



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA
HACIENDA EL MURRIETA

GOMEZCOELLO QUICHIMBO JOSE LUIS
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

NOLES RAMON KEVIN PAUL
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE
LA HACIENDA EL MURRIETA

GOMEZCOELLO QUICHIMBO JOSE LUIS
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

NOLES RAMON KEVIN PAUL
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

MACHALA
2020



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA HACIENDA EL
MURRIETA

GOMEZCOELLO QUICHIMBO JOSE LUIS
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

NOLES RAMON KEVIN PAUL
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

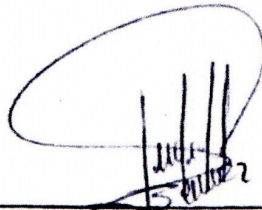
BENITEZ CASTRILLON PAOLA MERCEDES

MACHALA, 07 DE MAYO DE 2020

MACHALA
2020

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA HACIENDA EL MURRIETA, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



BENITEZ CASTRILLON PAOLA MERCEDES

1103587737

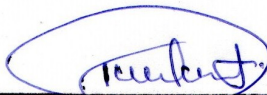
TUTOR - ESPECIALISTA 1



ALVARADO CACERES JESSICA VANESSA

0703240978

ESPECIALISTA 2



ROMERO FERNANDEZ DAYSE MARGOT

0701666836

ESPECIALISTA 3

Machala, 07 de mayo de 2020

Diagnóstico de dermatofitosis en trabajadores de la hacienda El Murrieta

INFORME DE ORIGINALIDAD

1 %	1 %	0 %	0 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.unl.edu.ec	1 %
	Fuente de Internet	

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

< 20 words

Excluir bibliografía

Apagado

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, GOMEZCOELLO QUICHIMBO JOSE LUIS y NOLES RAMON KEVIN PAUL, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA HACIENDA EL MURRIETA, otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 07 de mayo de 2020



GOMEZCOELLO QUICHIMBO JOSE LUIS
0706024544



NOLES RAMON KEVIN PAUL
0706267697

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado:

A Dios por permitirme estar con vida y salud, por guiarme por un buen camino y por ayudarme a tomar las decisiones correctas y dejarme ser la persona que ahora soy.

A mis padres: Luis Gomezcoello y Gina Quichimbo, a mi tía Teresa Gomezcoello, a mis abuelos por brindarme todo su apoyo y confiar en mi durante todo mi proceso de formación profesional y por siempre exigirme día a día para que me esfuerce y ser cada vez mejor y cumplir con esta meta.

A la BQF. Kerly Noles Z. por ser quien día a día a estado conmigo en los buenos y malos momentos dándome apoyo incondicional y desinteresado y por motivarme para ser mejor persona.

A todas las personas que de una u otra manera me han apoyado y ayudado durante toda mi carrera universitaria.

José Luis Gomezcoello Quichimbo

El presente trabajo está dedicado:

A toda la comunidad científica y en general interesada en aprender acerca de las infecciones causadas por hongos dermatofitos.

A mis padres Martha y Juan, y hermana Joselyn por todo el apoyo económico y emocional que me brindaron a lo largo de mi carrera de formación profesional.

A la BQF. Estefanía Rueda por ser una parte importante en mi vida y carrera universitaria.

A todas las demás personas que de alguna manera me ayudaron a cumplir esta meta.

Kevin Paúl Noles Ramón

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Técnica de Machala por habernos permitido formarnos dentro de sus aulas y volverse nuestra Alma Máter, al Hospital Básico No. 1 “EL ORO” por permitir el uso de su laboratorio clínico para el desarrollo experimental del trabajo.

A todos los docentes, personal técnico y administrativo que nos brindaron sus conocimientos y amistades.

Un especial agradecimiento a la Dra. Paola Benítez por brindarnos su apoyo incondicional como tutora y amiga durante la realización del trabajo de titulación, y al Sgto. Manuel Gomezcoello por el aprendizaje y apoyo en el desarrollo de la parte práctica de la investigación.

Por último, agradecemos a las señoritas Kerly Noles y Estefanía Rueda por habernos brindado su amor, cariño, apoyo y paciencia en todo el trayecto de realización del trabajo de titulación.

RESUMEN

La dermatofitosis es una infección cutáneaomucosa producida por hongos dermatofitos que afecta a más de la mitad de la población generando daños de la superficie queratinizada de la piel, uñas, cuero cabelludo y mucosas, pero sin causar daño a los tejidos subcutáneos evitando que se genere una invasión a nivel linfático. Las actividades agrícolas que se realizan en la región costa del Ecuador condicionan a los trabajadores a exponerse por periodos extensos en condiciones de temperatura y humedad que sirven como fuente para el crecimiento de microorganismos micóticos. En la actualidad el mal uso y la fácil accesibilidad que se tiene a los fármacos antimicóticos ha generado resistencia a los mismos debido a que el tratamiento que se lleva a cabo es incompleto o a su vez la dosis administrada no es la adecuada para el tipo de infección que se está tratando. Fluconazol e itraconazol son dos moléculas pertenecientes a la familia de los azoles usados para el tratamiento de afecciones cutáneo mucosas provocadas por dermatofitos y que actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol presente en la membrana celular de los hongos. La presente investigación es un trabajo descriptivo de tipo experimental en la cual se aplicaron protocolos estandarizados para el análisis microbiológico que garantizaron la calidad de los resultados obtenidos. Para este estudio se analizaron 60 muestras de uñas de trabajadores de la hacienda El Murrieta. Para la ejecución del trabajo se consideraron las tres fases se diagnosticó clínico, fase pre-analítica, analítica y post-analítica, y en base a ellos se aplicaron técnicas y métodos de identificación, cultivo y aislamiento de agentes dermatofíticos, para la cual se realizó la preparación de materiales, equipos, reactivos y medios de cultivo que fueron necesarios para el crecimiento de hongos. La observación microscópica se realizó con colorantes específicos como el hidróxido de potasio (KOH al 20%) y azul de lactofenol, las mismas que sirvieron para visualizar y diferenciar las estructuras micóticas. El cultivo de las especies se llevó en medio Agar Sabouraud Dextrosa con Cloranfenicol (Agar Micosel). El aislamiento se realizó mediante la técnica de microcultivo y, las pruebas de sensibilidad se efectuaron en Agar Müller Hinton utilizando el método de Epsilon test en el que se confrontaron fluconazol e itraconazol. Los agentes patógenos de origen micótico que fueron identificadas con KOH al 20% son: *Trichophyton rubrum* (48%), *Trichophyton mentagrophytes* (2%) y *Paecilomyces lilacinus* (17%). Se realizó el

aislamiento de las especies patógenas causantes de dermatofitosis y se visualizó las estructuras fúngicas con azul de lactofenol logrando diferenciar *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Posterior a la identificación de los hongos dermatofíticos se realizaron los ensayos de sensibilidad a las 30 muestras aisladas dando como resultado lo siguiente: *T. rubrum* 26 muestras sensibles y 3 resistentes para fluconazol, mientras que para itraconazol, 25 muestras fueron sensibles, 1 sensible dependiendo de la dosis y 3 resistentes; y *T. mentagrophytes* la única muestra analizada fue sensible a ambos fármacos. Todos estos valores fueron comparados con los puntos de corte establecidos en las normas estandarizadas de la CLSI para hongos filamentosos.

Palabras claves: Dermatofitosis, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, Microcultivo, Epsilon test, Fluconazol, Itraconazol,

ABSTRACT

Dermatophytosis is a cutaneous skin infection caused by dermatophyte fungi that affects more than half of the population causing damage to the keratinized surface of the skin, nails, scalp and mucous membranes, but without causing damage to the subcutaneous tissues preventing a lymphatic invasion. The agricultural activities carried out in the coastal region of Ecuador condition the workers to be exposed for extended periods in conditions of temperature and humidity that serve as a source for the growth of fungal microorganisms. Actually, the misuse and easy accessibility of antifungal drugs has generated resistance to them because the treatment that is carried out is incomplete or in turn the dose administered is not adequate for the type of infection that is being treated. Fluconazole and itraconazole are two molecules belonging to the family of azoles used to treat dermatophytic cutaneous diseases that act by inhibiting the synthesis of ergosterol present in the fungal cell membrane. The present investigation is a descriptive work of an experimental type in which standardized protocols for microbiological analysis were applied that guaranteed the quality of the results obtained. For this study, 60 nail samples from workers at the El Murrieta farm were analyzed. For the execution of the work, the three phases of diagnosed clinical were considered: pre-analytical, analytical and post-analytical and based on them techniques and methods were identified, culture and isolation of dermatophytic agents, for which the preparation of materials, equipment, reagents and culture media that were necessary for the growth of fungi. The microscopic observation was carried out with specific dyes such as potassium hydroxide (20% KOH) and lactophenol blue, which served to visualize and differentiate the fungal structures. The species were grown in Sabouraud Dextrose Agar medium with Chloramphenicol (Mycosel Agar). The isolation was performed using the microculture technique and, the sensitivity tests were performed in Müller Hinton Agar using the Epsilon test method in which fluconazole and itraconazole were confronted. The pathogens of fungal origin that were identified with 20% KOH are: *Trichophyton rubrum* (48%), *Trichophyton mentagrophytes* (2%) and *Paecilomyces lilacinus* (17%). Isolation of the pathogenic species causing dermatophytosis was performed and the fungal structures were visualized with lactophenol blue, differentiating *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*. After the identification of dermatophytic fungi, sensitivity tests were performed on the 30 isolated samples resulting in the following: *T. rubrum* 26 sensitive and 3 resistant samples for fluconazole, while for itraconazole, 25 samples were sensitive, 1 sensitive depending on

of dose and 3 resistant; and *T. mentagrophytes* the only sample analyzed was sensitive both drugs. All these values were compared with the cut-off points established in the standardized CLSI standards for filamentous fungi.

Keywords: Dermatophytosis, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, Microculture, Epsilon test, Fluconazole, Itraconazole,

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	11
PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVO ESPECÍFICO	15
VARIABLES	16
VARIABLE DEPENDIENTE	16
VARIABLE INDEPENDIENTE	16
CAPÍTULO I	17
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1. Definición de micosis.....	17
1.2. Micosis cutáneomucosas.....	17
1.2.1. Definición	17
1.2.2. Factores de riesgo	17
1.2.3. Dermatofitosis.....	17
1.3. Características y Morfología de las especies patógenas	18
1.3.1. <i>Trichophyton</i>	18
1.3.2. <i>Microsporum</i>	18
1.3.3. <i>Epidermophyton</i>	19
1.3.4. Otras especies contaminantes y oportunistas.....	19
1.4. Manifestaciones clínicas	19
1.4.1. Tinea corporis (Tiña del cuerpo)	19
1.4.2. Tinea cruris (tiña inguinal)	19
1.4.3. Tinea pedís (tiña del pie)	19
1.4.4. Tinea capitis (tiña del cuero cabelludo).....	20
1.4.5. Tinea unguium (tiña de las uñas).....	20
1.5. Pruebas de identificación y diagnóstico	20
1.5.1. Microscopía directa con hidróxido de potasio (KOH).....	20

1.5.2.	Aislamiento de agente patógeno	20
1.5.3.	Identificación del agente patógeno con azul de lactofenol	20
1.5.4.	Sensibilidad a los antifúngicos (Método de Epsilon test).....	21
1.6.	Antimicóticos	21
1.6.1.	Clasificación y mecanismo de acción de los antimicóticos	21
1.6.2.	Azoles	22
1.6.3.	Interacciones farmacológicas.....	22
1.7.	Respuesta inmune ante agentes fúngicos	23
1.8.	Mecanismo de resistencia de la especie patógena.....	23
CAPITULO II.....		25
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.3.	Tipo de estudio.....	25
2.4.	Lugar de desarrollo de la investigación	25
2.5.	Periodo de investigación	25
2.6.	Universo	25
2.7.	Muestra de estudio	25
2.8.	Criterios de inclusión	25
2.9.	Criterios de exclusión.....	25
2.10.	Diseño de la investigación.....	26
2.10.1.	Fase pre-analítica	26
2.10.2.	Fase analítica.....	27
2.10.3.	Fase post-analítica.....	27
CAPÍTULO III.....		29
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.3.	Resultados de la investigación	29
CAPITULO IV		34
4.	CONCLUSIONES.....	34
CAPITULO V.....		35
5.	RECOMENDACIONES	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fármacos antifúngicos contra dermatofitos	21
Cuadro 2. Interacciones entre los azoles y otros fármacos	23

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Estructura representativa de fármacos antifúngicos	22
--	----

ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1. Examen microscópico realizado a la muestra directa con KOH 20%	29
Tabla 2. Identificación de los agentes micóticos en el cultivo mixto con Agar Micosel	29
Tabla 3. Dermatofitos aislados por técnica de Ridell	30
Tabla 4. Ensayo de sensibilidad antifúngica por el método de Epsilon test	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Oficio dirigido al representante legal de la hacienda "El Murrieta"	40
Anexo 2. Oficio dirigido al jefe de Laboratorio del Hospital Básico No. 1-B1 "El Oro"	41
Anexo 3. Encuesta.....	42
Anexo 4. Consentimiento informado.....	43
Anexo 5. Protocolo de toma de muestra.....	44
Anexo 6. Protocolo de transporte y conservación de la muestra.....	45
Anexo 7. Preparación de medio de cultivo	46
Anexo 8. Protocolo para la siembra de la muestra.....	48
Anexo 9. Identificación con Hidróxido de potasio (KOH) y azul de lactofenol	49
Anexo 10. Microcultivo	50
Anexo 11. Pruebas de sensibilidad	51
Anexo 12. Registro de resultados de examen microscópico con KOH la muestra directa.....	53
Anexo 13. Registro de resultados de examen microscópico con KOH a 7 días de incubación.	54
Anexo 14. Registro de resultados de examen microscópico con azul de lactofenol a los 15 días de incubación	55
Anexo 15. Registro de resultados de las pruebas de sensibilidad	56

Anexo 16. Observación macroscópica y microscópica de <i>Trichophyton rubrum</i>	57
Anexo 17. Observación macroscópica y microscópica de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	58
Anexo 18. Tiras E-test.....	59
Anexo 19. Tabulación y procesamiento de resultados.....	60

INTRODUCCIÓN

Las micosis superficiales son las formas más frecuentes de infecciones humanas afectando al 25% de la población mundial. Se estima que entre el 30% y el 70% de los adultos son portadores asintomáticos de estos patógenos.^{1,2}

Aunque la resistencia a los hongos no está a la par con la resistencia bacteriana, las facetas económicas asociadas con las infecciones por hongos siguen siendo inaceptablemente altas. También teniendo en cuenta el número limitado de medicamentos antifúngicos disponibles, una de las principales estrategias para mejorar la terapia en micosis es superar la resistencia antifúngica.³

El Ecuador al ser un país que posee un clima cálido y húmedo como son en la región costa y oriente, es fuente propicia para la reproducción de hongos patógenos. Como país dedicado al sector agrícola (bananeras), la mayoría de los trabajadores se ven expuestos a este tipo de ambientes por tiempos prolongados donde la adquisición de algún microorganismo u hongo patógeno es casi inevitable.

El objetivo de esta investigación se basa en diagnosticar el agente patógeno causante de dermatofitosis en uñas de pie de los trabajadores de la Hacienda “El Murrieta”, la misma que será determinada mediante técnicas microbiológicas para la evaluación de la resistencia frente a fluconazol e itraconazol

PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los mayores problemas que afectan al sector agrícola del Ecuador y el mundo entero son una serie de infecciones que son producidas por microorganismos como hongos que están presentes en zonas cálidas y húmedas, en donde la exposición a estas condiciones durante periodos de tiempos prolongados puede ocasionar afecciones a la salud de las personas, es por eso que la reproducción de estos microorganismos es casi inevitable y los trabajadores que estén realizando sus actividades en estas zonas pueden verse afectados, teniendo mayor probabilidad de presentar micosis.

Estas micosis pueden ser clasificados de diferentes tipos, así como lo son las micosis superficiales que pueden generarse en pies y manos, en este caso por el uso de guantes y botas las cuales van a mantener esta área expuesta a condiciones de humedad.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los factores o condiciones que intervienen en el desarrollo de micosis cutáneomucosas y la resistencia micótica por parte del agente patógeno en los trabajadores de la hacienda “El Murrieta”?

JUSTIFICACIÓN

Las especies zoofílicas son responsables de aproximadamente el 30% de las dermatofitosis humanas y suelen causar características inflamatorias agudas. Las especies antropofílicas representan aproximadamente el 70% de las infecciones en estos hospedadores, lo que causa una infección crónica de progresión lenta, lo que sugiere que el hongo se ha adaptado al hospedador humano.¹

La rica diversidad de biomasa y climas tropicales latinoamericanos proporcionan una variedad de hábitats adecuados para diferentes microorganismos, incluidos hongos patógenos. Adicionalmente, los países de esta región tienen una gran población de los trabajadores rurales que se dedican principalmente a las actividades agrícolas y están expuestas a diversos hongos.⁴

Se debe considerar, que la falta de control en la venta de medicamentos antimicóticos ha generado resistencia de estos patógenos que en muchos casos ocasionan infecciones sistémicas más graves provocando la muerte del individuo por ineficacia del tratamiento prescrito.

Por esta razón esta investigación nos permitirá dar una solución a este problema que se genera al existir una infección por hongos en los trabajadores de la Hacienda, y a su vez evaluar la resistencia de estos agentes micóticos presente en las uñas de los pies frente a fluconazol e itraconazol.

HIPÓTESIS

Los trabajadores de la Hacienda El Murrieta presentan infecciones causadas por hongos dermatofitos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar el agente patógeno causante de dermatofitosis en uñas de pie de los trabajadores de la hacienda “El Murrieta” mediante técnicas microbiológicas para evaluar la resistencia frente a fluconazol e itraconazol.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Determinar los agentes patógenos de origen micótico presentes en uñas de pie de los trabajadores de la hacienda “El Murrieta”.
2. Identificar dermatofitos a través de técnicas de microcultivo y microscopia.
3. Evaluar la resistencia a fluconazol e Itraconazol en dermatofitos presentes en uñas de pies.

VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE

- Micosis
- Resistencia antimicótica

VARIABLE INDEPENDIENTE

- Patógeno detectado
- Trabajadores

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Definición de micosis

La micosis es considerada como una infección producida en distintas partes del cuerpo por la colonización de hongos de diferentes especies, causando daños a nivel local y sistémico⁵.

1.2. Micosis cutáneomucosas

1.2.1. Definición

La micosis cutáneomucosa es una infección provocada por hongos que producen afecciones a la piel, cuero cabelludo, uñas y mucosas, sin producir daño a los tejidos subcutáneos evitando una invasión linfática. La dermatomicosis se refiere de manera general a las infecciones micóticas producidas en la piel, y la dermatofitosis son infecciones cutáneas generadas por hongos dermatofitos de característica queratinofílicos. ⁶⁻⁸.

1.2.2. Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo que pueden aumentar la prevalencia de esta infección, así como, personas inmunocomprometidas e inmunosuprimidas, personas con problemas de obesidad, diabetes, piel seca, fumadoras e incluso personas saludables como los atletas⁵.

1.2.3. Dermatofitosis

Dentro de los principales agentes etiológicos dermatofíticos causantes de este tipo de micosis tenemos a las especies *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, aunque ocasionalmente por otras especies de levaduras y mohos no dermatofíticos⁶. Teniendo en cuenta su hábitat natural, las especies de dermatofitos se clasifican en zoofílicas, geofílicas y antropófilas⁹.

1.3. Características y Morfología de las especies patógenas

1.3.1. *Trichophyton*

Microscópicamente se puede visualizar la presencia de hifas hialinas ramificadas y septadas, además microidios parecido a un racimo de uvas (esféricos o semiesféricos). También se puede observar hifas en forma espiral y de raqueta. Macroscópicamente las colonias por lo general son planas, presentando un color crema con una textura granulosa, aterciopelada o pulverulenta. Al reverso de la placa se visualiza una pigmentación que puede ser de color amarillo, rojo café o café rosado¹⁰.

1.3.1.1. *Trichophyton rubrum*

Macroscópicamente se puede observar una morfología variable, esto depende del medio de cultivo que se utilice para realizar el aislamiento del agente micótico. Las colonias son de textura plana, algodonosa y suave con una superficie de color blanca, aunque con el tiempo se toma una coloración rosa. Al reverso se observa un color vino que puede variar a marrón y amarillo. Microscópicamente se visualiza hifas alargadas y septadas con macroconidios un poco alargados y abundantes, en ocasiones ausentes. Las microconidias son escasas y tienen forma de lagrima formándose en las hifas o cerca de las macroconidias, pero no se forman en los conidióforos¹¹⁻¹⁵.

1.3.1.2. *Trichophyton mentagrophytes*

Macroscópicamente se observa las colonias con una textura suave, plana, esponjosa o pulverulenta, la coloración de la colonia puede variar de blanco a crema. Al reverso se observa una coloración que puede variar de amarillo a color marrón rojizo. Microscópicamente se visualiza hifas septadas y algunas se presentan en forma espiral. Las macroconidias son alargadas y en ocasiones están ausentes. Las microconidias son abundantes y redondeadas presentes en los conidióforos^{13,14,16}.

1.3.2. *Microsporum*

Microscópicamente se observa conidios y abundantes hifas redondeadas. También se pueden observar hifas septadas aplicando hidróxido de potasio acompañada de lactofenol. Macroscópicamente las colonias son planas con bordes vellosos y dentados, presentando

un aspecto poco pulverulento. En el anverso de la placa se produce una pigmentación de color canela, y en el reverso una coloración ocre¹⁷.

1.3.3. *Epidermophyton*

Microscópicamente se visualizan una gran cantidad de macroconidios que pueden estar en forma de racimo o a su vez aisladas por la escasa presencia de microconidios. La pared de los macroconidios son lisas y poco gruesas, además pueden presentar varias formas. Macroscópicamente las colonias son de color amarillo verdoso, con un aspecto pulverulento y aterciopelado¹⁸.

1.3.4. Otras especies contaminantes y oportunistas

Existen algunos tipos de hongos no dermatofíticos de tipo filamentosos que ocasionan infecciones sobre el tejido epitelial como son la especie *Fusarium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Penicillium*¹⁹.

1.4. Manifestaciones clínicas

1.4.1. Tinea corporis (Tiña del cuerpo)

Es una afectación que se produce en cualquier parte del cuerpo con excepción de la planta de los pies, la ingle y de la palma de las manos. Los dermatofitos de esta tiña producen una reacción inflamatoria bien delimitada y de varios tamaños^{20,21}.

1.4.2. Tinea cruris (tiña inguinal)

Afecta al área perineal, perianal, púbica y especialmente a la región inguinal. Se produce con más frecuencia en hombres adolescentes, y en individuos que presenten una sudoración excesiva, diabetes y obesidad^{20,22}.

1.4.3. Tinea pedis (tiña del pie)

También es conocida como pie de atleta, se presenta con frecuencia en adolescentes y niños mayores. Se conocen varias firmas clínicas, como la afección interdigital que consiste en a descamación entre los dedos y descamación de la planta del pie^{20,21}.

1.4.4. Tinea capitis (tiña del cuero cabelludo)

Afectación que se produce por causa de los dermatofitos en el pelo y piel del cuero cabelludo. Se presenta con mayor frecuencia en niños entre 2 y 14 años. La afección se puede producir tanto en la superficie como dentro del pelo^{20,22}.

1.4.5. Tinea unguium (tiña de las uñas)

Es una infección que suele ser asintomática, aunque en pocas ocasiones presenta dolor y picazón del área afectada. Se produce con más frecuencia en las uñas de los pies que en las uñas de las manos^{20,21}.

1.5. Pruebas de identificación y diagnóstico

1.5.1. Microscopía directa con hidróxido de potasio (KOH)

Una infección producida por hongos se la puede identificar mediante un examen de microscopia directa, la cual permitirá la observación de ciertas estructuras micóticas. Esta identificación se la puede realizar mediante preparaciones en fresco utilizando Hidróxido de potasio (KOH) al 20% que servirá para visualizar de manera más clara las estructuras fúngicas²³⁻²⁵.

1.5.2. Aislamiento de agente patógeno

Cada agente micótico necesita diferentes tipos de requerimientos para su crecimiento, para ello deben cultivarse en medios de cultivo sólidos. El microcultivo o técnica de Ridell es un método utilizado para lograr el aislamiento del agente patógeno en estudio y sirve para observar microscópicamente las estructuras de hongos filamentosos sin que sufran ningún tipo de alteración. Los medios de cultivos más utilizados en esta técnica es el Agar Sabouraud Dextrosa o el Agar Micosel que inhibe el crecimiento de agentes micóticos ambientales y de bacterias específicamente, debido a que contiene cicloheximida o cloranfenicol en su composición^{26,27}.

1.5.3. Identificación del agente patógeno con azul de lactofenol

La tinción con azul de lactofenol es una técnica utilizada para la observación de las estructuras micóticas. El fenol actúa destruyendo sustancias que no sean de origen

micótico, el ácido láctico permite conservar todas las estructuras fúngicas que estén presentes sin distorsión y el azul de algodón va a teñir la quitina presente en la pared celular del hongo, la cual ayudará a la identificación del agente micótico^{24,25}.

1.5.4. Sensibilidad a los antifúngicos (Método de Epsilon test)

El método Epsilon test (Etest) es una técnica de difusión en disco utilizada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diferentes agentes patógenos (hongos). Esta técnica consiste en utilizar una tira de plástico de 6 centímetros de largo y 5 milímetros de ancho, compuesto por gradientes de antimicóticos en microdiluciones ya definidas, que van desde 0.016 mg/L hasta 256 mg/L dependiendo del antimicótico utilizado. El principio de este método consiste en colocar la tira Etest sobre la superficie de la placa una vez que ya este sembrado el agente micótico. Tras el proceso de incubación se observa los puntos de corte que se generan en la placa de acuerdo a normas estandarizadas para determinar si el agente micótico aislado es sensible, intermedio o resistente al antimicótico utilizado^{28,29}.

1.6. Antimicóticos

1.6.1. Clasificación y mecanismo de acción de los antimicóticos

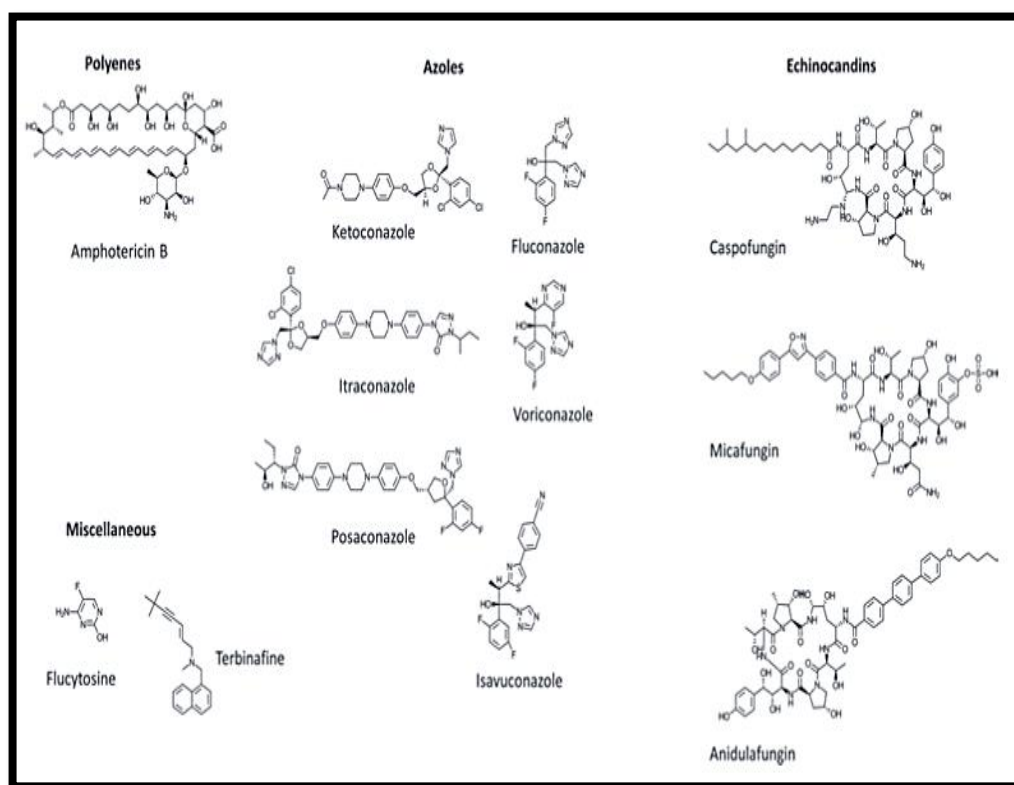
Los fármacos antifúngicos están asociados en base a su estructura química y mecanismo de acción.

Cuadro 1. Fármacos antifúngicos contra dermatofitos

Antimicótico	Sitio de acción	Blanco diana
Azoles	Biosíntesis de ergosterol	14 α -desmetilasa del citocromo P-450
Polienos	Ergosterol	Barrera de membrana
Antimetabolitos	ADN fúngico	Timidilato sintetasa
Alilaminas	Biosíntesis de ergosterol	Escualeno epoxidasa
Equinocandinas	Pared celular	Polímeros de 1,3- β -D-glucano
Griseofulvina	Aparato mitótico fúngico	Microtúbulos

Fuente: Brunton et al., 2018

Figura 1. Estructura representativa de fármacos antifúngicos



Fuente: Hospenthal, 2015

1.6.2. Azoles

Los antifúngicos azoles afectan indirectamente a la membrana celular del hongo a través de la inhibición de la biosíntesis de ergosterol. Los compuestos antifúngicos azólicos inhiben el esteroil 14 α -desmetilasa del citocromo P-450, una enzima que cataliza la eliminación oxidativa del grupo 14 α -metilo de lanosterol en la vía biosintética del ergosterol³⁰. Los fármacos más representativos incluyen los Imidazoles como el ketoconazol y miconazol; y los Triazoles como el fluconazol, voriconazol e itraconazol³.

1.6.3. Interacciones farmacológicas

Son un problema potencial entre el grupo de los azoles y otras clases de medicamentos que incluyen la ciclosporina, ciertos antihistamínicos, anticoagulantes y anticonvulsivos, hipoglucemiantes orales y otros medicamentos que se metabolizan a través de vías similares en el hígado, ya sea inhibiendo o potenciando el efecto terapéutico del antifúngico al igual que sus efectos tóxicos^{31,32}.

Cuadro 2. Interacciones entre los azoles y otros fármacos

Aumenta la concentración del fármaco	Disminuye la concentración de los azoles	Aumenta la concentración de los azoles
Ciclosporina	Carbamazepina	Claritromicina
Tacrolimús	Fenitoína	Azitromicina
Estatinas	Fenobarbital	Ritonavir
Bloqueantes de los canales de calcio	Fármacos que reducen la acidez gástrica	Jugo de Toronja

Fuente: Brunton et al., 2018

1.7. Respuesta inmune ante agentes fúngicos

Los mecanismos de defensa del huésped contra los hongos son numerosos, y van desde una inmunidad no específica hasta mecanismos adaptativos especializados y específicos que se inducen durante el desarrollo de la infección y enfermedad³³. La importancia relativa entre los mecanismos específicos de defensa innata y adaptativa difiere, dependiendo del organismo y el sitio anatómico de la infección (piel, mucosa o infección diseminada). Además, el tipo de patógeno fúngico (levadura o hifas) determina el tipo de respuesta inmune del huésped³³. Aunque, los hongos patógenos han desarrollado mecanismos para evadir las defensas del huésped, lo que permite que algunos hongos intracelulares sobrevivan dentro de los fagocitos para luego diseminarse por todo el huésped³³.

1.8. Mecanismo de resistencia de la especie patógena.

La resistencia antifúngica comprende la regulación y expresión de los mecanismos luego de estar expuestos a agentes antifúngicos, así como la baja importación y alta exportación de droga produciendo cambios que están asociados con la resistencia primaria y secundaria. En cuanto a la resistencia primaria, ciertos antifúngicos como la Flucitosina y azoles está asociada únicamente con la importación disminuida de estos fármacos. La

importación de los medicamentos puede afectarse por la composición que tienen los esteroides presentes en la membrana plasmática del hongo, como el ergosterol que se va a alterar por la acumulación de 14 α -metil esterol produciendo una disminución de la fluidez de la membrana³⁰.

Los hongos presentan bombas de flujo de salida que pueden ser de dos tipos: la primera son transportadores de casete de unión a ATP (ABC) que únicamente confiere fenotipos que producen resistencia a diferentes fármacos, y los facilitadores mayores (MF) que van a expulsar el antifúngico ingresado debido al estrecho espectro de susceptibilidad del sustrato. El sitio de unión del fármaco es otro de los mecanismos que pueden producir una resistencia antifúngica, debido a las alteraciones genéticas que se producen y que codifican el 14 α -desmetilasa por una disminución de la actividad que generan los azoles³⁰.

Los cambios que se producen en las rutas biosintéticas genera la sustitución de los esteroides presentes en la membrana por el ergosterol, pudiendo disminuir la acumulación intracelular de los azoles afectando la unión de la Anfotericina B a la membrana celular, y por ende producir una resistencia antifúngica³⁰.

En los procesos de degradación y metabolismo de los fármacos antifúngicos se producen alteraciones que son poco estudiadas con respecto a la resistencia en los hongos, sin embargo, la resistencia hacia la Flucitosina está asociada por las alteraciones generadas en la citosina desaminasa. Estudios recientes se han enfocado en el estudio de la vía metabólica de la calcineurina que provoca una gran resistencia al efecto de los agentes antifúngicos debido a una alteración en la proteína de choque térmico 90 (Hsp90)³⁰.

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3. Tipo de estudio

Para la siguiente investigación se realizó un estudio de carácter descriptivo y experimental.

2.4. Lugar de desarrollo de la investigación

Se desarrolló en la Hacienda “EL MURRIETA” ubicada en la parroquia Buenavista del Cantón Pasaje en la Provincia de El Oro.

2.5. Periodo de investigación

La investigación se realizó entre los meses de octubre 2019 y febrero 2020.

2.6. Universo

El universo de estudio estuvo constituido por 60 trabajadores de la Hacienda “El Murrieta” que laboraban en áreas donde estaban expuestos continuamente a condiciones de humedad.

2.7. Muestra de estudio

La muestra de estudio la conformó todos los trabajadores que cumplieron con criterios de inclusión.

2.8. Criterios de inclusión

- Trabajadores que firmaron el consentimiento informado.
- Trabajadores que presentaron lesiones superficiales dermatológicas.
- Trabajadores que no estaban administrándose fármacos.
- Trabajadores que estaban expuestos continuamente a humedad y que llevaban laborando por más de 1 año.

2.9. Criterios de exclusión

- Trabajadores que no desearon participar de la investigación.

2.10. Diseño de la investigación

El presente trabajo se lo realizó mediante tres fases de estudio: Fase pre-analítica, fase analítica y fase post-analítica en relación al desarrollo de un estudio clínico.

2.10.1. Fase pre-analítica

Se elaboró un oficio dirigido al representante legal de la Hacienda “El Murrieta” ubicada en la parroquia Buenavista del Cantón Pasaje, solicitando el permiso correspondiente para el desarrollo del trabajo de investigación (Anexo 1).

Se elaboró un oficio dirigido al Jefe del Laboratorio del Hospital Básico No 1 “El Oro” de la Ciudad de Pasaje el acceso y uso de las instalaciones donde se llevará a cabo el procesamiento y análisis microbiológico de las muestras (Anexo 2).

Se realizó una encuesta a cada uno de los trabajadores que se encontraban laborando en la Hacienda “El Murrieta”, mediante la cual se obtuvo información correspondiente de los mismos y posterior a ello se procedió a verificar si podían formar parte de la investigación (Anexo 3).

Firma de consentimiento informado

Se hizo firmar una hoja de consentimiento informado a todos los trabajadores que participaron en la investigación (Anexo 4).

Toma de muestra

Se realizó a los trabajadores de acuerdo al procedimiento establecido en el protocolo de toma de muestra (Anexo 5).

Transporte y conservación de la muestra

El transporte y conservación de las muestras se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el protocolo, desde la toma de muestra hasta su respectivo análisis en el laboratorio (Anexo 6).

Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo Agar Sabouraud, el cual se utilizó como un medio de enriquecimiento para el agente micótico que esté presente en las muestras recolectadas (Anexo 7).

2.10.2. Fase analítica

Siembra de la muestra

La siembra de las muestras recogidas se desarrolló utilizando cajas petri preparadas con agar sabouraud, para observar si existe la presencia de agentes micóticos (Anexo 8).

Identificación y caracterización del agente micótico

Se llevó a cabo mediante técnicas de microscopía aplicando hidróxido de potasio y azul de lactofenol (Anexo 9) a partir de las colonias que fueron aisladas para poder identificar y caracterizar el agente micótico.

Aislamiento del agente micótico identificado

El aislamiento del agente micótico se realizó mediante la técnica de microcultivos de las colonias identificadas (Anexo 10).

Pruebas de sensibilidad

Luego de aislar las cepas y haber transcurrido 72 horas del microcultivos se obtuvieron colonias lo suficientemente adecuadas para la preparación de la solución salina a una escala de 3.0 McFarland. Una vez que se llevaron a cabo las diluciones se realizaron los ensayos de sensibilidad a cada uno de los agentes micóticos aislados utilizando diferentes moléculas antimicóticas (Anexo 11).

2.10.3. Fase post-analítica

Resultados

Se realizó el registro de los resultados de: examen microscópico con KOH 20% a la muestra directa (Anexo 12), examen microscópico con KOH 20% a la muestra a los 7

días de incubación (Anexo 13), examen microscópico a las muestras aisladas con azul de lactofenol a los 15 días de incubación (Anexo 14) y pruebas de sensibilidad (Anexo 15).

Observación macroscópica y microscópica de las especies aisladas

Se realizó la observación de las especies causantes de dermatofitosis que fueron aisladas e identificadas, en el cual se obtuvo imágenes de *T. rubrum* (Anexo 16) y *T. mentagrophytes* (Anexo 17).

Lectura de las tiras E-test

Se realizó la lectura correspondiente de las cajas petri con el agente patógeno aislados y las tiras E-test de fluconazol e itraconazol, en el cual se obtuvieron los puntos de corte indicando si el agente patógeno es sensible, sensible dependiendo de la dosis o resistente a los mismos (Anexo 18).

Análisis y procesamiento de resultados

Para el análisis y procesamiento de resultados se utilizó el programa estadístico Excel (Anexo 19).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3. Resultados de la investigación

Tabla 1. Examen microscópico realizado a la muestra directa con KOH 20%

Resultado	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	44	73 %
Negativo	16	27 %
TOTAL	60	100 %

Fuente: Datos registrados de la investigación

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo, Kevin Paúl Noles Ramón

El examen microscópico directo que se realizó a las 60 muestras recogidas de uñas de pies dieron como resultado 44 muestras positivas a KOH (73%) y 16 muestras negativas a KOH (27%).

Tabla 2. Identificación de los agentes micóticos en el cultivo mixto con Agar Micosel

Especie identificada	Frecuencia	Porcentaje
<i>Trichophyton rubrum</i>	29	48 %
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	2 %
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	10	17 %
Negativo	15	25 %
Contaminadas	5	8 %
TOTAL	60	100 %

Fuente: Datos registrados de la investigación

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo, Kevin Paúl Noles Ramón

Las 60 muestras recogidas fueron cultivadas en agar dextrosa sabouraud con cloranfenicol (Agar Micosel), de las cuales se realizó la visualización de las estructuras con tinción de KOH al 20% a los 7 días de incubación para identificar el agente micótico presente, dando como resultado 29 muestras positivas a *T. rubrum* (48%), 1 muestra

positiva a *T. mentagrophytes* (2%), 10 muestras positivas a *P. lilacinus* (17%), 15 muestras reportadas como negativas (25%) y 5 muestras contaminadas (8%).

Tabla 3. Dermatofitos aislados por técnica de Ridell

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>Trichophyton rubrum</i>	29	97 %
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	3 %
TOTAL	30	100 %

Fuente: Datos registrados de la investigación

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo, Kevin Paúl Noles Ramón

Del total de 40 muestras identificadas, 30 fueron aisladas y visualizadas con azul de lactofenol a los 15 días, 29 de ellas correspondientes a *T. rubrum* (97%) presentaron colonias blancas de 1-3 cm de diámetro aproximadamente con textura plana, algodonosa y de color amarillento al reverso de la caja, además microscópicamente se observó la presencia de hifas alargadas y septadas con escasas microconidias; y 1 de ellas corresponde a *T. mentagrophytes* (3%) presentó colonias blancas de 1-3 cm de diámetro con textura suave, pulverulenta y de color marrón-rojizo al reverso de la caja. Microscópicamente se observó la presencia hifas septadas y microconidios abundantes alrededor de los conidióforos.

Tabla 4. Ensayo de sensibilidad antifúngica por el método de Epsilon test

Especie Aislada	Fluconazol (Flu)			Itraconazol (Itra)			Frecuencia (Flu)-(Itra)	%
	≤ 8	16-32	≥ 64	≤ 0.12	0.25-0.5	≥ 1		
	S	SDD	R	S	SDD	R		
<i>T. rubrum</i>	26	-	3	25	1	3	29	97%
<i>T. mentagrophytes</i>	1	-	-	1	-	-	1	3%
	TOTAL						30	100%

NOTA: S: sensibilidad SDD: sensible dependiendo de la dosis R: resistente

Fuente: Datos registrados de la investigación

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo, Kevin Paúl Noles Ramón

El estudio de sensibilidad antifúngica por el método de Epsilon test (E-test) se llevó a cabo en las 30 muestras que fueron aisladas. Se evaluó sensibilidad frente a fluconazol e

itraconazol, dando como resultado para la especie *Trichophyton rubrum*, 26 muestras sensibles y 3 resistentes a fluconazol, mientras que para itraconazol 25 muestras fueron sensibles, 1 sensible dependiendo de la dosis y 3 presentaron resistencia. Para la especie *Trichophyton mentagrophytes* la única muestra en la que se hizo el ensayo presentó sensibilidad tanto para fluconazol e itraconazol.

3.4. Discusión de resultados

La dermatofitosis es una infección causada por hongos dermatofitos del género *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*, que afectan a millones de personas a nivel mundial cuyas manifestaciones clínicas varían desde una pigmentación de uñas hasta la descamación parcial del tejido cutáneo^{1,9}.

En Sudamérica, la presencia de factores de riesgo como las inmunodeficiencias, obesidad y la edad, además de factores climáticos característicos de zonas tropicales favorecen el desarrollo de esta enfermedad. La costa ecuatoriana se caracteriza por dedicarse en su mayoría a las actividades agrícolas en las cuales los trabajadores están expuestos por periodos prolongados a condiciones que favorecen la supervivencia y desarrollo de microorganismos como los dermatofitos provocando afectaciones de tipo superficial⁵.

Los resultados obtenidos en esta investigación se basan a un estudio descriptivo de tipo experimental, que aplicando protocolos para diagnóstico de micosis cutáneomucosas partió del examen microscópico de la muestra directa con KOH al 20%, obteniéndose 44 (73%) muestras positivas para estructuras fúngica como hifas y conidios. En estudios similares realizados por Pérez, 2017 afirman que este es el mejor método de identificación de estructuras micóticas en fase inicial.

Continuando el procedimiento analítico las 60 muestras que fueron recogidas se sembraron en cajas preparadas con agar dextrosa sabouraud con cloranfenicol (Agar Micosel), las mismas que se incubaron a una temperatura de 35°C por 7 días. Considerando el tiempo establecido por el protocolo se realizó la identificación las especies, obteniendo los siguientes resultados: *T. rubrum* (48%), *T. mentagrophytes* (2%) y *P. lilacinus* (17%) utilizando la técnica de microscopía con KOH al 20% También se

obtuvieron cajas reportadas como negativas (25%) al observarse que no hubo crecimiento de colonias, y cajas contaminadas (8%).

La identificación de las especies se logró mediante el análisis de características morfológicas a nivel macroscópico y microscópico de las colonias desarrolladas. En el caso de *T. rubrum*, se visualizó colonias blancas de textura plana y algodonosas con pigmentación amarillenta al reverso de la caja, hifas alargadas y septadas con escasa presencia de microconidios. Para *T. mentagrophytes*, se observaron colonias blancas de textura suave y pulverulenta con coloración marrón-rojizo al reverso de la caja, hifas septadas con presencia abundantes de microconidios alrededor de los conidióforos. Estas características de las dos especies antes mencionadas coinciden con el estudio de Su et al., 2019 en el cual la identificación morfológica realizada es similar¹⁵. Para la especie *P. lilacinus*, se observaron colonias de color blanca-amarillenta con textura estriada y aterciopelada con presencia de exudado, hifas septadas, fiálides formadas a partir de los conidióforos y conidios encadenados, igual a los resultados obtenidos en el estudio Chen et al., 2019¹⁹.

Shi et al., 2019 emplea la técnica de Ridell para microcultivo, que permite el aislamiento de la especie que se quiere identificar a partir de un cultivo mixto²⁷. En nuestra investigación se realizó el aislamiento de las especies de interés como *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* utilizando la misma técnica de microcultivo, complementando el aislamiento a través de la aplicación del azul de lactofenol que permitió observar las características microscópicas propias de estas especies de dermatofitos.

Las pruebas de sensibilidad y resistencia a través del método E-test, evaluaron el comportamiento de las especies aisladas frente a dos fármacos empleados en el tratamiento de micosis superficiales, para este estudio se confrontó Fluconazol e Itraconazol, evidenciando los siguientes resultados: de un total de 29 muestras de *T. rubrum*; 26 mostraron sensibilidad y 3 resistencia frente a Fluconazol; mientras que para Itraconazol 25 presentaron sensibilidad, 1 sensible dependiendo de la dosis y 3 resistencia. En el caso del *T. mentagrophytes* la muestra analizada presentó sensibilidad tanto para Fluconazol e Itraconazol. Todos estos resultados están basados de acuerdo a las normas estandarizadas por el CLSI, en donde los puntos de corte para Fluconazol

consideran sensible $\leq 8\text{mg/L}$, sensible dependiendo de la dosis $16\text{-}32\text{ mg/L}$ y resistente $\geq 64\text{mg/L}$; y, para Itraconazol se establece sensible $\leq 0.12\text{mg/L}$, sensible dependiendo de la dosis $0.25\text{-}0.5\text{ mg/L}$ y resistente $\geq 1\text{mg/L}$. Estudios similares demuestran que el fluconazol sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento de micosis cutáneomucosas, como lo explica Altinbas et al., 2018 quienes utilizando el mismo método de sensibilidad obtuvieron los siguientes resultados. De las 66 muestras analizadas, 55 presentaron sensibilidad a fluconazol y 2 dos muestras sensibles a itraconazol³.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el cultivo de las 60 muestras de uñas recogidas de los trabajadores de la Hacienda El Murrieta se logró identificar los agentes patógenos de origen micótico a través de la técnica de microscopía con KOH al 20%, en donde se obtuvo como resultado la presencia de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Paecilomyces lilacinus*.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron a través de la técnica de microcultivo y microscopía con azul de lactofenol se pudo identificar las especies dermatofíticas *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* causante de micosis cutáneomucosas.

Con las especies dermatofíticas identificadas se evaluó la resistencia utilizando el método de Epsilon en el cual se comprobó fluconazol vs itraconazol, dando como resultado lo siguiente: *T. rubrum* 26 muestras sensibles y 3 resistentes para fluconazol, mientras que para itraconazol, 25 muestras fueron sensibles, 1 sensible dependiendo de la dosis y 3 resistentes; y *T. mentagrophytes* la única muestra analizada fue sensible ambos fármacos. Por lo que queda demostrado la efectividad del fluconazol para el tratamiento de este tipo de micosis.

CAPITULO V

5. RECOMENDACIONES

Complementar el estudio de caracterización con ensayos bioquímicos y moleculares para la identificación de la filogenia de las especies estudiadas.

Evaluar la resistencia de las especies aisladas, empleando otros métodos de identificación de sensibilidad y resistencia micótica, así como la evaluación de la eficacia de nuevos fármacos antifúngicos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Pai, V., Ganavalli, A., & Kikkeri, N. N. Antifungal Resistance in Dermatology. *Indian J. Dermatol.* **2018**, 63 (5), 361-368. https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_131_17.
- (2) Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.; Denning, D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi* **2017**, 3 (4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- (3) Kumar Nigam, P. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. *Our Dermatology Online* **2015**, 6 (2), 212-221. <https://doi.org/10.7241/ourd.20152.58>.
- (4) Colombo, A. L.; Tobn, A.; Restrepo, A.; Queiroz-Telles, F.; Nucci, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med. Mycol.* **2011**, 49 (8), 785-798. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821>.
- (5) Costa, M. C.; de Sá, N. P.; Johann, S.; Santos, D. A. Social , environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in. *New Microbes New Infect.* **2019**, 29, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.11.004>.
- (6) Sabogal, M.; Jiménez, H.; Morales, C.; Alvarado, Z.; Colmenares, C. Micosis en los pies : descripción clínico-epidemiológica en un centro de referencia de Bogotá, Colombia. *Infectio* **2019**, 23 (1), 39-44.
- (7) Santos, R. S.; Loureiro, K.; Rezende, P.; Nalone, L.; Barbosa, R. D. M.; Santini, A.; Santos, A. C.; Silva, F.; Souto, E. B.; Souza, D. P. De; et al. Innovative nanocompounds for cutaneous administration of classical antifungal drugs: a systematic review. *J. Dermatolog. Treat.* **2018**, 1-38. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1479726>.
- (8) Prats, G. Micología. En *Microbiología Clínica*; Médica Panamericana: Madrid, 2005; pp 83-107.
- (9) Sardana, K.; Kaur, R.; Arora, P.; Goyal, R.; Ghunawat, S. Is Antifungal Resistance a Cause for Treatment Failure in Dermatophytosis : A Study Focused on Tinea Corporis and Cruris from a Tertiary Centre ? *Indian Dermatol. Online J.* **2018**, 9 (2), 90-95. <https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ>.
- (10) Rivas, L.; Mühlhauser, M. Complejo Trichophyton mentagrophytes. *Rev. Chil. Infectología* **2015**, 32 (3), 319-320.
- (11) Mayorga, J.; De León-Ramírez, Y. Prevalencia de dermatofitosis producidas por Trichophyton. *Dermatol Rev Mex* **2017**, 61 (2), 108-114.

- (12) Angulo, A. G.; Bravo, N.; Falco, A.; Pulido, A. M.; Rivera, Z.; Cavallera, E. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. *Dermatología Venez.* **2008**, *46*, 12-17.
- (13) Indian Council of Medical Research. Standard Operating Procedures for Fungal Identification and Detection of Antifungal Resistance, 2019.
- (14) Tartabini, M. L.; Bonino, G. S.; Racca, L. Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton* en Rosario, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **2013**, *45* (4), 248-253. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70031-2](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70031-2).
- (15) Su, H.; Packeu, A.; Ahmed, S. A.; Al-hatmi, A. M. S.; Blechert, O.; Hagen, F.; Liu, W.; Deng, S.; Hendrickx, M.; Xu, J.; et al. Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, N.º 12, 1-37. <https://doi.org/10.1128/JCM.00352-19>.
- (16) Maikhan, H. K.; Mohammad-amin, S. M.; Tawfeeq, H. M. Morphological and Molecular Identification of *Trichophyton mentagrophytes* Isolated from Dermatophytes Patients in Garmian Area. *J. Pure Appl. Sci.* **2018**, *30* (4), 1-10. <https://doi.org/10.21271/ZJPAS.30.4.1>.
- (17) Garc, L.; Espinosa-ruiz, J. J. Tiña capitis por *Microsporum gypseum*, una especie infrecuente. *Arch. Argentino Pediatría* **2018**, *116* (2), e296-e299. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.e296>.
- (18) Cruz, R.; Carvajal, L. Frecuencia de *Epidermophyton floccosum* en dermatofitos aislados en un laboratorio de la Región de Valparaíso, Chile. Período 1980-2010. **2018**, *35* (3), 262-265.
- (19) Chen, Y.; Yeh, L.; Ma, D. H. K.; Lin, H.; Sun, C.; Tan, H.; Chen, H.; Chen, S.; Sun, P.; Hsiao, C. *Paecilomyces / Purpureocillium keratitis* : A consecutive study with a case series and literature review. *Med. Mycol.* **2019**, *0*, 1-7. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz059>.
- (20) Conejo, A.; Martínez, A.; Ramírez, O.; Álvez, F.; Hernández, A.; Baquero, F.; Alfayate, S.; Piñeiro, R.; Cilleruelo; et al. Documento de consenso SEIP-AEPap-SEPEAP sobre la etiología, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones cutáneas. *Rev. Pediátrica en Atención Primaria* **2016**, *18*, e149-e172.
- (21) Brooks, G.; Carrol, K.; Butel, J. *Jawetz, Melnick y Adelberg: Microbiología médica*, 27e ed.; McGraw-Hill Interamericana, 2016.
- (22) Murray, P.; Rosenthal, K.; Pfaller, M. *Microbiología Médica*, 8a ed.; Elsevier, 2017.

- (23) Llovo, J.; Pontón, J. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. En *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*; Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio, M., Eds.; 2007; p 30.
- (24) Morales Restrepo, N.; Cardona-Castro, N. Métodos de diagnóstico en micología. *Ces Med.* **2018**, *32* (1), 41-52. <https://doi.org/10.21615/cesmedicina.32.1.5>.
- (25) Pérez, J.; Casado, I.; Santiago, F. Técnica de examen directo de la onicomycosis mediante microscopía con hidróxido de potasio. *Rev. Española Podol.* **2017**, *28* (1), 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.repod.2017.01.001>.
- (26) Noman, E.; Al-Gheethi, A.; Rahman, N.; Talip, B.; Mohamed, R.; Kadir, O. Single Spore Isolation as a Simple and Efficient Technique to obtain fungal pure culture. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2018**, *140* (12055), 1-6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/140/1/012055>.
- (27) Shi, X.; Qiu, H.; Id, J. W.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Sun, C. A handy method to remove bacterial contamination from fungal cultures. *PLoS One* **2019**, *14* (11), e0224635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224635>.
- (28) Intra, J.; Sarto, C.; Mazzola, S.; Fania, C.; Tiberti, N. In Vitro Activity of Antifungal Drugs Against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* spp . by E-Test Method and Non-supplemented Mueller – Hinton Agar Plates. *Mycopathologia* **2019**, *184* (4), 517-523. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00360-9>.
- (29) Alastruey-Izquierdo, A.; Melhem, M.; Bonfietti, L.; Rodríguez-Tudela, J. SUSCEPTIBILITY TEST FOR FUNGI : CLINICAL AND LABORATORIAL CORRELATIONS IN MEDICAL. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2015**, *57* (19), 57-64. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700011>.
- (30) Hospenthal, D.; Rinaldi, M. *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections*, Second edi.; Springer, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13090-3>.
- (31) Brunton, L.; Hilal-Dandan, R.; Knollman, B. *Goodman E Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica*, 13a ed.; McGraw-Hill Interamericana: México, 2018.
- (32) Ali, F.; Akbar, A.; Raiesi, O. Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *J. Basic Res. Med. Sci.* **2018**, *5* (2), 48-55. <https://doi.org/10.29252/jbrms.5.2.48>.

- (33) Guidry, J.; Kollipara, R.; Downing, C.; Lee, M.; Tying, S. K. Fungal Infections. En *Clinical and Basic Immunodermatology*; Springer International Publishing, 2017; pp 325-357. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29785-9>.
- (34) Altınbaş, R.; Özakkaş, F.; Bariş, A.; Turan, D.; Şen, S. In vitro susceptibility of seven antifungal agents against dermatophytes isolated in İstanbul. *Turk J Med Sci* **2018**, *48*, 615-619. <https://doi.org/10.3906/sag-1709-157>.
- (35) Bueno, N. *Recomendaciones para la obtención de muestras y cultivos fúngicos*; 2015.
- (36) Araiza, J.; Hernández, A. Procedimientos y técnicas de diagnóstico. En *Micología Médica Básica 5ed.*; McGraw-Hill Interamericana, 2015; pp 420-510.
- (37) Laboratorios Britania. Sabouraud Glucosado Agar, 2015.
- (38) Universidad Nacional de la Patagonia. *Micología: Microbiología Ambiental*; 2017.
- (39) Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3a, 2018.
- (40) Cantón, E.; Martín, E.; Espinel-Ingroff, A. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*; Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., Rubio, M., Eds.; 2007; p 24.

Anexo 1. Oficio dirigido al representante legal de la hacienda “El Murrieta”



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
“Calidad Pertinencia y Calidez”
D.L.Nº 69-04, DE 14 DE ABRIL DEL 1969
PROV. DE EL ORO-REP. DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Buenavista, 04 de Diciembre del 2019

Sra. Lucía Esperanza Quichimbo Hoyos

ADMINISTRADORA DE LA HACIENDA “EL MURRIETA”

De nuestras consideraciones

Nosotros, José Luis Gomezcoello Quichimbo y Kevin Paúl Noles Ramón, de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Técnica de Machala, por medio de la presente nos dirigimos a usted para expresarle un fraternal saludo y a la vez desearle éxitos en sus funciones.

Le solicitamos de la manera más comedida se nos autorice el permiso correspondiente para realizar el proyecto de tesis denominado: **DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA HACIENDA “EL MURRIETA”**, en el cual la muestra de estudio estará conformada por los trabajadores que estén bajo su cargo.

Por la atención que le conceda a la presente, le anticipamos nuestros sinceros agradecimientos.

Atentamente,

José Luis Gomezcoello Quichimbo
Estudiante de la Carrera de
Bioquímica y Farmacia

Kevin Paúl Noles Ramón
Estudiante de la Carrera de
Bioquímica y Farmacia

Anexo 2. Oficio dirigido al jefe de Laboratorio Clínico del Hospital Básico No. 1-B1 "El Oro"



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
"Calidad Pertinencia y Calidez"
D.L.N° 69-04, DE 14 DE ABRIL DEL 1969
PROV. DE EL ORO-REP. DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Pasaje, 27 de Diciembre del 2019

SGOP DE SND. GOMEZCOELLO G. MANUEL A.

JEFE DE LABORATORIO DEL HOSPITAL BASICO No. 1-B1 "EL ORO"

De nuestras consideraciones

Nosotros, José Luis Gomezcoello Quichimbo y Kevin Paúl Noles Ramón, de la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Técnica de Machala, por medio de la presente nos dirigimos a usted para expresarle un fraterno saludo y a la vez deseárselo éxitos en sus funciones.

Le solicitamos de la manera más comedida se nos autorice el permiso correspondiente para realizar el procesamiento y análisis de las muestras en el **LABORATORIO DEL HOSPITAL BASICO No. 1-B1 "EL ORO"**, y a su vez, utilizar los equipos para llevar a cabo nuestro proyecto de tesis denominado: **DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA HACIENDA "EL MURRIETA"**.

Por la atención que le conceda a la presente, le anticipamos nuestros sinceros agradecimientos.

Atentamente,

José Luis Gomezcoello Quichimbo

Estudiante de la Carrera de
Bioquímica y Farmacia

Kevin Paúl Noles Ramón

Estudiante de la Carrera de
Bioquímica y Farmacia

Anexo 3. Encuesta



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
"Calidad Pertinencia y Calidez"
D.L.Nº 69-04, DE 14 DE ABRIL DEL 1969
PROV. DE EL ORO-REP. DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ENCUESTA

TEMA DE TRABAJO: Diagnóstico de dermatofitosis en trabajadores de la Hacienda "El Murrieta"

El objetivo de la siguiente encuesta es para recolectar información acerca de los trabajadores que forman parte del estudio, cuyos datos serán utilizados únicamente para fines académicos.

N. de paciente: _____

Edad: _____ años

Sexo:

- Hombre () - Mujer ()

¿Qué tiempo lleva laborando en la hacienda?

- Menos de 1 año () - Más de 1 año ()

¿Conoce lo que es una onicomicosis, tiña de la uña o tiña unguium?

- SI () - NO ()

¿Ha presentado alguno de estos signos o características en las uñas del pie?

- Color negro () - Color Amarillo ()
- Aspecto quebradizo () - Engrosamiento ()

¿Está llevando a cabo algún tratamiento farmacológico contra hongos?

- SI () - NO ()

En caso de responder SI a la pregunta anterior, indique el nombre del que medicamento que se está administrando.

¡GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!

Anexo 4. Consentimiento informado



Fecha:/...../.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, con número de cédula declaro que he sido informado del estudio denominado **“DIAGNÓSTICO DE DERMATOFITOSIS EN TRABAJADORES DE LA HACIENDA “EL MURRIETA”**.

1. Mi participación en esta investigación es de manera voluntaria.
2. La muestra recolectada será utilizada para determinar si existe la presencia de agentes micóticos (hongos).
3. Todos los resultados obtenidos de los análisis serán confidenciales.
4. Los investigadores no tendrán ninguna clase de beneficio económico con la elaboración de este proyecto de tesis sin mi autorización.

Yo, como sujeto de estudio me comprometo a que toda la información que se obtenga será ajustada a la verdad.

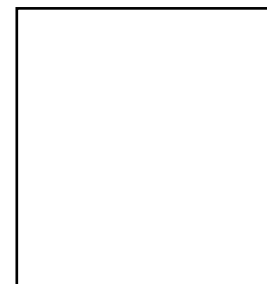
De esta manera declaro que estoy de acuerdo con lo descrito anteriormente y que participo de manera voluntaria sin ser sometido a ninguna intervención. En constancia procedo a firmar a continuación.

Nombre:

N° de Cédula:

FIRMA:

HUELLA DIGITAL (En caso que el paciente no sepa leer ni escribir).



Anexo 5. Protocolo de toma de muestra

Existen métodos muy eficaces para realizar una correcta recolección de muestra, entre ellos ^{24,35}:

Cinta adhesiva transparente

- Cortar aproximadamente 10 centímetros de cinta adhesiva transparente.
- Aplicar y presionar la parte engomada de la cinta sobre el área donde se encuentra la lesión para que de esta manera las escamas de la zona se adhieran.
- Retirar la cinta que se aplicó en la zona donde se está recolectando la muestra.
- Seguidamente se aplica la cinta sobre un portaobjeto que esté limpio, asegurándose que no se despegue.
- La muestra recolectada debe ser enviada al laboratorio para su posterior análisis.
- Es recomendable tomar la muestra en dos o tres cintas adhesivas.

Raspado

- Raspar el borde de la lesión con ayuda de un bisturí o el borde de un portaobjeto debidamente esterilizado.
- En el caso de ser una zona donde se presenten lesiones vesiculosas, se debe mover estas vesículas con ayuda del bisturí y proceder a la recolección de la muestra.
- Se recoge una cantidad suficiente de muestra para que el análisis en el laboratorio no se dificulte.
- La muestra recolectada debe ser depositada en contenedores estériles y se debe enviar al laboratorio en un periodo de hasta dos horas una vez recolectada, ya que luego de ese tiempo el crecimiento de las colonias puede ser limitada y escaso.

Anexo 6. Protocolo de transporte y conservación de la muestra

Todas las muestras recolectadas que ingresen al laboratorio deben cumplir ciertas condiciones de las cuales dependerá la calidad de los resultados³⁶.

- Las muestras recolectadas para realizar el diagnóstico de micosis deben ser transportadas en recipientes totalmente sellados para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Algunos recipientes que se utilizan en el transporte de la muestra pueden ser: tubos esterilizados con tapa rosca, jeringuillas, frascos esterilizados con boca ancha, cajas petri.
- Cuando se haga la recolección de una muestra de tejido como es el caso de las biopsias, se recomienda dividir la muestra y colocar un parte en una solución con formol para realizar un estudio histopatológico, y el restante de la muestra en una solución con solución salina estéril para realizar el estudio micológico.
- Las muestras recolectadas deben ser conservadas a una temperatura de 4 °C, siempre y cuando el traslado de la muestra sea más de cuatro horas, para de esta manera evitar contaminación.

Anexo 7. Preparación de medio de cultivo

AGAR DEXTROSA SABOURAUD CON CLORANFENICOL³⁷

Fundamento

Es un medio recomendado para el desarrollo de agentes micóticos que están asociados con infecciones producidas en la piel, pelo y uñas. El medio está compuesto por los nutrientes necesarios para el crecimiento de los hongos, tales como: la triptonga, peptona y glucosa. El cloranfenicol, glucosa y el pH ácido del medio, evitan el crecimiento de bacterias y favorecen el desarrollo de hongos.

Uso

Es un medio de cultivo considerado como selectivo y es utilizado para la identificación y aislamiento de agentes micóticos.

Instrucciones

Preparación

- En un recipiente de 1000 mL suspender 65 g del polvo de medio agar dextrosa sabouraud con cloranfenicol en 1 litro de agua debidamente purificada.
- Dejar en reposo durante 5 minutos y remover hasta que la mezcla sea uniforme.
- Calentar la muestra agitando y hervir la misma durante 1 minuto hasta lograr una disolución completa.
- Realizar la suspensión del medio preparado en los recipientes destinados (Cajas petri debidamente esterilizadas).
- El medio de cultivo estará listo para la siembra de la muestra

Almacenamiento

Medio deshidratado

- El almacenamiento será a una temperatura de 10°C a 35°C.

Medio Preparado

- El almacenamiento será a una temperatura de 2°C a 8°C.

Incubación

Para lograr una correcta incubación se deberá seguir las siguientes condiciones:

- De manera general la incubación debe ser de 2 a 4 semanas.
- En el caso que se quiera hacer la identificación de hongos pertenecientes a la familia de los dermatofitos la incubación debe ser de 3 a 4 semanas, y el cultivo deberá ser examinado cada 7 días.

Anexo 8. Protocolo para la siembra de la muestra

Para realizar el cultivo de muestras que contienen hongos superficiales se requiere del uso de medios de cultivo selectivo como el Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol: El procedimiento para realizar la siembra de este tipo de muestra es el siguiente³⁷:

Se realiza una homogenización de la muestra obtenida

1. Se procede a utilizar un hisopo estéril o un asa de platino esterilizada para recolectar la muestra
2. En caso de usar un mechero para esterilizar el asa de platino, dejar reposar hasta que esté fría.
3. Se introduce el hisopo o el asa dentro del frasco colector para obtener una porción de la muestra recolectada.
4. Se realiza el sembrado dentro de las cajas Petri que contienen el medio de cultivo (Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol) usando un estriado por agotamiento en varias direcciones dentro de una cámara de seguridad biológica.
5. Se procede a realizar la incubación a una temperatura de 35-37°C por alrededor de 3 a 4 semanas, examinando el cultivo cada 7 días.

Anexo 9. Identificación con Hidróxido de potasio (KOH) y azul de lactofenol

Para la realización de la identificación con Hidróxido de potasio y Azul de Lactofenol se debe seguir el siguiente procedimiento^{25,26}:

- Seleccionar de 2 a 3 colonias y recogerlas con un hisopo estéril.
- La muestra del agente micótico se deposita en un portaobjeto.
- Se añade una gota de la solución de Hidróxido de potasio al 20% o azul de lactofenol.
- Homogenizar la muestra y colocar un cubreobjetos.
- Esperar unos minutos y notar cómo se va clarificando la muestra para su visualización.
- Examinar la preparación con la ayuda de un microscopio.

Anexo 10. Microcultivo

Para la realización de la técnica de microcultivos se debe seguir el siguiente procedimiento^{27,38}:

- Preparar la caja petri con agar Müller Hinton enriquecido con dextrosa y gentamicina.
- Cortar cuadros de agar de un centímetro de lado y 3 milímetros de grosor con ayuda de un bisturí debidamente esterilizado.
- Seleccionar la colonia con la especie que ya fue identificada por microscopia.
- Inocular la colonia escogida en cada lado del cuadro de agar.
- Colocar un portaobjeto sobre el agar inoculado, y presionar de manera ligera hasta que el portaobjeto se adhiera completamente al medio.

Anexo 11. Pruebas de sensibilidad

Este método se basa en la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido para estudiar la sensibilidad que presentan las cepas fúngicas hacia los antifúngicos en función de halo de inhibición generado³⁹.

Preparación del Agar Mueller Hinton enriquecido con dextrosa y gentamicina.

- Se pesa y prepara el medio Mueller Hinton Agar según las especificaciones del fabricante.
- Mezclar toda la solución usando plancha de calentamiento hasta ver completa disolución
- Se procede a esterilizar el medio preparado usando autoclave (121°C y 1 atm).
- Se deja enfriar el medio y posterior añadir dextrosa (2 gr de dextrosa por cada 100 mL de medio preparado), además agregar una ampolla de gentamicina (20mg del antibiótico por cada 100 mL de medio preparado)
- Dispensar en placas de Petri de vidrio o descartables con un volumen equivalente de 5 mm de espesor de la placa utilizada.
- Se deja enfriar las placas y posterior se guardan en refrigeración a 4° C.

Preparación del inóculo

- Se toman de 3 a 5 colonias mayores a 1 mm de diámetro usando un asa de cultivo o hisopo estéril y se las resuspenden dentro de un tubo en solución salina estéril.
- Se mide con ayuda de un espectrofotómetro a 530 nm de longitud de onda que presenten una densidad óptica de 3 McFarland
- La solución final presentará una concentración aproximada de $1 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^6$ UFC/mL

Inoculación e incubación de las placas

- Se toma una muestra del inóculo con ayuda de un hisopo estéril.
- Se procede a sembrar dentro de la placa de manera uniforme en tres direcciones.
- Se dejan secar por 3 minutos las placas entreabiertas y luego se añaden las tiras E test (Fluconazol e Itraconazol) e Incubar alrededor de 24 a 72 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$

Lectura de las placas

- En caso de que no haya una buena lectura a las 24 horas, se procede a reincubar y hacer la lectura a las 48 y 72 horas.
- Se deben ignorar la presencia de micro colonias en los bordes del halo de inhibición o de colonias grandes dentro del halo de inhibición.

Puntos de corte establecidos para hongos filamentosos según Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁴⁰

Categoría Interpretativa	Intervalos de la Concentración mínima inhibitoria (CMI)	
	Fluconazol	Itraconazol
	CMI (mg/L)	CMI (mg/L)
Sensible	≤ 8	$\leq 0,12$
Sensible dependiendo de la dosis	16 – 32	0,25 – 0,5
Intermedio	-	-
Resistente	≥ 64	≥ 1

Fuente: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Anexo 12. Registro de resultados de examen microscópico con KOH 20% a la muestra directa

Nº de muestra	Tipo de Muestra	Positivo a KOH	Negativo a KOH	Características visualizadas

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo; Kevin Paul Noles Ramón

Anexo 13. Registro de resultados de examen microscópico con KOH 20% a los 7 días de incubación

N° de muestra	Tipo de muestra	Tipo de tinción	Levadura	Hongo	Descripción de morfología microscópica	Características morfológicas de colonias	Especie identificada

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo; Kevin Paul Noles Ramón

Anexo 14. Registro de resultados de examen microscópico con azul de lactofenol a los 15 días de incubación

N° de muestra	Tipo de tinción	Levadura	Hongo	Descripción de morfología microscópica	Características morfológicas de colonias	Especie identificada

Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo; Kevin Paul Noles Ramón

Anexo 15. Registro de resultados de las pruebas de sensibilidad

N°	Especie	FLUCONAZOL					ITRACONAZOL				
		Valor de referencia	Valor obtenido	S	SDD	R	Valor de referencia	Valor obtenido	S	SDD	R

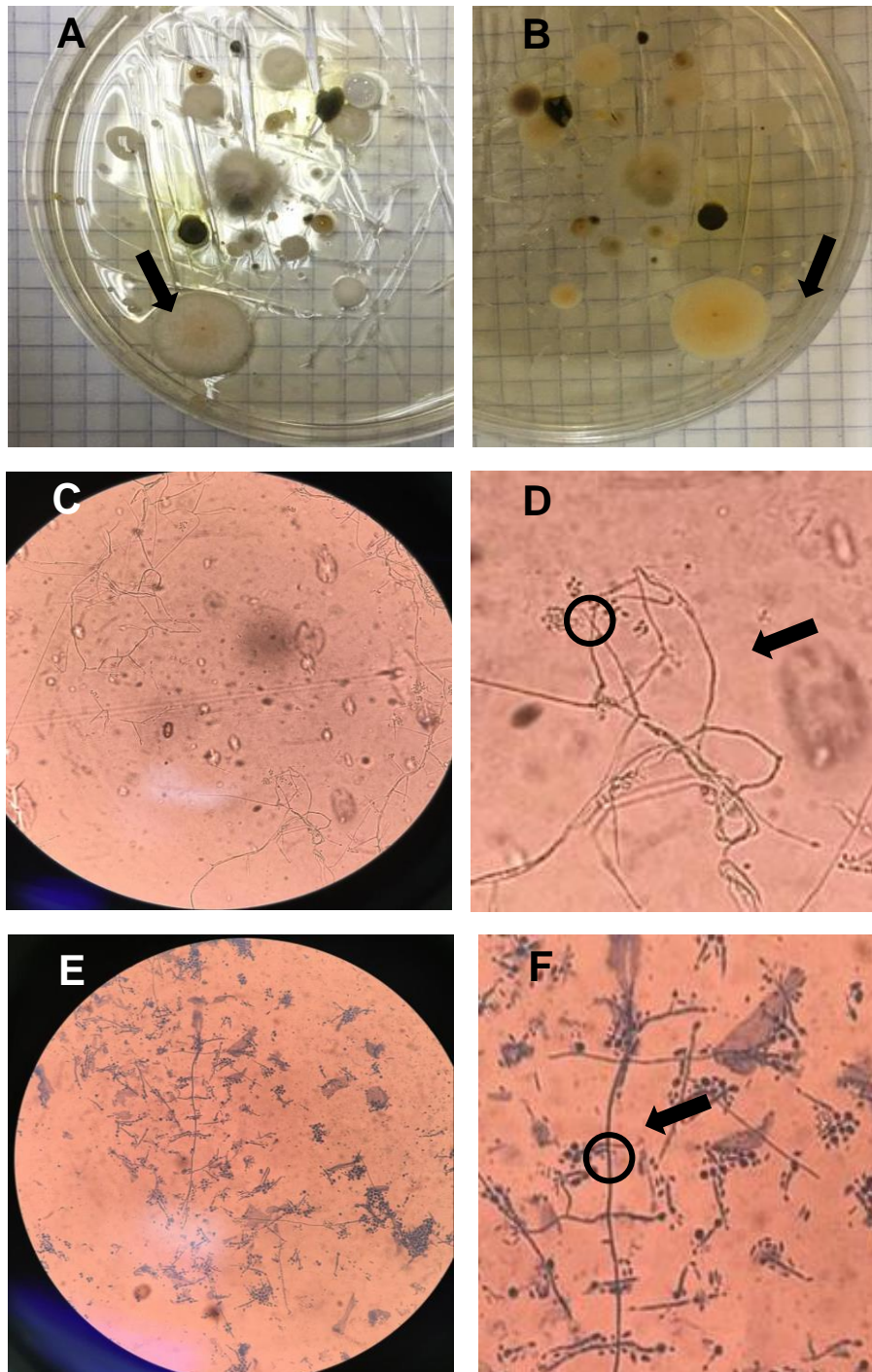
Elaborado por: José Luis Gomezcoello Quichimbo; Kevin Paul Noles Ramón

S: Sensible

I: Intermedio

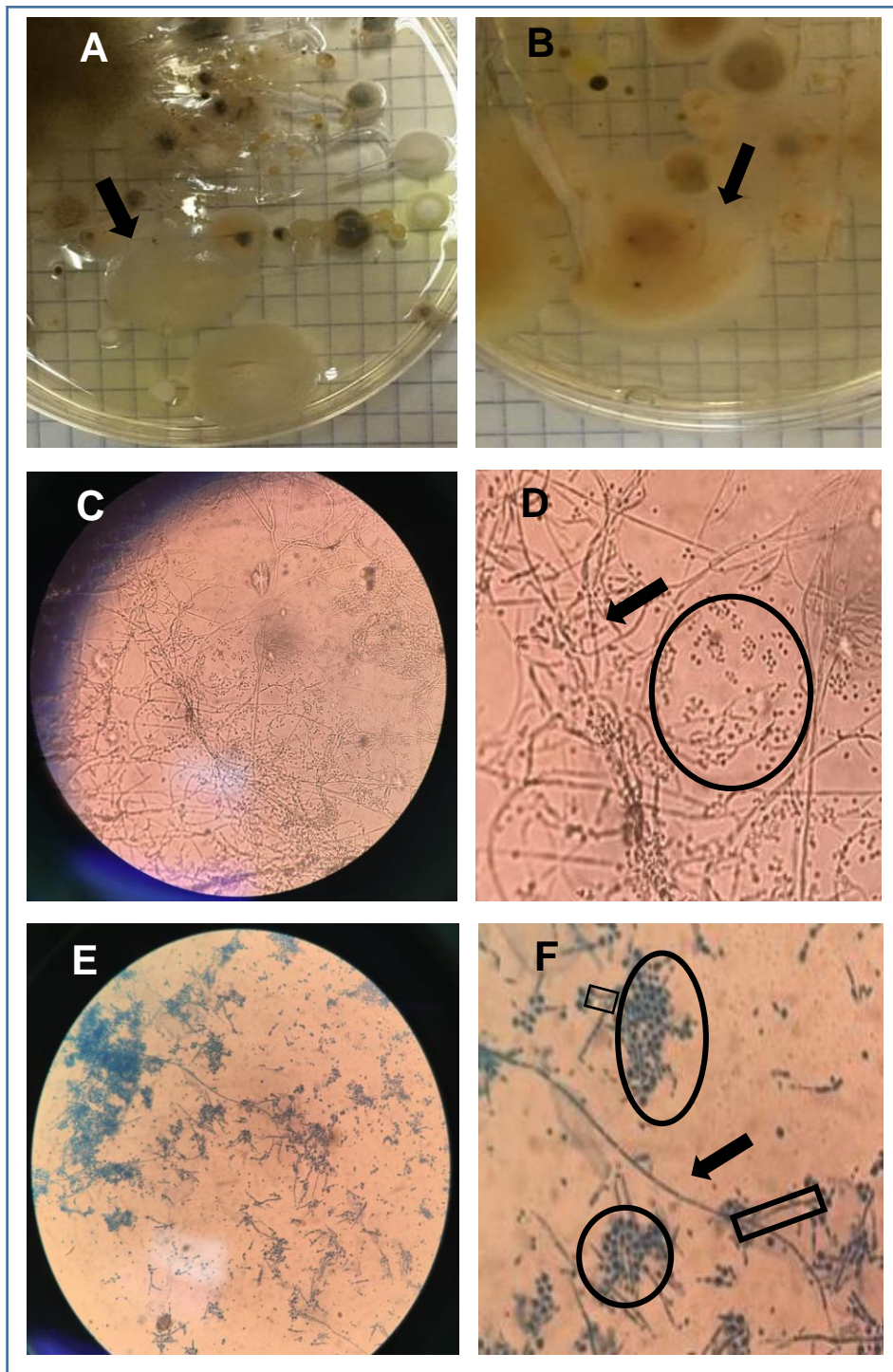
R: Resistente

Anexo 16. Observación macroscópica y microscópica de *Trichophyton rubrum*



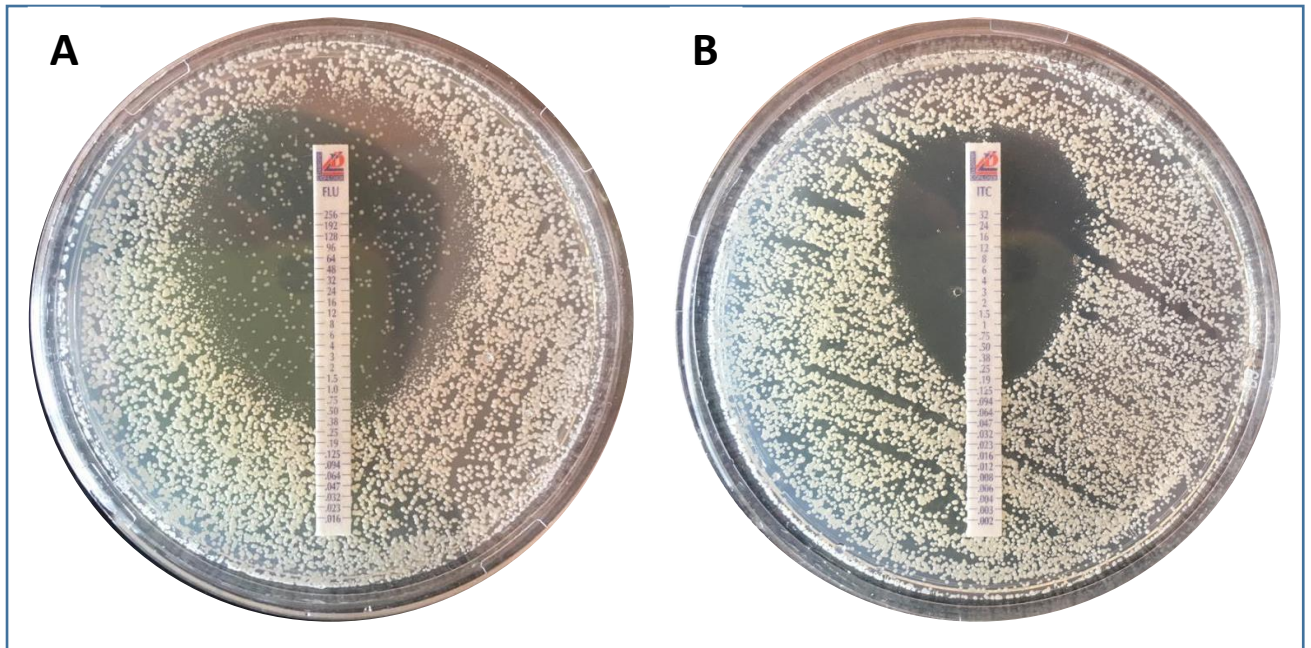
Nota. A: Colonia en agar dextrosa sabouraud con cloranfenicol, mostrando una textura plana y algodonosa de color blanco. B: Reverso de la placa con pigmentación amarillenta. C-D: Observación microscópica (40X) a los 7 días con hidróxido de potasio KOH al 20% visualizando la presencia de hifas alargadas y septadas (flecha) microconidios escasos (círculo). E-F: Observación microscópica (40X) a los 15 días con azul de lactofenol presentando estructuras fúngicas similares a las visualizadas con KOH al 20%.

Anexo 17. Observación macroscópica y microscópica de *Trichophyton mentagrophytes*.



Nota. A: Colonia en agar dextrosa con cloranfenicol (Agar Micosel), con una textura suave, pulverulenta y de color blanco. B: Reverso de la caja con pigmentación marrón rojiza. C-D: Observación microscópica (40X) a los 7 días con hidróxido de potasio (KOH) al 20%, observándose hijas septadas (flecha) y presencia abundante de microconidios (círculo). E-F: Observación microscópica (40X) a los 15 días con azul de lactofenol, visualizando hijas septadas (flecha) y abundantes microconidias (círculo) alrededor de conidióforos (cuadrado).

Anexo 18. Tiras E-test



Nota: Puntos de corte obtenidos utilizando la técnica de Epsilon test con fluconazol (A) e itraconazol (B) frente a *T. rubrum* a las 72 horas de incubación

Anexo 19. Tabulación y procesamiento de resultados

Para la tabulación y procesamiento de resultados se usará el programa estadístico Excel, en el cuál se aplicará el siguiente procedimiento:

1. Se seleccionó y ejecutó el programa de Excel
2. Se desarrolló una tabla de valores usando como datos los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de diagnóstico e identificación.
3. Se calculó parámetros como distribución de frecuencias y porcentajes
4. Se realizó la interpretación de los resultados obtenidos.