

**Universidad Nacional del Nordeste**

**Facultad de Medicina**

**Maestría en Micología  
Médica**

**Identificación y evaluación de la sensibilidad a fluconazol de *Candida* spp.  
colonizante y/o asociada a vulvovaginitis en gestantes de una clínica materna  
de la ciudad de Cartagena de Indias.**

**Maestrando**

**Paola Inés Suárez Alvarez**

**Directora**

**Alicia Arechavala**

**Año**

**2015**

*A Beatri y Nacho*

Doy mis más sinceros agradecimientos

A la doctora Alicia Arechavala, por su orientación y solícito apoyo en el desarrollo de mi proyecto y trabajo de tesis

Al doctor Gustavo Giusiano por su atenta guía en el desarrollo del trabajo

A Martha Puello y Gregorio Young por su valiosa colaboración profesional, su incansable apoyo y dedicación

A María de la Vega por su paciente y constante asistencia técnica y sus palabras de ánimo

A la doctora Ana María Bello, por su inconmensurable participación en la toma de muestras y diagnóstico clínico de las pacientes

A Niradiz Reyes Ramos, no sólo por responder mis inquietudes y dudas, si no por sus palabras de aliento.

A Ketty Mendoza, por sus palabras de apoyo y solidaridad

A mis compañeros y docentes de la Maestría por su incondicional apoyo y sus sabias enseñanzas

A la clínica Maternidad Rafael Calvo, por su aval para el desarrollo del presente trabajo

A la Universidad de Cartagena y su Facultad de Medicina por todo el apoyo y colaboración para la realización y ejecución, en el laboratorio de micología y el laboratorio de investigaciones de toda la parte experimental de este trabajo.

A todos los que de una u otra forma hicieron posible este sueño.

## ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
JUSTIFICACIÓN	10
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	43

## RESUMEN

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección común que afecta una gran proporción de mujeres en edad fértil. Se estima que alrededor del 75% de las mujeres sanas han tenido al menos un episodio de CVV en su vida y que un 40-50% han experimentado recurrencias. El desarrollo de la CVV depende de factores relacionados con las cepas de *Candida* y de factores relacionados con el hospedero. La colonización vaginal por *Candida* spp. puede variar del 10 al 17% y esta se incrementa hasta un 35% durante el embarazo. La candidiasis vulvovaginal es una infección de la vagina estrogenizada y el vestíbulo, la cual puede extenderse a los labios menores, los labios mayores y la región intercrural. Los síntomas y signos asociados a la CVV corresponden a prurito, dolor, sensación de quemadura y edema vaginal y vulvar, enrojecimiento, descarga vaginal blanquecina en grumos con aspecto de "leche cortada". En general, el diagnóstico de la CVV involucra una combinación de anamnesis, síntomas y signos clínicos, y la presencia de blastoconidios y/o pseudohifas en fluido vaginal. El comportamiento epidemiológico del género *Candida* en la CVV tiende a ser variable y este dependerá del nivel de estrógenos de la vagina, condiciones de inmunosupresión o de la cronicidad del proceso. Diferentes estudios muestran variaciones con respecto a las especies más frecuentemente aisladas y también en relación con la sensibilidad a los antifúngicos comúnmente usados, lo que justifica la necesidad de conocer el comportamiento epidemiológico de *Candida* spp. como colonizante y asociada a vulvovaginitis en grupos de carácter especial como las mujeres gestantes. El presente trabajo es un estudio descriptivo que se realizó en gestantes que asistieron a la consulta externa ginecológica de una clínica materna de la ciudad de Cartagena de Indias (Colombia). Los datos sociodemográficos y factores de riesgo, así como la sintomatología se consignaron en un formulario diseñado para su recolección. El diagnóstico clínico fue realizado por el médico especialista competente, quién tomó las muestras de

las pacientes. El estudio de laboratorio comprendió el uso del examen directo de los exudados vaginales, mediante preparación en fresco y tinciones diferenciales. Las especies aisladas se identificaron por pruebas fenotípicas y PCR múltiple y se utilizó el método M27-A3 del CLSI por microdilución para evaluación de la sensibilidad al fluconazol. Los resultados revelaron un 71,1% de cultivos positivos para el total de pacientes y a *Candida albicans* como la especie más frecuente, seguida por *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. La colonización por *Candida* se presentó en un 50%, mientras que un 21,1% de la población fue diagnosticada con candidiasis vaginal. Los factores más frecuentes para la colonización estuvieron relacionados con ropa hecha de materiales que generaban calor y para la candidiasis vaginal el uso de lubricantes vaginales. La mayoría de las cepas (93,2%) resultaron sensibles al fluconazol.

## INTRODUCCIÓN

El género *Candida* incluye un grupo de levaduras que forman parte de la microbiota normal humana del tracto digestivo, piel y vagina, dentro del cual varias especies emergen como patógenos oportunistas involucrados en infecciones superficiales y sistémicas. Estas infecciones comprenden candidiasis orofaríngeas, oculares, cutáneas, genitales, esofágicas, gastrointestinales, mucocutánea crónica y diseminadas, especialmente en pacientes con inmunosupresión asociada a trasplante de órgano, quimioterapia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida o edad avanzada, así como en pacientes diabéticos o que reciben terapia antibiótica de amplio espectro [1-8].

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una infección común que afecta a una gran proporción de mujeres en edad fértil [9, 10]. Se estima que alrededor del 75% de las mujeres sanas han tenido al menos un episodio de CVV en su vida y que un 40-50% han experimentado recurrencias [9]. El desarrollo de la CVV depende de factores relacionados con las especies de *Candida* y de factores relacionados con el hospedero [11]. De esta manera el proceso de patogénesis estará relacionado por un lado con los factores de virulencia de la levadura; la adhesinas, el dimorfismo, producción de enzimas hidrolíticas como las proteinasas y los cambios fenotípicos [12-15] y por otra parte con factores predisponentes que determinan, en primer lugar, la colonización por *Candida* spp. y eventualmente la presentación clínica de la enfermedad [11].

Los altos niveles de estrógenos de la vagina serían fundamentales para la colonización [16]. Así se observa que la colonización por *Candida* spp. es menor en las niñas antes de la menarquía y en mujeres postmenopáusicas, quienes

usualmente no sufren de candidiasis vaginal [11]. La colonización vaginal es más alta en mujeres con vaginas con altos niveles de estrógenos, especialmente durante el embarazo, además, las mujeres que están colonizadas por *Candida* spp. tienen un riesgo hasta de un 33% de desarrollar vaginitis después de tratamiento con antibióticos [11, 17]. Un mayor número de mujeres diabéticas están colonizadas frente a mujeres sanas y presentan más frecuentemente candidosis vaginal y fallas en los tratamientos si la glicemia no desciende a los valores normales [11]. Otros factores que se han discutido están relacionados con alteraciones de la biota de *Lactobacillus*, factores genéticos, uso de anticonceptivos, corticosteroides, higiene personal, tipo de ropa, dermatitis atópica y estrés psico-social que puede originar inmunosupresión [9, 11, 18].

El embarazo es un factor predisponente debido a los altos niveles de glucógeno y la alta carga hormonal, por lo que muchas mujeres sufren varias infecciones especialmente en el último trimestre del embarazo [19]. Igualmente la portación de *Candida* spp., que en mujeres no gestantes es del 10 al 17%, aumenta hasta el 35% en el embarazo [20].

En general, se considera que la colonización es el paso previo para la vulvovaginitis siempre que esté presente un factor predisponente, sin embargo, el cambio de colonización a vaginitis no está bien dilucidado [11].

La CVV es una infección de la vagina con altos niveles de estrógeno y el vestíbulo, la cual puede extenderse a los labios menores, los labios mayores y la región intercrural [11]. Los signos asociados a la CVV corresponden a edema vaginal y vulvar, enrojecimiento y descarga vaginal blanquecina en grumos con aspecto de "leche cortada" [18, 21]. Los síntomas incluyen prurito, dolor, sensación de

quemadura, también se puede presentar dispareunia y disuria [11]. Los síntomas y los signos por sí solos no permiten asegurar la causa de la vaginitis, pero usualmente la falta de prurito y de inflamación hacen la CVV menos probable [11]. El diagnóstico de la CVV involucra una combinación de anamnesis, síntomas y signos clínicos, medición del pH y la presencia de levaduras [9, 11].

La observación microscópica del fluido vaginal es fundamental para el diagnóstico correcto [11]. El examen directo puede realizarse con solución salina estéril o tinción de Gram para verificar la presencia de blastosporas y pseudohifas aunque no siempre se observen [1, 11]. Aunque no es necesaria la solicitud de cultivo para el diagnóstico inicial, si las levaduras se observan en el frotis vaginal, en las formas recurrentes o complicadas la realización del cultivo suele ser imprescindible [11]. El aislamiento de *Candida* spp. y su identificación puede realizarse en medios diferenciales como CHROMagar Candida [18, 22, 23], que permite la identificación presuntiva a nivel de especie mediante un sustrato cromogénico, el cual puede complementarse con otras pruebas como microscopía, formación de tubo germinal y/o de clamidosporas [18, 24, 25]. Esta identificación fenotípica presuntiva permitiría la diferenciación entre *Candida albicans* y otras especies no-*C. albicans*, al igual que la diferenciación de otras levaduras, lo cual es relevante desde el punto de vista epidemiológico por su comportamiento diferente tanto como biota normal o como patógeno [17, 26]. La utilización de pruebas fisiológicas basadas en la asimilación y fermentación de azúcares también permiten la identificación de las especies del género, sin embargo es creciente el uso de pruebas moleculares como PCR para la confirmación de los aislados [1, 27-30].

El comportamiento epidemiológico del género *Candida* en la CVV tiende a ser variable y este dependerá del nivel de estrógenos de la vagina, condiciones de

inmunosupresión o de la cronicidad del proceso [11]. En un estudio realizado en Túnez [9] durante dos años en 481 mujeres con edades entre los 14 y los 63 años con signos o síntomas sugestivos de vaginitis, se encontró que el 48% (231 pacientes) eran positivas para CVV esporádica y recurrente. Los factores más frecuentemente implicados fueron desempleo, diabetes no controlada, historia de infección genital y uso de dispositivo intrauterino. Las recurrencias se asociaron al uso de espermicidas. La especie más frecuentemente aislada fue *C. albicans* (76,3%), seguida por *C. glabrata* (19,3%). La infección por *C. glabrata* fue más frecuente en mujeres con la forma recurrente de la CVV. En otro estudio realizado por Pirotta y col [17], en Melbourne, en el que se estudiaba el efecto sobre la colonización y los síntomas por *Candida* spp. luego de tratamiento con antibióticos, la colonización por *Candida* spp. aumentó del 21% al 37%, encontrándose como especie predominante a *C. albicans* y, en segundo lugar a *C. glabrata*. En otro estudio realizado en Nueva Delhi [31], en un grupo de 85 pacientes diabéticas y 62 no diabéticas, se encontró en una mayor proporción a *C. glabrata* (46%) en el primer grupo con respecto a los controles no diabéticos, mientras que *C. albicans* se mantuvo en el mismo porcentaje (27%) en ambos grupos.

En México, Rivera –Sánchez y col realizaron un estudio en un total de 5839 mujeres sin antecedentes de VIH con edades entre 14 y 65 años, y encontraron entre las especies más frecuentes a *C. albicans* (39%), *C. glabrata* (35,9%) y *C. tropicalis* (16,2%) [21]. En Buenos Aires, Gracia Heredia y col, realizaron un estudio en 493 exudados vaginales de mujeres embarazadas, de los cuales 139 resultaron positivos con una prevalencia del 28% de *Candida* spp. con una distribución de especies de *C. albicans* 90,4%, *C. glabrata* 6,3 %, *C. parapsilosis* 1,1%, *C. kefyr* 1,1% [20]. En 2007 [19], se realizó un estudio descriptivo en 300 mujeres gestantes de Medellín, Colombia, para analizar la prevalencia de *Candida* spp., y se encontró una distribución de *C. albicans* 77%; *C. parapsilosis* 11%; *C. tropicalis* 5%; *C. glabrata*

3%; *C. guilliermondii* 2%; *C. kefyr* 1% y *C. famata* 1%. Estos resultados muestran que se pueden observar variaciones referentes a la distribución de especies al compararse con otros estudios en los que aparece como segunda especie más frecuente *C. glabrata*, lo que indica que se necesitan estudios para conocer la distribución de especies de *Candida* en las diferentes poblaciones, así como su correlación con los factores de riesgo o predisponentes que se deben controlar, para asegurar la efectividad de la terapia instaurada.

El tratamiento de la CVV puede ser oral o tópico empleando polienos, azoles, ácido bórico o ciclopiroxolamina [11]. En diferentes estudios de CVV se ha evaluado el perfil de sensibilidad frente a antifúngicos especialmente azoles [7, 19, 20, 31-33]. En estudios de sensibilidad realizados en Jordania [7], utilizando el método de dilución en agar, que se realizaron con los fármacos que comúnmente emplean: anfotericina B, nistatina, nitrato de miconazol y clorhexidina, el antimicótico más efectivo fue la anfotericina B en contraste con el miconazol que tuvo la menor respuesta. En otro estudio realizado en Shenzhen [32], encontraron que la resistencia a fluconazol era rara, en tanto que *C. albicans* como *Candida* no-*C. albicans* eran sensibles a nistatina. Goswami y col. [31], estudiaron un grupo de 85 pacientes con diabetes mellitus, y encontraron que solo un tercio de los pacientes respondió a la monodosis de fluconazol de 150 mg, quizás porque la especie más prevalente fue *C. glabrata*. En Turquía [33], otro estudio mostró que todos los aislados eran sensibles a fluconazol, itraconazol y anfotericina B, excepto una cepa de *C. krusei*, una de *C. glabrata* y una de *C. albicans*. En Argentina, en un estudio en mujeres embarazadas todos los aislados fueron sensibles a fluconazol, ketoconazol, itraconazol sólo los aislados de *C. glabrata* fueron resistentes a los azoles [20]. En el estudio realizado por Duque, en gestantes, en la ciudad de Medellín [19], se halló resistencia al itraconazol en 9% de los aislados de *C. albicans* y en 100% de los aislados de *C. glabrata*. Las variaciones en estos estudios nos muestran la necesidad de conocer el

comportamiento epidemiológico de *Candida* spp., como colonizante y asociada a vulvovaginitis en las diferentes poblaciones para establecer de una forma más apropiada las pautas a seguir en el control y manejo de esta entidad clínica en grupos especiales como son las embarazadas. El presente trabajo es el primer estudio realizado, en gestantes, en la ciudad de Cartagena de Indias, situada al norte de Colombia y en él se determinaron las especies de *Candida* colonizantes y asociadas a patología, y su sensibilidad frente a fluconazol, un antifúngico comúnmente utilizado en el tratamiento oral de las candidiasis vaginales.

## JUSTIFICACIÓN O PROBLEMÁTICA DE TEMA

La CVV es una infección común que afecta una gran proporción de mujeres en edad fértil. Se estima que alrededor del 75% de las mujeres sanas han tenido, al menos, un episodio de CVV en su vida y que un 40-50% han experimentado recurrencias [11]. El comportamiento epidemiológico de *Candida* spp. es variable tanto en la distribución de especies como por los factores de riesgo implicados según las poblaciones estudiadas [7, 9, 11, 18-21, 31, 33]. La importancia de estos estudios radica, además, en que la respuesta a la terapéutica utilizada es variable y depende de la especie de *Candida* causal, pues pueden observarse buenas respuestas a azoles en algunos casos mientras que en otros serán necesarios otros antifúngicos [31, 32, 34, 35]. Las variaciones en estos estudios nos muestran, la necesidad de conocer el comportamiento epidemiológico de *Candida* spp. en grupos especiales como las gestantes, para establecer de una forma más apropiada, las pautas a seguir en el control y manejo de esta entidad clínica, que presenta una alta morbilidad en la población femenina. El presente trabajo es el primer estudio, realizado en la ciudad de Cartagena de Indias situada al norte de Colombia, y en él se evaluaron las especies de *Candida* colonizantes y asociadas a sintomatología, además de los patrones de sensibilidad frente a fluconazol, comúnmente utilizado en el tratamiento de esta patología.

## HIPÓTESIS

Se postula que en el presente estudio se encontrará un predominio de *C. albicans* y *C. glabrata* en proporciones similares como agentes colonizantes y causales de CVV en gestantes con factores de riesgo relacionados con su estilo de vida. Se espera que un 40% de los aislamientos de *C. albicans* sean resistentes a fluconazol mientras que la sensibilidad de las demás especies puede ser variable.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Identificar las especies de *Candida* colonizantes y/o asociadas a vulvovaginitis y sus patrones de sensibilidad a fluconazol en gestantes atendidas en una clínica materna de la Ciudad de Cartagena de Indias.

### **Objetivos específicos**

- Describir las características socio-demográficas de la población de estudio y señalar los factores de riesgo más frecuentes en la población estudiada para la colonización y la vulvovaginitis.
- Aislar a *Candida* spp. colonizante y asociada a vulvovaginitis en muestras vaginales en la población estudiada.
- Identificar a los aislados a nivel de especie por pruebas fenotípicas y PCR múltiple.
- Determinar la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol en las *Candida* spp. aisladas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El aislamiento y caracterización de las especies de *Candida* spp. procedentes de flujo vaginal se realizó utilizando un estudio descriptivo que constaba de las siguientes etapas:

### **Definición de la población de estudio**

El estudio se realizó en un grupo total de 76 pacientes en gestación con signos (inflamación, flujo vaginal) y síntomas (ardor, prurito, dispareunia, mal olor) de vulvovaginitis que asistieron a la consulta ginecológica de la clínica de maternidad Rafael Calvo de la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia, en el período comprendido entre junio y diciembre de 2014. Los criterios de exclusión comprendían, ausencia de gestación, ser menor de 16 años y sangrado vaginal. El cuestionario de comorbilidades para la población estudiada se elaboró de acuerdo a lo referenciado en la literatura científica [9, 18, 19, 25] (Ver anexos). Las pacientes colonizadas fueron aquellas cuyo examen directo fue negativo y cultivo positivo, mientras que se diagnosticaron con candidiasis vaginal aquellas con ambas pruebas positivas [19, 40].

### **Toma de muestras**

A todas las pacientes se les explicó de forma detallada los objetivos, la toma de la muestra y la importancia del estudio. Una vez aclaradas las dudas, se les solicitó su participación de manera libre y sin ningún tipo de retribución económica, para lo cual firmaron el debido consentimiento informado. Las muestras de las pacientes fueron tomadas por el médico especialista en ginecología, mediante un hisopo estéril con la ayuda de un espéculo estéril de acuerdo a lo referenciado por García-Heredia y col [20].

Se tomaron dos hisopados, uno de ellos se extendió sobre dos portaobjetos o láminas y el otro se introdujo en solución salina estéril al 0,9%. Los portaobjetos, se guardaron apropiadamente en cajas plásticas, especiales para su transporte adecuado. Todo se marcó debidamente en correspondencia con el cuestionario de comorbilidades y el consentimiento informado. (ver Anexo) Las muestras y los extendidos fueron trasladados, en el menor tiempo posible, al Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Cartagena para su procesamiento.

### **Procesamiento de las muestras**

Una vez que las muestras se recibían, eran procesadas para examen microscópico directo, cultivo y otras pruebas para diferenciar el origen bacteriano o parasitario de la sintomatología [36, 37]. Una las láminas se sometió a tinción de Gram, para la observación de células guía, diplococos Gram negativos, bacilos de Döderlein, cocobacilos, pseudohifas, blastoconidios, micelio y otras morfologías microbianas, así como células inflamatorias, epiteliales y eritrocitos. La otra lámina se tiñó con Giemsa para la observación de *Trichomonas vaginalis*. La muestra depositada en solución salina estéril también se observó en fresco para la visualización de estructuras fúngicas, bacterianas y/o parasitarias, así como indicadores de inflamación. A la muestras se le midió el pH con tirillas indicadoras y se realizó la prueba de aminas. Esta última se realizó mediante, la adición de unas gotas de KOH al 10% a la muestra ubicada sobre un portaobjetos. La producción de un olor a aminas (a pescado) indicó positividad de la prueba para vaginosis bacteriana. Todos los resultados se consignaron en una hoja de recolección de datos (ver Anexos). Los criterios utilizados para describir la biota vaginal fueron los correspondientes a *normal*: cuando predominaron *Lactobacillus* spp. y casi ningún otro morfotipo, *intermedia*: cuando *Lactobacillus* son escasos y pueden observarse otros morfotipos, pero no abundantes y asociación a proceso infeccioso cuando predominaba un morfotipo bacteriano diferente, levaduras o

parásitos y no se observan *Lactobacillus* [38, 39]. Se utilizaron los criterios de Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. Estos criterios incluyen, presencia de descarga vaginal homogénea; prueba de aminas positiva, pH vaginal > 4,5 y observación de células guía en el examen directo del frotis vaginal [36]. El diagnóstico de candidiasis vaginal se estableció de acuerdo a la observación de blastoconidios, pseudohifas o hifas en el examen directo de la muestra de flujo vaginal y además el cultivo era positivo [19, 40]. Se consideró la especie de *Candida* aislada como colonizante cuando el examen directo resultaba negativo y el cultivo positivo [19, 40]. Las infecciones se clasificaron como mixtas al resultar positivo el examen directo tanto para vaginosis bacteriana como para candidiasis.

La muestra se sembró directamente en CHROMagar Candida (CHROMagar, Francia) y se incubó a 37°C por 24 a 48 horas [18].

### **Aislamiento y pruebas fenotípicas**

Las especies se diferenciaron de acuerdo a los colores producidos por las colonias en CHROMagarCandida atendiendo a las indicaciones del fabricante y lo citado por Odds y Bernaerts [23]. Los colores orientan hacia las diferentes especies de *Candida* de la siguiente manera:

- Colonias verdes: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Candida africana*
- Colonias azules: *C. tropicalis*
- Colonias rosadas-lilas: *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*
- Colonias blancas: *Candida* spp..

La clasificación de las colonias de acuerdo a los colores observados, facilitó su posterior identificación por PCR múltiple.

La conservación de los aislados se realizó con cepas resembradas, el día anterior, en agar Sabouraud con 4% de glucosa sin cloranfenicol (SDA) (Merck, Alemania). Para cada aislado, se tomaron unas 5 a 6 colonias, las cuales se depositaron en una mezcla de agua estéril más glicerol al 30%, en un volumen de 500 µL. Para cada aislado se conservaron 4 viales a -72°C.

Igualmente, para todos los ensayos y pruebas fenotípicas, PCR y de sensibilidad tanto los aislados clínicos como las cepas control, fueron sembrados en SDA e incubados a 37°C por 24 horas, previas a la realización del experimento. Cuando los estudios de los aislados, se realizaban de forma continua, estos se mantenían para las resiembras, en placas de SDA a 4°C. Las cepas utilizadas como control fueron las siguientes: *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 64677, *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*) ATCC 6258, *Candida lusitanae* ATCC 34449, *Candida guilliermondii* ATCC 6260, *C. dubliniensis* GM0314 (Aislado clínico caracterizado fenotípica y molecularmente).

Las colonias verdes fueron evaluadas por pruebas fenotípicas para diferenciación de especies. Se utilizaron las siguientes pruebas:

### **Prueba de tubo germinal en suero**

A un Eppendorf con 500 µL de suero humano, se adicionó una asada del aislado en estudio con 24 horas de crecimiento, se mezcló y se incubó por 2-3 horas a 37°C. Para la observación microscópica se tomó una gota de la suspensión con ayuda de una pipeta Pasteur y se observó a 40X en una laminilla cubierta con cubreobjetos. La prueba es positiva para *C. albicans* y *C. dubliniensis*. El tubo germinal es definido como una prolongación filamentosa procedente de una célula levaduriforme, sin constricción en el

punto de origen, semejante a un “espejo de mano”, cuyo grosor puede medir alrededor de la mitad del diámetro de la levadura y tener una longitud tres a cuatro veces mayor de dicho diámetro [41].

### **Prueba de clamidosporas en agar leche**

El agar leche se preparó con 2 g de agar-agar (Merck, Alemania), 1 mL de Tween 80 (Sigma, EE. UU.) y completando hasta 100 mL con agua destilada. Luego de disolver mediante calentamiento, 3 mL del medio se distribuyeron en tubos con tapa a rosca. La leche en polvo entera se reconstituyó mezclando 1 g de leche en 10 mL de agua destilada en un Erlenmeyer. El medio y la leche reconstituida se esterilizaron por separado por calor húmedo y se conservaron a 4°C. Para el montaje se utilizaron portas y cubreobjetos estériles. Cada portaobjetos se ubicó en una caja Petri estéril con un algodón humedecido con agua destilada estéril, para formar una cámara húmeda. Previamente, el medio se sometió a calentamiento en baño de María hasta que estuvo líquido. A cada tubo con 3 mL de agar, se adicionaron 30 µL de leche. El agar leche se sirvió sobre los portaobjetos, ubicados en las cámaras húmedas. Una vez solidificado, se procedió a sembrar por medio de una estría con un asa en punta, haciendo incisión del medio. Se sembraron tres cepas por cada portaobjetos. Luego se colocaron los cubreobjetos, sobre cada estría. Las cajas se incubaron a 28°C por 48 horas. La observación microscópica se hizo directamente con el portaobjetos con una intensidad de luz apropiada para la visualización de las estructuras a 400X. Las clamidosporas son definidas como estructuras de resistencia que se observan como ensanchamientos de las hifas o filamentos, bien sea intercalares o terminales. La prueba se consideró positiva para *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Suelen diferenciarse porque *C. dubliniensis* produce muchas y en racimos y las de *C. albicans* son aisladas [42].

## **Macro y micromorfología en agar tabaco**

El agar tabaco se elaboró utilizando 50 g de tabaco (Tabaco artesanal, Colombia) por 1 L de agua destilada. La mezcla se hirvió durante 30 minutos en baño de María, luego se filtró con gasa y se ajustó el volumen a un litro. Se adicionaron 20 g de agar-agar y se verificó el pH a 5,4. El medio se esterilizó por calor húmedo y se sirvió en cajas de Petri. Los aislados con 24 horas de crecimiento en SDA se sembraron en el agar tabaco, en forma de círculo de un centímetro de diámetro. Por cada caja de Petri se sembraron 4 aislados. Las placas se incubaron por 48-72 horas a 30°C. Se realizó la observación macroscópica del crecimiento y se tomó una asada para observación microscópica con una gota de solución salina estéril a 400X. Un crecimiento rugoso, seco y de color ocre con formación de clamidosporas se consideró positivo para *C. dubliniensis*, mientras que un crecimiento blanco, liso y sin formación de clamidosporas fue positivo para *C. albicans* [42].

## **Crecimiento a 45°C**

Las cepas a estudiar, provenientes de un cultivo de 24 horas a 37°C, se resembraron en SDA y se incubaron a 45°C por 24 horas. *C. albicans* da positivo el crecimiento a esta temperatura, mientras que *C. dubliniensis* es inhibida [42].

Las colonias rosadas y blancas no identificadas por PCR múltiple, se sometieron adicionalmente a prueba de zimograma (fermentación de azúcares).

## **Prueba de zimograma**

El medio utilizado se se preparó con 5,5 g de extracto de levadura (Oxoid, EE.UU), 7,5 g de peptona (Merck, Alemania) y 40 mg de púrpura de bromocresol (Merck, Alemania) por litro y los azúcares glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa (Panreac,

España) y trehalosa ((Merck, Alemania) a una concentración del 6%. El medio y los azúcares se prepararon por separado. El medio líquido de color violeta, se dispensó (10 mL) en tubos con tapa a rosca a los que se adicionó una campana de Durham, para luego esterilizar por calor húmedo. Mientras que los azúcares se esterilizaron por filtración. Tanto los medios como los azúcares estériles se guardaron bajo refrigeración a 4°C para su posterior uso. Para la prueba, los aislados completaron 24 horas de crecimiento. El inóculo se preparó con solución salina estéril y se ajustó a 1 de la escala de McFarland. A cada tubo de medio se agregó 1 mL de uno de los azúcares a evaluar y 100 µL del inóculo, hasta completar los seis azúcares por cada aislado en estudio. Se incubaron, por 48 horas a 37°C y se tomó como positivo ante el viraje del medio a amarillo y/o la producción de gas [28, 43].

## **IDENTIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE**

### **Extracción de ADN**

El ADN de los aislados de *Candida* spp. se obtuvo por el método de choque térmico descrito por Millar [44]. En un Eppendorf de 1,5 mL, a 500 µL de buffer TE (0,08 ml; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 con 1mM de EDTA) se agregaron 5 colonias de la cepa a identificar y se mezcló por 20 segundos en vórtex a 2500 rpm. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 500 µL de buffer TE, se mezcló en el vórtex por 10 segundos a 2500 rpm y se llevó a 100°C por 30 minutos. Inmediatamente, se congeló a -40°C por 20 minutos. Nuevamente se sometió a calentamiento a 100°C para descongelar por 5 minutos. Se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se guardó, con ayuda de una micropipeta, en otro Eppendorf a -20°C hasta que se fuera a realizar la PCR.

## SELECCIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE PRIMERS O CEBADORES

Para la amplificación de las especies de *Candida* se utilizó el método de PCR múltiple descrito por Carvalho y col [30]. Los *primers* que se utilizaron y sus correspondientes amplicones se presentan en la tabla 1. Los *primers* universales UNI1 y UNI2 amplificaron la región 1 (ITS1) y 2 (ITS2), que incluía el 5.8S rRNA de ocho especies de *Candida*. Los *primers* especie-específicos Calb, Cgla, Ckru, Cpar, Ctro, Cgui y Cdub fueron diseñados de acuerdo a las secuencias para ITS1 y ITS2 de cepas de referencia y cepas provenientes de aislamientos clínicos de EMBL/ GenBank databases [30]. Estos primers fueron corroborados usando el programa Primer blast en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Los *primers* fueron comprados a Eurofins Mwg Operon con sede en Estados Unidos. Los primers libres de sal se reconstituyeron de acuerdo a las indicaciones del fabricante para una concentración final de 100  $\mu$ M. La reconstitución se hizo con *buffer* TE con un pH de 7,0 para garantizar la estabilidad de los oligonucleótidos [30]. Una vez reconstituidos, la solución de trabajo de los *primers* se preparó realizando una dilución con agua desionizada como disolvente, a concentraciones apropiadas de acuerdo a los volúmenes y concentraciones finales que se utilizaron en la mezcla de reacción de la PCR. Los *primers* reconstituidos y las soluciones de trabajo se conservaron a -20°C.

Tabla 1. Lista de *primers*, secuencias y amplicones de la PCR múltiple

Especies	Primer	TIPO	SECUENCIA	AMPLICONES (pb)
	UNI1	Universal	GTC AAA CTT GGT CAT TTA	
	UNI2	Universal	TTC TTT TCC TCC GCT TAT TGA	
<i>Candida albicans</i>	Calb	Específico	AGC TGC CGC CAG AGG TCT AA	583/446
<i>Candida glabrata</i>	Cgla	Específico	TTG TCT GAG CTC GGA GAG AG	929/839
<i>Candida krusei</i>	Ckru	Específico	CTG GCC GAG CGA ACT AGA CT	590/169
<i>Candida tropicalis</i>	Ctro	Específico	GAT TTG CTT AAT TGC CCC AC	583/507
<i>Candida parapsilosis</i>	Cpar	Específico	GTC AAC CGA TTA TTT AAT AG	570/370
<i>Candida guilliermondii</i>	Cgui	Específico	TTG GCC TAG AGA TAG GTT GG	668/512
<i>Candida lusitanae</i>	Clus	Específico	TTC GGA GCA ACG CCT AAC CG	433/329
<i>Candida dubliniensis</i>	Cdub	Específico	CTC AAA CCC CTA GGG TTT GG	591/217

## MEZCLA DE REACCIÓN Y CONDICIONES DE PCR

La PCR múltiple se realizó de acuerdo a lo descrito por Carvalho y col [30] pero con un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y con el Kit Go Taq Green Master Mix (Promega, EE. UU.). La Master Mix es una pre-mezcla lista para usar que contiene *Taq* polimerasa de ADN, 400  $\mu\text{M}$  dNTPs, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  y *buffer* de reacción (pH= 8.5). La preparación de la mezcla, en condiciones de esterilidad, se realizó en un Eppendorf de 0,2 mL y se mantuvieron en hielo los materiales utilizados. De la muestra de ADN se adicionó 4  $\mu\text{L}$  y de la Master Mix 12,5  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones finales de los *primers* fueron las descritas por Carvalho y col [30]: UNI1 Y UNI2, 0,55  $\mu\text{M}$ ; Calb, 0,15  $\mu\text{M}$ ; Cdub, 0,4  $\mu\text{M}$ ; Ctrop, 0,2  $\mu\text{M}$ ; Ckru, 0,15  $\mu\text{M}$ ; Cgla, 0,2  $\mu\text{M}$ ; Cpar, 0,3  $\mu\text{M}$ ; Cgui, 0,05  $\mu\text{M}$  y Clus, 0,2  $\mu\text{M}$ . El volumen se completó con agua desionizada estéril. Las condiciones para la PCR fueron las señaladas por Carvalho y col. [30]. La reacción se corrió en un termociclador Perkin- Elmer (EE. UU.) GeneAmp PCR System 2400, de la siguiente manera: un período inicial de desnaturalización y activación enzimática de 10 minutos a 94°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 45 segundos a 65°C. La mezcla de reacción se corrió inmediatamente en el gel de agarosa.

## Electroforesis

El gel de agarosa al 2% se preparó teniendo en cuenta las dimensiones de la cámara de electroforesis. La agarosa disuelta en *buffer* TBE (Tris-Borato-EDTA) se llevó a calentamiento, para luego adicionar bromuro de etidio (5  $\mu\text{L}$ /100 mL de agarosa) cuando la temperatura de la agarosa estuvo un poco más baja. La agarosa preparada se adicionó a la cámara de electroforesis ya instalada. Una vez solidificada se retiraron con mucho cuidado el peine y los moldes. Se procedió a adicionar *buffer* TBE hasta completar el nivel de la cámara. Una vez hecho esto, se llenaron los pozos

con 5 µL de las muestras (productos de PCR). Las muestras se ubicaron a partir del segundo pozo, incluidas los aislados a identificar y las cepas ATCC control. En el primer pozo se colocó el marcador de peso molecular Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific, EE. UU.) y en el último pozo el control negativo. El control negativo se preparó con todos los componentes pero la muestra se reemplazó con agua libre de nucleasas. Una vez completados los pozos, se tapó la cámara, se aplicó la corriente con un voltaje de 100 V. Luego de 1 hora 30 minutos aproximadamente, se pudo visualizar los amplicones productos de la reacción. Las fotografías se registraron con un fotodocumentador, InGenius 3, Genesys versión 1.2.7.0 Data Base Version: 1.66, Cámara Synoptics 3.0 MP. (Synoptics, Inglaterra)

### **Evaluación de la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol**

La sensibilidad antifúngica se evaluó por el método de microdilución en placa según el documento M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [45] y las lecturas se interpretaron de acuerdo al suplemento M27-S4 del CLSI [46].

### **Preparación de las microplacas con el antifúngico**

La solución madre de fluconazol (Sigma, EE.UU) se preparó con agua desionizada estéril con una concentración de 5120 µg/mL. La *solución madre* se esterilizó por filtración y se almacenó en viales de 1 mL cada uno, a -20°C para ser usados posteriormente. La *solución madre* de antifúngico se preparó con 1 mL de la solución madre más 3 mL de medio RPMI (RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato de sodio (Gibco Lifetechnologies, EE. UU.) más ácido 3-morfolino-4-il-propano-1-sulfónico (MOPS) (Sharlab, España), pH7,0, esterilizado por filtración). La concentración de la solución de uso correspondió a 1280 µg/mL con un volumen final de 4 mL. Las diluciones se realizaron bajo condiciones de esterilidad. Se utilizaron 10 tubos para realizar la primera dilución a partir de la solución madre, obteniendo las

concentraciones señaladas en la tabla 2. Para la segunda dilución se dispusieron nuevamente 10 tubos a los que se adicionaron 4 mL de RPMI y se adicionó 1 mL de la dilución I correspondiente para cada uno, obteniéndose una dilución de 1:5 que se llamó dilución II. Las concentraciones respectivas para la dilución II se señalan en la tabla 2. Las microplacas estériles (Thermo Scientific Nunclon Delta Surface, EE. UU.) que se utilizaron son de 96 pozos, fondo en U y con tapa, y están marcadas en las columnas del 1 al 12 y las filas de la A a H. El llenado de las microplacas se realizó de acuerdo a cada tubo de dilución II preparado. Cada pozo de la columna 1 de la A a H se llenó con 100  $\mu$ L del tubo 1. Del tubo 2 igualmente se tomaron 100  $\mu$ L y se completó la columna 2 de la A a H y así sucesivamente hasta llenar las 10 primeras columnas de la microplaca. Las concentraciones finales de 0,12 a 64  $\mu$ L para el volumen final más el inóculo se muestran en la tabla 2. La columna 11 se llenó con 100  $\mu$ L de RPMI de la A a H, para el control de crecimiento y la columna 12 se llenó con 200  $\mu$ L de RPMI para el control de esterilidad. Por cada 1mL de solución madre se podían completar 5 microplacas, las cuales se almacenaron en sus respectivos empaques plásticos a -70°C.

Tabla 2. Diluciones de antifúngico soluble por el método M27-A3

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RPMI (mL)	1	0.5	1.5	0.5	0.75	1.75	0.5	0.75	1.75	1		
Solución de uso 1280 µg/mL <i>Se prepara con 1mL de solución madre + 3mL de RPMI</i>	<b>1 de la solución de uso</b>	0.5 del tubo 1	0.5 del tubo 1	0.5 del tubo 3	0.25 del tubo 3	0.25 del tubo 3	0.5 del tubo 6	0.25 del tubo 6	0.25 del tubo 6	1 del tubo 9		
Concentración de la dilución I	640	320	160	80	40	20	10	5	2.5	1.25		
Cantidad tomada de las diluciones realizadas (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
RPMI (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	RPMI	RPMI
Concentración dilución II	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25		
µL de la dilución II para cada columna de pozos	100 1A- 1H	100 2A-2H	100 3A-3H	100 4A-4H	100 5A-5H	100 6A-6H	100 7A-7H	100 8A-8H	100 9A-9H	100 10A-10H	100	200
CONCENTRACION	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	control crecimiento	control esterilidad

### Preparación del inóculo

El inóculo se obtuvo del crecimiento de toda la noche en agar Sabouraud a 37°C de los aislados a estudiar de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*, para las que están establecidos los puntos de corte, así como de las cepas control *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*) ATCC 6258. El inóculo se preparó por la adición de 5 a 6 colonias de la cepa en estudio a 1 mL de solución salina estéril y se ajustó visualmente de acuerdo a un estándar de 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL.). La dilución I del inóculo se preparó con 25 µL de inóculo en solución salina estéril más 1225 µL de RPMI. La dilución II se preparó adicionando 150 µL de la dilución I a 2800 µL de RPMI (Figura 1). Una vez preparado el inóculo se adicionaron 100 µL a cada pozo, por duplicado desde la columna 1 a la 11, ya que el 12 es el control de esterilidad. Las microplacas de 96 pozos con forma de U se incubaron a 35°C por 48 horas.

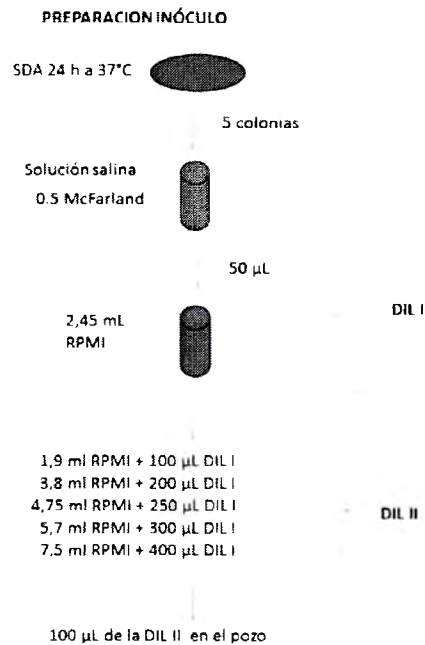


Figura 1. Preparación del inóculo

### Lectura de las microplacas e interpretación de resultados

La lectura se realizó con ayuda de un espejo invertido en el modelo mostrado en la figura 2. La lectura del fluconazol se realiza con un 50% de inhibición con respecto al control de crecimiento. Para la lectura se utilizó una pipeta Pasteur con el fin de homogenizar el medio en cada pozo y visualizar mejor la turbidez. La interpretación de los resultados se realizó como sensible, dosis dependiente (SDD) o resistente de acuerdo a los puntos de corte establecidos en el suplemento M27-S4 del CLSI [46]

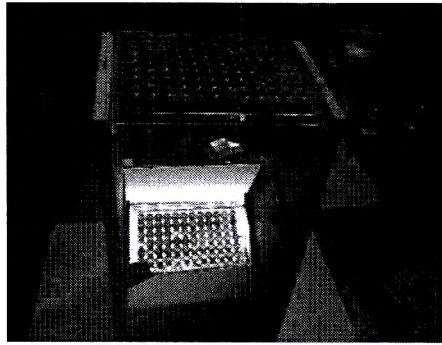


Figura 2. Espejo para la lectura visual de las microplacas.

**Análisis de resultados:** se analizaron las frecuencias, así como los valores de dispersión, tendencia central y la significación estadística para las variables sociodemográficas, síntomas, factores predisponentes, métodos fenotípicos y moleculares utilizados. Las frecuencias de los factores predisponentes en especies colonizantes y patógenas identificadas, así como los resultados de las pruebas de sensibilidad, se estudiaron utilizando el programa estadístico de IBM SPSS versión 19.0 para Windows. [9].

**Consideraciones éticas:** los pacientes involucrados en el estudio fueron debidamente informados de los objetivos, procedimientos y beneficios del estudio para la promoción de su calidad de vida. Se suministró a los participantes un consentimiento informado de manera que libremente y en ejercicio de su plena voluntad decidieran participar en el presente proyecto (ver Anexo). La toma de muestras se realizó bajo el estricto seguimiento de las normas de seguridad establecidas para ello y el desecho de materiales microbiológicos y/o otros residuos se realizó previa esterilización por calor húmedo y/o seco de acuerdo a la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y de la Protección Social de Colombia.

## RESULTADOS

Un total de 76 pacientes gestantes con sintomatología asociada a vulvovaginitis, previo consentimiento informado, participaron libremente en el estudio realizado desde junio hasta diciembre de 2014. Las pacientes procedían en un 63,2% de la capital del departamento de Cartagena de Indias, mientras que el resto de la población habitaba en islas, municipios y corregimientos aledaños. El rango de edad se encontraba entre 16 y 36 años, con una media de  $22,4 \pm 6,04$  años. El 46,1% de la población había completado 11 años de educación totales, lo que quiere decir que la mayoría culminó los estudios secundarios, pero sólo 7 pacientes habían continuado con estudios técnicos o profesionales. Es importante señalar, que el 90,8% de las consultantes se dedicaban a las labores del hogar y no eran independientes económicamente. El 39,5% de las pacientes sólo tenía un hijo, mientras que un 2,6% tenía 4 hijos. El 64,5% de las participantes se encontraba en el tercer trimestre del embarazo y la minoría en el primer trimestre. Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Datos sociodemográficos de la población n=76.

Edad	Procedencia (%)	Educación Años (%)	Ocupación (%)
Rango	<b>Urbana</b> Cartagena	>11	Hogar
16-36	(63,2)	(10,4)	(90,8)
Media		11	Estudiante
22,4±6,07		(46,1)	(3,9)
Moda	<b>Rural</b> Aledaños e Islas	9- 10	Profesional
20	(36,2)	(10,5)	(2,6)
Mediana		<9	Mesera, Vendedora
21		(15,6)	(2,6)

Tabla 3. Número de hijos y porcentaje pacientes de acuerdo al trimestre

Número de Hijos (%)	Trimestre de Embarazo (%)
0 (28,9)	Primero (1-12 semanas) 7,9
1 (39,5)	
2 (18,4)	Segundo (13-28 semanas) 27,6
3 (10,5)	
4 (2,6)	Tercero (29-40 semanas) 64,5

Los signos y síntomas predominantes en las pacientes fueron el flujo vaginal, seguido por mal olor y prurito, mientras que el menos frecuente fue la erupción vulvovaginal (Tabla 4). El diagnóstico clínico con más alto porcentaje (57,9%) fue vaginosis bacteriana lo que no correspondió con los datos de laboratorio, donde según los criterios de Amsel, sólo el 15,8% tenía diagnóstico de vaginosis bacteriana, sin embargo en el diagnóstico de candidiasis vaginal hubo una mejor correspondencia en términos de porcentaje. En el diagnóstico de laboratorio predominó la biota intermedia en un 52,6% y además no se demostró en el examen en fresco, ni con tinción de Giemsa, la presencia de *T. vaginalis*. Mientras que el diagnóstico médico presumía una infección mixta por candidiasis y tricomoniasis, en el examen directo sólo se evidenció candidiasis asociada a vaginosis bacteriana. (Tabla 5)

Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de signos y síntomas presentes en vulvovaginitis

<b>SIGNO</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Flujo</b>	71	93,4
<b>Mal olor</b>	21	27,6
<b>Erupción</b>	5	6,6
<b>Enrojecimiento</b>	7	9,2
<b>SÍNTOMA</b>		
<b>Ardor</b>	9	11,8
<b>Prurito</b>	18	23,7
<b>Dispareunia</b>	11	14,5

Tabla 5. Diagnósticos clínicos y de laboratorio

<b>Diagnóstico clínico</b> <b>Frecuencia (%)</b>	<b>Diagnóstico de Laboratorio</b> <b>Frecuencia (%)</b>
Candidiasis 22 (28,9)	Candidiasis 15 (19,7)
Vaginosis bacteriana 44 (57,9)	Vaginosis bacteriana 12 (15,8)
Candidiasis-Tricomoniasis* 1 (1,3)	Candidiasis-Vaginosis* 1 (1,3)
Tricomoniasis 1 (1,3)	Infección bacteriana 1 (1,3)
Ninguno 8 (10,5)	Biota intermedia 40 (52,6)
	Biota normal 7 (9,2)

\*Infecciones mixtas.

Los cultivos de las muestras vaginales resultaron positivos para levaduras en 54 (71,1%) de las pacientes, con un total de 56 aislados debido al crecimiento de dos levaduras en cada una de las muestras de dos pacientes. El crecimiento en CHROMagar Candida mostró una mayoría de colonias verdes, como se observa en la figura 3.

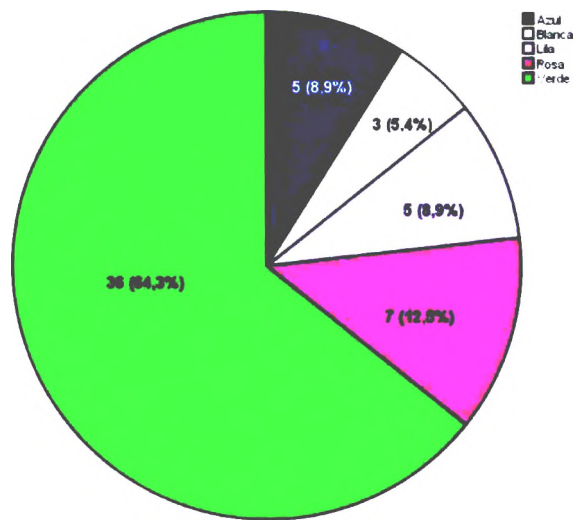


Figura 3. Distribución por frecuencia y porcentaje de los aislados en CHROMagar candida, n=56.

Las colonias verdes se evaluaron fenotípicamente para diferenciación presuntiva de *C. albicans*, *C.dublinsiensis* y *Candida africana*. Los resultados de las pruebas realizadas en 36 aislamientos se muestran en la Tabla 6. (ver prueba positiva Fig. 4)

Tabla 6. Pruebas fenotípicas en colonias verdes, n=36.

<b>Tubo germinal Suero</b>	<b>Clamidosporas Agar leche</b>	<b>Agar Tabaco Color</b>	<b>Agar Tabaco Clamidosporas</b>	<b>Crecimiento 45°C</b>
Si	Si	Blanco	No	Si
30 (83,3 %)	36 (100%)	34 (94,4 %)	34 (94,4 %)	25 (69,4 %)
No	No	Ocre	Si	No
6 (17,6 %)	0 (0 %)	2 (5,6 %)	2 (5,6 %)	11 (30,6 %)

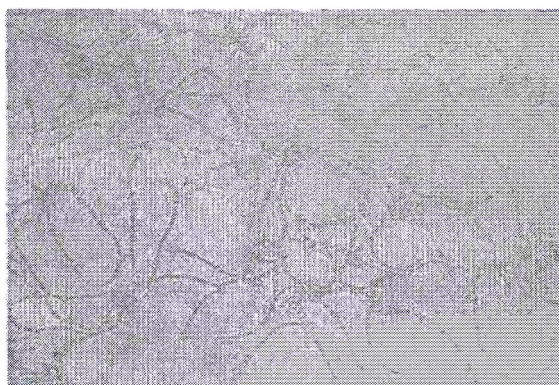


Figura 4. Filamentos y clamidosporas en agar leche.

Las pruebas de tubo germinal pueden presentarse negativas para algunas cepas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, así que no descarta que se traten de estas especies. La prueba en agar tabaco indicaría la presencia de dos cepas de *C. dubliniensis* aunque para estas cepas la prueba de crecimiento a 45°C resultó positiva. La prueba a 45°C presuntamente identificaría a 11 cepas como *C. dubliniensis*. Sin embargo los resultados de la PCR múltiple no mostraron, en muchos casos, correspondencia con estas pruebas fenotípicas (Figura 5). De esta manera se obtuvo, que 34 de las colonias verdes correspondían a *C. albicans* correspondientes al 60,7% del total de aislados.



Figura 5. PCR para colonias verdes. M; peso molecular bp, Calb; *Candida albicans* ATCC 90028; carril 1-9; cepas clínicas.

Las colonias azules, rosadas, lilas y blancas se evaluaron por PCR múltiple (Fig. 6 y 7). En cuanto a la correspondencia entre CHROMagar Candida y PCR múltiple, se encontró que las colonias rosadas podían corresponder a *C. krusei* y *C. parapsilosis* y que en relación a las colonias azules, una no se identificó como *C. tropicalis*. Igualmente 6 aislados no pudieron identificarse por PCR múltiple, debido a que sólo identifica ocho especies.



Figura 6. PCR colonias blancas y rosadas. M; peso molecular bp, Clus: *Candida lusitanae* ATCC 34449, Cgui: *Candida guilliermondii* ATCC 6260, Cpar: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, carriles 1-7; cepas clínicas, B; blanco.



Figura 7. PCR colonias azules. M; peso molecular bp, Ctrop: *Candida tropicalis* ATCC 750, carriles 1-5; cepas clínicas, B; blanco.

La prueba de zimograma se realizó, como prueba adicional para los aislados que no se pudieron identificar plenamente, (ver prueba de reacción Fig. 8). Para uno de los aislados se estableció un diagnóstico preliminar, mientras que las otras no se identificaron plenamente y se etiquetaron como *Candida* spp.

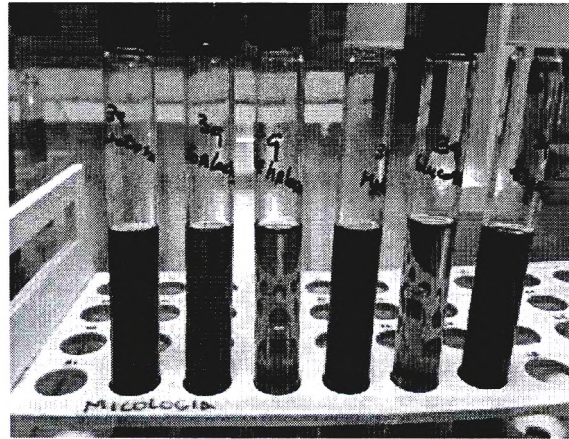


Figura 8. Prueba de Zimograma para seis azúcares después de 48 horas de incubación.

El consenso entre las pruebas fenotípicas y la prueba molecular, permitió la identificación de las especies y establecer la frecuencia de su presentación en la totalidad de la población y de acuerdo a su papel como colonizante o patógena. (Figura 9 y Tabla 7).

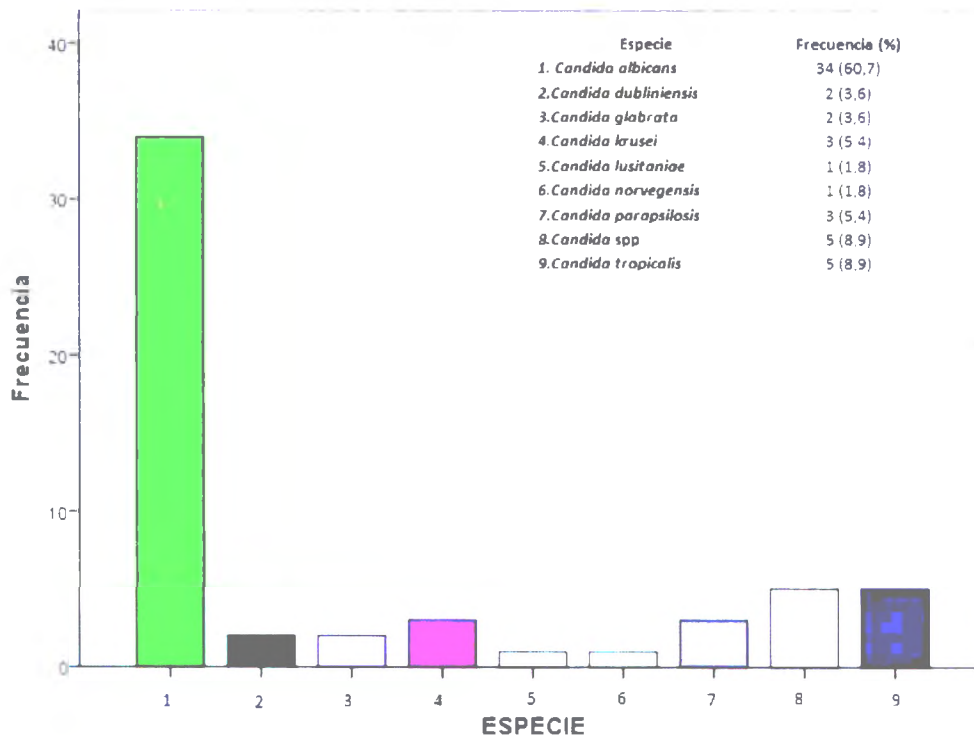


Figura 9. Frecuencia y porcentajes de especies identificados en el total de aislados, n=56.

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de especies colonizantes y patógenas.

ESPECIE	COLONIZANTES	PATÓGENAS
	Frecuencia (%) n=40	Frecuencia (%) n=16
<i>Candida albicans</i>	24 (60)	10 (62,5)
<i>Candida tropicalis</i>	3 (7,5)	2 (12,5)
<i>Candida krusei</i>	2 (5,0)	1 (6,3)
<i>Candida parapsilosis</i>	2 (5,0)	1 (6,3)
<i>Candida dubliniensis</i>	1 (2,5)	1 (6,3)
<i>Candida glabrata</i>	2 (5,0)	0
<i>Candida lusitanae</i>	1 (2,5)	0
<i>Candida norvegensis</i>	1 (2,5)	0
<i>Candida spp.</i>	4 (10)	1 (6,3)

En el grupo estudiado la frecuencia de colonización por el género *Candida* fue del 50%, teniendo en cuenta que en dos pacientes se realizaron en cada una dos

aislamientos, es decir en 38 pacientes los aislamientos eran colonizantes. La especie más frecuentemente aislada fue *C. albicans* seguida en menor porcentaje por *C. tropicalis*, y *Candida* spp. El género cumplió un papel como patógeno en el 21,1% de la población estudiada, *C. albicans* se mantuvo como la más frecuentemente aislada, sin embargo la variación de especies como patógenos fue menor que en los aislados colonizantes.

La frecuencia de factores de riesgo en colonizantes y patógenas aparece en la Tabla 8.

En las pacientes colonizadas por el género *Candida*, fueron más frecuentes el uso de ropa interior de lycra y negra, ropa exterior de lycra y de jean. En las pacientes con candidiasis vaginal, todas usaban lubricantes vaginales y otro factor frecuente fue el uso de ropa exterior e interior de lycra. En ambos grupos la frecuencia de uso de protectores diarios fue similar. Debe anotarse, que las pacientes no presentaban otros factores descritos como de riesgo como tratamiento con antibióticos de amplio espectro o uso de corticoides, diabetes, inmunosupresión innata o adquirida, etc..

Tabla 8. Frecuencia y factores de factores de riesgo en pacientes colonizadas o con candidiasis vaginal.

<b>Factores predisponentes</b>	<b>Colonizantes Frecuencia (%) n=40</b>	<b>Patógenas Frecuencia (%) n= 16</b>
<b>Duchas vaginales</b>	11 (27,5)	2 (12,5)
<b>Ropa de lycra</b>	32 (80)	13 (81,3)
<b>Pantalones de Jean</b>	27 (67,5)	7 (43,8)
<b>Ropa interior negra</b>	31 (77,5)	8 (50)
<b>Lubricantes vaginales</b>	3 (7,5)	16 (100)
<b>Condomes</b>	4 (10)	2 (12,5)
<b>Protectores diarios</b>	23 (57,5)	7 (43,8)
<b>Ropa interior de lycra</b>	33 ( 82,5)	10 (62,5)

Los aislados evaluados por el método M27-A3 en su mayoría (93,2%) resultaron sensibles frente al fluconazol, excepto dos aislados, uno de *C. albicans* y otro de *C. tropicalis* que resultaron SDD. Sólo un aislado de *C. tropicalis* resultó resistente. Los aislados de *C. glabrata* son SDD y los de *C. krusei* se asumen como intrínsecamente resistentes. (Ver Tabla 9 y figura 10).

Tabla 9. CMI y sensibilidad al fluconazol

Espece	CMI µg/mL	Sensibilidad
<b><i>Candida albicans</i> n= 34</b>	0,12-4	Sensible/SSD
<b><i>Candida tropicalis</i> n= 5</b>	0,12-16	Sensible/ SSD*/ Resistente
<b><i>Candida parapsilosis</i> n= 3</b>	0,12-2	Sensible
<b><i>Candida glabrata</i> n= 2</b>	0,12-4	SSD

CMI: concentración mínima inhibitoria

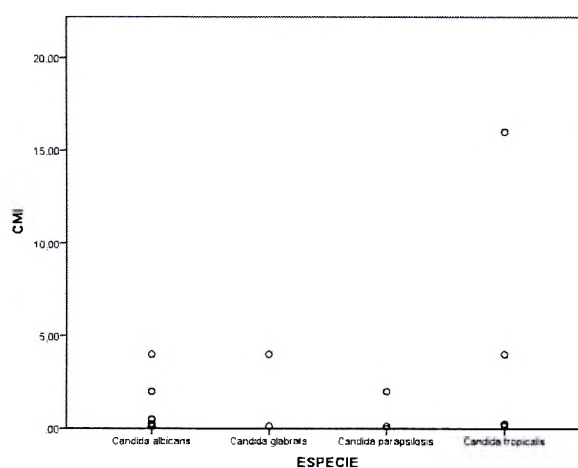


Figura 10. Gráfico de dispersión de CMI para el fluconazol frente a *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*.

## DISCUSIÓN

El presente estudio, de carácter descriptivo, fue realizado en 76 gestantes que asistieron a la consulta externa ginecológica de una clínica de maternidad de la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia. El rango de edad oscilaba entre 16 y 36 años, en su mayoría con un nivel educativo secundario y dedicadas a las labores del hogar. El 64,5% de las pacientes se encontraba en el último trimestre del embarazo y en su mayoría tenían un solo hijo. El síntoma más frecuente fue la descarga vaginal, seguido de mal olor y prurito. En el estudio realizado por Rivero y col. [47] en pacientes gestantes de Venezuela, la sintomatología predominante fue el flujo vaginal (65% de los casos) seguido por el prurito. En cuanto a la correspondencia entre el diagnóstico clínico y el diagnóstico de laboratorio, se observó que la vaginosis bacteriana fue el diagnóstico clínico predominante, en contraste con el hallazgo de biota intermedia, como el más frecuente, en el diagnóstico de laboratorio. Este resultado indica que la sola observación de los síntomas no permite un diagnóstico acertado en la mayoría de los casos, así como lo anota Rathod y col. [40] en un estudio sobre vulvovaginitis realizado en India, de allí la importancia de solicitar los exámenes correspondientes para un diagnóstico correcto. Debe anotarse que es una práctica común en nuestro medio la automedicación y la no consulta médica por la no regulación en la venta de medicamentos, también el uso de tratamientos alternativos en busca de la mejoría de los síntomas, lo que puede incidir en el bajo número de pacientes en consulta ginecológica por sintomatología vulvovaginal. Los cultivos de los exudados vaginales resultaron positivos para el género *Candida* en 71,1% (54 gestantes) de la población, para un total de 56 aislados. En el estudio realizado en mujeres en edad reproductiva en India por Rathod y col. [40]. sólo el 35% de los cultivos resultó positivo. En otro estudio realizado en embarazadas en Argentina, el 28% de los cultivos resultaron positivos [20] y en Colombia, en un estudio en Medellín, también en embarazadas, la prevalencia fue del 33,3% [19]. El alto

porcentaje hallado en la población estudiada puede estar relacionado con factores ambientales, dietarios o fisiológicos propios del embarazo. El 60,7% de los aislados se identificaron como *C. albicans*, le siguieron *C. tropicalis* (8,9 %), *C. krusei* (5,4 %), *C. parapsilosis* (5,4%) y otras especies en menor porcentaje. En el estudio realizado por García-Heredia y col. en embarazadas en Argentina, *C. albicans* (90,4%) fue la especie más frecuentemente aislada seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. kefyr* [20]. Duque y col. encontraron en un estudio realizado en Medellín (Colombia), que *C. albicans* (77%) fue la más frecuente, seguida por *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* [19]. El presente estudio concuerda con la literatura general sobre la especie más frecuentemente aislada, aunque se presentan variaciones con respecto a las demás especies aisladas. El porcentaje de colonización por el género *Candida* fue del 50%, en lo que refiere a los aislados realizados en mujeres sin diagnóstico de candidiasis vaginal. El 21,1% de la población estudiada resultó positiva para candidiasis vaginal. La prevalencia de candidiasis vaginal estuvo en el rango de 9 al 5% en el estudio de Rathod y col. [40]. y en el estudio de Andrioli y col. estuvo en un 47,9% [18]. Entre los factores de riesgo importantes para la colonización, fueron más frecuentes los relacionados con materiales de vestir, capaces de generar calor, tanto para ropa exterior como interior, mientras que en las mujeres con candidiasis vaginal el más frecuente fue el uso de lubricantes vaginales. En el estudio realizado por Andrioli y col. en Brasil la ropa fue uno de los aspectos diferenciales en los grupos que estudiaron [18]. Las cepas resultaron en su mayoría sensibles frente al fluconazol, el antifúngico más comúnmente utilizado. Duque y col. aunque en su estudio utilizaron ATBfungus, igualmente reportaron sensibilidad frente al fluconazol para todos sus aislados, [19].

## CONCLUSIONES

- La frecuencia de colonización por el género *Candida* en la población fue relativamente alta con un 50%. Hubo correspondencia en la hipótesis de este trabajo sobre la especie más frecuentemente aislada pero no con respecto a la segunda especie hallada.
- El diagnóstico de CVV solo se estableció en el 21,1% de la población estudiada. La interpretación de los síntomas y signos de las pacientes no son suficientes para el diagnóstico correcto de la vulvovaginitis porque no se encontró una alta concordancia entre el diagnóstico emitido por el médico y los resultados de los análisis de laboratorio clínico, ya que en muchos casos se trataba de biota intermedia.
- La colonización por el género *Candida* fue más frecuente en las pacientes que usaban ropa confeccionada con materiales que generaban calor, mientras que en las pacientes con CVV el factor más frecuente fue el uso de lubricantes vaginales.
- La mayoría de las cepas evaluadas fueron sensibles a fluconazol por lo que no hubo concordancia con la hipótesis de hallar resistencia en el 40% de los aislamientos.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Lopez-Martinez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol.* 2010;28(2):178-84.
2. Klepser ME. Candida resistance and its clinical relevance. *Pharmacotherapy.* 2006;26(6 Pt 2):68S-75S.
3. Bader MS, Lai SM, Kumar V, Hinthorn D. Candidemia in patients with diabetes mellitus: epidemiology and predictors of mortality. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(11-12):860-4.
4. Eyerich K, Eyerich S, Hiller J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C. Chronic mucocutaneous candidiasis, from bench to bedside. *Eur J Dermatol.* 2010;20(3):260-5.
5. Gligorov J, Bastit L, Gervais H, Henni M, Kahila W, Lepille D, et al. Prevalence and treatment management of oropharyngeal candidiasis in cancer patients: results of the French CANDIDOSCOPE study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;80(2):532-9.
6. Sensoy G, Belet N. Invasive Candida infections in solid organ transplant recipient children. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(3):317-24.
7. Abu-Elteen KH, Abdul Malek AM, Abdul Wahid NA. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast isolates in Jordan. *Mycoses.* 1997;40(5-6):179-85.
8. Anwar KP, Malik A, Subhan KH. Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran J Microbiol.* 2012;4(4):204-9.
9. Amouri I, Sellami H., Borji N., Abbes S., Sellami A., Cheikhrouhou F., et al. . Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia. *Mycoses* 2010;54:e499–e505.
10. Fischer G, Bradford J. Vulvovaginal candidiasis in postmenopausal women: the role of hormone replacement therapy. *J Low Genit Tract Dis.* 2011;15(4):263-7.
11. Mendling W, Brasch J. Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the german society for gynecology and obstetrics, the working group for infections and infectimmunology in gynecology and obstetrics, the german society of dermatology, the board of german dermatologists and the german speaking mycological society. *Mycoses.* 2012;55 (Suppl. 3):1-13.
12. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in Candida species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(4):208-10.
13. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. *Mycoses.* 2005;48(6):365-77.
14. Tamura NK, Negri MF, Bonassoli LA, Svidzinski TI. [Virulence factors for Candida spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(1):91-3.
15. Yang YL. Virulence factors of Candida species. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36(4):223-8.
16. Tarry W, Fisher M, Shen S, Mawhinney M. Candida albicans: the estrogen target for vaginal colonization. *J Surg Res.* 2005;129(2):278-82.
17. Pirotta MV, Garland SM. Genital Candida species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3213-7.
18. Andrioli JL, Oliveira GS, Barreto CS, Sousa ZL, Oliveira MC, Cazorla IM, et al. [Frequency of yeasts in vaginal fluid of women with and without clinical suspicion of vulvovaginal candidiasis]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(6):300-4.
19. Duque C, Uribe, OL., Soto, AF., Alarcon, JR. Candidiasis vulvovaginal en un grupo de mujeres gestantes de Medellin, Colombia. *Infectio.* 2009;13(1):14-20.
20. Garcia Heredia M, Garcia SD, Copolillo EF, Cora Eliseth M, Barata AD, Vay CA, et al. [Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility to antifungal agents]. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38(1):9-12.

21. Rivera-Sánchez R, Flores-Paz, R. and Arriaga-Alba, M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(10):634-6.
22. Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. Performance of Chromogenic *Candida* agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Med Mycol*. 2009;48(1):29-34.
23. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 1994;32(8):1923-9.
24. Gultekin B, Yazici V, Aydin N. [Distribution of *Candida* species in vaginal specimens and evaluation of CHROMagar *Candida* medium]. *Mikrobiyol Bul*. 2005;39(3):319-24.
25. Guzel AB, Ilkit M, Akar T, Burgut R, Demir SC. Evaluation of risk factors in patients with vulvovaginal candidiasis and the value of chromID *Candida* agar versus CHROMagar *Candida* for recovery and presumptive identification of vaginal yeast species. *Med Mycol*. 2010;49(1):16-25.
26. Merenstein D, Hu H, Wang C, Hamilton P, Blackmon M, Chen H, et al. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and noninfected women. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;29(1):30-4.
27. Mahmoudi Rad M, Zafarghandi A, Amel Zabihi M, Tavallae M, Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2012;2012:872169.
28. Pincus DH, Orenge S, Chatellier S. Yeast identification--past, present, and future methods. *Med Mycol*. 2007;45(2):97-121.
29. Liguori G, Di Onofrio, V., Galle, F., Lucariello, A., Albano, L., Catania, M. R., , Guida M. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *J Prev Med Hyg*. 2011;51(3):121-4.
30. Carvalho A, Costa-De-Oliveira, S., Martins, M. L., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Ludovico, P., Rodrigues, F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol*. 2007;45(7):619-27.
31. Goswami D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Miglani S, Lattif AA, et al. Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy. *J Infect*. 2006;52(2):111-7.
32. Fan SR, Liu XP. In vitro fluconazole and nystatin susceptibility and clinical outcome in complicated vulvovaginal candidosis. *Mycoses*. 2010;54(6):501-5.
33. Ozcan SK, Budak, F., Yucesoy, G., Susever, S., Willke, A. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS*. 2006;114(2):139-45.
34. Iavazzo C, Gkegkes ID, Zarkada IM, Falagas ME. Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. *J Womens Health (Larchmt)*. 2011;20(8):1245-55.
35. Sekhavat L, Tabatabaai A, Tezerjani FZ. Oral fluconazole 150 mg single dose versus intra-vaginal clotrimazole treatment of acute vulvovaginal candidiasis. *J Infect Public Health*. 2011;4(4):195-9.
36. Vera LM, López, N., Arámbula, A. L. Validez y reproducibilidad del sistema de puntuación de Nugent para el diagnóstico de vaginosis bacterianas en mujeres embarazadas. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2009;75(5):286-91.
37. Buscemi L, Arechavala, A., Negróni, R., . Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:177-81.
38. Alves DC, Cassamassimo, M.T., Da Silva, M.G., Garcia de Lima, C.M. Alteración de la flora vaginal en gestantes de bajo riesgo atendidas en servicio público de salud: prevalencia y asociación a la sintomatología y hallazgos del examen ginecológico. *Rev Latino-Am*

- Emfermagem. 2010;18(5):1-9.
39. Hiller SL, Krohn, M.A, Nugent, R.P., Gibbs, R.S. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by gram stain among pregnant women. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(3):938-44.
  40. Rathod SD, Klausner JD, Krupp K, Reingold AL, Madhivanan P. Epidemiologic features of Vulvovaginal Candidiasis among reproductive-age women in India. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012;2012:859071.
  41. Duarte A, Marquez, A., Araujo, C., Perez, C. Modalidades de la prueba de tubo germinal. *Rev Soc Ven Microb.* 2009;29:66-8.
  42. Pineda G, Scollo, K., Santiso, G., Lehmann, E., Arechavala, A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. *Rev Argen Microb.* 2008;40(211-17).
  43. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada.* 4 ed. México: McGraw-Hill Companies; 2011. 417.
  44. Millar BC, Jiru, X., Moore, J. E., Earle, J. A. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods.* 2000;42(2):139-47.
  45. CLSI. M27 A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test of Yeasts, Approved Standard- Third edition. Clinical and Laboratory Standards Committee Institute. 2008.
  46. CLSI. M27-S4, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Committee Institute. 2012.
  47. Rivero M, Diaz, J., Centeno, S. Frecuencia de especies de *Candida* aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003;3(2).

# ***ANEXOS***

**COLONIZACION Y CANDIDIASIS VAGINAL.**

**Código:**

**INSTITUCION:** \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**CUESTIONARIO**

Nombres: \_\_\_\_\_ .ID: \_\_\_\_\_ .Edad: \_\_\_\_\_ .Municipio \_\_\_\_\_  
 \_Tel \_\_\_\_\_

No.Hijos \_\_\_\_\_ Relaciones sexuales actuales SI ( ) NO ( ) Está embarazada SI ( ) NO ( )  
 Semanas de gestación \_\_\_\_\_ Fecha Primera menstruación: \_\_\_\_\_ Fecha de  
 última menstruación: \_\_\_\_\_ Total Años de estudio \_\_\_\_\_  
 Actividad Laboral: Ama de casa ( ), Oficina ( ), Comerciante ( ), Obrera ( ), Jubilada ( ),  
 Deportista ( ),  
 Profesional ( )

**SINTOMAS ACTUALES**

Flujo \_\_\_\_\_ Ardor \_\_\_\_\_ Erupciones en área genital \_\_\_\_\_ Prurito (picor) \_\_\_\_\_  
 Enrojecimiento \_\_\_\_\_ mal olor genital \_\_\_\_\_ Dolor con relaciones sexuales \_\_\_\_\_

**PRESENTACIÓN DE SINTOMAS ACTUALES**

Primera vez \_\_\_\_\_ Segunda vez \_\_\_\_\_ 3-5 veces \_\_\_\_\_ 6 o más veces \_\_\_\_\_

**ESTILO DE VIDA**

Usted utiliza con frecuencia (Marque si o no debajo de la casilla correspondiente)									
Duchas vaginales		Ropa ajustada tipo Lycra		Ropa ajustada de Jean		Ropa interior negra		Gel vaginal protector	
SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
Lubricantes vaginales		Condomes		Ovulos anticonceptivos		Protectores diarios		Ropa interior de Lycra	
SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO

**DIETA**

Usted consume alimentos azucarados ( Postres, dulces, galletas, pan, helados, chocolates)						
No recuerda	No consume	Muy ocasionalmente (una o dos veces por año)	Una vez al mes	Dos veces al mes	Una vez a la semana	Dos veces por semana
Una vez al día	2 veces al día	3 veces al día	Más de 3 veces al día			

**EN EL ÚLTIMO AÑO LE HAN REALIZADO**

**CITOLOGIA:** SI ( ) NO ( ). El resultado de su citología ha sido: Negativo ( ) Positivo ( )

Frotis vaginal		Si le han realizado frotis vaginal en el último año se lo han realizado				
SI	NO	1 vez	2 veces	3 veces	4 veces	Más de cuatro veces

En el último año le han diagnosticado candidiasis, moniliasis, micosis vaginales				
Ninguna vez	Una vez	Dos veces	Tres veces	Cuatro veces

Le han recetado cremas u óvulos		Le han recetado alguna de estas cremas, óvulos o baños:( Marque sobre el/los medicamento/s)							
SI	NO	Clotrimazol	Nistatina/ metronidazol	Isoconazol	Canesten	Icaden	Metrozin	Gynoflor	Lomecan Otro
		Benzirin Rosa	Otros: Cuál?						

Le han diagnosticado infecciones vaginales: (Marque sobre la enfermedad)						
Hongos	Herpes	Clamidias	Tricomonas	Vaginosis bacterianas	Candidiasis	Otras

En la actualidad le han diagnosticado:						
Diabetes	Lupus	Cáncer	Alergias	Dermatitis atópica	Liquen plano	VIH

En la actualidad recibe tratamiento con:				
Anticonceptivos	Diane35	Atorvastatina	Gemfibrozilo	Lovastatina
Meloxicam	Piroxicam	Ibuprofeno	Losartan	Enalapril_
Dolex	Alprazolam	Fluoxetina	Amitriptilina	Carbamazepina
Amprenavir	Ritonavir	Ciprofloxacina	Norfloxacina	Penicilinas
Aspirina	Acetaminofen	Antirretrovirales	Estrógenos	Isoflavonas
Antibióticos	Naproxeno			

**HALLAZGOS CLINICOS:**

FLUJO	Blanco	Amarillo	Gris	Espeso	Fluido	Grumoso	Inodoro	Fétido
VULVA	Normal	Edema	Ulcerada	Eritema	Puntos rojos			
VAGINA	Normal	Seudomembranas blancas	Eritematosa	Dolorosa				
CERVIX	Sano	Eritema	Edema	Ulceras				

**DIAGNOSTICO CLÍNICO**

CANDIDIASIS	
TRICOMONIASIS	
VAGINOSIS BACTERIANA	
CLAMIDIASIS	
HERPES SIMPLEX	

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Fecha \_\_\_\_\_

### Muestra 1. Examen directo y cultivo

La muestra se deposita en solución salina esteril al 0.85% para cultivo posterior y se toma una muestra

#### Observación en fresco:

<i>Trichomonas vaginalis</i>		Hematíes	
Bacterias		Leucocitos	
Levaduras		Células epiteliales	
Blastosporas		Células guía	
Seudomicelio		<b>Notas:</b>	
Hifas			

Prueba de aminas (KOH 10%)	Positiva	Negativa
<b>pH</b>		

### Muestra 2. Tinciones( SE HACE EXTENDIDO EN DOS PORTAOBJETOS)

Tinción con Giemsa:	<i>Trichomonas vaginalis</i>		SI		NO	
Tinción de Gram:	Levaduras		Diplococos		Célula guía	
	Blastoconidias		Bacilos		<b>Notas:</b>	
	Seudomicelio		Bacterias coreniformes			
	Hifas		Cocos			

## IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Código Muestra \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_\_

### CHROMagar candida

Verde	Azul	Rosa	Rosa seca	Lila	Blanca

Compatible con: \_\_\_\_\_

Prueba del tubo germinal en suero: Positiva \_\_\_\_\_ Negativa \_\_\_\_\_

Observación: \_\_\_\_\_

**Agar Leche:**

Observación compatible con \_\_\_\_\_

---

Otra observación \_\_\_\_\_

---

**PCR Multiplex**

*Candida albicans* \_\_\_\_\_

*Candida dubliniensis* \_\_\_\_\_

*Candida tropicalis* \_\_\_\_\_

*Candida parapsilosis* \_\_\_\_\_

*Candida guilliermondii* \_\_\_\_\_

*Candida lusitanae* \_\_\_\_\_

*Candida krusei* \_\_\_\_\_

*Candida glabrata* \_\_\_\_\_

*Candida africana* \_\_\_\_\_

**Evaluación de sensibilidad antifúngica (CMI)**

Fluconazol \_\_\_\_\_

Itraconazol este antifúngico no fue evaluado en el trabajo

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

**COMITÉ DE ETICA  
Cartagena de Indias**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACION (MAYORES DE EDAD)**

Yo, \_\_\_\_\_ CC \_\_\_\_\_ por el presente, estoy de acuerdo en participar en el estudio titulado: "IDENTIFICACION Y PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIFUNGICOS DE *Candida* spp. COLONIZANTE Y ASOCIADA A VULVOVAGINITISEN UN GRUPO DE PACIENTES DE LA CIUDAD DE CARTAGENA DE INDIAS"

He sido informado por los investigadores de los objetivos del estudio, el cual pretende *Identificar mediante estudio fenotípico y molecular, así como evaluar su susceptibilidad a antifúngicos*, las especies de *Candida* que se aislen de las muestras de flujo vaginal de pacientes de instituciones de salud de la ciudad de Cartagena de Indias. Del mismo modo me han explicado este objetivo en forma entendible para mí y han resuelto mis dudas al respecto.

La duración estimada del estudio es de **12 meses**; entiendo que los investigadores pueden detener el estudio ó mi participación en cualquier momento sin mi consentimiento. Así mismo tengo derecho a retirarme del estudio en cualquier momento.

Me han explicado que de acuerdo al literal b, artículo 11, capítulo 1, título 2 de la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio está clasificado como de **riesgo mínimo**, y en él se requiere la toma de muestras de flujo vaginal.

Mi participación en este estudio estará limitada a la toma de muestras de flujo vaginal, la cual será tomada por personal capacitado, en cantidades y frecuencias que no afectaran desfavorablemente mi estado general de salud.

Los investigadores me han explicado que no recibiré ningún beneficio personal por mi participación en este estudio. Que mi participación puede ser de beneficio para la sociedad, al contribuir a aumentar el conocimiento en el área biomédica.

Por el presente autorizo a los investigadores de éste estudio a utilizar las muestras de flujo vaginal para este estudio, y los autorizo a enviarlas a otros laboratorios, tanto nacionales como internacionales para la realización de análisis relacionados con este estudio.

Además, autorizo a los investigadores responsables a publicar la información obtenida como resultado de mi participación en este estudio, en revistas u otros medios legales, y de permitirles revisar mi historia clínica, guardando la debida CONFIDENCIALIDAD de mi nombre y apellidos.

Entiendo que todos los documentos que revelen mi identidad serán confidenciales, salvo que sean proporcionados tal como se menciona líneas arriba ó requeridos por Ley.

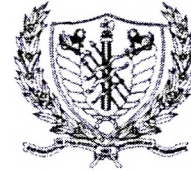
De la misma forma, en caso de requerir información adicional puedo comunicarme con el investigador principal Paola Suárez Álvarez quien labora en el Campus de Zaragocilla, Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, en la Unidad Académica de Microbiología, teléfono 6698178 ext. 140.

Firma y CC del Participante: \_\_\_\_\_ Iniciales del participante: \_\_\_\_\_

Nombre, Firma y CC del Testigo: \_\_\_\_\_

Nombre, Firma y CC del Testigo: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Investigador \_\_\_\_\_



Universidad  
de Cartagena  
Fundada en 1827

## EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

### HACE CONSTAR

Que, el proyecto titulado "IDENTIFICACIÓN Y PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE CANDIDA SPP. COLONIZANTE Y ASOCIADA A VULVOVAGINITIS EN UN GRUPO DE PACIENTES DE LA CIUDAD DE CARTAGENA DE INDIAS", presentado por **PAOLA SUAREZ ALVAREZ**, docente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, se ajusta a los requerimientos de los referentes éticos contemplados en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y al Reglamento de Ética de la Universidad de Cartagena, tal como consta en el Acta N° 72 del Comité de Ética en Investigaciones del día 22 de mayo de 2014.

Para constancia se firma en la ciudad de Cartagena, a los Veintisiete (27) días del mes de mayo del año dos mil catorce (2014).

**ALVARO OLIVERA DIAZ, MD**  
Presidente

*Mayra Martínez*



SC.CER153470



Vicerrectoría de Investigaciones  
Centro – Cra 4 No 38-40, Claustro de la Merced Telefax 6642663  
E-mail: [investigaciones@unicartagena.edu.co](mailto:investigaciones@unicartagena.edu.co) web: [www.unicartagena.edu.co](http://www.unicartagena.edu.co)  
Cartagena de Indias, D.T y C. – Colombia



NIT. 806.001.061-8

Cartagena de Indias, Junio 13 de 2014

Doctora

**PAOLA SUAREZ ALVAREZ**

Directora – Grupo de Micología

Universidad de Cartagena

Cordial Saludo,

La presente con el fin de informarle que en sesión ordinaria del día 21 de Mayo de 2014 el Comité de Ética Hospitalaria se **APROBO** desarrollo del trabajo de investigación “IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE CANDIDA SPP COLONIZANTE Y ASOCIADA A VULVOVAGINITIS EN UN GRUPO DE MUJERES DE LA CIUDAD DE CARTAGENA DE INDIAS” presentado por usted como Investigador principal.

Le recordamos que una vez finalizado el desarrollo del trabajo debe ser remitida al Comité una copia en físico de los resultados con énfasis en aquellos de relevancia para la ESE Clínica. Adicionalmente el Comité de Ética Hospitalaria de la ESE Clínica de Maternidad Rafael Calvo realizará seguimiento del desarrollo del trabajo a través de comunicaciones escritas y verbales con usted como Investigador Principal.

Atentamente



**MARTA ARMESTO ARDILA**

Subgerente científica CMRC

C.C. Archivo