available from: <http://revistas.ucu.edu.uy/index.php/actasodontologicas/article/view/1084>.

10. Cortez LI V MJMUJMUMCFO. Frecuencia de candidosis oral en portadores de prótesis dental Aspectos clínicos y epidemiológicos. [Online].; 2005 [cited 2018 Enero 7. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2005/dcm052c.pdf>.
11. Mitchell KF THCMRESHAD. Papel de la matriz beta 1,3 glucano en la resistencia antimicótica de candida no albicans.. [Online].; 2012 [cited 2018 junio 25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623361/>.
12. MR. RD. Estomatitis subprótesis, prevalencia de candidiasis oral y comparación de su resolución con o sin el empleo de antimicóticos. [Online].; 2014 [cited 2017 Septiembre 15. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/46968/1/46454405.%202014.pdf>.
13. S MM. Filamentación y actividad proteolítica como pruebas rápidas para la identificación del género *Cándida* spp. de infecciones nosocomiales. [Internet]. México: Universidad Autónoma del Estado de México Facultad de Química. [Online].; 2014 [cited 2017 Octubre 17. Available from: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14985/420046.pdf;jseccionid=45F99B572DEB593DC7857B0523D7892A?sequence=2>.
14. Castaño I CBDLPA. Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. [Online].; 2006 [cited 2018 Noviembre 20. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062c.pdf>.
15. H. GQC. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. [Online].; 2010 [cited 2018 Diciembre 20. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922010000600009.
16. S. CQ. Genoma de *Cándida albicans* y resistencia a las drogas. [Online].; 2017 [cited 2018 Diembre 28. Available from: https://www.researchgate.net/publication/316062735_Genoma_de_Candi

da_albicans_y_resistencia_a_las_drogas.

17. Wikipedia. Candidiasis. [Online]. [cited 2018 Diciembre 30. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans.
18. M. DB. Candidiasis. [Online]. [cited 2017 Octubre 20. Available from: https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf.
19. D. OB. Presencia de Candida albicans y su relacion con los valores de CD4+ en pacientes con infeccion por VIH. [Online].; 1995 [cited 2018 Junio 15. Available from: <https://hera.ugr.es/tesisugr/16448704.pdf>.
20. Pérez Caffarena M COLCNJ. Candidiasis Bucal. [Online].; 2004 [cited 2018 Noviembre 6. Available from: [file:///C:/Users/Gladys%20Barrios/Downloads/903-1-3496-1-10-20160222%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Gladys%20Barrios/Downloads/903-1-3496-1-10-20160222%20(1).pdf).
21. FG B. ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE AJO MORADO Y EL FLUCONAZOL FRENTE A CEPAS DE Cándida spp AISLADAS DE LA CAVIDAD BUCAL DE ADULTOS MAYORES DEL HOGAR MERCEDES. SUCRE 2015. Tesis. Sucre: Facultad De Ciencias Químico- Farmacéutico Y Bioquímicos, Chuquisaca; 2015.
22. Pereira DV. Candidiasis bucal. [Online].; 2018 [cited 2018 Diembre 30. Available from: <https://www.propdental.es/blog/odontologia/candidiasis/>.
23. clinic M. Candidiasis oral. [Online].; 2018 [cited 2018 Diciembre 29. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/oral-thrush/symptoms-causes/syc-20353533>.
24. B. DRV. Candidiasis oral o muguet. [Online].; 2010 [cited 2018 Junio 16. Available from: <https://www.hola.com/salud/enciclopedia-salud/2010031045111/enfermedades-infecciosas/principales/candidiasis->

oral-o-muguet/.

25. Philip DM MV. Microbiología Oral. 5th ed. Venezuela.; 2011.
26. ME FR. Estudio de la formación de la biopelícula de *Candida* spp y evaluación de nuevas combinaciones farmacológicas. [Online]. pamplona; 2017 [cited 2018 Diciembre 15. Available from: https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/43758/1/Tesis_FernandezRivero.pdf.
27. AC. GG. Etioepidemiología y factores de virulencia en *Candida* spp. aisladas de hemocultivos. [Online].; 2014 [cited 2018 Mayo 24. Available from: http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/1684/TDUEX_2014_Blanco_Blanco.pdf?sequence=1.
28. Rogelio de J TRGJGGGG. *Candida* parapsilosis, una amenaza desafiante. [Online].; 2012 [cited 2017 Diciembre 15. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-universitaria-304-articulo-candida-parapsilosis-una-amenaza-desafiante-X1665579612676659>.
29. *Candida glabrata*. [Online]. [cited 2018 noviembre 20. Available from: <https://candidiasisweb.com/que-es/candida-glabrata.php>.
30. Bezerra de Melo RE MRAPSP. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. [Online].; 2015 [cited 2017 Noviembre 22. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/cebc/>.
31. Montoya Ojeda RI SAP. Identificación molecular y evaluación de la susceptibilidad a fluconazol en *Candida* spp. colonizante en pie de pacientes diabéticos de un grupo de promoción de la salud del municipio de turbaco-Bolívar. [Online].; 2014 [cited 2018 julio 20. Available from: <http://190.242.62.234:8080/jspui/bitstream/11227/3949/1/Informe%20final%20de%20tesis.pdf>.

32. Gómez Biomédicas AC LDMHMC. Etioepidemiología y factores de virulencia en *Candida* spp aisladas de hemocultivos. [Online].; 2014 [cited 2018 octubre 20. Available from:
http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/1684/TDUEX_2014_Blanco_Blanco.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
33. Menezes RP BdMRAPSP. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. Revista Iberoamericana de Micología. [Online].; 2015 [cited 2017 noviembre 22. Available from:
<https://pdfs.semanticscholar.org/cebc/f504cc9>.
34. Castrillón RL PRPD. Factores de virulencia en *Cándida* spp. [Online].; 2005 [cited 2017 diciembre 15. Available from:
<https://es.slideshare.net/iltaitDes/articulo-de-divulgacin-cientfica-factores-de-virulencia-en-candida-sp>.
35. MV. E. Candidiasis. [Online].; 2013 [cited 2017 julio 14. Available from:
<https://es.slideshare.net/CamiloBeleo/candidiasis-24817505>.
36. Agar. BDt. Instrucciones de uso medios en placas.. [Online].; 2003 [cited 2017 diciembre 2. Available from:
<http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255506.pdf>.
37. GC P. Candidiasis oral. [Online].; 2013 [cited 2017 noviembre 1. Available from: <https://es.slideshare.net/crisppg/candidiasis-oral-patologa>.
38. Atalaya R ML. Prevalencia de candidiasis bucal en pacientes de la tercera edad que asisten a consulta médica al “hospital Jaime Mendoza” sucre, enero - agosto del 2009. [Online].; 2009 [cited 2018 Enero 12. Available from:
http://www.ecorfan.org/bolivia/series/Topicos%20Selectos%20de%20Quimica_I/Articulo%207.pdf.

39. Giusiano G PECMe1eA, 2016. a. Hongos oportunistas levaduriformes y filamentosos comunes en clínica. 1st ed. Argentina; 2016.
40. Linares Sicilia MJ SCF. Identificación de levaduras. [Online].; 2007 [cited 2019 enero 15. Available from:
<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>.
41. T. S. Técnica de microcultivo. [Online].; 2017 [cited 2018 diciembre 12. Available from: <https://es.scribd.com/document/357238180/Tecnicas-de-Microcultivo>.
42. Wikipedia. Fluconazol. [Online]. [cited 2018 Diciembre 20. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Fluconazol>.
43. MA FS. Estudio de susceptibilidad y mecanismos de resistencia a antifúngicos en *Candida albicans* de aislados clínicos chileno. [Online].; 2014 [cited 2018 octubre 12. Available from:
<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/138500/Estudio-de-susceptibilidad-y-mecanismos-de-resistencia-a-antifungicos-en-Candida-albicans-de-aislados-clinicos-chilenos.pdf?sequence=1>.
44. oral. C. [Online]. [cited 2018 Enero 20. Available from:
https://www.allinahealth.org/mdex_sp/SD2315G.HTM.
45. infectología. Rcd. Antifungicos y resistencia.. [Online]. [cited 2018 Enero 15. Available from:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000300020.
46. Adherencia. [Online]. [cited 2018 Enero 15. Available from:
<http://www.wordreference.com/definicion/adherencia>.
47. Wikipedia. [Online].; Hemolisis. [cited 2018 Enero 20. Available from:
<https://es.wikipedia.org/wiki/Hem%C3%B3lisis>.

48. medico. D. Desoxirribonucleasa o DNasa. [Online]. [cited 2018 enero 20]. Available from: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/desoxirribonucleasa-dnasa>.
49. Agar Sabouraud Glucosado. [Online]. [cited 2018 Enero 15. Available from: <https://es.scribd.com/document/288795638/Agar-Sabouraud-Glucosado>.
50. BBLTM CHROMagarTM Candida Medium. [Online]. [cited 2018 Enero 7. Available from: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8810>.
51. salud. Mdsind. Manual de procedimientos y tecnicas de laboratorio para la identificacion de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. [Online].; 2007 [cited 2018 junio 15. Available from: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Hongos.pdf>.
52. Microbiología general y bucal. [Online]. [cited 2018 Junio 15. Available from: http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html.
53. De los Santos VA HaECSPMAL. 1074 Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en cepas de Salmonella aisladas de nopal, agua y suelo. Revista mexicana de Ciencias agrícolas. 2012 diciembre; 3(6).
54. hongos. AMd. [Online]. [cited 2018 Enero 15. Available from: https://www.academia.edu/21781951/Microcultivo_de_hongos.
55. Dr Negroni R GL. Manual de procedimiento para laboratorios de micología médica Buenos Aires: Federación Bioquímica de la provincia de Buenos Aires.; 1999.

56. Duque CM CERJBJHO. Frecuencia de portadores de *Cándida* spp en cavidad oral de pacientes diabéticos de Medellín. [Online]. [cited 2019 Enero 10. Available from: <http://docplayer.es/71504862-Frecuencia-de-portadores-de-candida-sp-en-cavidad-oral-de-pacientes-diabeticos-de-medellin.html>].
57. López AK RKLCAJ. Mecanismos de resistencia antifungica de los azoles en *Cándida albicans* ; 2016.

ANEXOS

Consentimiento informado

El propósito de esta ficha de consentimiento es proveer a los participantes en esta investigación con una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La presente investigación es conducida por _____, de la Universidad _____ . La meta de este estudio es _____

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus datos serán codificados usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

Desde ya le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación, conducida por _____. He sido informado (a) de que la meta de este estudio es _____

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido. Para esto, puedo contactar a _____ al teléfono anteriormente mencionado.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

(en letras de imprenta)

Código	ESPECIE	Fluconazol	Dimorfismo	Biopelículas	Adherencia	Hemolisis	DNAsa
1	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
2	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
3	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
4	<i>Cándida parapsilosis</i>	S	P	F	A	P	N
5	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
6	<i>Cándida parapsilosis</i>	R	P	NF	NA	P	N
7	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
8	<i>Cándida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
9	<i>Cándida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
10	<i>Cándida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
11	<i>Cándida albicans</i>	R	P	F	A	P	N
12	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	NF	NA	P	N
13	OTRAS	S	N	F	NA	P	N
14	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	NF	NA	P	N
15	<i>Cándida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
16	<i>Cándida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
17	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
18	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
19	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
20	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
21	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
22	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
23	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
24	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
25	<i>Candida parapsilosis</i>	S	P	F	A	P	N
26	<i>Candida parapsilosis</i>	S	P	NF	NA	P	N
27	<i>Candida krusei</i>	R	P	F	NA	P	N
28	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
29	<i>Candida parapsilosis</i>	S	P	F	NA	P	N
30	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
31	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
32	OTRAS	S	N	F	NA	P	N

33	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
34	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
35	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
36	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
37	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
38	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
39	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
40	<i>Candida parapsilosis</i>	S	P	NF	NA	P	N
41	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
42	<i>Candida parapsilosis</i>	S	P	NF	NA	P	N
43	<i>Candida parapsilosis</i>	S	P	F	NA	P	N
44	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
45	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
46	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
47	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
48	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
49	<i>Candida tropicalis</i>	S	P	F	A	P	N
50	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	NA	P	N
51	<i>Candida albicans</i>	R	P	F	A	P	N
52	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
53	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
54	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
55	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
56	<i>Candida glabrata</i>	R	N	NF	NA	P	N
57	<i>Candida glabrata?</i>	R	P	F	NA	P	N
58	<i>Candida glabrata?</i>	R	N	F	A	N	N
59	<i>Candida krusei</i>	R	N	F	A	N	N
60	<i>Candida parapsilosis</i>	R	P	F	A	N	N
61	<i>Candida krusei</i>	R	P	F	A	N	N
62	<i>Candida glabrata</i>	R	P	F	A	N	N
63	<i>Candida krusei</i>	R	P	F	A	P	N
64	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	N	N
65	<i>Candida albicans</i>	S	N	F	A	P	N

66	<i>Candida albicans</i>	S	P	NF	NA	P	N
67	<i>Candida albicans</i>	R	N	NF	NA	P	N
68	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	N	N
69	<i>Candida glabrata?</i>	R	N	F	A	P	N
70	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
71	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N
72	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
73	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
74	<i>Candida albicans</i>	S	N	F	A	P	N
75	<i>Candida albicans</i>	S	N	F	A	P	N
76	<i>Candida tropicalis</i>	R	P	F	A	P	N
77	<i>Candida albicans</i>	R	N	F	A	P	N
78	<i>Candida albicans</i>	S	P	F	A	P	N
79	<i>Candida tropicaliis</i>	R	P	F	A	P	N
80	<i>Candida tropicalis</i>	R	P	F	A	P	N
81	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	N	N
82	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	NA	P	N
83	<i>Candida albicans</i>	R	N	F	A	N	N
84	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	N	N
85	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	N	N
86	<i>Candida glabrata</i>	R	N	F	A	P	N