

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS**



**Caracterización molecular de especies de *Candida spp.* en pacientes de  
diversas áreas del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela  
Universitario (HEU), Noviembre 2015- Abril 2016.**

TESIS SUSTENTADA POR:

**ERIKA WALESKA PÉREZ ALEMÁN**

**PARA OPTAR AL GRADO DE MÁSTER EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS  
Y ZONÓTICAS**

TEGUCIGALPA M.D.C.

MAYO 2018

HONDURAS C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

RECTOR

**FRANCISCO HERRERA, M.D.**

VICERRECTORA ACADÉMICA

**BELINDA FLORES, M.Sc.**

DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y POSGRADO

**LETICIA SALOMÓN, M.Sc.**

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

**NABIL KAWAS, M.Sc.**

COORDINADORA DEL POSGRADO EN ENFERMEDADES  
INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS

**MARITZA CANALES GIRÓN, M.S.P.**

TEGUCIGALPA M.D.C.

MAYO 2018

HONDURAS C. A.

A Dios por darme la vida y por estar conmigo siempre,  
a mis hijos Iván y Andrés, los dos grandes  
motivos que impulsan mis conquistas en la vida.

## RECONOCIMIENTOS

A Dios por sus infinitas bendiciones y acompañarme en todo momento.

A mi tutora, la Dra. Carmen Galo, por ser un ejemplo para mí como profesional y como ser humano, además de todas sus enseñanzas y paciencia durante este tiempo.

A nuestra colaboradora, la Dra. Sandra Montoya, por su valiosa ayuda, disposición y colaboración.

Al Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM) dirigido por la Dra. Lourdes Enríquez, por su apoyo económico y logístico para la realización de esta investigación.

A la Dra. Maritza Canales como pilar de la maestría, por su amabilidad, consejos y orientación.

Al Doctor Gustavo Fontecha, por su apoyo y por ser un gran maestro de investigación y en varios ámbitos de la maestría en general.

A mi apoyo de investigación, Bryan Ortiz por su disposición y acompañamiento.

A cada uno de los integrantes de la sección de Micología de la UNAH, por su alta calidad profesional y personal.

A mis familiares por su cariño y respaldo en mi formación profesional y personal y por compartir conmigo este sueño.

## CONTENIDO

<b>CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION</b> .....	1
1.1. INTRODUCCION .....	1
1.2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	3
1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	4
1.4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	5
1.4.1. OBJETIVO GENERAL .....	5
1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEORICO</b> .....	6
2.1 GENERALIDADES .....	6
2.2 TAXONOMÍA .....	8
2.3 BIOLOGÍA CELULAR Y ENZIMOLOGÍA .....	8
2.4 MORFOGÉNESIS (DIMORFISMO) .....	12
2.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL GÉNERO <i>CANDIDA</i> .....	14
2.6 PATOGENIA Y FACTORES DE VIRULENCIA .....	18
2.7 RUTAS DE TRANSMISIÓN DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> .....	21
2.8 PREVALENCIA CLÍNICA DE LAS ESPECIES DE <i>CANDIDA</i> .....	22
2.9 ESPECTRO DE LA ENFERMEDAD .....	24
2.10 MORTALIDAD Y PREDICTORES DE EVOLUCIÓN FINAL .....	31
2.11 PRESENTACIÓN CLÍNICA .....	32
2.12 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR <i>CANDIDA</i> .....	34
2.12.1. MICROSCOPIA DIRECTA .....	34
2.12.2. MICROBIOLOGÍA .....	34
2.12.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NO RELACIONADOS CON CULTIVO .....	39
2.12.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	41
2.13 TRATAMIENTO .....	46
2.14 RESISTENCIA .....	49
2.15 PREVENCIÓN DE LA CANDIDIASIS HEMATÓGENA .....	51
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b> .....	53
3.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	53
3.2. PERÍODO DE ESTUDIO .....	53
3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	53
3.4. MUESTRA .....	53

3.5 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN .....	53
3.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL HEU .....	54
3.6.1 METODOLOGÍA PARA LA TÉCNICA DE TUBO GERMINAL .....	54
3.7 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	54
3.7.1 METODOLOGÍA PARA LA TÉCNICA DE CHROMAGAR .....	55
3.8 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA POR BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR-RFLP).....	55
3.8.1 ROMPIMIENTO DE LA PARED CELULAR DE <i>CANDIDA</i> .....	55
3.8.2 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO .....	56
3.8.3 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR .....	57
3.8.4 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR .....	58
3.8.5 RFLP (DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN).....	59
3.8.6 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR- RFLP .....	60
3.9. ANÁLISIS DE DATOS .....	61
3.10. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	61
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO VII .....</b>	<b>84</b>
7.1 RECOMENDACIONES.....	84
7.2 LIMITACIONES .....	85
7.3 PERSPECTIVAS.....	86
<b>CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## i. LISTADO DE LAS FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura esquemática de una célula de <i>Candida</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Morfotipos de <i>Candida</i> y composición de su pared celular.....	11
<b>Figura 3.</b> Variaciones en la morfología celular del género <i>Candida</i> .....	13
<b>Figura 4.</b> Visión general de los mecanismos de patogenicidad de <i>Candida</i> .....	20
<b>Figura 5.</b> Región de ADN de del género <i>Candida</i> que codifica para el ARN ribosomal y detalle de una unidad repetitiva.....	44

## ii. LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las principales especies de <i>Candida</i> emergentes, distintas de <i>C. albicans</i> y causantes de infecciones invasivas.....	7
<b>Tabla 2.</b> Resumen sobre recomendaciones para diagnóstico de infección por <i>Candida</i> .....	36
<b>Tabla 3.</b> Reportes de estudios previos sobre el rendimiento de pruebas de detección de PCR versus 1,3-b-D-glucano.....	45
<b>Tabla 4.</b> Patrones de sensibilidad de las principales especies de <i>Candida</i> a la anfotericina B, azoles y equinocandinas.....	51
<b>Tabla 5.</b> Frecuencia de cultivos con crecimiento por especies de <i>Candida</i> según edad.....	62
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de cultivos con crecimiento por <i>Candida</i> según las sala de procedencia.....	64
<b>Tabla 7.</b> Frecuencias según tipo de muestra de cultivos con crecimiento por especies de <i>Candida</i> .....	65
<b>Tabla 8.</b> Frecuencia de especies de <i>Candida</i> determinadas mediante PCR-RFLP junto con los tipos de muestra que se aislaron.....	66

**Tabla 9.** Comparación de resultados entre las técnicas de Tubo germinal y PCR-RFLP de muestras con cultivos positivos por *Candida*.....72

**Tabla 10.** Distribución de especies de *Candida* en las diferentes salas pediátricas del HEU determinadas mediante PCR-RFLP.....73

**Tabla 11.** Comparación de resultados entre las diversas técnicas diagnósticas aplicadas.....74

**Tabla 12.** Coeficiente de correlación obtenido entre los métodos de PCR-RFLP y CHROMagar.....76

### iii. LISTADO DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Frecuencia según género en cultivos con crecimiento por las diferentes especies de <i>Candida</i> .....	63
<b>Gráfico 2.</b> Relación entre los resultados del examen directo de muestras y los cultivos aislados por levaduras .....	67
<b>Gráfico 3.</b> Frecuencias de especies de <i>Candida</i> identificadas mediante el Método de CHROMagar.....	68
<b>Gráfico 4.</b> Relación porcentual de especies de acuerdo a los casos en que se identificaron más de una especie en una sola muestra por CHROMagar .....	69
<b>Gráfico 5.</b> Frecuencias de especies de <i>Candida</i> identificadas mediante la técnica de PCR-RFLP.....	70
<b>Gráfico 6.</b> Relación porcentual de especies de acuerdo a los casos en que se identificó más de una especie en una sola muestra por PCR-RFL.....	71
<b>Gráfico 7.</b> Nivel de concordancia porcentual entre CHROMagar y PCR-RFLP con respecto a la identificación por especie.....	75

#### iv. Lista de cuadros

**Cuadro 1.** Protocolo para preparación de mastermix de PCR para determinación del género *Candida*.....57

**Cuadro 2.** Programación de termociclador para PCR de identificación del género *Candida*.....58

**Cuadro 3.** Protocolo para preparación de mezcla de reacción para RFLP (digestión con enzimas de restricción) para la determinación de especies de *Candida*.....59

**Cuadro 4.** Programación de termociclador para RFLP (digestión con enzimas de restricción) para la determinación de especies de *Candida*.....60

## v. ABREVIATURAS

<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNr:</b>	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
<b>APACHE II:</b>	Evaluación de salud fisiológica aguda y crónica II
<b>BPN:</b>	Neonatos con bajo peso al nacer
<b>CIG:</b>	Centro de Investigaciones Genéticas
<b>CVC:</b>	Catéter venoso central
<b>EUA:</b>	Estados Unidos Americanos
<b>EBPN:</b>	Neonatos de extremadamente bajo peso al nacer
<b>HEU:</b>	Hospital Escuela Universitario
<b>HAART:</b>	Terapia antiretroviral altamente activa
<b>ITS:</b>	Espaciadores transcritos internos
<b>KOH:</b>	Hidróxido de potasio
<b>LCR:</b>	Líquido Cefalorraquideo
<b>MEIZ:</b>	Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas
<b>MIC:</b>	Concentración inhibitoria mínima
<b>PAS:</b>	Ácido peryódico de Schiff
<b>Pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RFLP:</b>	Polimorfismo de fragmentos de restricción
<b>SAP:</b>	Enzimas aspartil-proteasas
<b>SIDA:</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central
<b>TAC:</b>	Tomografía axial computarizada
<b>TPN:</b>	Nutrición parenteral
<b>TPH:</b>	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
<b>UCI:</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>UCIN:</b>	Unidad de cuidados intensivos neonatales
<b>UCIP:</b>	Unidad de cuidados intensivos pediátricos
<b>VIH:</b>	Virus de inmunodeficiencia humana

## **CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION**

### **1.1. INTRODUCCION**

En la actualidad, un número creciente de pacientes están propensos a sufrir infecciones micóticas invasivas oportunistas como la causada por el género *Candida*. Existen diversos factores que incrementan las probabilidades de que dichas infecciones se presenten. Las infecciones fúngicas invasoras son más frecuentes en pacientes receptores de trasplante de órganos o sometidos a otras cirugías, pacientes hematológicos sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas, pacientes recibiendo fármacos inmunosupresores o aquellos bajo tratamiento con grandes dosis de antibióticos por tiempos prolongados. Además de estos factores, también se incluyen pacientes con enfermedades neoplásicas, SIDA, y enfermedades pulmonares crónicas entre otros.

Según reportes de estudios recientes, la prevalencia de las infecciones por *Candida spp.* es alta, detallada como la cuarta causa de infección del torrente sanguíneo de origen nosocomial. Las diferentes formas en las cuales el paciente puede volverse susceptible a la enfermedad han llevado a cambios en la epidemiología y presentación clínica de estas infecciones.

En el año 2013, Nucci y Alvarado realizaron un estudio en siete países de Latinoamérica, en el cual se incluyó Honduras, ellos tuvieron como objetivo la caracterización de la epidemiología de las candidemias y la determinación de la frecuencia de especies de *Candida* en pacientes hospitalizados., Este estudio, sobre la determinación de especies de *Candida* fue el primero realizado en Honduras, se llevó a cabo mediante aislamientos de hemocultivos obtenidos de diversas salas del Hospital Escuela Universitario (HEU), se determinó además la susceptibilidad y resistencia a fármacos antifúngicos. La información recolectada en dichos estudios es

de mucha importancia ya que se ha reportado resistencia a este tipo de fármacos en algunas especies del género *Candida*. La identificación de las especies circulantes, sobre todo a nivel hospitalario y en especial en áreas de atención crítica como la unidad de cuidados intensivos (UCI), brinda información que influye en la toma de decisiones al momento de administrar tratamiento profiláctico por parte del clínico y favorece la pronta administración de fármacos más eficaces, teniendo en consecuencia un menor riesgo de mortalidad, en especial para el paciente pediátrico en estado crítico.

## 1.2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La candidiasis se define como la infección causada por cualquiera de las más de 300 especies del género *Candida* identificadas hasta la actualidad. En cuanto a la candidemia, se sabe que es el aislamiento de cualquiera de estas especies en un cultivo de muestras de sangre y que un paciente crítico puede evolucionar, de forma tal que induce un alto riesgo de mortalidad. <sup>(1, 2)</sup>

La epidemiología de la infección invasiva por *Candida* (IIC) depende de factores tales como las características propias de la institución donde se atienden los pacientes, el tipo de población, y factores asociados al hospedero. La circulación de especies de *Candida* en ambientes hospitalarios se relaciona con la expansión del uso de terapia profiláctica con *azoles*, aumentando la proporción de forma variable de las especies *no-albicans*, a eso se agrega la dificultad para establecer la sospecha diagnóstica de forma temprana por parte del clínico o intensivista, influyendo en el pronóstico. <sup>(1, 3)</sup>

A nivel mundial se han realizado varios estudios sobre esta temática, algunos de estos muestran relación entre morbilidad y mortalidad con diferentes especies de *Candida*. Entre estos estudios se destaca el de *Jordan et al* <sup>(3)</sup>, realizado en 24 Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) en España, donde se encontró una mortalidad de 8.5 % por *C. albicans*, 13.5 % por *C. parapsilosis* y 23.3 % por *C. tropicalis*, dicho estudio también resume que la mayoría de especies aisladas resultaron ser *Candida no-albicans*, de 125 aislamientos solo 47 fueron *C. albicans*; esto es alarmante porque en la mayoría de los casos, los antifúngicos de primera línea que son anfotericina B y fluconazol van dirigidos principalmente contra la cepa de *C. albicans*, especie que se mantiene susceptible a tales fármacos, no presentando esta misma respuesta entre las especies *no-albicans*, puesto que estas han mostrado altos niveles de resistencia a dichos fármacos. Debido a estos reportes, actualmente se considera indispensable la identificación de especies de *Candida* en el laboratorio clínico, principalmente en centros hospitalarios donde las infecciones por esta levadura son frecuentes.

Según estudios previos, la candidemia induce una tasa de mortalidad de 16 % en pacientes pediátricos no-neonatos, con una tasa de mortalidad del 28 % en neonatos, de las cuales 70 % son por especies diferentes de *C. albicans*, <sup>(1)</sup> pasando la prevalencia de esta última de 80 % en hospitales a 29 % en algunos otros. <sup>(1, 4)</sup>

En Honduras, la mayoría de laboratorios en los hospitales, no cuentan con los recursos para la identificación de especies de *Candida*, solamente algunos de los hospitales terciarios realizan identificación de especie con muchas limitaciones, debido a que los métodos comercialmente disponibles son muy caros. Los métodos moleculares, aunque se utilizan casi exclusivamente con fines de investigación científica en Honduras, podrían solucionar el problema de diagnóstico laboratorial; estos métodos, una vez implementados demuestran ser accesibles, fáciles de realizar por un operador entrenado, y a la vez económicos en comparación con otras técnicas.

Se ha mencionado la importancia de la identificación de especies de *Candida* en diferentes tipos de muestras. Por ello, el estudio tiene como objetivo caracterizar las diferentes especies de *Candida*, aplicando la técnica de PCR-RFLP como opción diagnóstica en pacientes que necesiten una respuesta oportuna en casos de candidiasis invasivas y candidemias, además de que los datos obtenidos por el estudio podrían utilizarse para futuros proyectos de investigación con el agente infeccioso mencionado.

### **1.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son las especies circulantes de *Candida* causando infección en pacientes de las diferentes unidades del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU) determinadas mediante biología molecular en el período de Noviembre 2015- Abril 2016?

## **1.4 OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **1.4.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar por métodos moleculares las especies de *Candida* aisladas en muestras de las diferentes áreas de atención del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU), Tegucigalpa, Honduras, en el período de Noviembre 2015-Abril 2016.

### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar por métodos moleculares las especies de *Candida* aisladas de diferentes muestras de pacientes del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU).
2. Determinar la frecuencia de las especies de *Candida* entre los pacientes estudiados.
3. Determinar la distribución de especies de *Candida* según sala pediátrica.

## CAPÍTULO II. MARCO TEORICO

### 2.1 GENERALIDADES

Algunas especies de *Candida* y de forma notable *C. albicans*, son comensales humanos ubicuos. Estas se vuelven patógenas en situaciones en donde la resistencia del hospedero a la infección está disminuida de forma local o sistémica; y en dichas circunstancias estas especies pueden causar enfermedad en cualquier lugar del cuerpo humano.<sup>(5)</sup> La prevalencia de las infecciones por *Candida* es alta, y los diferentes factores en los cuales el paciente pueden volverse susceptible, ha llevado a cambios en la epidemiología y presentación clínica de estas infecciones, con un importante aumento en la incidencia en las últimas décadas.<sup>(1, 6)</sup>

En cuanto al término “candidiasis” este se refiere a la infección causada por cualquiera de las especies del género *Candida* reportadas hasta ahora.<sup>(7)</sup> Actualmente las especies de *Candida* son la cuarta causa más frecuente de infección nosocomial del torrente sanguíneo (“BSI” del inglés *Bloodstream Infection*) en los Estados Unidos de América (EUA) y está asociada con mortalidad importante, además de ser la principal causa de infección invasiva por hongos en el paciente críticamente enfermo de cualquier edad en unidades de cuidados intensivos, así como la segunda causa de infección invasiva por hongos en pacientes sin compromisos severos.<sup>(8)</sup>

Varias especies de *Candida* se han relacionado como causales de infección en humanos, mientras que otras menos frecuentes han sido ocasionalmente descritas como patógenos (Tabla 1), aunque no siempre se evidencia la frecuencia real de estas especies debido a la falta de identificación definitiva. <sup>(1, 6, 9)</sup>

Especie	Frecuencia y características	Factores de riesgo	Mortalidad
<b><i>C. krusei</i></b>	2-25 % de las fungemias 13 % en pacientes con cáncer. 13-25 % en pacientes con leucemia.	Leucemia, *TPH, neutropenia, profilaxis con fluconazol.	Global 30-70 %; atribuible 40 %
<b><i>C. glabrata</i></b>	8-37 % de las candidemias 4.5-13 % en pacientes con cáncer.	Tumor sólido, cirugía abdominal, profilaxis con fluconazol.	Global 45 %
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	12-15 % de las candidemias en pacientes con cáncer.	Dispositivos intravasculares	Global 8 %
<b><i>C. tropicalis</i></b>	4-25 % de las candidemias. 11-25 % en TPH. 18 % en neoplasias hematológicas. 4-9 % en tumores sólidos.	Leucemia aguda, neutropenia, mucositis	Global 33-90 %
<b><i>C. lusitaniae</i></b>	2-9 % de las candidemias. Causa de candidemia intercurrente (aparece al menos 5 días después de iniciar tratamiento antifúngico)	TPH, neutropenia, quimioterapia a altas dosis, neoplasia hematológica.	Global 35 %; atribuible 25 %
<b><i>C. guilliermondii</i></b>	0.7-5.5 % de las fungemias.	Cáncer, TPH, neutropenia.	Atribuible 24 %
<b><i>C. dubliniensis</i></b>	3-25 % de candidiasis orofaríngeas en enfermos VIH.	3-25 % de candidiasis orofaríngeas en enfermos VIH.	No hay datos.

**Tabla 1. Principales especies de *Candida no albicans* causantes de infecciones invasivas.**

\*TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos.

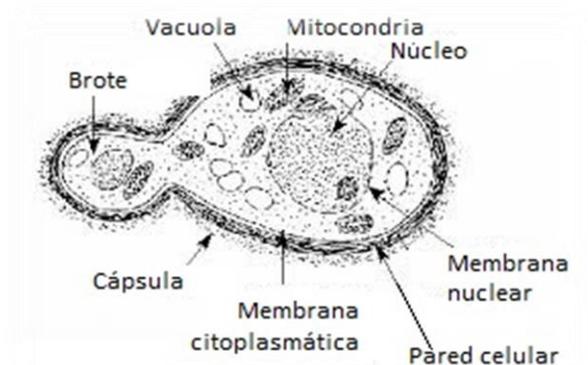
Fuente: Miguel Salabert et al, Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24 Supl 1:36-4.

## 2.2 TAXONOMÍA

Actualmente, *Candida* pertenece al reino de los hongos, al *Phylum Ascomycota*, *Subphylum Ascomycota*, *Clase Ascomycetos*, *Orden Saccharomycetales*, *Familia Saccharomycetaceae*, *Género Candida*, presentando estados Teleomorfos como: *Debariomyces*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Wckerhamomyces*, *Yarrowia*, *Meyerozyma*, *Clavispora*, entre otras estados Anamorfos: diversas especies y complejos de especies de *Candida* <sup>(9)</sup> (Figura 1).

## 2.3 BIOLOGÍA CELULAR Y ENZIMOLOGÍA

Debido a su importancia médica *C. albicans* ha sido investigada extensamente en comparación a otras especies del género. Sus características de crecimiento como procesos metabólicos y características enzimológicas son todas similares a las eucariotas.



**Figura 1. Estructura esquemática de una célula de *Candida*.**

Fuente: Richardson *et al*, 2007. Pag. 1-11.

Para su desarrollo, las blastoconidias de las especies de *Candida* se multiplican por medio de un proceso típico de producción de brotes (gemación), además de que también puede desarrollarse como verdaderas hifas del tipo filamentoso.<sup>(10)</sup>

Los polisacáridos en estas especies de *Candida* se localizan de forma primaria en la

pared celular y el principal componente de la pared celular son los mananos fosforilados, glucanos y pequeñas cantidades de quitina.

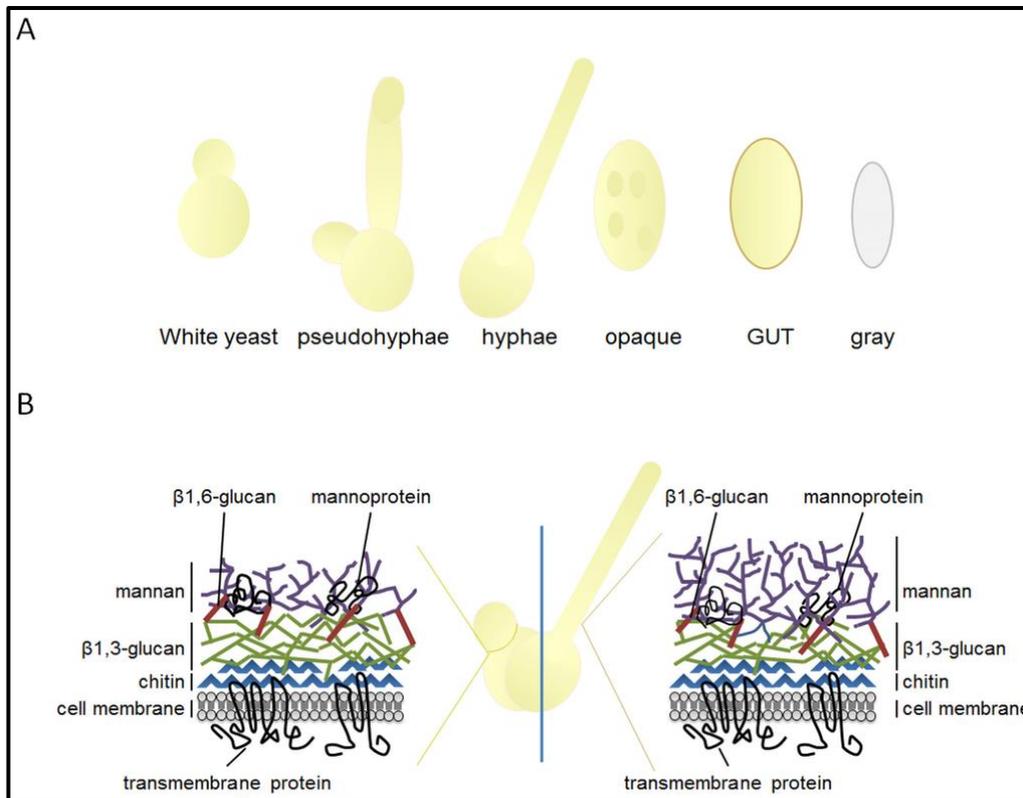
Los polipéptidos y proteínas están ligados de forma íntima con los polisacáridos de la pared celular y las estructuras finas de los distintos oligómeros fosfoglicopeptídicos y polímeros, lo que cuenta para establecer las diferencias entre estructuras antigénicas. La expresión de las macromoléculas de pared celular también puede variar de célula a célula y aún dentro de diferentes porciones de la pared en la misma célula.<sup>(1)</sup>

Se ha determinado que la pared celular de *C. albicans* es una estructura dinámica y en constante cambio que contiene proteínas enzimáticamente activas tales como la enolasa y la N-acetil-gluconaminidasa, epitopos similares a ubiquitina y una proteína relacionada con la familia hsp70 (una proteína de choque térmico). La expresión variable de esta proteína de pared celular presumiblemente es el resultado de un sistema complejo y dinámico de regulación. La pared contiene tres tipos de moléculas de adhesina, una de ellas es una glicoproteína, expresada en condiciones de estrés celular sobre la superficie de las células de *C. albicans* simulando componentes humanos de complemento como C3d y también iC3b; un segundo tipo de adhesina es una proteína mitad glicoproteína que se liga a los glicósidos del hospedero que contienen fucosa o N-acetilglicosamina, el tercer tipo involucra la porción de polisacáridos de una manoproteína que se liga a receptores desconocidos del hospedero. La estructura de los polisacáridos mananos de *C. albicans* ha sido estudiada de forma extensa, dada su relevancia como uno de los principales componentes de la pared celular, la naturaleza de esta estructura puede ser alterada por cambios en el pH externo y la temperatura <sup>(1, 6, 9)</sup> (Figura 2 A).

Los lípidos en *C. albicans* son predominantemente fosfolípidos y esteroides, el ergosterol es el principal componente esteroide de la membrana (Figura 2 B). Dichos lípidos proporcionan el sitio de acción para la síntesis de enzimas involucradas en la morfogénesis de la pared celular y de la acción de fármacos antifúngicos, las alteraciones en dichos lípidos pueden presentarse durante la transición de levadura a micelio. Se conoce que *C. albicans* crece en un amplio rango de pH, desde por debajo

de 2.0 hasta casi 8.0 y bajo condiciones aerobias, microaerofílicas y anaerobias. Además, en la mayoría de las enzimas del género *Candida* han sido ya descritas, una de las más estudiadas es el grupo de las aspartil-proteinasas (Sap) producidas por varias especies como: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Diferentes isoformas de Sap encontradas en *C. albicans* son factores importantes de virulencia para diferentes tipos de candidiasis; dichas enzimas producen proteólisis de proteínas del hospedero involucradas en defensa contra la infección.

La diferencia en los perfiles de desnaturalización dependientes de pH puede explicar de forma parcial las diferencias entre especies de *Candida* respecto a la virulencia.<sup>(9)</sup> La superfamilia Sap en *C. albicans* incluye al menos 10 isoenzimas (desde SAP1 hasta SAP10). Se han asociado diferentes localizaciones de varios Saps dentro de las levaduras con diferente tipo de patogénesis. La expresión predominante de Sap1-3 ha demostrado ser crucial para las infecciones experimentales superficiales en candidiasis cutánea de mucosas, y Sap4-6 puede ser importante para la enfermedad sistémica.<sup>(7)</sup> *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* también producen fosfolipasas; estas enzimas son importantes para el control de crecimiento de las levaduras, remodelación de la membrana de la pared celular del hongo e invasión a través de hidrólisis de fosfolípidos en los tejidos blandos del hospedero. La fosfolipasa B es esencial para la virulencia de *C. albicans*, y es secretada por dicha especie durante el proceso infeccioso.<sup>(1, 9)</sup>



**A= Diferentes morfologías de *Candida spp.*** que juegan varios papeles en la colonización y la enfermedad. Las células blancas sirven en la creación y difusión de infecciones micóticas, las pseudohifas e hifas verdaderas intervienen en la penetración e invasión de tejido hospedero, las células en fase opaca y grices se están acoplando a células gastrointestinales induciendo transición (GUT) y adaptadas especialmente para el crecimiento como comensales.

**B= Representación esquemática de la composición de la pared celular de *Candida spp.*** en células de levadura e hifas. En dichas formas los restos de azúcares presentes en la pared celular de los hongos son los mismos pero su exposición y espesor determinar diferentes propiedades inmunogénicas. Por ejemplo,  $\beta$ -glucanos solamente están expuestos en las cicatrices del brote de las levaduras y los tabiques de división están ocultos por una capa superficial de manano en la forma de hifas.

**Figura 2. Morfotipos de *Candida* y composición de su pared celular.**

Fuente: Mukaremera. L *et al*, 2017. Immune Recognition. Frontiers in immunology.

## 2.4 MORFOGÉNESIS (DIMORFISMO)

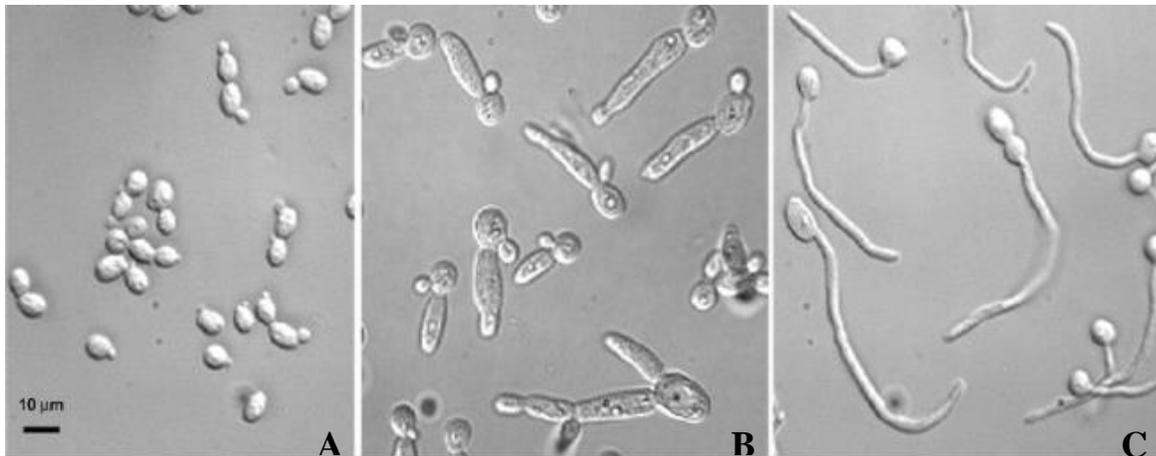
*Candida glabrata* crece como una pequeña levadura pequeña y elíptica con brotes unicelulares; este crecimiento contrasta con los tipos de crecimiento de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, las cuales forman levaduras en brote elíptico y también pueden formar pseudohifas las cuales tendrán filamentos multicelulares bien desarrollados. *C. krusei* y *C. parapsilosis* pueden ser consideradas como dimórficas debido a que exhiben formas reproductivas en forma de brotes y también como pseudohifas. La presencia de brotes de levaduras y pseudohifas en el tejido infectado es usualmente indicativa de candidiasis. <sup>(11)</sup>

Bajo condiciones adecuadas de incubación, *C. albicans* puede también formar clamiconidias refráctiles grandes, dicho proceso morfogenético puede estar regulado genéticamente. Con respecto al dimorfismo de *C. albicans*, diferentes formas pueden penetrar tejidos blandos del organismo y relacionarse con la virulencia de la especie, aún más, las formas de brotes y filamentos juntos probablemente juegan un papel en la progresión de la infección en seres humanos.

La formación y desprendimiento de brotes unicelulares puede facilitar la diseminación hematógena de la levadura luego de la angiоinvasión. En contraste, las formas filamentosas de la especie presumiblemente amplifican la capacidad para invadir tejidos. Las señales para que se produzca este dimorfismo (levaduras en brotes, pseudohifas e hifas) incluyen: el pH del microambiente, la disponibilidad de nitrógeno y carbono, oxigenación, factores plasmáticos y hormonales, así como la densidad de estas levaduras causando infección en el hospedero.

Los genes sensibles al pH que están involucrados en el crecimiento, morfología, síntesis de la pared celular y el cambio de brotes de tipo levadura a formas filamentosas, han sido identificados y descritos en la literatura indicando que la importancia de estos podría variar de acuerdo al sitio de infección necesarios para el crecimiento normal de los brotes y filamentos.<sup>(9)</sup>

La regulación del crecimiento filamentoso está además a cargo de varias proteínas-quinazas de la subfamilia Cdc2 y la sensibilidad o detección de quórum, el cual es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular, las células involucradas producen y excretan sustancias llamadas autoinductores, que sirven de señal química para inducir la expresión genética colectiva.<sup>(6, 9)</sup> (Figura 3).



A= Levaduras en gemación, B= Pseudohifas, C= Hifas verdaderas

### **Figura 3. Variaciones en la morfología celular del género *Candida*.**

Fuente: Bendel C. *et al*, Elsevier Saunders; 2010.

#### **2.4.1 Cambios fenotípicos en *C. albicans***

Las colonias de *C. albicans* en agar algunas veces muestran variaciones en la forma, particularmente después de un largo período de incubación. Esta característica ha sido definida como la expresión de un fenómeno llamado "*switching*" fenotípico.<sup>(12)</sup> Los cambios en la forma de una colonia se presentan con alta frecuencia en subcultivos secuenciales desde un clon único, con nuevas variantes en las colonias. La frecuencia de este fenómeno es muy alta como para relacionarse con mutación

genética, y muy baja como para ser atribuible a una conversión en masa, en la cual todas las células de una población cambien su fenotipo en respuesta a cambios ambientales.

Es probable que este fenómeno sirva como un tipo de sistema maestro en *C. albicans* que se relaciona con respuestas rápidas a nivel celular por cambios en el microambiente; lo que explica diferencias ya descritas entre epitopos expresados en la superficie de células individuales, y podría relacionarse con los cambios en la morfología celular, algunas veces observada dentro de unidades celulares.<sup>(9, 13)</sup> Se ha postulado que este cambio fenotípico explica la capacidad de *C. albicans* para sobrevivir en micronichos ambientales dentro de un hospedero mamífero. *C. albicans*, utiliza una configuración común de vías conservadas para regular el dimorfismo, emparejamiento y cambio fenotípico. Todas estas vías regulan la expresión de genes específicos de la fase a su vez específicos de las hifas que codifican proteínas que contribuyen directa o indirectamente a la patogénesis y virulencia de *C. albicans*. Por consiguiente los genes de virulencia están co-regulados con la morfogénesis celular.  
(1, 6, 9)

## **2.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL GÉNERO *CANDIDA***

*Candida spp.* reside de manera comensal principalmente en el tracto gastrointestinal, vagina, uretra, piel y debajo de las uñas. El género *Candida* está a menudo asociado con enfermedad humana, pero también se obtiene en aislamientos de otros animales vertebrados, además se encuentra en la atmósfera, agua fresca y mar junto con arena, a la vez, es un contaminante ocasional de algunos alimentos y puede ser recuperada de fómites, tales como: ropa diaria y cepillo de dientes.

La prevalencia estimada de *Candida spp.* es variable según el sitio y la población muestreada y el método de muestreo. La prevalencia de colonización oral es de alrededor del 6 % (2-37%) entre sujetos saludables y 47 % (13-76 %) entre pacientes hospitalizados.<sup>(7)</sup>

Ademas, la tasa de portadores es mayor en ciertos individuos tales como: pacientes

infectados con el virus de Inmunodeficiencia humana (VIH) que tengan bajos conteos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pacientes con dentadura postiza, diabéticos, adultos que reciben quimioterapia como tratamiento para neoplasias y finalmente niños.<sup>(14)</sup>

Virtualmente el 100% de los seres humanos son portadores de alguna especie o más de *Candida* en el intestino, desde el duodeno hasta el colon, y el número de levaduras acarreadas en cualquier momento en el intestino a menudo aumenta a niveles que se vuelven detectables en la boca y en las heces en personas enfermas en circunstancias en donde los mecanismos de supresión microbiana del hospedero estén reducidos.<sup>(9,</sup>  
<sup>15)</sup> Raramente la piel seca es colonizada por *Candida spp*; y las especies que predominan en las muestras de piel son *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, más que *C. albicans*.<sup>(2)</sup>

El incremento de la supervivencia neonatal también ha contribuido a la reciente emergencia de casos, dado que los recién nacidos son hospederos vulnerables a la colonización e invasión, especialmente en los menores de 1000 gramos de peso que se clasifican como neonatos con extremadamente bajo peso al nacer (EBPN) o con menos de 28 semanas de edad gestacional, reportándose un comportamiento similar al de la ecología descrita para UCI de adultos. Según estudios realizados en salas de neonatos de EUA se encontró en el año 1994 un porcentaje de 60-80 % de aislamientos de especies de *Candida* como *C. albicans*<sup>(16)</sup>, encontrándose un porcentaje en esta misma sala de 40-50 % en el 2001; esto relacionado posiblemente con la emergencia de *C. parapsilosis* como segundo agente asociado a mortalidad en este tipo de pacientes con factores determinantes de la enfermedad como: tamaño del inóculo, susceptibilidad del neonato, virulencia de la especie, aumento de la colonización de las superficies mucosas y disrupción de la función inmune.<sup>(3, 17, 18)</sup>

En EUA los aislamientos por *Candida* ocupan el cuarto lugar de los agentes identificados en hemocultivos de pacientes hospitalizados y este género es responsable del 8-15 % de todas las fungemias nosocomiales, ocupando en dicho país el cuarto lugar de todas las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo (9

% de los cultivos).<sup>(16)</sup>

### 2.5.1 Epidemiología de candidiasis en América Latina

En un estudio reciente sobre prevalencias de especies de *Candida* en los principales centros de atención realizado en siete países de la región latinoamericana con 20 centros terciarios incluidos, se encontró una prevalencia general de: *C. albicans* 37.6 %, *Candida parapsilosis* 26.5 %, *C. tropicalis* 17.6 %, *C. guilliermondii* 6.5 %, *C. glabrata* 6.3 % y *C. krusei* 2.7 %.<sup>(14)</sup> Ecuador mostró la mayor proporción de episodios debido a *C. albicans* con 52.2 % de los aislamientos, mientras que Honduras y Venezuela mostraron la tasa más baja con 27.4 % y 26.8 %. Aunque *C. parapsilosis* fue muy frecuente en la mayor parte de los países, en Honduras fue la especie menos frecuente con 14.1 % mientras los datos muestran que *C. guilliermondii* fue muy frecuente en nuestro país con 20.7 %. La proporción más alta de episodios por *C. glabrata* fue en Brasil con 10 % y la más baja en Venezuela con 2.4 %.<sup>(14)</sup>

En relación a la mortalidad en Brasil, del total de fallecimientos relacionados con hongos, la candidiasis fue de 16.3 %, superior a la aspergilosis (5 %), histoplasmosis (5.6 %), zigomicosis (0.9 %), coccidioidomicosis (0.8 %) y sólo superada por paracoccidioidomicosis (44.6 %) y criptococcosis (26.8 %), mostrando zonas hiperendémicas de estos dos últimos agentes en dicho país.<sup>(3, 4)</sup>

En el 2001, fue iniciado en Brasil el programa ARTEMIS, con el objetivo de generar vigilancia sobre la actividad del fluconazol y voriconazol sobre *Candida spp.* asociada a infección invasiva y para proporcionar el desarrollo continuo y validación de sistemas de prueba de susceptibilidad antifúngica basados en caldo y en agar, este programa utiliza un laboratorio central de referencia y una red internacional de 105 centros como fuentes de muestras.<sup>(14, 19)</sup>

De acuerdo a los hallazgos reportados en la actualidad por métodos de diagnóstico más sensibles y específicos, más del 90% de las infecciones invasivas relacionadas

con especies de *Candida*, se atribuyen a cinco especies como principales responsables de estas etiologías y fueron: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *tropicalis* y *C. krusei*.<sup>(20)</sup>

Aunque *C. albicans* se mantiene como la especie dominante causando infección del torrente sanguíneo, la frecuencia de ocurrencia varía en el mundo desde 37 % en Latinoamérica hasta 70 % en Noruega.<sup>(21)</sup>

Es notable la baja frecuencia de *C. glabrata* como causa de invasión del torrente sanguíneo en Latinoamérica, ya que sólo el 4-7 % de estas infecciones se atribuyen esta especie. La tendencia de *C. glabrata* de hemocultivos en la frecuencia es a la disminución de aislamiento, así en Latinoamérica pasó de 7.4 a 4.7 %, entre 2002 y 2004; en Europa de 10.5 % a 8.8 %, y en la región de Asia-Pacífico pasó de 12.1 % a 7.2 %. Por otra parte, la frecuencia de candidiasis invasiva por *C. parapsilosis* ha aumentado recientemente y de forma muy notable en Latinoamérica. Otra característica reciente es que *C. tropicalis* es la cuarta especie más frecuentemente identificada de *Candida* asociada a hemocultivos en Norteamérica (7%).

A nivel Latinoamericano *C. tropicalis* se ha encontrado en un 20%, aislándose con mayor frecuencia que *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. rugosa*, que son especies relativamente poco frecuentes, aunque se contabilizan en 3- 5% de todas las candidemias tendiendo a ser más comunes que *C. glabrata* o *C. krusei* en estas regiones<sup>(22)</sup>.

En Brasil en el 2011 *San Blas & Burger*,<sup>(22, 23)</sup> reportaron una prevalencia general de *C. albicans* de 40.9 % de los aislamientos de *Candida*, seguido en frecuencia por *C. tropicalis* con 20.9 % y *C. parapsilosis* (11.7%); estos aislamientos presentaban un 20.5% de sensibilidad a fármacos polienos, triazoles y caspofungina. Venezuela, hasta el 2005, *C. albicans* representó 46.7 % de las especies aisladas seguido por *C. tropicalis* con 19 %, *C. glabrata* con 9.2 % y *C. parapsilosis* con 6 %. En Chile las cifras son similares con: 40.8% para *C. albicans*, 13.1% para *C. parapsilosis* y 10% para *C. tropicalis*. En Argentina, de forma similar, *C. albicans* representa 40.7 %, *C. parapsilosis* 28.7 %, *C. tropicalis* 15.8 %, *C. famata* 4.5 %, *C. neoformans* 3.8%, *C. glabrata* 2.6% y otras 4.5%.

En pacientes inmunosupresos con candidiasis se encontró *C. albicans* en 24.4% y *C. dubliniensis* en 4.4%.

En México, *C. parapsilosis* ocupó el primer lugar con 37.9% (2004-2007), *C. albicans* 31.9 %, *C. tropicalis* 14.8 %, *C. glabrata* 8 %. Hay que hacer notar que todas estas prevalencias pueden variar de acuerdo al grupo de edad.<sup>(22)</sup>.

## 2.6 PATOGENIA Y FACTORES DE VIRULENCIA

El estado del hospedero es de importancia primordial para determinar la patogénesis de *Candida spp*; de hecho estas especies se consideran patógenos oportunistas y para que ocurra enfermedad debe haber un factor que altere la actividad del sistema inmune en el paciente, permitiendo que se establezca la infección. Además de factores por parte del paciente se han identificado factores en dicho microorganismo que contribuyen a su capacidad para causar enfermedad y que explican la diferencia respecto a la patogénesis, entre estos factores se incluye el pH ambiental y mecanismos múltiples de adherencia que permiten la adhesión a los tejidos del hospedero y la subsecuente proliferación; estos mecanismos de adherencia incluyen proteínas de superficie específicas de hifas (*Hwp1*), necesarias para la adhesión estable a las células epiteliales, mutaciones en genes que regulan el cambio de brotes de levadura a formas filamentosas, que es codificada a proteínas de superficies de *C. albicans* (*INF1*) y manosil-transferasa.

La adherencia de las especies de *Candida* a un amplio rango de tipo de tejidos y superficies estables, es esencial en los estadios tempranos de la colonización y de la invasión tisular. *C. albicans* se adhiere más fuertemente a células epiteliales que *C. tropicalis*, seguido por *C. parapsilosis*. Estos hallazgos se relacionan con la categoría de la virulencia asignada a dichas especies <sup>(1)</sup>.

La adherencia es obtenida mediante la combinación de mecanismos específicos (interacción ligando-receptor) y no específicos (carga eléctrica-fuerzas de Van de Waals). Las células de *C. albicans* que están agrupadas de forma más compleja se adhieren mejor al hospedero que durante la fase de levadura.

La hidrofobicidad de la superficie celular de *C. albicans* juega un papel importante en

la fijación del microorganismo a las células eucariotas y superficies inertes, se sabe que la producción del tubo terminal se asocia con un aumento significativo en la hidrofobicidad de la superficie facilitando dicha adherencia.<sup>(1, 6)</sup> (Figura 4).

Los mananos son glicoproteínas presentes en la superficie celular de *C. albicans* y que contribuyen también a su virulencia, afectando principalmente la hidrofobicidad de la superficie celular de la levadura, llevando a cambios en la capacidad de adherencia a los tejidos del hospedero, y también suprimiendo la respuesta inmune; dichas mananoproteínas liberadas de *C. albicans* se ligan a eritrocitos y causan hemólisis. Las hifas de *C. albicans* se ligan a la hemoglobina humana. El nivel del receptor de hemoglobina es significativamente mayor en las especies que presentan hifas en comparación con las especies que solo presentan levaduras, cabe resaltar que sólo las células con hifas de *C. albicans* utilizan la hemoglobina como fuente de hierro.<sup>(7, 24)</sup>

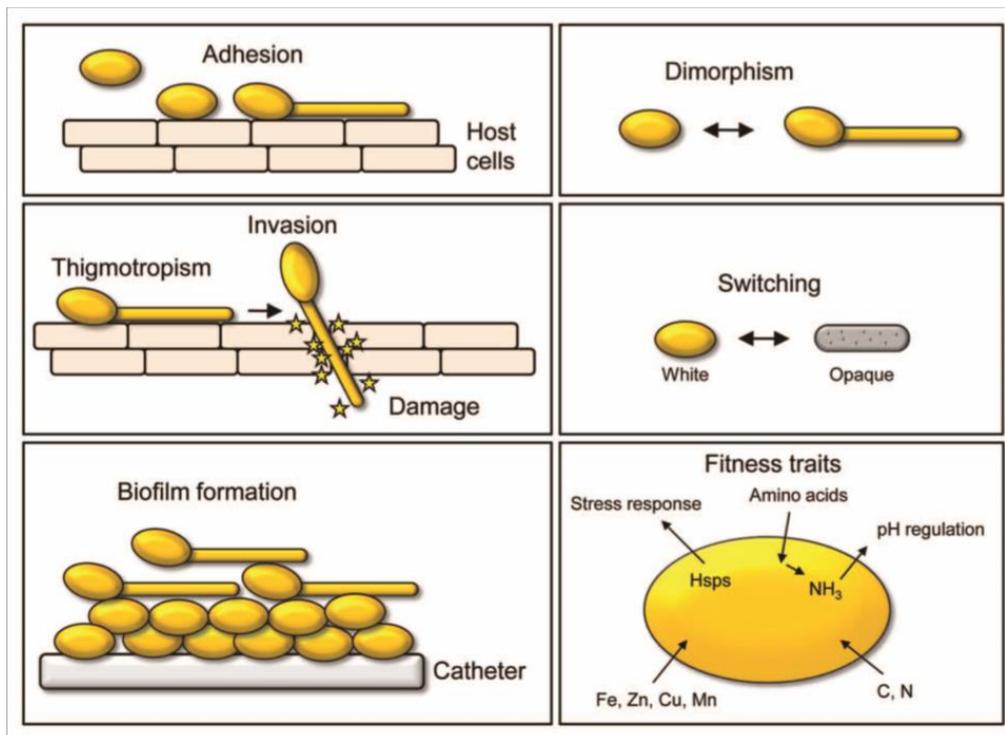
La producción enzimática por las especies de *Candida* es un factor importante de resistencia ya que dichas enzimas incluyen proteinasas extracelulares, fosfolipasas, lipasas, enzimas hidrolíticas y de adhesión.<sup>(1, 6, 9)</sup>

Los grupos más extensamente estudiados de enzimas son las Sap y las fosfolipasas (ver sección de biología celular y enzimología de *Candida spp*).

La expresión de las glicoproteínas de pared, secreción de enzimas proteolíticas, formación de hifas, resistencia a las defensas del hospedero y la resistencia a los azoles son contribuyentes de la virulencia, del mismo modo todas estas características han sido asociadas con el fenómeno de cambio de fenotipo. Por consiguiente, el cambio de fenotipo contribuye a la virulencia facilitando la capacidad para sobrevivir, invadir tejidos y escapar a la defensa del hospedero. Por otro lado, los neutrófilos por si mismos pueden aumentar el proceso de cambio de fenotipo en las cepas más susceptibles.<sup>(24)</sup>

Otro factor de virulencia potencial es la resistencia a la proteína microbicida plaquetaria inducida por trombina (tPMP), la susceptibilidad o resistencia de las especies de *Candida* a tPMP ha sido demostrada en la evolución y resultado final de infecciones experimentales a nivel endovascular.

Se ha reportado que la extensión del aclaramiento de *Candida* por fluconazol es mayor en animales infectados con cepas susceptibles a tPMP que en aquellas cepas resistentes.<sup>(9)</sup>



Las células de *Candida* obtienen la **adherencia celular al hospedero** por la expresión de adhesinas, dicho contacto desencadena en algunas especies la transición de levadura a hifa y un crecimiento dirigido a través de tigmotropismo. **La penetración a las células del hospedero** ocurre a través de endocitosis inducida, un segundo mecanismo de penetración son las fuerzas físicas (penetración activa rompiendo las barreras) y secreción de hidrolasas. **La unión de las células de *Candida*** a elementos inertes (ejemplo catéteres) y a la superficie de células del hospedero puede dar lugar a la formación de biopelículas. **la plasticidad fenotípica (conmutación)** influye en la antigenicidad y formación de biofilms, Además de estos factores de virulencia, **varios rasgos de comportamiento** en dicho género influyen en la patogenicidad como por ejemplo una robusta respuesta al estrés celular mediada por proteínas de choque térmico (HSP); auto-inducción de la formación de hifas a través de absorción de aminoácidos, excreción de amoníaco (NH<sub>3</sub>), alcalinización extracelular concomitante; flexibilidad metabólica, absorción de diferentes compuestos como el carbono (C) fuentes de nitrógeno (N); y absorción de metales traza esenciales, por ejemplo, hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn).

**Figura 4. Visión general de los mecanismos de patogenicidad de *Candida*.**

Fuente: Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4:119-128, 2013. <sup>(24)</sup>

## 2.7 RUTAS DE TRANSMISIÓN DE ESPECIES DE *CANDIDA*

La fuente predominante de infección en todas las enfermedades causadas por *Candida* es el mismo paciente, con una disminución de la barrera anti-*Candida* del hospedero, la transmisión desde el intestino hasta el torrente sanguíneo requiere del crecimiento aumentado de levaduras en el intestino, y esto es favorecido por la pérdida de integridad de la mucosa intestinal.<sup>(7, 9)</sup>

Aunque la fuente de infección es mayoritariamente endógena, cerca del 30% tienen origen exógeno (demostrado por técnicas moleculares). La importancia de la transmisión exógena depende en gran parte de la naturaleza de la enfermedad involucrada; se ha reportado que gran parte del personal de salud es portador en especial de *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Las infecciones por especies de *Candida* que resultan de materiales contaminados ya han sido descritas y estas incluyen con mayor frecuencia la endoftalmitis quirúrgica causada por soluciones contaminadas intravítreas, materiales procedentes de nutrición parenteral así como supositorios contaminados.<sup>(1, 7)</sup>

La transmisión desde el equipo de atención médica al paciente, y de paciente a paciente, también ha sido demostrada. Dichas rutas de transmisión parecen ser de importancia en contextos relativamente cerrados tales como unidades de quemados, unidades geriátricas, hematología, UCI y unidades de trasplantes de órganos.<sup>(1, 7)</sup> También, la transmisión vertical es una vía particular de la adquisición de especies de *Candida* para los neonatos, siendo una manera en que se transmite la biota de la vagina materna al momento del nacimiento.

La candidiasis vulvo-vaginal está presente hasta en el 56% de las mujeres embarazadas, especialmente en el último trimestre de embarazo, además de que el personal médico puede ser un reservorio potencial de transmisión nosocomial con una prevalencia según estudios de hasta 50% de portadores en estos equipos médicos de atención.<sup>(1, 4)</sup>

## 2.8 PREVALENCIA CLÍNICA DE LAS ESPECIES DE CANDIDA

*Candida albicans* es la especie más frecuentemente relacionada con infecciones en sitios genitales, cutáneos y orales.<sup>(4)</sup> Las especies *no albicans* que son patógenas y se aíslan con mayor frecuencia son: *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, y *C. tropicalis*.<sup>(7)</sup>

*C. albicans* es la especie predominante que produce candidiasis orofaríngea entre los pacientes VIH positivos.<sup>(1)</sup> La extensión del uso de profilaxis con fluconazol en pacientes VIH ha inducido la aparición de cepas resistentes al fluconazol de *C. albicans* y ha aumentado la frecuencia de casos relacionados con *Candida no albicans*, especialmente en estadios tardíos del SIDA; sin embargo desde que se introdujo la terapia antiretroviral altamente activa (HAART) la tasa de casos portadores de *C. albicans* resistente a fluconazol ha disminuido de forma importante; dicha disminución de los portadores de cepas resistentes a fluconazol indica que la resistencia posiblemente está en función del estado inmune del hospedero.

Las especies de *Candida* son el cuarto organismo más frecuentemente aislado de hemocultivos de pacientes hospitalizados en EUA. Entre 1995 y el 2002 se contabilizaron 1,890 cultivos positivos por *Candida* relacionados con fungemia nosocomial, siendo *C. albicans* la más frecuente con 54% de los episodios seguidos por *C. glabrata* con 19% y *C. parapsilosis* y *tropicalis* con 11 % cada una; durante este período, la proporción de *C. albicans* y *C. parapsilosis* aumentó, en contraste con la disminución de los casos de *C. glabrata* y *C. tropicalis*.<sup>(16)</sup>

Los cambios en la distribución de las especies puede presentarse no sólo con el tiempo sino en diferentes localizaciones, aunque la exposición a los agentes antifúngicos ha sido considerado por largo tiempo el principal factor para este cambio (Ejemplo: exposición a fluconazol aumenta las infecciones por *C. glabrata* y *C. krusei*). Datos recientes demuestran que hay factores múltiples que pueden llevar a cambios en la distribución de las especies.<sup>(2)</sup>

La inmunosupresión severa, prematuridad, enfermedad crítica, exposición a antibióticos de amplio espectro y la edad avanzada pueden llevar a la reducción en las tasas de *C. albicans* en favor de las especies *no-albicans*, en particular *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. El uso de catéteres intravenosos y la falta de cumplimiento con el lavado de manos por parte del personal médico se ha reportado que aumenta las infecciones por *C. parapsilosis*.<sup>(1)</sup>

Los factores anteriormente mencionados, pueden explicar las diferencias en la distribución de las especies en varias partes del mundo, como en el caso de Latinoamérica al reportarse la tasa más baja de *C. albicans* y *C. glabrata* mientras que estas especies son las más frecuentemente aisladas en los EUA y Dinamarca.<sup>(19)</sup>

La colonización del sitio por más especies de *Candida* no es infrecuente. En estudios conducidos entre individuos saludables, pacientes con malignidades hematológicas, diabetes mellitus, infección por VIH, cáncer nasofaríngeo y pacientes geriátricos, se encontró colonización por más de una especie en hasta 44%.<sup>(1, 7)</sup> Los individuos en quienes sólo se encuentra colonización o en quienes sólo se logra aislar *C. albicans* usualmente están colonizados por un solo tipo de cepa.

En términos de genética poblacional, la colonización se describe como clonal; sin embargo, la colonización por más de un biotipo de *C. albicans* (colonización policlonal) oscila entre 3% y 55% entre individuos saludables, pacientes con malignidad hematológica, infección por VIH, y entre pacientes geriátricos. Por consiguiente, aunque la mayor parte de las poblaciones de *C. albicans* son comensales y tienden a ser principalmente clonales, se encuentran pequeñas variaciones respecto al tipo de cepa encontrada de acuerdo a los diferentes nichos anatómicos;<sup>(2)</sup> aparentemente esto se origina por microevolución como resultado de reordenamientos genéticos.

La colonización simultánea de *Candida* en más de un sitio puede involucrar la misma o diferentes cepas. El aislamiento concurrente de especies similares o de diversos tipos, es el hallazgo más frecuente, especialmente cuando los sitios están

relacionados de forma anatómica, en cuanto a esto, más del 90% de las cepas de *Candida* aisladas simultáneamente de vagina, uretra y ano representan las mismas especies o el biotipo de *Candida*.<sup>(1, 6)</sup>

## 2.9 ESPECTRO DE LA ENFERMEDAD

No obstante el solape de características de los varios síndromes de candidiasis invasiva, es útil dividirlos en aquellos que involucran el torrente sanguíneo, como la candidiasis hematógena, y aquellas que se presentan como infección de un órgano específico (candidiasis de órganos profundos).<sup>(25)</sup>

### 2.9.1 Candidiasis hematógena

El término candidemia se refiere al aislamiento de las especies patógenas de *Candida* procedentes de un cultivo de una muestra de sangre, sin embargo esta definición no hace justicia al amplio espectro de infecciones asociadas con la candidemia. La candidemia puede mostrarse como no complicada y con un curso relativamente benigno o convertirse en una complicación con inclusión de órganos blancos y producir así una osteomielitis, endoftalmitis o invasión de órganos profundos. De igual forma, *Candida* en el paciente neutropénico puede mantenerse limitada al torrente sanguíneo (no complicada) o evolucionar a una complicación que amenaza la vida, tal como una candidiasis aguda diseminada, candidiasis diseminada crónica o candidiasis de órganos profundos.<sup>(1, 9)</sup>

### 2.9.2 Candidiasis de órganos profundos

La mayor parte de estas infecciones se presentan como resultado de candidiasis hematógena no detectada, ocasionalmente las infecciones pueden originarse por la inoculación directa del hongo en ciertos órganos. Un ejemplo es la peritonitis que usualmente se desarrolla en pacientes con catéteres de diálisis peritoneal o luego de

una lesión al colon. Las formas más frecuentes de la enfermedad involucran el tracto gastrointestinal (típicamente la cavidad oral), genitales femeninos, piel y uñas (1, 2, 9, 18)

### 2.9.3 Infecciones del tracto gastrointestinal por *Candida*

Las infecciones orales por *Candida* se presentan predominantemente en pacientes con inmunosupresión local o sistémica o con exposición a otros factores que favorecen el sobrecrecimiento de *Candida spp.* Los individuos con inmunosupresión incluyen a neonatos con asfixia al nacer, desnutrición o pacientes diabéticos, infección por VIH, también aquellos que reciben corticosteroides o quimioterapia citotóxica y los que son sometidos a radioterapia maxilofacial. El tratamiento prolongado con antibióticos o corticosteroides inhalados así como ser portador de prótesis dental son factores de riesgo adicionales.<sup>(1)</sup>

La prevalencia de candidiasis oral en pacientes con SIDA alcanza 100%, particularmente cuando el conteo de linfocitos CD4<sup>+</sup> es menor de 200 células por mililitro; sin embargo, la introducción de la terapia altamente activa ha disminuido de forma significativa. La incidencia de candidiasis oral hasta el 2- 4%.<sup>(5)</sup> Entre los pacientes con cáncer sometidos a tratamiento antineoplásico, la incidencia de candidiasis oral oscila entre 28 -38%. (1, 9, 18)

En los pacientes con candidiasis oral induce presentaciones clínicas que incluyen: parches blancos (en forma de queso *cottage*), de tipo pseudomembranoso y superficie expuesta o sangrante cuando es raspada. La candidiasis puede incluir cualquier sitio del intestino, pero más frecuentemente: la cavidad oral, esófago y el intestino delgado; en este caso las lesiones pueden progresar a infección hematógena, obstrucción o perforación.

La patología de la infección por *Candida* en el intestino inferior oscila desde ulceración de la mucosa con o sin lesiones y la pseudomembranas que están compuestas por una mezcla de levaduras y pseudohifas incrustadas que pueden extenderse más allá de la capa muscular y alcanzar la vasculatura directa a través de la pared intestinal. El diagnóstico para esta condición se basa en la presencia de brotes de levadura y/o

pseudohifas en frotis con KOH y cultivos por hongos de epitelio roto mostrando una reacción inflamatoria en la submucosa <sup>(1, 9, 18)</sup>.

#### 2.9.4 Infecciones genitales por *Candida*

Las especies de *Candida*, particularmente *C. albicans*, juegan un papel importante en la candidiasis vulvovaginal, que es la segunda causa más frecuente de malestares genitales en mujeres, con alrededor del 75 % experimentando al menos un episodio en la vida, y la mitad experimentará la infección antes de los 25 años de edad. <sup>(1)</sup> Los factores de riesgo de candidiasis vulvovaginal con frecuencia se han asociado con el uso de anticonceptivos orales, corticosteroides o antibióticos, diabetes y embarazo. La transmisión sexual de cepas de *Candida spp.* ocurre entre parejas, especialmente en el contexto de la realización de sexo oral receptivo, ya que la infección no parece ser transmitida a través de las relaciones vaginales.

En la mayoría de los casos la presentación es aguda, los síntomas son leves (prurito, dolor vaginal, disuria externa, y descarga vaginal anormal) y responde rápidamente a un tratamiento tópico de curso corto (azoles tópicos). Sin embargo, alrededor del 5 % de las mujeres desarrollan una candidiasis vulvovaginal recurrente ( $\geq 4$  episodios por año), dichas infecciones típicamente son resistentes al tratamiento estándar.

Para confirmar el diagnóstico de vulvovaginitis por *Candida* resistente, debe obtenerse muestras de secreciones vaginales y para identificar especies no usuales tales como *C. glabrata* y otras especies *no albicans* que se reportan en un 10-20% de los casos con candidiasis vaginal.<sup>(1,9)</sup> Es importante recordar que la vía de infección a través del parto vaginal es una de las más importantes para pacientes pediátricos, sobre todo los que presentan bajo peso al nacer.

### 2.9.5 Infecciones por *Candida* en la piel y uñas

Se ha demostrado que *C. albicans* afecta piel y las membranas mucosas en cerca del 75 % de la población, sin causar enfermedad. Sin embargo la infección por *Candida* puede desarrollarse en sitios corporales que tienen pliegues de piel tales como la región inguinal, axila, espacios entre los dedos y las mamas.

Las manifestaciones clínicas pueden presentarse como *rash* prurítico con bordes pobremente definidos, abundantes lesiones vesiculosas, pustulosas o eritematosas. La infección invasiva de las uñas u onicomicosis es causada principalmente por *C. albicans*, *C. parapsilosis* y menos frecuentemente por *C. glabrata* y *C. guilliermondii*.<sup>(1, 5)</sup>

Algunas levaduras y particularmente *C. albicans* son frecuentes en neonatos, sin embargo, en el neonato prematuro inmunocomprometido hay mayor susceptibilidad de infecciones más severas.<sup>(1)</sup> Los neonatos que pesan más de 1000 gramos raramente desarrollan candidiasis neonatal congénita, esta condición se presenta como *rash* eritematoso macular generalizado que puede presentar pústulas, pápulas o vesículas con posterior descamación. Entre los neonatos prematuros que pesan menos de 1000 g, esta entidad se presenta como una dermatitis erosiva que puede evolucionar a candidiasis hematógena y posiblemente la muerte.<sup>(1, 18)</sup>

### 2.9.6 Infección del tracto urinario (ITU)

El aislamiento de los especímenes de *Candida* de una muestra de orina representa contaminación (frecuente en el genero femenino), colonización y raramente infección del tracto urinario inferior o superior.

La colonización o candiduria asintomática, así como la infección se presenta en pacientes con los factores de riesgo usuales como: diabetes, inmunosupresión, entre otros; y en aquellos con factores de riesgo locales tales como la presencia de catéter urinario, obstrucción del tracto urinario y cirugía. La prevalencia de candidiasis que mantiene los pacientes hospitalizados oscila entre 2-11 %, y es más alta entre los pacientes con leucemia, transplante de médula ósea y pacientes de la unidad de

cuidados intensivos.

En el laboratorio, para el diagnóstico de infección en pacientes cateterizados, la piuria y un alto conteo de colonias en orina no son totalmente útiles, sin embargo la presencia de  $>10^3$  UFC/ml de especies de *Candida* sugiere infección entre pacientes no cateterizados. El urocultivo con resultados negativos no puede excluir infección por *Candida*. La candiduria asintomática usualmente tiene un curso benigno aunque puede presentar infección hematológica en pacientes con inmunosupresión severa.<sup>(1, 6, 9)</sup>

En la infección del tracto urinario bajo, como en la cistitis, los síntomas son comparables con los de la cistitis bacteriana. La infección del tracto superior es indistinguible de la pielonefritis bacteriana y de la sepsis de origen urogenital; dichas infecciones se presentan principalmente entre pacientes con obstrucción y estasis urinaria. Las complicaciones incluyen pielonefrosis, abscesos focales, y quistes por acúmulos de hongos (bezoares) que pueden llevar a obstrucción, cólico renal y necrosis papilar. Los bezoares por hongos son raros y se desarrollan principalmente en la pelvis y la parte superior de los uréteres. La candidemia es una complicación frecuente de infección ascendente y se presenta principalmente entre pacientes con obstrucción, o luego de la manipulación urológica. La ultrasonografía y la TAC pueden diagnosticar infecciones por estos agentes. La candidiasis renal es secundaria a la candidiasis hematológica y se presenta con las manifestaciones usuales de sepsis. La candiduria puede estar presente aún sin síntomas de afectación renal.<sup>(1, 9)</sup>

### 2.9.7 Mediastinitis

En la mayoría de casos, esta condición se presenta después de procedimientos relacionados con cirugía torácica, reportándose una media de 11 días y un rango de 6-100 días, y se presenta como eritema de la pared torácica con o sin drenaje, fiebre e inestabilidad esternal; la evolución puede complicarse si hay diseminación hematológica contigua. La tasa de mortalidad es mayor al 50%, debido a un retraso en el diagnóstico.<sup>(1, 9)</sup>

### 2.9.8 Infección cardiovascular

Los hongos producen entre 2-4% de todas las endocarditis y un 65% de éstas se dan por especies de *Candida*. Entre un 2-10% de endocarditis por válvulas será ocasionada por *Candida*, y de las endocarditis que se presentan entre los consumidores de drogas intravenosas, el 14 % serán por especies de *Candida*.

Los factores de riesgo por endocarditis asociada con *Candida* incluyen cirugía mayor cardíaca y otras cirugías invasivas, endocarditis bacteriana preexistente o enfermedad valvular y presencia de marcapasos o catéter venoso central colocado por largo tiempo. Otras poblaciones en riesgo incluyen a los neonatos y ocasionalmente pacientes con inmunosupresión.

La presentación clínica de la endocarditis es similar a la de la endocarditis bacteriana con fiebre en el 75% de los casos.<sup>(1, 9)</sup>

### 2.9.9 Infección del Sistema Nervioso Central (SNC)

Esta es una presentación rara que se manifiesta como meningitis o abscesos, y ocasionalmente como evento cerebrovascular. Usualmente estas infecciones son secundarias a candidiasis hematógena o por cirugía del SNC, en neonatos la candidiasis hematógena se asocia con meningitis (64%), comparado con un 15% en adultos. El diagnóstico se realiza por examen de líquido cefalorraquídeo (LCR) y cultivo del mismo, y en situaciones como la meningitis crónica por *Candida*, muestra un cuadro clínico similar al de la tuberculosis o al de la Criptococosis, requiriendo de un volumen relativamente grande de LCR para descartar este agente debido al bajo número de microorganismos circulantes en la mayoría de las ocasiones.<sup>((18)</sup>

### 2.9.10 Infecciones oculares

Estas incluyen queratitis, corioretinitis y endoftalmitis, estas dos últimas presentaciones son secundarias a candidiasis hematogena y pueden ser manifestaciones tempranas de dicha infección hematogena, ocasionalmente puede originarse por trauma ocular o cirugía, que también pueden inducir queratitis.<sup>(1)</sup>

### 2.9.11 Infecciones de huesos y articulaciones

La artritis séptica primaria por *Candida* es muy poco frecuente, se da sobre todo en pacientes diabéticos con úlceras de pie o por implantación accidental del hongo por una cirugía, inyección intra-articular de corticosteroide o por abuso de drogas; se caracteriza por un inicio insidioso de artritis séptica e involucra generalmente una sola articulación, el sitio varía según la edad, en adultos afecta principalmente las vértebras y los huesos largos en niños, el dolor local es el síntoma, el diagnóstico es por cultivo de líquido articular, una sola colonia en uno de estos cultivos debe ser tomada en consideración.<sup>(1, 9)</sup>

### 2.9.12 Infecciones abdominales

Se ha reportado la identificación de especies de *Candida* en 10% de los pacientes sometidos a cirugía por necrosis pancreática infectada, también se han identificado en abscesos subfrénicos, hepáticos y de vesícula biliar, así como pacientes con cáncer que tienen catéteres de drenaje. También se ha identificado *Candida* en el 8% de las peritonitis que se presentan en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria continua, representando *C. albicans* el 75% de estas infecciones. También se identifica en pacientes con cirrosis hepática y con malignidad intra-abdominal, y si no se trata este hallazgo puede haber diseminación hematogena y formación de abscesos que requerirán de drenaje quirúrgico.<sup>(1, 9)</sup>

## 2.10 MORTALIDAD Y PREDICTORES DE EVOLUCIÓN FINAL

La mortalidad atribuible a candidiasis invasora oscila entre 5-71%,<sup>(1, 9)</sup> y es probablemente el resultado de diferencias en el tipo y tamaño de la población estudiada, definiciones de la enfermedad, intervalo de tiempo para la evaluación y estrategia de tratamiento.

Los factores asociados a riesgo identificados son: edad avanzada, insuficiencia renal aguda y una puntuación no favorable de *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II* (APACHE-II).

APACHE-II es un sistema de clasificación de severidad o gravedad de enfermedades, uno de varios sistemas de puntuación (*scoring*) usado en UCI. Este es aplicado dentro de las 24 horas de admisión del paciente a UCI: un valor entero de 0 a 71 es calculado basado en varias medidas; a mayor puntuación, le corresponden enfermedades más severas y un mayor riesgo de muerte.

Es interesante observar que la candidemia no se asocia con aumento en la mortalidad después de ajustar estos factores, en estos casos los predictores de un mal pronóstico son: Edad avanzada, diseminación visceral y neutropenia persistente; la remoción del catéter venoso central se identificó como factor pronóstico independiente en uno solo de 10 estudios. También se relaciona con malignidad hematológica y muerte temprana (3-7 días después de la candidemia).<sup>(9)</sup>

Los factores relacionados con el desarrollo de candidiasis hematógena por colonización está relacionada con factores endógenos (tratamiento antibiótico prolongado) y exógenos, estancia hospitalaria prolongadas en salas como UCI de 7-10 días; el daño la integridad de la mucosa intestinal que lleva al aumento en la translocación fúngica, desnutrición, cirugía, quemaduras severas y enfermedad de injerto-hospedero. Otro factor importante es la inmunosupresión, que puede ser local (aumenta el sobre crecimiento de *Candida* y/o translocación) o sistémica (diseminación)<sup>(1, 7)</sup>; condiciones que suprimen la inmunidad mediada por células T o la fagocitosis y que se incluye dentro de la prematuridad, quemaduras severas,

hemodiálisis, trasplante, cáncer especialmente hematológico, neutropenia, SIDA, tratamiento inmunosupresor con esteroides o quimioterapia por cáncer y recepción de trasplante de médula ósea o de órganos sólidos <sup>(1, 9)</sup>.

La presencia de catéter venoso central se ha reportado como factor de riesgo en algunos estudios y en otras literaturas demuestran lo contrario; esto es debido que el catéter venoso central es un factor de riesgo de candidemia por la contaminación cutánea con *Candida* en el sitio de inserción del catéter venoso central, sin embargo no hay datos que apoyen esta teoría, ya que principalmente se encuentran *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, que son menos frecuentes como agentes de candidemia, además de que la vida media de las especies de *Candida spp.* sobre la piel es de sólo unos pocos minutos.

Otros postulado que la presencia de catéter venoso central, que han la marcador de severidad de la enfermedad más que un factor de riesgo de candidemia, explicando que estos pueden infectarse durante la candidiasis hematógena y convertirse en una fuente de infección persistente, en neonatos la tasa neta de mortalidad inducida por infecciones asociadas a especies de *Candida* es de 25-30% con mortalidad atribuible de 13%, reportándose mortalidad de 42% por *C. parapsilosis*.  
(26)

## 2.11 PRESENTACIÓN CLÍNICA

### 2.11.1 Candidiasis diseminada aguda

En neonatos, esta presentación clínica es más frecuentemente causada por *C. albicans* y tiene una presentación clínica diferente en adultos; en niños ocurre más frecuentemente el choque séptico y la meningitis, la diseminación en diferentes órganos es frecuente incluyendo dos tercios a piel (66%) o SNC (64%) y 50% a la retina, aunque el tratamiento empírico ha disminuido la incidencia de endoftalmitis hasta 6%; la disfunción respiratoria y la apnea también son frecuentes (70%).<sup>(1)</sup>

En adultos, la candidiasis aguda diseminada se presenta en pacientes no

neutropénicos ingresados en UCI y en pacientes neutropénicos con malignidad hematológica que están recibiendo quimioterapia antineoplásica. La infección puede incluir órganos como el ojo, con afectación entre 3-78% dependiendo de la población estudiada (menor en el paciente neutropénico, probablemente debido a su incapacidad para desarrollar una completa respuesta inflamatoria); en los pacientes neutropénicos se presentan lesiones en piel en 10-25 % <sup>(3)</sup>. La afectación pulmonar puede ocurrir durante la candidiasis aguda diseminada, pudiendo ser visualizada con una Tomografía axial computarizada (TAC), aunque es difícil distinguir las de la aspergilosis invasiva, incluyendo múltiples opacidades nodulares a menudo asociadas con áreas de consolidación como signo del halo, cavitación y opacidades en vidrio de reloj. <sup>(1, 9, 17)</sup>

#### 2.11.2 Candidiasis crónica diseminada

Es menos frecuente que la enfermedad diseminada aguda, anteriormente conocida como candidiasis hepatoesplénica y casi siempre relacionada con la recuperación de la neutropenia y que puede originar un episodio subsecuente de candidiasis diseminada aguda. Esta condición se presenta principalmente entre pacientes con leucemia aguda sometidos a quimioterapia citotóxica y se caracteriza por fiebre persistente que no responde a los antibióticos, hemocultivo negativo (usualmente), y la presencia de imagen radiológica de abscesos múltiples en hígado y en otros órganos como son: bazo, pulmones y riñones. La hepatomegalia y/o esplenomegalia se presenta en la mitad de los pacientes, mientras que la sensibilidad o dolor abdominal puede presentarse en cerca de dos tercios. <sup>(1, 9, 17)</sup>

#### 2.11.3 Tromboflebitis séptica secundaria relacionada con catéter

En esta entidad, la fuente primaria de la candidemia es la translocación intestinal de la especie en el catéter, durante la diseminación hematológica, las especies de *Candida* se adhieren al trombo asociado con el catéter venoso central, llevando a tromboflebitis séptica. Así pues el catéter después se convierte en una fuente de donde *Candida* puede posteriormente diseminarse por lo que se llama candidemia

secundaria relacionada con catéter.

## 2.12 DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR *CANDIDA*

### 2.12.1. Microscopía Directa

El diagnóstico de laboratorio depende de tres abordajes: a) Microbiológico, b) Histopatológico y, c) Inmunológico, que debe incluir colaboración estrecha entre clínicos, microbiólogos y patólogos.<sup>(1, 9)</sup>

En el examen microscópico directo del material clínico con montaje húmedo puede utilizarse coloraciones como: GRAM, GIEMSA, ácido peryódico de Schiff (PAS) o tinción de calcoflúor pueden identificar rápidamente la combinación de características de brotes de levaduras y pseudohifas, aunque *Trichosporum* y *Geotrichum* pueden producir hallazgos similares.

En los pacientes en los que se sospecha candidemia, el diagnóstico temprano puede ser realizado examinando un frotis de sangre con coloraciones como Wright-Giemsa, específicamente buscando levaduras.<sup>(1, 9, 23)</sup>

Las tinciones histológicas como la hematoxilina y eosina (H&E), tinciones de GMS y PAS pueden detectar *Candida spp.* en diferentes líquidos y tejidos; sin embargo la tinción de hematoxilina y eosina puede ser inadecuada cuando hay pocos elementos del hongo. En dicho contexto las tinciones de GMS y PAS pueden detectar pequeñas cantidades de hongos y delinear mejor su morfología. Cuando es necesario, pueden utilizarse tinciones inmunofluorescentes para confirmar una identificación presuntiva histológica de *Candida*.<sup>(27)</sup>

### 2.12.2. Microbiología

El hemocultivo es esencial para el diagnóstico de candidemia, disponiéndose de guías internacionales que incluyen recomendaciones generales para la toma y procesamiento de muestras sanguíneas dirigidas a asegurar el aislamiento óptimo del microorganismo.<sup>(18, 28)</sup>

La ruta tradicional o estándar para el diagnóstico microbiológico de importancia para la toma de decisiones por parte del clínico que afectan el pronóstico del paciente inicia con la toma de muestra, que con mayor frecuencia es de sangre, dado que con esta muestra se puede identificar de forma más temprana la forma diseminada de la candidiasis invasiva, algunos factores que influyen la capacidad de detección del hemocultivo es el volumen del inóculo, condiciones de cultivo, concentración del organismo en el torrente sanguíneo y la especie; *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* se detectan en los primeros 1-3 días y *C. krusei* y *C. glabrata* en 4-9 días.<sup>(29)</sup>

El número de hemocultivos recomendados son tres para una sesión única, con un volumen total variable de acuerdo a la edad del paciente, 40-60 ml para adultos, 2-4 ml para niños menores de 2 kg de peso, 6 ml para niños entre 2-12 kg y 20 ml para niños entre 12-36 kg.

La venopunción se mantiene como la técnica de elección para la toma de muestra de sangre. La frecuencia recomendada es diaria cuando se sospecha candidemia y el período de incubación debe ser de al menos cinco días. Cuando se han seguido dichas recomendaciones, la sensibilidad del hemocultivo para detectar *Candida* oscila entre 50-75%<sup>(10)</sup>, aunque en pacientes neutropénicos sometidos a tratamiento antifúngico la sensibilidad puede ser más baja; también dicha sensibilidad varía dependiendo de las especies y el sistema de identificación utilizado como BACTEC, así *C. glabrata* tiene crecimiento menos óptimo en el sistema a menos que se incluya una botella especial con las características óptimas para el crecimiento micótico.

La identificación a nivel de especies es obligatoria debido a que el tratamiento antifúngico puede variar de acuerdo la especie de *Candida*. En adición, las levaduras en el hemocultivo no siempre son *Candida spp*; pudiendo encontrarse levaduras patógenas menos comunes en hasta el 5% de los pacientes con fungemia.

El desempeño del hemocultivo no es muy alto, por lo que no puede ser considerado como técnica de diagnóstico temprano; procedimientos alternativos basados en la detección y cuantificación de biomarcadores de hongos contribuyen a mejorar y

anticipar la detección de candidemia.<sup>(1, 9)</sup> En la tabla 2 se incluyen las recomendaciones de ESCMID 2012 acerca del uso de dichas técnicas en el contexto clínico.<sup>(25)</sup>

ENFERMEDAD	MUESTRA	PRUEBA DIAGNÓSTICA	RECOMENDACIÓN EN LA APLICACIÓN
<b>Candidemia</b>	Sangre	Hemocultivo	Investigación esencial*
	Plasma	Manano/anti-manano	Recomendado
<b>Candidiasis invasiva</b>	Sangre	B-D glucano	Recomendado
	Plasma	Otros anticuerpos	No recomendado
		Kit PCR Septifast	No recomendado
		PCR in-house	No recomendado
	Tejido y líquidos estériles corporales	Microscopía directa e	Investigación esencial
		Histopatología	Investigación esencial
		Cultivo	No recomendado
		Inmunohistoquímica	No recomendado
		PCR de tejidos	No recomendado
		Hibridización <i>in situ</i>	
<b>Candidiasis diseminada crónica</b>	Sangre	Hemocultivo	Investigación esencial
	Plasma	Manano/anti-manano	Recomendado
		B-D-glucano	Recomendado
		Kit de PCR Septifast	No recomendado
		PCR in-house	No recomendado
	Tejido y líquidos corporales estériles	Microscopía directa e	Investigación esencial
		Histopatología	Investigación esencial
		Cultivo	No recomendación
		Inmunohistoquímica	No recomendación
		PCR in-house	No recomendada
		Hibridización <i>in-situ</i>	
<b>Candidiasis esofágica y orofaríngea</b>	Hisopado	Cultivo	Investigación esencial
		PCR in-house	No recomendado
	Biopsia**	Microscopía directa e	Investigación esencial
		Histopatología	Investigación esencial
		Cultivo	No recomendado
		PCR in-house	
<b>Candidiasis vaginal</b>	Hisopado/secreción vaginal	Microscopía directa	Investigación esencial
		Cultivo	Investigación esencial
		Pruebas comerciales	Sólo pruebas validadas
		PCR in-house	No recomendado

\* Investigación esencial significa que ésta debe ser realizada si es posible \*\* La biopsia orofaríngea no es obligatoria

## **Tabla 2. Resumen sobre recomendaciones para diagnóstico de enfermedad por *Candida*.**

Fuente: Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect 2012;18 Suppl 7:9-18.

Los hemocultivos pueden no obtener ningún crecimiento bacteriano, en un número importante de pacientes con infección por *Candida spp*; apoyándose el diagnóstico sobre la combinación de hallazgos clínicos y laboratoriales. La fiebre inexplicable, la sepsis y la lesión metastásica de piel pueden ser signos clínicos útiles; en estos pacientes se deben buscar el foco potencial de origen y que en ocasiones coincide con mialgias secundarias a abscesos musculares, endoftalmitis o lesiones en piel. El 30% de las candidiasis invasivas no obtendrán crecimiento bacteriano en el hemocultivo, lo que determina la importancia de conocer la biota local y de disponer de datos sobre la epidemiología de las especies *no-albicans*, que se relacionan más con la resistencia a fluconazol.<sup>(10, 25)</sup>

La baja sensibilidad de los hemocultivos para detectar candidemia, como se ha mencionado, se ha mejorado de forma significativa con nuevas tecnologías tales como los sistemas de cultivo sanguíneo automatizados para monitoreo continuo; e.g. BactT/Alert[BioMerieux]<sup>TM</sup>, Bactec<sup>TM</sup>(Becton-Dickinson) y el método de lisis-centrifugación (*Isolator, Wampole*).<sup>(30)</sup>

El aislamiento de *Candida* en sangre requiere de caldo de cultivo para amplificar el usualmente bajo número de levaduras, las cuales pueden ser colocadas en placas u otros medios para aislamiento e identificación. Los medios bifásicos de hemocultivo y botellas de cultivos ventilados son óptimos para la detección de levaduras de *Candida* y las muestras sanguíneas previamente tratadas por lisis celular y centrifugación, lo que amplifica en gran manera la confiabilidad de detección.

La combinación de lisis-centrifugación y el sistema automatizado como *Bactec*<sup>TM</sup> que ofrece un tiempo promedio de detección de 3-4 días para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, en cambio, se ha encontrado que es necesario mayor tiempo en el caso

de la identificación de *C. krusei* y *C. glabrata*.<sup>(31)</sup>

Por consiguiente, los hemocultivos obtenidos para descartar la candidiasis hematológica se realizan durante dos semanas. El muestreo de varios sitios anatómicos y diversas muestras como esputo, heces, orina y otros, buscando colonización por *Candida* es útil para identificar la categoría de riesgo por candidemia (el riesgo es bajo si hay cultivos persistentemente negativos *versus* alto riesgo si la colonización es multifocal) y aquellos en quienes el tratamiento antifúngico se ha proporcionado con agentes además de fluconazol deben considerarse (colonización con *C. glabrata* o *C. krusei*).

Las especies de *Candida* crecen bien en medio estándar micológico a 35°C tales como agar Sabouraud pH 5.6, y sobre muchos medios bacterianos incluyendo agar sangre, agar con infusión de cerebro-corazón y agar triptosa. La cicloheximida (*Actidione*<sup>™</sup>)<sup>(32)</sup> inhibe el crecimiento de *Candida* y por lo tanto no debe ser incorporado en el abordaje laboratorial por identificación de *Candida*.

En los casos en que una levadura en cultivo no pueda ser reconocida como *C. albicans* o *C. dubliniensis*, se debe examinar la morfología de las blastoconidias y la capacidad para producir pseudohifas y clamidioconidias sobre medios adecuados tales como agar de maíz o de crema de arroz (*Rice-Tween*). La prueba de trehalosa puede identificar *C. glabrata* así como el crecimiento diferencial de color azul sobre agar de metileno-eosina (y crecimiento rápido vs. no crecimiento o crecimiento lento sobre agar-sangre).

El tiempo necesario para identificación de las especies puede acortarse utilizando medios que pueden diferenciar especies de *Candida* por el color de la colonia tales como *Candida CHROM agar*<sup>®</sup>, el cual inhibe el crecimiento bacteriano y proporciona una identificación presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. krusei*; el medio *Fongiscreen 4H*<sup>®</sup> también permite una acción similar.

Otros medios de cultivo que permiten identificación rápida de *C. albicans* incluyen *CandiSelect*<sup>®</sup> de *Sanofi Diagnostic Pasteur, France*; *Fluoroplate*<sup>®</sup> *Candida*, *Merck, Alemania*, *Murex C. albicans*<sup>®</sup>, *Murex Diagnostic, USA*; y *Albicans ID*<sup>®</sup>, *Biomerieux, Francia*.

### 2.12.3. Métodos de diagnóstico no relacionados con cultivo

La identificación es relativamente fácil en cualquier medio de los descritos previamente, y alternativamente la identificación de *C. albicans* puede apoyarse sobre la capacidad de estas especies para producir tubos germinales en plasma después de tres horas a 37°C (>90 % de aislamiento de *C. albicans* producen tubos germinales); sin embargo también pueden producir este fenómeno especies como *C. dubliniensis* y *C. stellatoidea*, especialmente en el caso de la primera.

La mayor parte de los laboratorios continúan confiando en la batería de pruebas bioquímicas ofrecidas por la cinta *API-20C* para identificación de levaduras o el Kit extendido *ID32C API Candida Kit™*.<sup>(33)</sup>

Recientemente se han desarrollado métodos moleculares que utilizan sondas de ácido nucleico peptídico marcado con fluoresceína, el cual se dirige al ARNr de 26S de *C. albicans*, dicho método se lleva a cabo en frotis hechos directamente a partir del contenido de la botella de hemocultivo (prueba *C. albicans PNA FISH™*, *AdanDx Inc, Woburn, MA*). El método permite identificación rápida en 2-3 horas de *C. albicans* vrs. especies *no-albicans*.<sup>(10)</sup> El examen es altamente sensible y específico no obstante el sistema de hemocultivo o formulación de caldo utilizada. Aplicando este método se obtiene una identificación entre 24 a 48 horas más temprana que con los métodos convencionales y puede ofrecer ahorros sustanciales como resultado del tratamiento directo con antifúngicos.<sup>(1, 9)</sup>

Un abordaje muy prometedor es la prueba seriada de la combinación de pruebas de antígenos llamada *Platelia* que detecta mananos con la prueba de anticuerpos así como la prueba *Beta 1-3-glucano (BG)*, (*Fungitell® BG Assay, Associates of Cape Cod Inc, Falmouth, MA*). BG es un componente de la pared celular de la mayor parte de los hongos patógenos incluyendo *Candida* y puede ser detectado y cuantificado en el torrente sanguíneo en pacientes con infección por hongos con sensibilidad y especificidad mayor el 90% en pacientes con candidiasis hematológica.

Las limitaciones incluyen resultados falsos negativos relacionados con hiperbilirrubinemia o hipertrigliceridemia así como falsos positivos que pueden

relacionarse con exceso de manipulación de la muestra y exposición a gases u otro material que contenga glucano, o en presencia de bacteremia por grampositivos, hemólisis, hemodiálisis con membranas de celulosa y tratamiento con inmunoglobulina intravenosa y albúmina.<sup>(13)</sup> La manipulación mínima de la muestra y los resultados secuenciales positivos mejoran el desempeño de la prueba.<sup>(1, 9)</sup>

La detección combinada de anticuerpos de mananos y anti mananos se considera un método específico para detección de especies de *Candida* plasmáticas, con una combinación de pruebas disponibles (*Platelia, Candida Antigen Plus [Ag Plus™]*) y *Antibody Plus (Ab Plus™, Bio-Rad Laboratories)*. Diversos estudios publicados han demostrado que estas pruebas diagnósticas han presentado una sensibilidad y especificidad de alrededor de 80% y 85% respectivamente, lo que se traduce en confiabilidad de 50-70%. Sin embargo, las determinaciones seriadas pueden ser necesarias, la prueba muestra un alto valor predictivo >85% y puede ser utilizada para descartar la infección por lo que este es el recomendado para el diagnóstico de candidemia y puede ser utilizado como parte de la estrategia diagnóstica para establecer la ausencia de la enfermedad y reducir el uso injustificado de agentes antifúngicos en esquemas profilácticos y empíricos en el contexto de UCI, sin embargo hay que hacer notar que la presencia de anticuerpos tarda un promedio seis días.<sup>(25)</sup>

La detección con B-1,3-D-glucano (BDG) es útil en la detección de *Candida* pero no es específica debido a que se encuentra en muchas especies de hongos, la sensibilidad de la prueba es mayor del 65% en la mayor parte de los estudios que la han utilizado, con tasas de especificidad mayores al 80% e índices de probabilidad positiva de cuatro y negativas de 0.50 con valores predictivos mayores al 85%.

Esta prueba puede presentar falsos positivos con el uso de albúmina, inmunoglobulinas o en pacientes que reciben hemodiálisis, creyéndose que la mayor utilidad se encuentra en pacientes que no tienen enfermedad hematológica, en cuanto a la aplicación de la prueba diagnóstica en niños no ha sido validada por el momento. Los kits de detección de anticuerpos tales como *Serion Elisa Classic®* y anticuerpos de tubo terminal de *Candida* están bajo evaluación aún, con evidencia limitada sobre

su confiabilidad en la práctica clínica.<sup>(25)</sup>

#### 2.12.4. Métodos de diagnóstico molecular

Se han realizado muchos progresos en el conocimiento de la biología molecular de *C. albicans*, con cientos de secuencias de ADN que han sido registradas en la base de datos oficial del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Las técnicas de diagnóstico de laboratorio basadas en métodos de amplificación genómica, como la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), pueden resultar una alternativa rápida y más sensible que los métodos convencionales como el cultivo, para la detección temprana de candidemia en pacientes críticos, pudiendo detectar el genoma de levaduras directamente de muestras como ser: sangre completa, suero, plasma o a partir de medios de cultivo; estos ensayos presentan una sensibilidad que va del 73 al 100% y una especificidad del 72 al 100 %, capaz de detectar género y especie de *Candida*.<sup>(13)</sup>

En contraste con los métodos convencionales de cultivo, la amplificación de ADN utilizando la PCR, ha hecho posible detectar una gran variedad de infecciones microbianas de forma rápida, sensible y específica, con diversos protocolos descritos para detectar el ADN directamente inclusive de muestras sanguíneas.<sup>(29)</sup>

Aunque el *gold standard* de diagnóstico por infección por *Candida spp.* de manera diseminada o invasiva sigue siendo la detección por hemocultivos, su rendimiento en el mejor de los casos es del 50 % <sup>(4)</sup>; siendo mas de la mitad del porcentaje de los pacientes infectados por *Candida spp.* que no se logrará documentar la infección micótica o se identificará en forma tardía. Los métodos fenotípicos estándar no son muy sensibles ni específicos y requieren alrededor de 48 a 72 horas o incluso más tiempo para la determinación de especies de *Candida*.<sup>(34)</sup>

Los métodos de detección basados en ADN ofrecen un medio potencialmente más sensible para el diagnóstico de infecciones con baja carga infecciosa y la determinación temprana de la especies, facilitan también el diagnóstico de co-

infección por dos o más especies de *Candida*,<sup>(13)</sup> lo cual brinda una herramienta para guiar el tratamiento antimicótico de la especie en particular de acuerdo con los lineamientos terapéuticos ya establecidos.<sup>(35)</sup>

En la actualidad, *Candida spp.* se ha identificado por técnicas tradicionales, como la producción del tubo germinal y pruebas bioquímicas, sin embargo, estos métodos necesitan procedimientos de purificación y discriminación entre especies lo que resulta en una técnica más laboriosa y que además consume mucho tiempo. Los métodos de identificación de *Candida* basado en la asimilación de pruebas bioquímicas requieren por lo menos 1-5 días para la identificación a nivel de especie, sin embargo, las imprecisiones son siempre posibles, por esa razón se recomiendan análisis más sensibles y específicos para el diagnóstico.<sup>(36)</sup>

Las técnicas moleculares son un buen sustituto para la identificación y diagnóstico de hongos como *Candida spp.*; por su alta sensibilidad además de ser más rápida que los métodos comunes. Este procedimiento con alto poder de discriminación se utiliza en el diagnóstico de especies especialmente en los estudios epidemiológicos para evaluar la vía de transmisión, así como para seleccionar fármacos antifúngicos adecuados.<sup>(37)</sup>

Varios métodos moleculares para identificación de *Candida spp.* se utilizan actualmente<sup>(38)</sup> pero debido a la falta de un método óptimo no se determina aún.<sup>(39)</sup> Durante la última década, se han aplicado diversas técnicas moleculares, ya que tienen alto grado de fiabilidad para la investigación epidemiológica de las diversas variantes de cepas de levaduras patógenas.<sup>(40)</sup> Entre estos métodos, las técnicas basadas en PCR<sup>(41)</sup> son confiables para la mayoría de los propósitos de tipificación y presentan una oportunidad para la tipificación de cepas en un tiempo de respuesta rápida. Los métodos de PCR pueden detectar cantidades muy pequeñas de ADN y causar una detección más temprana de hongos patógenos y en consecuencia, mejorar las posibilidades de supervivencia.<sup>(36)</sup>

Varios métodos de PCR han sido desarrollados para este fin, como ser: PCR anidada,

múltiple, Taq-Man, Light-Cycler y fluorescentes.<sup>(42)</sup>

Ha habido informes de varios estudios recientes que utilizan técnicas de PCR junto con enzimas de restricción para la identificación de especies de diversos hongos. Las regiones ITS1 e ITS2 de los hongos están rodeadas por el gen 5.8SrDNA.<sup>(43)</sup> Estas regiones son apropiadas para el diagnóstico, identificación, taxonomía y filogenia de hongos que son de importancia médica, pudiéndose utilizar como cebadores universales para hongos. Varios métodos, tales como PCR-RFLP, se han reportado en la literatura para identificar diferentes hongos utilizando estos cebadores universales.<sup>(44)</sup> En Fallahi *et al*, utilizaron PCR para amplificar la región ITS del ADNr y se digiere los fragmentos amplificados con tres enzimas de restricción. Ellos Llegaron a la conclusión de que varias especies de *Candida* podrían ser identificadas sobre la base de tamaño y variación de la secuencia.<sup>(45)</sup>

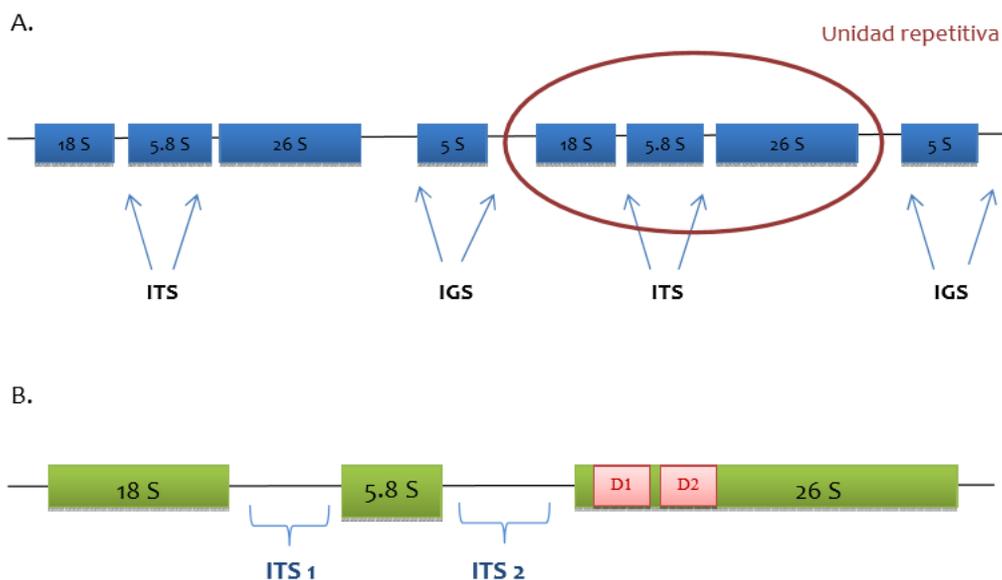
Mirhendi *et al*<sup>(20)</sup> utilizò la técnica de PCR digiriendo los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción (PCR-RFLP) , para diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. krusei* mediante el análisis de estos fragmentos obtenidos, estas especies son las más importantes involucradas en la producción de enfermedad en el ser humano, teniendo como limitación la incapacidad de distinguir entre cepas de *C. albicans* *C. dubliniensis* y *C. stellatoidea* tipo I, por esta razón se han planteado otras técnicas moleculares como la de hibridización fluorescente con péptidos de ácidos nucleicos,<sup>(46)</sup> al utilizar otras enzimas para su discriminación como la *HpaII* y la *BlnI*, esta última corta donde hay una secuencia CCATGG con el fin de discriminar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*; como sólo hay un punto de equilibrio sobre la región de *C. dubliniensis* se han creado dos fragmentos, todo lo contrario a *C. albicans* que presenta un solo fragmento con esta enzima, ya que no presenta un punto de equilibrio sobre dicha región región.<sup>(46)</sup>

La amplificación del gen *hwp1* nos distingue entre los miembros de este complejo mediante diferente longitud de pares de bases por especie, *C. albicans* (941 pb), *C. africana* (750 pb) y *C. dubliniensis* (569 pb); la amplificación de dicho gen se consigue usando los pares de cebadores como ser:

Forward 5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3' y Reverse 5'-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3'.<sup>(47)</sup>

Mohammadi *et al* <sup>(48)</sup> aplicò cebadores universales ITS1 e ITS4 para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2, incluyendo genes de la subunidad 5.8S (Figura 5). Posteriormente se digirió el producto de PCR con enzimas de restricción para identificar las especies de *Candida spp.* sobre la base de tamaño y número de bandas. Vijayakumar *et al* <sup>(49)</sup> con el método específico de PCR-RFLP con los cebadores universales (ITS1 e ITS2), determinaron que fueron capaces de amplificar las regiones ITS de todas las levaduras probadas, y después los amplicones de PCR se digirieron con la enzima *MspI*. Dicha enzima es utilizada para el corte de regiones específicas de las diferentes cepas de *Candida* lo que produce diferentes patrones de bandas, llevandolo a diferenciar entre especies.

Finalmente se identificaron con éxito seis especies frecuentes de *Candida* de importancia clínica. Además, se obtuvieron diferentes patrones en especies no frecuentemente aisladas pero causantes de patologías.



**Figura 5. Región de ADN del género *Candida* que codifica para el ARN ribosomal y detalle de la composición de una unidad repetitiva (ITS).**

Fuente: Pombo AG. Identificación molecular y métodos de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida, 2014.

El análisis de RFLP derivado del ADN de *Candida spp.* tiene la ventaja de ser fácil para un operador entrenado, rápido y fiable en comparación con los métodos fenotípicos que se utilizan actualmente y que en ocasiones no son suficientemente sensibles cuando se necesita aislar estos microorganismos de muestras con baja carga infecciosa como en los hemocultivos, a la vez pueden carecer de reproducibilidad sobre todo en diagnósticos de co-infecciones con cepas de diferentes especies de *Candida*.

En general, parece que este sistema de genotipificación comparando con el sistema de fenotipificación es un método rápido, barato y casi completamente válido para la identificación de *Candida spp.*; (Tabla 3) este método es útil para la investigación clínica y epidemiológica, tanto de las formas mucocutáneas y sistémicas.<sup>(44)</sup>

<b>Prueba</b>	<b>Candidiasis Invasiva</b>	<b>Candidemia</b>	<b>Candidiasis Profunda</b>	<b>Candidiasis Intra-abdominal</b>
<b>PCRc</b>				
<b>Sensibilidad</b>	80 %	59 %	89 %	88 %
<b>Especificidad</b>	70 %			
<b>BDG (Positivo ≥80pmol/mL)</b>				
<b>Sensibilidad</b>	56 %	68 %	53 %	56 %
<b>Especificidad</b>	73 %			
<b>BDG (Positivo ≥60pmol/mL)</b>				
<b>Sensibilidad</b>	69 %	81 %	66 %	65 %
<b>Especificidad</b>	63 %			

BDG= 1,3-b-D-glucano; PCRc=reacción en cadena de la polimerasa con resultado positivo directamente de plasma y/o suero.<sup>(50)</sup>

### **Tabla 3. Reportes de estudios previos sobre el rendimiento de pruebas de detección por PCR versus 1,3-b-D-glucano.**

Fuente: Clancy CJ. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis, 2012.

## **2.13 TRATAMIENTO**

### **2.13.1 Tratamiento de la candidiasis hematológica**

La candidiasis aguda diseminada se trata empíricamente debido a que las herramientas actuales son insuficientes para realizar diagnóstico temprano, llevando consigo a un aumento de la mortalidad por el retardo del tratamiento. En cuanto la profilaxis dada con fluconazol parece disminuir la incidencia y mortalidad, aplicándose frecuentemente como tratamiento empírico.

Por ello, es crítico identificar a los individuos que tienen alto riesgo de candidiasis diseminada aguda, ya que dicha identificación requiere de un tratamiento temprano que es crítico para el pronóstico.

La recuperación de especies de *Candida* de múltiples sitios en pacientes con fiebre sin origen alguno, leucocitosis e hipotensión, debe considerarse altamente sugestiva de candidiasis invasiva y debe iniciarse el tratamiento empírico. Por lo mencionado previamente, se han desarrollado sistemas de puntuación para pronosticar el riesgo de estos pacientes e identificar los candidatos al tratamiento temprano; entre estos sistemas se incluyen el índice de colonización por hongos y la combinación con otros factores de riesgo.<sup>(1, 9, 18)</sup>

El índice de colonización por hongos está compuesto con los siguientes valores, por sepsis severa (+2.038), colonización multifocal por *Candida* spp. (+1.112), cirugía (+0.997), y TPN (+0.908); los pacientes con más de 2.5 tienen 7 veces mayor riesgo de sufrir de candidiasis invasiva. Otros sistemas descansan sobre variables que incluyen: Ingreso de cuatro o más días en UCI, CVC, Diabetes Mellitus, debutante en hemodiálisis, TPN y uso de antibióticos de amplio espectro.

### 2.13.2 Tratamiento empírico

Las opciones terapéuticas consisten en la administración de azoles, equinocandinas o anfotericina B, al seleccionar un azol (fluconazol 400-800 mg/día), el criterio de administración debe contemplar la epidemiología local, y si esta sugiere que podría ser un agente *no-albicans*, se recomienda voriconazol debido a su actividad contra *C. krusei* y algunas cepas de *C. glabrata*.

La aplicación de fluconazol se cree que es costo-eficaz en la UCIP cuando la probabilidad de candidiasis invasiva es mayor al 2.5% o cuando la resistencia a fluconazol es menor de 24%. Si hubiera mayores niveles de resistencia al fluconazol, se recomienda una equinocandina, ya que las características clínicas no permiten la predicción confiable de la especie.

La selección empírica del tratamiento antifúngico se basa en aspectos como el estado hemodinámico, la epidemiología local (potencial o riesgo de cepas resistentes), la exposición previa a agentes antifúngicos, y la relación de costo eficacia.<sup>(9, 17)</sup>

El fluconazol tiene buena actividad contra las especies de *Candida* excepto contra *C. krusei* y *C. glabrata*, además de mejor tolerancia que la anfotericina B, la combinación de ambos inducen resultados terapéuticos más rápidos. El tratamiento con itraconazol aún no se aplica de forma estándar debido a la evidencia limitada.

El voriconazol no es inferior a anfotericina B y se considera la segunda elección para tratar candidemia en pacientes no neutropénicos, su administración es por vía oral así como intravenosa, pero se relaciona con interacciones con otros fármacos.

El posaconazol posee excelente actividad *in vitro* contra las especies de *Candida* pero no hay formulación intravenosa y la evidencia disponible es limitada.

La anfotericina B es mejor tolerada en formulaciones de lípidos con amplia actividad contra la mayor parte de las especies de *Candida*; entre las formulaciones hay una de dispersión coloidal (*AmB Amphocil*®, complejo lipídico *AmB (ABLC; LAmB Abelcet*® y formulación liposomal (*AmBisome*®). Estudios han demostrado que la *ABLC*

(*Abelcet*®) a dosis de 5 mg/kilogramos/día es eficaz y menos nefrotóxica que la *D-AmB* (0.7-1 mg/kg/día) aunque con evidencia limitada.

La eficacia de la L-AmB ha sido establecida en candidiasis neonatal con tasas de respuesta que van desde el 72-100% de casos y con evidencia de su eficacia en adultos. Las equinocandinas como la anidulafungina, caspofungina y micafungina son agentes de amplio espectro con mínimos efectos adversos. Tiene estructura comparable, farmacología, actividad y eficacia experimental *in vitro* similar a la encontrada en candidiasis invasiva.<sup>(9)</sup>

En el caso del manejo del catéter venoso central, es obligatorio la remoción del mismo, aunque algunos autores mencionan estar en desacuerdo, otros recomiendan la remoción cuando el reemplazo es fácil y seguro, si hay presencia de fungemia de alto grado que sugiere tromboflebitis séptica o endocarditis, inestabilidad hemodinámica no explicable, infección eniiiii órganos por *Candida* o infección empaquetada en un sitio así como fiebre que no remite o de origen desconocido por más de 72 horas con tratamiento antifúngico, en el caso de identificar *C. parapsilosis* se debe retirar el catéter obligatoriamente; un ejemplo es el paciente con neutropenia y mucositis por leucemia o trasplante de órganos, así que la remoción del catéter es poco probable que sea beneficiosa.

Si la candidemia no es complicada, una semana de tratamiento es adecuada; se considera complicada cuando hay origen profundo de la infección o cuando hay afectación de órganos,<sup>(51)</sup> esta última requiere de tratamiento por al menos 14 días después de la resolución de todos los signos y síntomas de candidiasis además de la remoción del origen. Algunos autores han propuesto el tratamiento con citoquinas para candidiasis hematogena, principalmente debido a que la respuesta del sistema inmune del hospedero contra la candidiasis se basa en la interacción entre la inmunidad innata y la inmunidad mediada por células.<sup>(1, 9, 25)</sup>

### 2.13.3 Tratamiento de candidiasis crónica diseminada

La supervivencia con anfotericina B con o sin flucitosina típicamente se asocia con tasas de supervivencia del 54%, y aunque hay reportes que citan 82%, los pacientes

que no responden o no toleran la anfotericina pueden tratarse con fluconazol con respuesta en 80-100%, o con la formulación lípida de anfotericina (*AmB ABLC*) y L-AmB. Se ha reportado un resultado terapéutico variable en un paciente tratado con caspofungina.<sup>(32)</sup> Algunos autores recomiendan un curso breve de anfotericina a dosis de 0.5-1 g o AmB-lípida 2-4 g seguido por fluconazol por 1-2 meses después de la resolución completa de todos los signos de infección y las cicatrices radiológicas pueden persistir por años.<sup>(1, 9, 25)</sup>

## 2.14 RESISTENCIA

### 2.14.1 Resistencia a los agentes antifúngicos

Se define la resistencia clínica como la falla terapéutica o recaída rápida de la infección con un patógeno que no ha demostrado resistencia *in vitro* al agente terapéutico utilizado<sup>(52)</sup>

Las variables relacionadas con resistencia clínica incluyen: disminución en la capacidad inmune, foco no drenado de infección como abscesos o material prostético e incumplimiento terapéutico por parte del paciente y las dosis bajas de fármacos son la variable más importante responsable de la resistencia a un fármaco, ya sea por dosificación inadecuada, absorción disminuida del agente oral debido a distribución intestinal como náusea, vómito, diarrea, intestino corto, mucositis, interacción del fármaco con los alimentos como el caso del contenido alcalino en estómago por cápsulas de itraconazol, pobre ingesta oral e interacción entre fármacos con azoles y varios fármacos que resultan en disminución en la exposición del agente.<sup>(1, 9)</sup>

La resistencia *in vitro* se refiere a la alta concentración inhibitoria mínima (MIC) del agente terapéutico contra el agente patógeno. La resistencia *in vitro* puede ser primaria cuando el patógeno es intrínsecamente resistente al agente antifúngico sin previa exposición del paciente a dicho fármaco; o secundaria en el caso de que el desarrollo de resistencia ocurra luego de la exposición del fármaco antifúngico.

La resistencia también puede ser dependiente de la dosis o tamaño del inóculo, sin

embargo no se dispone de evidencia que muestre una fuerte correlación entre la susceptibilidad *in vitro* y el resultado clínico de la candidiasis invasiva.<sup>(1, 9)</sup>

#### 2.14.2 Resistencia emergente luego de exposición prolongada al fármaco

El amplio uso de nuevos agentes antifúngicos en el paciente con inmunocompromiso se ha asociado con emergencia de resistencia al fármaco entre pacientes expuestos a períodos prolongados de tiempo, dicho fenómeno se ha demostrado en la candidiasis orofaríngea del paciente con VIH; también se ha encontrado resistencia cruzada a los azoles en pacientes con cáncer que presentan fungemia por *C. tropicalis* después de itraconazol profiláctico (35-105 días) seguido por fluconazol empírico, hallazgo similar en los pacientes con transplante de médula ósea en los que se identifica *C. albicans* resistente a fluconazol.

La resistencia cruzada en algunos estudios es del 1.3-20 %, reportan alrededor del 20 % la especie de *C. glabrata*. La resistencia a equinocandinas ha sido descrita para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, aunque aún se considera muy rara. En algunos casos se ha encontrado resistencia cruzada a anfotericina o azoles (Tabla 4); la resistencia encontrada en equinocandinas es cruzada.<sup>(1, 9)</sup>

Patógeno	Anfotericina B	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol Posaconazol	Caspofungina
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	Sa
<i>C. glabrata</i>	S a I	SDD a Rb	SDD a Rc	Sa	S
<i>C. krusei</i>	S a I	R	SDD a Rc	Sa	S
<i>C. lusitaniae</i>	S a Rd	S	S	S	S
<i>C. guilliermondii</i>	S a R	S a SDD	S	S	S
<i>C. dubliniensis</i>	S a Ia	S, SDD, R	S	S	S

a=Sensible, pero los datos clínicos son limitados. b=10-15% de *C. glabrata* son resistentes al fluconazol. c= Son resistentes al itraconazol ~50% de aislamientos de *C. glabrata* y ~ 30% de *C. krusei*. d=Un 20% de los aislamientos son resistentes a anfotericina B. S=sensible; I= intermedio; R= resistente; SDD=sensible dependiente de la dosis; ND= datos no disponibles.

#### Tabla 4. Patrones de sensibilidad de las principales especies de *Candida* a anfotericina B, azoles y equinocandinas.

Fuente: Salavert Lletí M et al Enferm Infecc Microbiol Clin; 2006.

### 2.15 PREVENCIÓN DE LA CANDIDIASIS HEMATÓGENA

Las mejores estrategias son las que se enfocan en identificar las poblaciones con el mayor riesgo de candidiasis invasiva y administrando quimioprofilaxis. Se han obtenido datos en estudios que indican que el 47% de las enfermeras y el 44% de los médicos en la UCIN están colonizados por *C. parapsilosis* y que el 45.5% de los infantes que presentan candidemia están colonizados por estas cepas en comparación de un 21.9% de infantes que no presentan esta condición.<sup>(1, 9, 26)</sup>

Las medidas de control por estas infecciones consisten en: lavado de manos estricto, eliminación del uso de uñas postizas, limpieza, esterilización y desinfección del equipo médico, aparatos intravasculares y la preparación estéril de infusiones de TPN, por lo anteriormente descrito deben seguir estándares establecidos en las guías de manejo.<sup>(1, 9, 25)</sup>

En las pacientes con leucemia aguda, trasplante de médula ósea o similar deben ser sometidos a profilaxis con fluconazol (400 mg/día) durante el período de riesgo. En el paciente con trasplante hematopoyético la profilaxis con fluconazol se recomienda por 75-100 días, en el caso del paciente con neutropenia severa y prolongada, el itraconazol a dosis de 200 mg al día o solución 5 mg/kg/día, reduce la candidiasis hematógena; también se puede administrar micafungina 50 mg/día que equivale a la dosis de fluconazol y que además se cree que puede favorecer al paciente con protección hacia la aspergilosis.

El posaconazol a 200 mg, tres veces al día también se compara con fluconazol o itraconazol en un paciente neutropénico con leucemia aguda, sugiriéndose que podría disminuir el riesgo de aspergilosis en estos pacientes.

La anfotericina B (D-AmB) no es considerada óptima en profilaxis debido a su toxicidad recomendándose su utilización sólo en casos de no tener alternativa y recomendándose la formulación lípidica de L-AmB (*AmBisome*®) por ser la menos tóxica a dosis de 1 mg/kg/día a 2 mg/kg/día, tres veces por semana y la caspofungina se compara con itraconazol.<sup>(1, 9, 25)</sup>

En el neonato de pre-término la profilaxis con fluconazol reduce la prevalencia de 16.7% a 4.4%, entre los menores de 1500 g; beneficio que se extiende a los que pesan menos de 1000 g; igualmente la colonización por *Candida* es menor (22% vrs. 60%) y recomendándose dos dosis profiláctica de fluconazol por semana por seis semanas en los menores de 1000 g.<sup>(18, 25)</sup>

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

### 3.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Estudio de casos, transversal.

### 3.2. PERÍODO DE ESTUDIO

Noviembre 2015 hasta abril 2016.

### 3.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Muestras de pacientes pediátricos de diversas salas de atención que llegaron al servicio de Micología del laboratorio clínico del HEU durante el período del estudio.

### 3.4. MUESTRA

Se incluyeron todos los cultivos que presentaron crecimiento por *Candida*, independientemente del tipo de muestra (orina, sangre, secreciones, heces, hisopado bucal, jugo gástrico, liquido peritoneal y punta de catéter) proveniente de las diversas áreas de atención hacia los pacientes del Departamento de Pediatría del HEU, durante el período de estudio (Muestreo por conveniencia).

### 3.5 RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

Se elaboró una base de datos con información proveniente de la solicitud de análisis que llegó al laboratorio de Micología del HEU, anonimizando y codificando dicha información.

### 3.6 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL HEU

A los cultivos positivos por levaduras que se obtuvieron en el laboratorio de Micología del HEU se les realizó la técnica del tubo germinal para identificación de especies de *Candida albicans* vrs *Candida no-albicans*,<sup>(53)</sup> donde se siguió el siguiente protocolo de trabajo:

#### 3.6.1 Metodología para la técnica de tubo germinal

Se emulsionó una porción de la colonia aislada en 0,5 ml de suero humano, luego se incubó a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, se realizó la visualización microscópica de la presencia de prolongaciones en la pared de las levaduras inducidas por factores contenidos en el suero (tubo germinal).

### 3.7. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los cultivos positivos por el género *Candida*, fueron almacenados en el laboratorio de Micología del Departamento de Laboratorio Clínico del HEU y resembrados en medio de Sabouraud; posteriormente se trasladaron al laboratorio de la Maestría de Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Microbiología, UNAH, siguiendo las medidas de bioseguridad pertinentes.

Una vez obtenidos los cultivos se realizó, en el laboratorio de Maestría de Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ) de la UNAH, la determinación de especies de *Candida* mediante la técnica de CHROMagar,<sup>(54)</sup> la cual siguió el siguiente protocolo:

### 3.7.1 Metodología para la técnica de CHROMagar (BD Diagnostic Systems)

Se colocó en un matraz 47.7 g de la base de CHROMagar en polvo en 1 litro de agua purificada y se mezcló hasta que el agar estuvo disuelto. Posteriormente se calentó el medio a 100°C agitando regularmente hasta ebullición. Una vez que el medio preparado alcanzó la temperatura adecuada (37 a 40°C), se sirvió en platos Petri estériles y se dejó solidificar (no fue necesaria la esterilización dado a que el medio contiene Cloranfenicol). Los medios preparados se conservaron a temperatura ambiente durante un día o se conservaron refrigerándolos de 2 a 8°C por dos meses (para proteger de la luz y deshidratación).

Al momento de realizar la resiembra, estos medios se colocaron a temperatura ambiente y luego se incubaron en atmosfera aerobia de 30 a 37°C por un promedio de 48 horas. Como paso final se leyeron los resultados obtenidos comparando colores presentados por las colonias por las proporcionadas en el inserto de información del medio CHROMagar.<sup>(55)</sup>

## 3.8 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA POR BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR-RFLP)

En el laboratorio de la MEIZ se realizó la extracción del material genético a partir de los subcultivos; posteriormente se determinó molecularmente la especie de *Candida* por medio de la técnica de PCR-RFLP <sup>(49)</sup> en el Centro de Investigaciones Genéticas (CIG) de la Escuela de Microbiología, UNAH. El proceso contó con los siguientes pasos:

### 3.8.1 Rompimiento de la pared celular de *Candida*

Para la liberación del contenido genético de *Candida* se utilizó el siguiente buffer de lisis mezclando en un matraz: (10ml TRIS-HCl, 1 M, pH 7.8, 4ml EDTA 0, 5 M pH 8, 20 ml de CTAB al 10%, 30 ml de NaCl 5M).

Se aforó con agua destilada hasta llegar a 100 ml de esta solución, se agregó 1% del volumen final de Mercaptoetanol. Se Colocó en un vial 1 ml del Buffer de lisis al cual se le añadió una asada completa de las muestras del cultivo de *Candida*, dicha mezcla se colocó en baño maría a 100°C por 1 minuto. Se transfirieron 700 µl de la mezcla anterior a un vial especial con cierre hermético al que previamente se le colocó 0.13 g de perlas de vidrio.

Se aseguró el cierre de dichos tubos con papel parafilm y colocó en el aparato Mini Bead Beater para su agitación durante 1 minuto con 3 segundos cada una de las muestras. Se recuperó en un vial nuevo la mayor cantidad de sobrenadante evitando tomar las perlas, dicho sobrenadante fue el que se utilizó para realizar los siguientes pasos para la extracción del material genético de *Candida*.<sup>(49)</sup>

### 3.8.2 Extracción del material genético

Se agregó a cada muestra recuperada del paso anterior 400 µl de la mezcla de Fenol-Cloroformo en proporción 1:1 previamente homogenizada en un vortex.

Se centrifugó 10 min a 13,000 rpm, recuperando la fase acuosa y transfiriéndola a un nuevo vial (anotando el volumen recuperado). Se agregó 1/10 de Acetato de Sodio a 3M pH 5.2 al volumen recuperado y un volumen similar al obtenido de Isopropanol frío. Se centrifugó 3 min a 13,000 rpm, eliminando posteriormente el sobrenadante. Se lavó 3 veces con 200 µl de Etanol al 70% y se dejó evaporar el etanol residual sobre un bloque caliente. Posteriormente se resuspendió el material genético recuperado en 30 µl de TE1X o en agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 3.8.3 Preparación de la mezcla de reacción para PCR

Se realizó en una cabina de bioseguridad situada en el área blanca del CIG, en un vial con capacidad de 200  $\mu$ l que contenía la siguiente mezcla:

-25  $\mu$ l de mezcla para PCR comercial (*Promega Corp. Madison, WI, EUA*)

-1  $\mu$ l de primer forward (ITS-1)(10 nM) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

-1  $\mu$ l de primer reverse (ITS-4)(10 nM) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Dicha mezcla se llevó a un volumen final de 49  $\mu$ l con agua estéril libre de nucleasas. Finalmente se agregó 1  $\mu$ l del ADN extraído y se colocó en el termociclador, <sup>(49)</sup> de acuerdo con las siguientes condiciones de trabajo: (Cuadro 1)

Mezcla de Reacción	1x (50 $\mu$ l)
2X <i>Taq</i> Master Mix	25 $\mu$ l
ITS-1 forward Concentración	1 $\mu$ l
ITS-4 reverse Concentración	1 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	22 $\mu$ l
ADN	1 $\mu$ l

**Cuadro 1. Protocolo para preparación de mastermix de PCR para determinación del género *Candida***

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	PROCESO
1	95 °C	5 min	Desnaturalización Inicial
37	95°C	30 seg	Desnaturalización
	56°C	30 seg	Alineamiento
	72°C	30 seg	Extensión
1	72°C	5 Min	Extensión final
1	4°C	∞	Conservación

**Cuadro 2. Programación de termociclador para PCR de identificación del género *Candida*:**

#### 3.8.4. Visualización de productos de PCR

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en 1.5 % de concentración en gel de agarosa, estos se tiñieron con bromuro de etidio (5 µl por cada 100 ml de agarosa) y se visualizaron bajo luz UV. Estos se compararon con el patrón de peso molecular referenciado, esperando obtener un amplicón de un tamaño de 500-800 pb<sup>(49)</sup>, para determinar las siguientes especies de *Candida*, detallándose a continuación:

- 535 pb para *C. albicans*,
- 524 pb para *C. tropicalis*,
- 871 pb para *C. glabrata*,

- 510 pb para *C. krusei*
- 520 pb para *C. parapsilosis*.

Dichos resultados fueron fotografiados y almacenados en la base de datos (Anexo 3).

### 3.8.5. RFLP (Digestión con enzimas de restricción)

Se colocó en un vial con capacidad de 200  $\mu$ l la mezcla de la reacción que contenía por muestra:

- 12.3  $\mu$ l de agua des ionizada
- 2  $\mu$ l de Buffer RE 10X
- 0.2  $\mu$ l de BSA 10ug/ $\mu$ l
- 0.5 de enzima de restricción MspI (Conc:10u/ $\mu$ l)

La mezcla se llevó al vortex y se colocó en viales de reacción para llevar a un volumen final de 16  $\mu$ l, añadiendo 4  $\mu$ l de ADN del paso anterior para completar 20  $\mu$ l de mezcla por muestra, se incubó dicha preparación por 2 horas a 37°C dentro de un termociclador.<sup>(49)</sup> Todo lo anterior bajo el siguiente protocolo de trabajo (Cuadro 3):

<b>Mezcla de Reacción</b>	1x (20 $\mu$ l= vol final)
<b>Agua des ionizada</b>	12.3 $\mu$ l
<b>Buffer RE 10X B</b>	2.0 $\mu$ l
<b>BSA acetilado 10ug/<math>\mu</math>l</b>	0.2 $\mu$ l
<b>Enzima MspI</b>	0.5 $\mu$ l

**Cuadro 3. Protocolo para preparación de mezcla de reacción para RFLP (digestión con enzimas de restricción) para la determinación de especies de *Candida***

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	PROCESO
1	37 °C	2 horas	Incubación
1	4°C	∞	Conservación

**Cuadro 4. Programación de termociclador para RFLP (digestión con enzimas de restricción) para la determinación de especies de *Candida***

3.8.6. Visualización de productos de PCR- RFLP

Los productos de PCR-RFLP se sometieron a electroforesis en 2% de concentración en gel de agarosa, tiñiéndose con bromuro de etidio (5 µl por cada 100 ml de agarosa), se visualizaron bajo luz UV y se compararon con los patrones de peso molecular establecidos, esperando obtener los siguientes tamaños en los productos de restricción:

- 297, 238 pb para *C. albicans*,
- 340, 184 pb *C. tropicalis*,
- 557, 314 pb *C. glabrata*,
- 261, 249 *C. krusei* y 520 pb para *C. parapsilosis*;

Los resultados fueron fotografiados y almacenados en la base de datos.

### 3.9. ANÁLISIS DE DATOS

Se generó una base de datos electrónica en IBM-SPSS 21.0 (*IBM-SPSS Inc, Cary, NC, EUA, 2012*). Posteriormente, utilizando el mismo software, se generó estadística descriptiva (media, mediana, moda, desviación estándar) con el 95 % de confiabilidad así como intervalos de confianza de 95% utilizando el método binomial (*Epi-6.04d, CDC, Atlanta, Georgia, EUA, 2001*). Además, se utilizó Microsoft Excel 14.0 (*Microsoft Inc™, Redmond, WA, EUA, 2010*) para generar gráficos y tablas, que llevo al análisis de la concordancia entre los métodos de PCR-RFLP Y CHROMagar de acuerdo al método de Spearman.

### 3.10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los pacientes fueron anonimizados e identificados por códigos que reemplazaron el nombre del participante, asegurando así la confidencialidad del mismo. Todos los datos fueron guardados cuidadosamente en archivo bajo llave del investigador principal. Los resultados del estudio fueron manejados solamente por el equipo de investigación.

El presente estudio cuenta con la aprobación ética del CEI-MEIZ N.04-2016.

## CAPITULO IV. RESULTADOS

Los resultados de este estudio se describen a continuación:

### 4.1 DATOS GENERALES

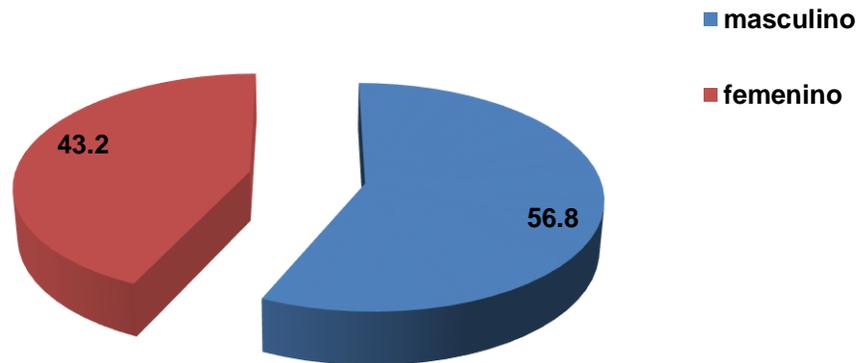
De un total de 111 cultivos positivos por *Candida* obtenidos de varios tipos de muestras que correspondían a diversas salas de pediatría del HEU, se encontró una media de distribución para edad de 5.8 años con una desviación estándar de 5.6 años y un rango de 1 mes a 18 años.

El grupo etario más frecuente fue el de menores de 1 año con 28 aislamientos (25.2 %) seguido por los de niños de 1-2 años con 20 (18 %) (Ver Tabla 5).

EDAD	FRECUENCIA	PORCENTAJE
< 1 año	28	25.2
1 -2 años	20	18.0
3 -5 años	18	16.2
6 -8 años	7	6.3
9 -12 años	18	16.2
13-15 años	12	10.8
16-18 años	8	7.2
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 5. Frecuencia de cultivos con crecimiento por especies de *Candida* según edad.**

También, se encontró según el género, que 63 (56.8 %) de los pacientes eran del sexo masculino y 48 (43.2 %) del sexo femenino (Gráfico 1).



**Gráfico 1. Frecuencia según género en cultivos con crecimiento por las diferentes especies de *Candida*.**

En relación a la sala de procedencia, se encontró que el mayor número de cultivos con crecimiento por *Candida* provenían de la sala de Lactantes con 30/111 (27%), seguido por la sala de Oncología Pediátrica con 25 (22.5%, Tabla 6).

SALA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Lactantes	30	27.0
Oncología Pediátrica	25	22.5
Nutrición	19	17.1
Medicina Pediátrica	12	10.8
UCIP	11	9.9
Emergencia Pediátrica	5	4.5
Quemados Pediatría	3	2.7
Terapia de rehidratación	3	2.7
Consulta Externa Pediatría	2	1.8
Autopsia	1	0.9
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 6. Frecuencia de cultivos con crecimiento por *Candida* según las salas de procedencia.**

#### **4.2 ESPECIES DE *CANDIDA***

Para la identificación de las diferentes especies de *Candida* se recopilaban diferentes tipos de muestras (Tabla 7) para obtener por medio de cultivo con crecimiento por levadura, lo cual se obtuvieron 132 cepas en 111 pacientes.

A la vez se observó que las muestras de orina fueron las más frecuentes con 68 aislamientos (61.3%), seguido por las muestras de heces con 22(19.8%).

TIPO DE MUESTRA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Orina	68	61.3
Heces	22	19.8
Hisopado bucal	7	6.3
Secreción	6	5.4
Sangre	2	1.8
Jugo gástrico	1	0.9
Líquido peritoneal	1	0.9
Punta de catéter	1	0.9
No consignado	3	2.7
<b>Total</b>	<b>111</b>	<b>100.0</b>

**Tabla 7. Frecuencias según tipo de muestra de cultivos con crecimiento por especies de *Candida*.**

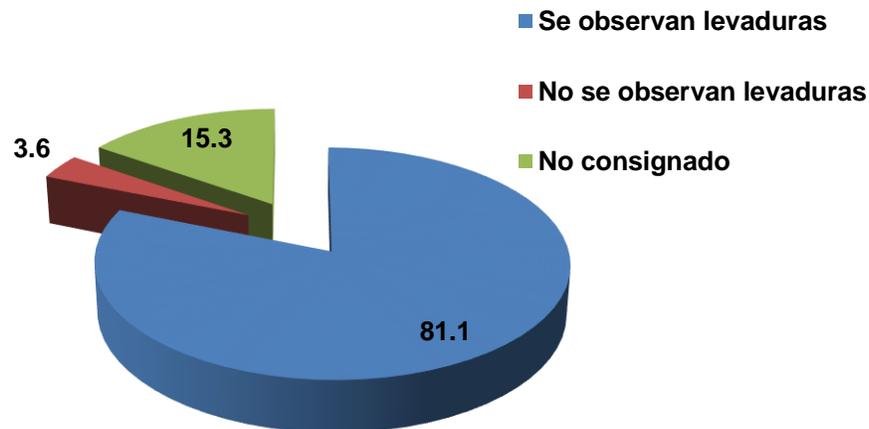
En relación a la especie de *Candida* y el tipo de muestra, se encontró que las especies con mayor frecuencia fueron *Candida albicans* en cultivos de orina en 27 muestras (20.45%), seguido de *C. tropicalis* con crecimiento en 22 muestras de orina (16.67%), además de identificar más combinaciones entre especies en este tipo de muestra (Tabla 8).

ESPECIES	TIPO DE MUESTRA									TOTAL
	NC	HB	Heces	Orina	JG	Sangre	Scr	LP	PC	
<i>C. albicans</i>	1	1	6	19		0	2	1	1	31
<i>C. tropicalis</i>		2	7	17	1	2				29
<i>C. glabrata</i>		1		5						6
<i>C. krusei</i>	2		1	7						10
No amplificó			1	4						5
Patrón no identificable			3	1						4
<i>C. albicans, C. tropicalis</i>			1	1						2
<i>C. albicans, C. glabrata</i>		1	1	3			2			7
<i>C. tropicalis, C. glabrata</i>				2						2
<i>C. parapsilosis</i>		2		5			1			8
<i>C. albicans, C. parapsilosis</i>				1						1
<i>C. krusei, C. albicans</i>				1						1
<i>C. krusei, C. tropicalis</i>			1							1
<i>C. krusei, C. glabrata</i>			1							1
<i>C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata</i>				2			1			3

\*132 cepas procedentes de 111 pacientes; **NC**: No consignado, **HB**: Hisopado Bucal; **JG**: Jugo gástrico; **Scr**: Secreción; **LP**: Líquido peritoneal; **PC**: Punta de catéter.

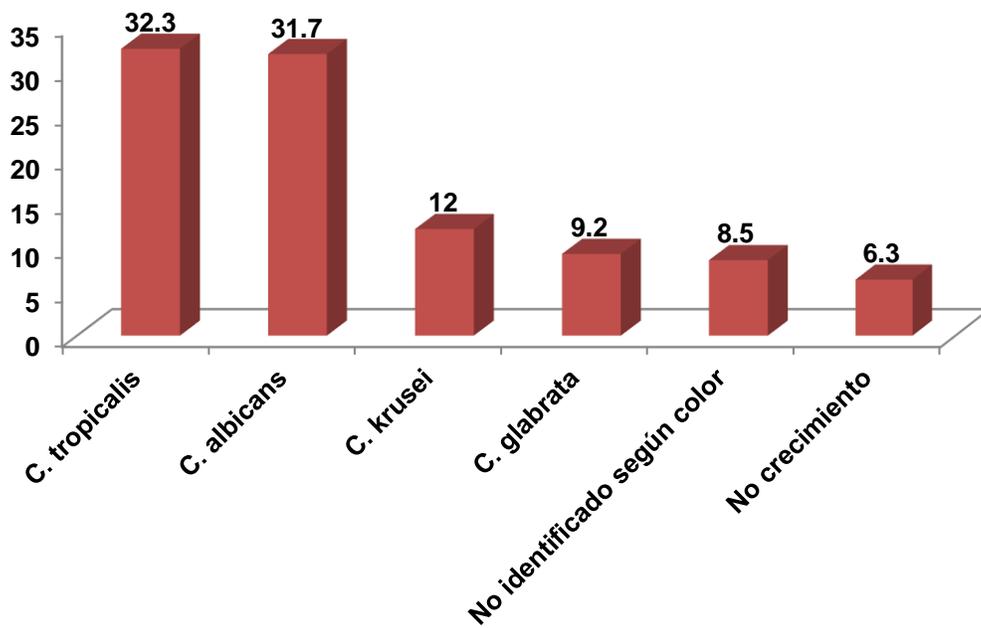
**Tabla 8. Frecuencia de especie(s) de *Candida* determinadas mediante PCR-RFLP junto con los tipos de muestra que se aislaron.**

Según la relación entre la observación de levaduras mediante exámen directo al microscopio con sus correspondiente cultivo aislado, se encontró que 90 de ellas (81.1%) tenían relación (Gráfico 2).

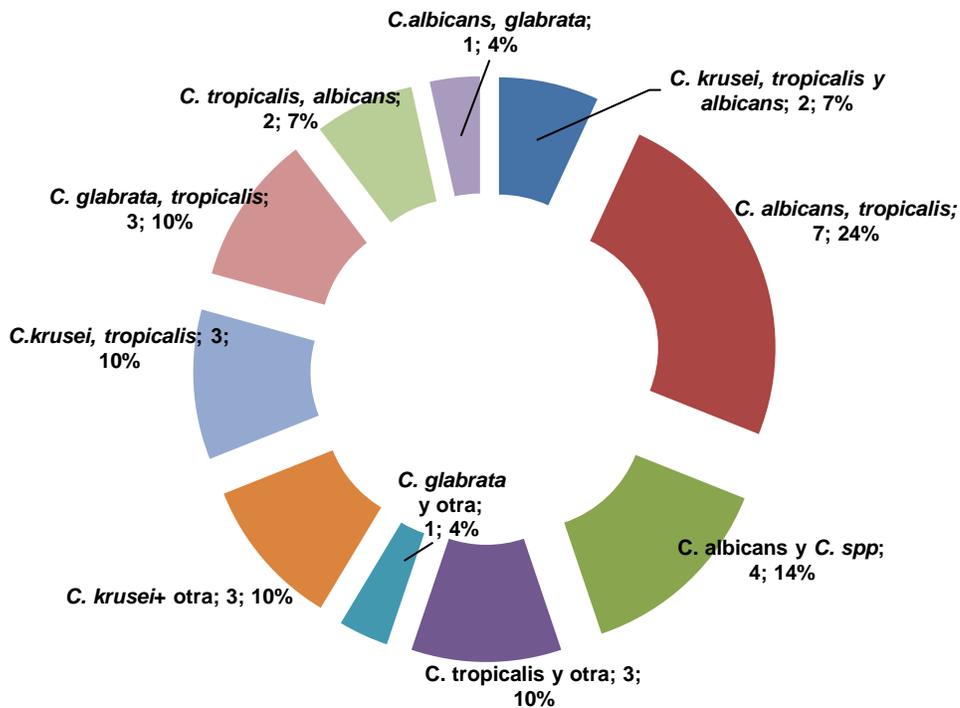


**Gráfico 2. Relación entre los resultados del examen directo de muestras y los cultivos aislados por levaduras.**

Según la identificación realizada en el medio cromogénico de CHROM Agar®, de 46 de las 142 cepas aisladas totales (32.3%) correspondieron a *C. tropicalis*, seguido por *C. albicans* 45/142 (31.7%). Es importante hacer notar que en dicho medio de cultivo algunas muestras se identificaron con 2 y 3 especies a la vez resultando con 142 cepas de 111 pacientes (Gráficos 3 y 4).

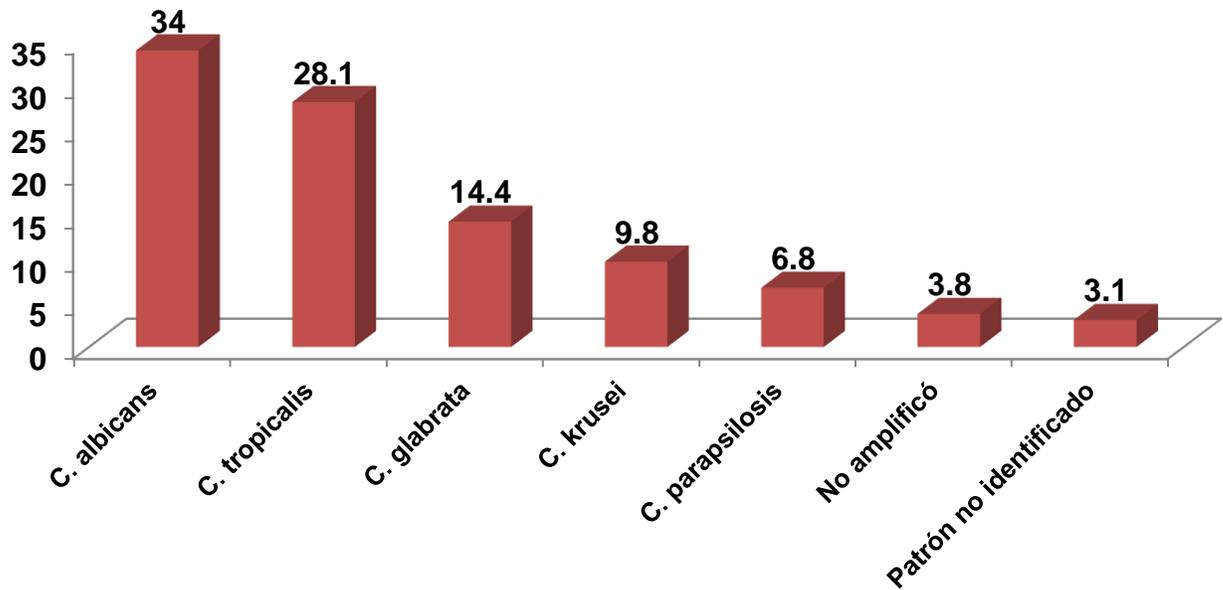


**Gráfico 3. Frecuencias de especies de *Candida* identificadas mediante el método de CHROMagar®.**



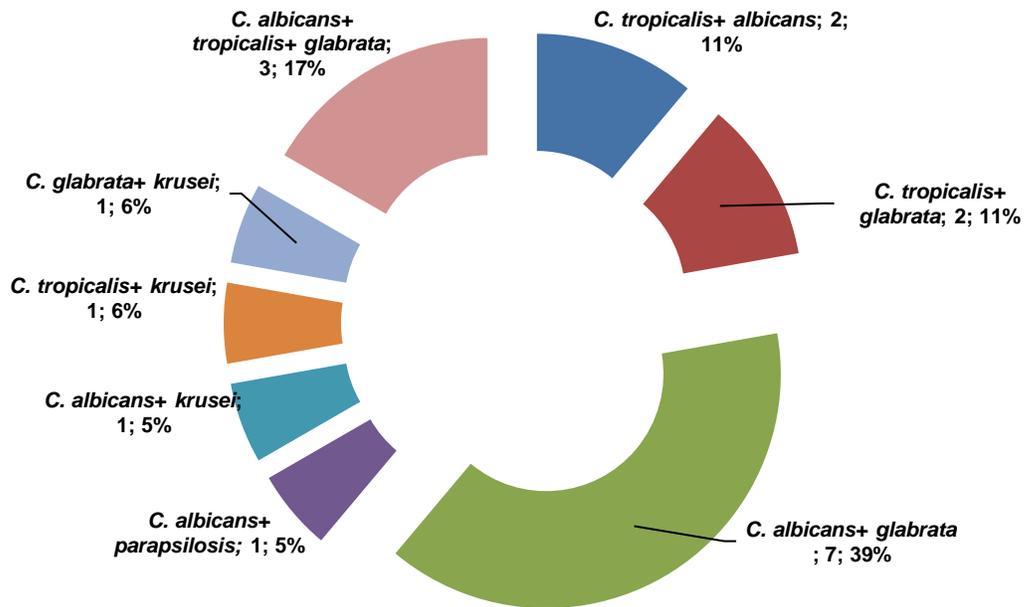
**Gráfico 4. Relación porcentual de especies de acuerdo a los casos en que se identificaron más de una especie en una sola muestra por CHROMagar.**

Según el resultado de PCR, de un total de 132 cepas provenientes de cultivos positivos de muestras de 111 pacientes, se encontró que su mayoría resultaron ser *C. albicans* con 45/132 (34.0%), seguido por *C. tropicalis* 37/132 (28.1%, Gráfico 5).



**Gráfico 5. Frecuencias de especies de *Candida* identificadas mediante la técnica de PCR-RFLP.**

Con el método de PCR-RFLP, se identificó más de una especie en 16.22% (18/111) de las muestras estudiadas haciendo un total de 39 cepas identificadas causando infecciones mixtas. En estas 18 muestras se identificaron *C. albicans* en 14/18 individuos (77.78%), *C. glabrata* en 13/18 (72.22%), *C. tropicalis* en 8/18 (44.44%), *C. krusei* en 3/18 (16.67%) y *C. parapsilosis* en 1/18 (5.56%).



**Gráfico 6. Relación porcentual de especies de acuerdo a los casos en los cuales se identificó más de una especie en una sola muestra por PCR-RFLP.**

En cuanto al resultado obtenido del tubo germinal y el de PCR-RFLP, se encontró que la mayoría de ellos mostraban relación. *Candida albicans* se identificó en 25 casos que previamente fueron reportados con prueba de tubo germinal positiva.

Según el orden de importancia, se obtuvieron datos por PCR-RFLP de 25 casos de *Candida tropicalis* que se identificaron como tubo germinal previamente reportado como negativo. Sin embargo, se dieron casos de resultados positivos en tubo germinal identificando una especie de *C. albicans* en donde se presentaba simultáneamente otra especie *no-albicans* que fue detectada por PCR-RFLP (Tabla 9).

Resultado PCR	RESULTADO TUBO GERMINAL (HEU)		TOTAL
	T.g positivo ( <i>C. albicans</i> )	T.g negativo ( <i>C. no-albicans</i> )	
	No amplificó	3	
<i>C. albicans</i>	25*	6	31
<i>C. tropicalis</i>	4*	25	29
<i>C. glabrata</i>		6	6
<i>C. krusei</i>	1	9	10
Patrón no identificado		4	4
<i>C. albicans, C. tropicalis</i>	2		2
<i>C. albicans, C. glabrata</i>	4*	3	7
<i>C. tropicalis, C. glabrata</i>		2	2
<i>C. parapsilosis</i>		8	8
<i>C. albicans, C. parapsilosis</i>		1	1
<i>C. krusei, C. albicans</i>	1*		1
<i>C. krusei, C. tropicalis</i>		1	1
<i>C. krusei, C. glabrata</i>		1	1
<i>C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata</i>	2	1	3

T.g=Tubo germinal, \*= uno de ellos tuvo un resultado mixto en PCR (*C. albicans* + *C. no albicans*)

**Tabla 9. Comparación de resultados entre las técnicas de tubo germinal y PCR-RFLP de muestras con cultivos positivos por *Candida*.**

Según la frecuencia de especies identificadas por sala pediátrica utilizando el método de PCR-RFLP se encontró que *C. albicans* fue identificada con mayor frecuencia en la sala de Lactantes con 17 aislamientos (15.3%), seguido por

*C. tropicalis* en 9 de ellos (8.1%), mientras que en la sala de Oncología Pediátrica fue más frecuente *C. glabrata* con 9 (8.1 %), seguido por *C. tropicalis* con 8 (7.2%).

Sala pediátrica	Especie identificada mediante PCR-RFLP							TOTAL
	<i>C. albicanstropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	NA*	PNI**	
Lactantes	17	9	4	3	3	1		<b>37</b>
Oncología Pediátrica	6	8	3	9	3	1	1	<b>31</b>
Nutrición	5	5	6	1	2	1	1	<b>21</b>
Medicina Pediátrica	4	4		1	1	2	1	<b>13</b>
UCIP	6	6		1				<b>13</b>
Emergencia Pediátrica	1	3		2				<b>6</b>
Quemados Pediatria	3			1				<b>4</b>
Terapia de rehidratación	1	2		1				<b>4</b>
Consulta Externa Pediatria	1					1		<b>2</b>
Autopsia	1							<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>37</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>132</b>

\*NA: No amplificó, \*\*PNI: Patrón No Identificado.

**Tabla 10. Distribución de especies de *Candida* en las diferentes salas pediátricas del HEU determinadas mediante PCR-RFLP**

A continuación, se detallan las similitudes y diferencias en los resultados obtenidos al comparar las técnicas diagnósticas utilizadas en nuestro estudio (Tabla 11).

ESPECIE	EXAMEN DIRECTO	TUBO GERMINAL	CHROMagar	PCR-RFLP
Se observan levaduras	90			
No se observan levaduras	4			
No consignado	17			
<i>C. no albicans</i>		69		
<i>C. albicans</i>		42	45	45
<i>C. glabrata</i>			13	19
<i>C. tropicalis</i>			46	37
<i>C. krusei</i>			17	13
<i>C. parapsilosis</i>				9
NISC*, PNI**			12	4
NC***, NA****			9	5
<b>TOTAL</b>	<b>111</b>	<b>111</b>	<b>142</b>	<b>132</b>

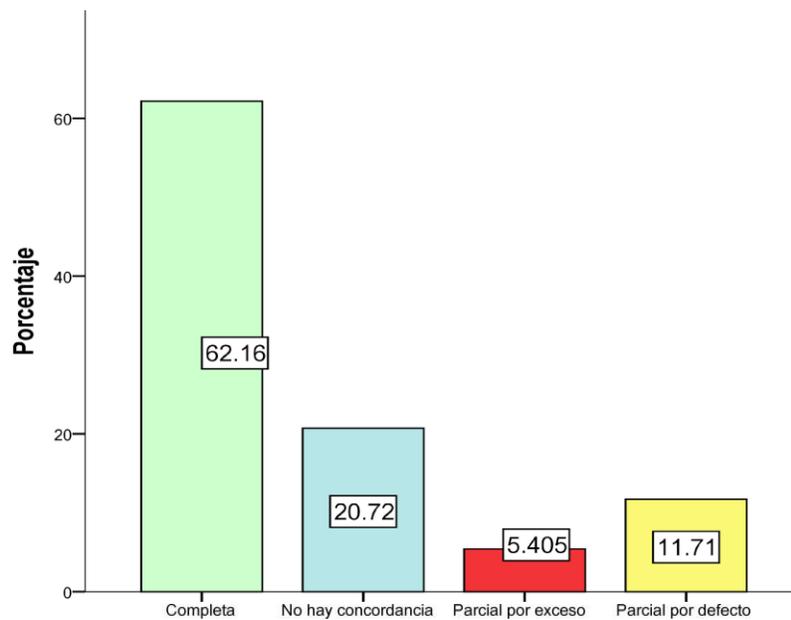
\*NISC: No identificado según color en CHROMagar, \*\*PNI: Patrón No Identificado en PCR-RFLP, \*\*\*NC: No hubo crecimiento en CHROMagar, \*\*\*\*NA: No amplificó en PCR-RFLP.

**Tabla 11. Comparación de resultados entre las diversas técnicas diagnósticas aplicadas.**

Con respecto al nivel de concordancia entre CHROMagar y PCR-RFLP, tomando este último método como estándar de oro, entre cada una de las muestras en estudio se obtuvieron datos de concordancia completa en el

62.16% de los casos, y sin ninguna concordancia un 20.72%. Se nombró **concordancia parcial por exceso**, (5.4%) cuando se identificaron las cepas involucradas aplicando los dos métodos, observándose en CHROMagar cepas adicionales según color.

Por el contrario, se llamó **concordancia parcial por defecto** en un 11.71% cuando ambas técnicas coincidían en la identificación de algunas cepas pero otras solamente se detectaron por la técnica de PCR-RFLP (Gráfico 7).



**Gráfico 7. Nivel de concordancia porcentual entre CHROMagar y PCR-RFLP con respecto a la identificación por especie.**

Al correlacionar 102 muestras (se descartó el resto de resultados porque no estaban consignados en ambos métodos) los resultados de laboratorio obtenidos mediante la

técnica de PCR-RFLP y los de CHROMagar, se encontró una leve correlación entre ambos métodos ( $r=0.125$ ) de acuerdo al método de Spearman para correlación entre categorías. Aunque este método es el idóneo para este tipo de comparaciones, también se realizó el nivel de correlación con los otros dos métodos disponibles, el método de Pearson ( $r=0.124$ ) y Tau\_b de Kendall ( $r=0.107$ ) utilizando los rangos de -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, y cero que significa no correlación pero no independencia (Tabla 12).

			Resultado CHROM Agar UNAH 1
Rho de Spearman	Resultado PCR UNAH 1	<u>Coefficiente de correlación</u>	.125
		Sig. (bilateral)	.212
		N	102
	<u>Resultado CHROM Agar UNAH 1</u>	<u>Coefficiente de correlación</u>	1.000
		Sig. (bilateral)	
		N	102

**Tabla 12. Coeficiente de correlación obtenido entre los métodos de PCR-RFLP y CHROMagar.**

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

La distribución de especies de *Candida* a nivel global es variable, reportándose en varios estudios alrededor del mundo que hasta el 2003 *C. albicans* aún era la más frecuente con 66%, seguida de *C. glabrata* (11%), *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (6%) y *C. krusei* (2%).<sup>(1, 3, 9)</sup> Varios estudios de vigilancia en Europa muestran que hasta el 2014, la incidencia de infecciones del torrente sanguíneo por *Candida* oscilaba entre 3 y 8,6 por 100,000 habitantes al año<sup>(21, 56-59)</sup>.

En África, Asia y el Pacífico, *Candida albicans* es la especie predominante que causa candidiasis y candidemia, específicamente en Australia, Japón, Corea, Hong Kong, Malasia, Singapur y Tailandia, mientras que *C. tropicalis* es la especie de *Candida* más frecuentemente encontrada en Pakistán e India.<sup>(60)</sup>

Los aislamientos obtenidos de candidiasis invasiva en estas regiones, demuestran que *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* siguen siendo altamente susceptibles al fluconazol (> 90%). Se ha encontrado además una susceptibilidad al itraconazol (3.9-10 %), voriconazol (5-17.8%) así como una resistencia al fluconazol de 6.8-15% y un 2.1-2.2 % de resistencia a las equinocandinas entre estas especies<sup>(60)</sup>.

Actualmente se encuentra *C. glabrata* como una especie que está aumentando en frecuencia entre los aislamientos obtenidos a partir de muestras de candidiasis invasiva.<sup>(61, 62)</sup>

A pesar de la introducción de nuevos agentes antifúngicos, esta infección sigue siendo una enfermedad grave asociada con una mortalidad significativa<sup>(16)</sup>. Por lo tanto, se recomienda que en los centros de atención de salud existan terapias profilácticas antimicóticas en pacientes de alto riesgo; sin embargo esta medida debe de estar monitoreada por estudios de ecología de especies de *Candida* circulantes en las diversas áreas críticas de estos centros de atención dada la selección de especies *no- albicans* debida a dicha profilaxis.<sup>(63)</sup>

En el presente estudio, realizado en población pediátrica de las diversas salas del Hospital Escuela Universitario con sospecha clínica de infección por levaduras, la especie más frecuentemente aislada resultó ser *C. albicans*, abarcando un poco más

de un tercio de los casos (34.1%), seguido de *C. tropicalis* (28.1%) y *C. glabrata* (14.4%). *Candida krusei* y *C. parapsilosis* se aislaron con menor frecuencia. Los datos son comparables con los obtenidos en otros estudios, <sup>(1, 9)</sup> sin embargo en este estudio, los porcentajes de frecuencia fueron más altos en las especies de *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Según datos reportados en el estudio de Nucci & Alvarado, para el año 2013 Honduras se clasifica como un país con baja prevalencia de *C. albicans* en servicios de salud de nivel terciario (27.4%), sólo superando en prevalencia a Venezuela (26.8%), datos que no están muy lejos del 34.0% de prevalencia encontrado en este estudio (Gráfico 4). También Nucci & Alvarado, menciona datos sobre la prevalencia candidiasis en América Latina, donde *C. albicans* ocupa el primer lugar a nivel regional (40.1%); reporte que resalta a Ecuador con hallazgos de un poco más de este promedio (52%). Según los resultados obtenidos en el presente estudio, al igual que los de los estudios mencionados, confirman que *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada en el total de salas del Departamento de Pediatría del HEU y otras le siguen en menor frecuencia.<sup>(14)</sup>

Con respecto a la emergencia de *C. parapsilosis*, esta especie ha sido objeto de campañas de prevención por contaminación nosocomial. *C. parapsilosis* se ha encontrado como portadora en el personal médico; esta podría ser una fuente importante de contaminación, especialmente en las UCIs.<sup>(64)</sup> Un estudio sobre prevalencia de portación de microorganismos en personal médico en una sala de UCI, dio a conocer que casi la mitad de las enfermeras (47%) y más de dos quintas partes de los médicos (44%) estaban colonizados por *C. parapsilosis*.<sup>(3)</sup> Otros estudios reportan que el 45.5% de los infantes que presentan candidemia están colonizados también por dicha especie.<sup>(4, 26)</sup>

En datos obtenidos en el presente estudio en pacientes pediátricos, *C. parapsilosis* ha sido encontrada en baja frecuencia (6.8%). Se ha tomado como referencia el estudio del grupo ARTEMIS, el cual reportó una frecuencia de 14.1%, tanto en población pediátrica como adulta en Honduras; este mismo grupo ha reportado que en otros

países de Latinoamérica, *C. parapsilosis* es la segunda especie más frecuente (26.5%).<sup>(14)</sup>

La baja frecuencia de *C. parapsilosis* en Honduras podría deberse a las nuevas políticas implementadas en las salas de hospitalización para el cumplimiento de lavado de manos y otras medidas de prevención, así como las mejoras en la logística de suministros de catéteres centrales para uso clínico.

Respecto a *C. glabrata*, la prevalencia reportada previamente en población pediátrica a nivel de América Latina fue 3.2%<sup>(19)</sup>; muy inferior a la frecuencia de 14.4 % encontrado en la muestra de este estudio (Gráfico 4). Esta diferencia podría deberse, como se mencionó previamente, a la emergencia de esta especie (junto con *C. krusei*) a la selección inducida por el uso de profilaxis, aunque se necesitaría de un estudio de cohorte para concluir al respecto.

En el estudio multicentrico del grupo ARTEMIS donde participó Honduras, la especie *C. tropicalis* ocupó el tercer lugar en frecuencia en América Latina. En ese estudio se incluyeron varios grupos etarios, siendo el grupo adulto el mayoritario, en el que se encuentro con mayor frecuencia esta especie. No hubo información específica de la población pediátrica, por lo que este aspecto limita su utilidad en la comparación con este estudio. *C. guilliermondii* en los centros terciarios a nivel regional, fue reportada en 2013 en 11.6% en la población pediátrica, pasando a ser una especie con prevalencia emergente, especialmente en Honduras, que la reporta en 20.7% de los aislamientos.<sup>(14)</sup> Esto no pudo ser comprobado en este estudio debido a que no se incluyó el patrón de identificación de dicha especie por lo que seguirá ahora con el proceso de secuenciación (Ver sección 3.12, Metodología).

La colonización en diversas partes del cuerpo humano por más de una especie de *Candida* ha sido reportada por varios autores y esta oscila entre 3-55% (individuos saludables o no) independientemente del sitio de toma de muestra, ya que en un individuo el 51-90% de los aislamientos de diferentes sitios corporales serán de la misma especie.<sup>(1)</sup> En los últimos años *C. krusei* y *C. glabrata* se reconocen como especies resistentes a fluconazol, mostrando tendencia al aumento porcentual

reportado en diversos estudios en EUA, posiblemente debido al aumento de profilaxis empírica con fluconazol en el paciente crítico.<sup>(9, 62)</sup>

En el presente estudio se identificó más de una especie en 16.22% (18/111) de los individuos estudiados, encontrándose que las especies referidas como de mayor resistencia a los fármacos (*C. krusei* y *C. glabrata*) estuvieron presente en varios casos, especialmente *C. glabrata*. Aunque la frecuencia de identificación de más de una especie está en el rango más bajo reportado, siendo notoria la identificación hasta de tres especies en un solo individuo (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*), lo que se constituye en un llamado de atención para las autoridades a establecer un sistema de vigilancia que permita la identificación temprana de tendencias de selección de especies en un protocolo para la implementación de intervenciones profilácticas con los fármacos antifúngicos adecuados.

En el laboratorio clínico del HEU, el proceso de identificación inicia con la sospecha por parte del clínico, seguido de toma de muestra. Para el estudio microbiológico de la misma se incluye observación microscópica directa de la muestra y cultivo en medios micológicos, resultando con un crecimiento de colonias típicas de *Candida*.

Por años, se ha considerado de mucho valor la identificación de *C. albicans* por el método de tubo germinal; esto permite categorizar *C. albicans* o *no-albicans* para ser enviada a especiación, totalizando un promedio de cuatro días para obtener diagnóstico con este tipo de método. La determinación de especies por métodos diferentes del tubo germinal es importante, puesto que su especificidad de la prueba de tubo germinal no es muy alta.<sup>(29)</sup>

Debido al alto grado de similitud fenotípica entre especies de *Candida*, los problemas de identificación son inminentes. Los enfoques convencionales para identificar hasta el nivel de la especie no son muy eficaces en la detección de dicha levadura.<sup>(65)</sup>

Por lo tanto, los ensayos moleculares alternativos en ciertos casos son necesarios en pacientes que lo ameriten, estos por lo general resultan ser de alta especificidad, reproducibilidad y sensibilidad.<sup>(20)</sup>

Para la diferenciación de especies, los métodos moleculares han resuelto problemas existentes en relación a factores económicos y de tipo técnico. Entre todos los métodos disponibles derivados del uso de la técnica de PCR, hay algunos muy precisos de acuerdo a la muestra a estudiar, sin embargo la mayor parte de ellos requieren de equipo costoso y personal entrenado.

La PCR-RFLP es un desarrollo que se ubica dentro del término “PCR *in-house*” ó PCR de aplicación a bajo costo. La aplicación de rutina de PCR-RFLP como la aplicada en este estudio podría disminuir el período de confirmación laboratorial a un tiempo promedio de dos días, que incluiría la obtención de crecimiento del inóculo debido a la facilidad de reconocimiento, reproducibilidad, bajo costo y desciframiento con mínima capacitación sobre los patrones que caracterizan esta técnica.<sup>(29, 45, 49)</sup>

En este estudio se demostró que la técnica llevada a cabo y reconocida en la literatura como “PCR *in-house*” es simple y fácil de realizar por un operario capacitado, mostrando especialmente sus bondades en cuanto a su sensibilidad y especificidad como se ha mencionado previamente.

Al usar la técnica de PCR- RFLP con la enzima de restricción *MspI*, nos da un parámetro de bandas claro entre especies, pero es necesaria la distinción entre especies que nos dan un patron similar de bandas dada su similitud genetica.

La identificación de especies entre todos los miembros del complejo *C. albicans* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*) se realiza mediante la amplificación del gen de la proteína 1 de la pared de las hifas (*Hwp1*) como lo describen Romeo y Criseo en sus estudios.<sup>(47)</sup>

La prevalencia de especies de *Candida* de acuerdo a la sala o ambiente hospitalario puede variar según la evolución local o institucional de prevención, métodos de manejo y otros factores, tal como la intensidad de uso de profilaxis con fármacos antifúngicos.

En este estudio, la sala de Lactantes reportó la mayor proporción de muestras positivas, predominando *C. albicans*, seguido en frecuencia descendente de *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, con una pequeña proporción de casos con *C. parapsilosis*.

En este estudio no fue posible determinar la evolución temporal de los cambios en la ecología local de esta sala, ya que se necesitarían estudios de tipo longitudinal para determinar este objetivo. La segunda sala en frecuencia de cultivos positivos fue Oncología Pediátrica, luego estuvieron las salas de Pediatría, Medicina Pediátrica y UCIP con similar representación porcentual, con la excepción que en dichas salas de Oncología Pediátrica y Nutrición se encontró que predominan las especies resistentes a fluconazol. La explicación a esta diferencia podría ser la reconocida relación entre candidiasis invasiva y la relación con el estado nutricional-inmune de estos pacientes (Tabla 6).

Aunque aún no se logra alcanzar el nivel de rapidez idóneo para las decisiones a tomar en UCIP, la implementación de la prueba de PCR-RFLP podría ser de mucha utilidad en salas del área pediátrica al realizar estudios epidemiológicos en forma de cortes transversales y relacionados con aspectos clínicos como supervivencia y riesgo de mortalidad; aspectos que no fueron incluidos entre los objetivos de este estudio pero que podrían ser llevados a cabo en estudios clínicos futuros que aprovechen la información proporcionada en la presente investigación.

También en el estudio obtuvimos cuatro muestras en las que no concluyó la identificación de su especie, ya que resultaron con ciertos patrones de bandas por RFLP, que no contaba entre los parámetros de referencia proporcionados por la literatura. Además, la variabilidad ecológica encontrada también podría haber sido influenciada por ser un estudio transversal, ya que no permite reconocer la evolución en el tiempo de las especies nosocomiales de importancia clínica.

Por anteriormente descrito, es recomendable mantener un monitoreo sobre la ecología de especies de *Candida* en las salas de pediatría del HEU de forma permanente, como corriente continua de información epidemiológica y clínica que incluya recursos para micograma, y ofrecer así información actualizada al médico que supervisa salas para favorecer la toma de decisiones en tratamiento y control, llevando al resultado de beneficio hacia los pacientes en su calidad de vida.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó de manera general por PCR-RFLP, en las salas de Pediatría del HEU, la frecuencia de especies de *Candida* en orden descendente fueron *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, y *C. parapsilosis*.
2. La frecuencia de especies encontradas, muestra una posible tendencia al aumento de cepas de *Candida* resistentes a fluconazol como *C. glabrata* y *C. krusei*, posiblemente dado a la disminución de *C. albicans* por el uso de antimicóticos de manera profiláctica.
3. La frecuencia de cultivos con crecimiento por especies de *Candida* es mayor en la sala de Lactantes, posiblemente por la mayor cantidad de pacientes ingresados por diversas patologías y algunas de ellas graves, seguida en frecuencia descendente por la sala de Oncología Pediátrica y Medicina Pediátrica.
4. En las salas de Oncología Pediátrica y Nutrición, se observó mayor frecuencia de especies resistentes al fluconazol, dicha resistencia puede estar relacionada con una profilaxis antifúngica frecuente en estas salas (Tabla 10).
5. El método de PCR- RFLP planteado en este estudio resultó ser más sensible, específico y rápido en comparación con otras técnicas de identificación de especies, por lo que puede ser una herramienta sumamente útil en pacientes críticos que necesiten de un diagnóstico rápido, utilizando directamente muestras como: sangre, orina y preferiblemente de líquidos estériles, dada su sensibilidad.

## CAPÍTULO VII.

### 7.1 RECOMENDACIONES

- Iniciar el proceso de implementación de un sistema de vigilancia de la ecología de especies de *Candida* en salas concretas de hospitales basándose en estudios longitudinales.
- Implementar vigilancia sobre la eficacia terapéutica a través de estudios de susceptibilidad y resistencia de cepas aisladas.
- Reforzar las estrategias metodológicas para prevención de contaminación cruzada en salas concurridas como: Lactantes y de alto riesgo, Oncología y Nutrición.
- Se recomienda a las autoridades de salud, el apoyo a los laboratorios clínicos para el sostenimiento de metodologías de identificación de especies de *Candida*, enfocándose en métodos altamente sensibles y específicos como el presentado en este estudio.
- Debido a que la extracción del material genético de las levaduras resultó ser complicada por la conformación de su pared celular (conteniendo abundantes ácidos grasos y quitina), se recomienda optimizar una técnica más rápida de extracción en futuras investigaciones.

## 7.2 LIMITACIONES

- Las cepas de *Candida* utilizadas en este estudio se obtuvieron de la sección de Micología del Departamento del laboratorio Clínico del HEU enviadas por las diferentes salas pediátricas, basándose los resultados y frecuencias en ello, considerándose como limitante para poder realizar un monitoreo y vigilancia completa de cada sala; en su lugar se recomienda la toma de muestra de forma activa por períodos y con número de muestra específicos de acuerdo a una población en estudio.
- El género *Candida* puede habitar muchos sitios corporales y la técnica de PCR-RFLP es altamente sensible y específica, siendo preferible utilizar muestras de sitios corporales estériles como lo indica la literatura.  
En el presente estudio se incluyeron diversos tipos de muestras puesto que el número de hemocultivos con crecimiento por el genero *Candida* fue muy limitado para solo incluir dichos hemocultivos dentro del estudio.
- La falta de disposición de ciertos parametros de referencia para algunas cepas de *Candida* aisladas en este estudio, no hizo posible la identificación de especie basándose en las bandas resultantes de la PCR-RFLP dadas por la literatura. Esta situación dificultó la interpretación de los aislamientos que no mostraron un patrón contemplado dentro de las 5 especies de mayor importancia clínica. Se hizo necesario solicitar la secuenciación de dichas cepas, pudiendo contar posteriormente con la herramienta del análisis *in silico* de estas cepas de *Candida* menos frecuentes.

### 7.3 PERSPECTIVAS

- Se espera que los datos obtenidos en esta investigación contribuyan al conocimiento de la ecología de *Candida*, que circula entre las diferentes salas pediátricas de hospitales de nivel terciario en Honduras y que sean utilizados para mejorar las condiciones de salud.
- La técnica de PCR-RFLP, utilizada en este estudio puede ser de mucha utilidad y aplicabilidad para laboratorios de diagnóstico, que tengan la opción de implementar técnicas de biología molecular y así brindar un diagnóstico rápido a los pacientes sospechosos de infecciones críticas por el género *Candida* y poder distinguir entre especies de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. stellatoidea* y *C. africana*, utilizando otras enzimas de restricción como: *HpaII* y la *BlnI* o la amplificación del gen *hwp1*.
- En Honduras, son necesarias futuras investigaciones sobre el género *Candida* relacionadas con resistencia a los fármacos antifúngicos así como el desarrollo de nuevos temas de investigación en el área de Micología.

## CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

1. Smith B, Steinbach W. 2012. Chapter 243. *Candida* Species, p. 1196-1202. *In* Long S, Pickering L, Prober C (ed.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 3 ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, Massachusetts, USA.
2. Quindos G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista iberoamericana de micología* 31:42-48.
3. Jordan I, Hernandez L, Balaguer M, Lopez-Castilla JD, Casanueva L, Shuffelman C, Garcia-Teresa MA, de Carlos JC, Anguita P, Aguilar L, group Es. 2014. *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* invasive infections in the PICU: clinical features, prognosis and mortality. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia* 27:56-62.
4. Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, DaSilva BCM, Silva EH, Gandra RF. 2005. Fungemia by Yeast in Brazil: Occurrence and Phenotypic Study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, Sao Paulo. *Journal of Mycologie Médicale* 15:13-21.
5. Falagas ME, Apostolou KE, Pappas VD. 2006. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 25:419-425.
6. Richardson M, Rautemaa R, Hietanen J. 2007. Diagnosis of *Candida* infection in Tissue by Immunohistochemistry, p. 1-11. *In* Kavanagh K (ed.), *Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques*. Chapter 1. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England.
7. Holland LM, Schroder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grozer Z, Gacser A, Ames L, Haynes K, Higgins DG, Butler G. 2014. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 10:e1004365.
8. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C. 2006. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC infectious diseases* 6:21.
9. Dignani M-C, Solomkin J, Anaissie B. 2009. *Candida*, p. 197-229. *In* Anaissie E, McGinnis M, Pfaller M (ed.), *Clinical Mycology*, 2 ed. Churchill-Livingstone/Elsevier Inc, London, UK.
10. Quindos G. 2011. Candidiasis, aspergillosis and other invasive mycoses in recipients of solid organ transplants. *Rev Iberoam Micol* 28:110-119.
11. Fortun J, Martin-Davila P, Gomez-Garcia de la Pedrosa E, Pintado V, Cobo J, Fresco G, Meije Y, Ros L, Alvarez ME, Luengo J, Agundez M, Belso A, Sanchez-Sousa A, Loza E, Moreno S. 2012. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect* 65:64-70.
12. Pujol C, Daniels KJ, Soll DR. 2015. Comparison of Switching and Biofilm Formation between MTL-Homozygous Strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Eukaryotic cell* 14:1186-1202.
13. Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. 2007. Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC infectious diseases* 7:103.
14. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarria JI, Colombo AL, Latin American Invasive Mycosis N. 2013. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PloS one* 8:e59373.

15. Dendis M, Horvath R, Michalek J, Ruzicka F, Grijalva M, Bartos M, Benedik J. 2003. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9:1191-1202.
16. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C. 2005. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41:1232-1239.
17. Brian Smith P, Steinbach WJ, Benjamin DK, Jr. 2005. Invasive *Candida* infections in the neonate. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 8:147-162.
18. Bendel C. 2010. Candidiasis, p. 1058-1079. *In* Wilson C, Nizet V, Remington J, Klein J, Maldonado Y (ed.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*, 7 ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, USA.
19. Santolaya ME, Alvarado T, Queiroz-Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, Cortes JA, Thompson L, Guzman M, Sifuentes J, Echevarria JI, Nucci M, Latin American Invasive Mycosis N. 2014. Active surveillance of candidemia in children from Latin America: a key requirement for improving disease outcome. *The Pediatric infectious disease journal* 33:e40-44.
20. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. 2006. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology* 47:225-229.
21. Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gaustad P. 2006. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *Journal of clinical microbiology* 44:1977-1981.
22. San-Blas G, Burger E. 2011. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. *Revista iberoamericana de micologia* 28:1-25.
23. Cooper C. 2011. Yeast Pathogenic to Humans, p. 9-19. *In* Kurtzman C, Fell J, Boekhout T (ed.), *The Yeasts*, 5 ed, vol. 1. Elsevier Inc, Utrecht, The Netherlands.
24. Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4:119-128.
25. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Flörl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ. 2012. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 7:9-18.
26. Reiss E, Lasker BA, Lott TJ, Bendel CM, Kaufman DA, Hazen KC, Wade KC, McGowan KL, Lockhart SR. 2012. Genotyping of *Candida parapsilosis* from three neonatal intensive care units (NICUs) using a panel of five multilocus microsatellite markers: broad genetic diversity and a cluster of related strains in one NICU. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12:1654-1660.
27. Lockart S, Diekema D, Pfaller M. 2009. The Epidemiology of Fungal Infections, p. 15-32. *In* Aissie E, McGinnis M, Pfaller M (ed.), *Clinical Mycology*. Churchill-Livingstone Elsevier, Philadelphia, PA, USA.
28. Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. 2001. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 20:864-870.

29. Jordan JA, Durso MB. 1996. Rapid Speciation of the Five Most Medically Relevant Candida Species Using PCR Amplification and a Microtiter Plate-Based Detection System. *Mol Diagn* 1:51-58.
30. Verweij PE, Meis JF. 2000. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 2:80-87.
31. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. 2003. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet. Infectious diseases* 3:685-702.
32. Karthaus M, Cornely OA. 2005. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Annals of hematology* 84:207-216.
33. Shinoda T, Kaufman L, Padhye AA. 1981. Comparative evaluation of the latron serological Candida check kit and the API 20C kit for identification of medically important Candida species. *Journal of clinical microbiology* 13:513-518.
34. Chen SC, Halliday CL, Meyer W. 2002. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Medical mycology* 40:333-357.
35. Ellepola AN, Morrison CJ. 2005. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of microbiology* 43 Spec No:65-84.
36. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. 2000. Simple and rapid detection of Candida albicans DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of clinical microbiology* 38:3016-3021.
37. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. 2014. Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *International journal of antimicrobial agents* 43:78-81.
38. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. 2002. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *Journal of clinical microbiology* 40:2483-2489.
39. Zarrinfar H, Kaboli S, Dolatabadi S, Mohammadi R. 2016. Rapid detection of Candida species in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary symptoms. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 47:172-176.
40. Susever S, Yegenoglu Y. 2011. Evaluation of the significance of molecular methods in the diagnosis of invasive fungal infections: comparison with conventional methods. *Mikrobiyoloji bulteni* 45:325-335.
41. Posch W, Heimdörfer D, Wilflingseder D, Lass-Flörl C. 2017. Invasive candidiasis: future directions in non-culture based diagnosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 15:829-838.
42. Kim HJ, Brehm-Stecher BF. 2015. Design and evaluation of peptide nucleic acid probes for specific identification of Candida albicans. *Journal of clinical microbiology* 53:511-521.
43. Pombo AG. 2014. Identificación molecular y métodos de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida. Tesis de grado.
44. Mohammadi R, Abdi S. 2015. Molecular identification of Candida species isolated from gastro-oesophageal candidiasis in Tehran, Iran. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* 8:288-293.
45. Fallahi AA, Korbacheh P, Zaini F, Mirhendi H, Zeraati H, Noorbakhsh F, Moazeni M, Andonian L, Nazeri M, Rezaie S. 2013. Candida species in cutaneous candidiasis

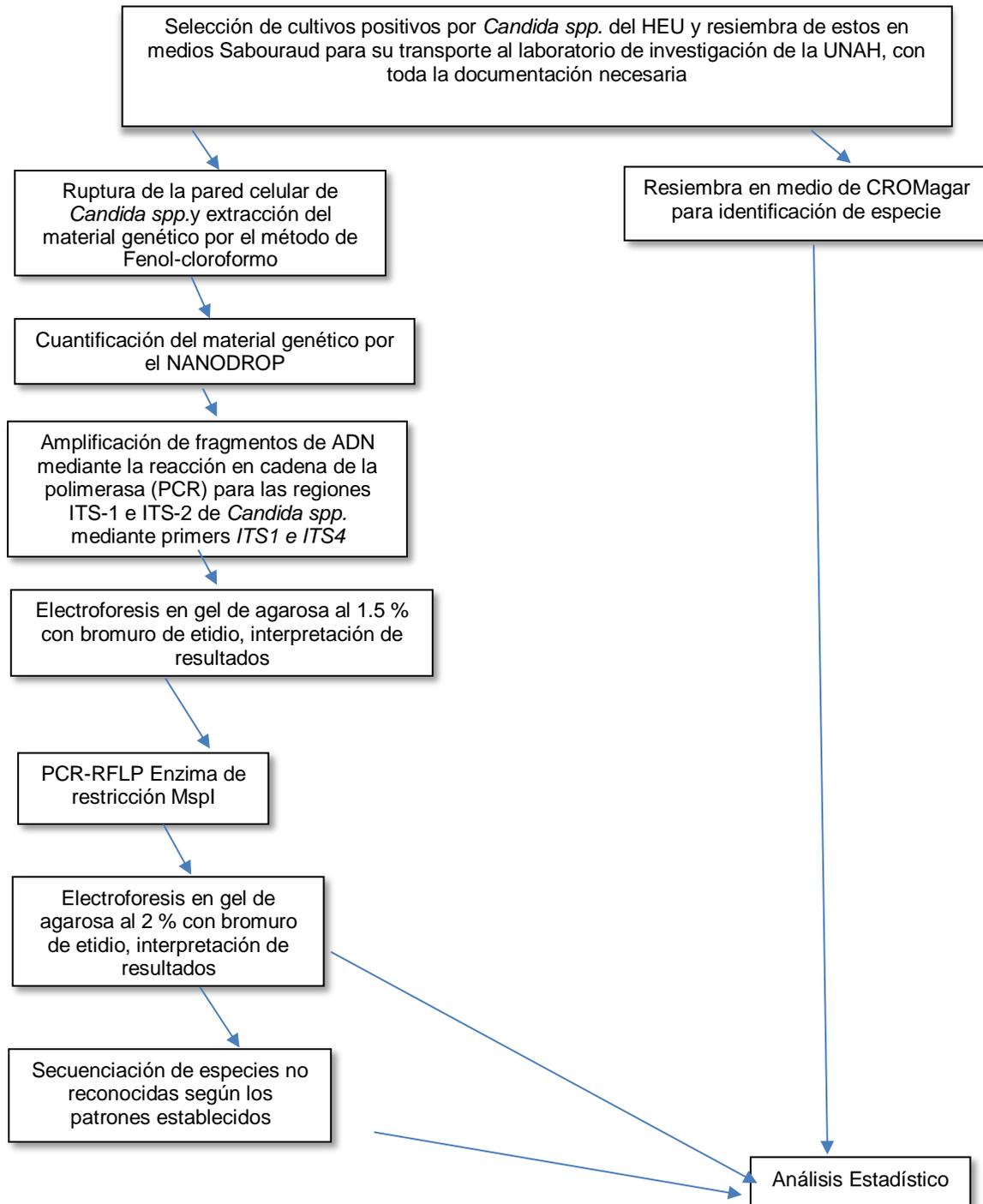
- patients in the Guilan province in Iran; identified by PCR-RFLP method. *Acta medica Iranica* 51:799-804.
46. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H. 2001. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *Journal of clinical microbiology* 39:4138-4141.
  47. Romeo O, Criseo G. 2008. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 62:230-233.
  48. Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. 2016. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. *Current medical mycology* 2:1-7.
  49. Vijayakumar R, Giri S, Kindo AJ. 2012. Molecular species identification of *Candida* from blood samples of intensive care unit patients by polymerase chain reaction - restricted fragment length polymorphism. *Journal of laboratory physicians* 4:1-4.
  50. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Shields RM, Cheng S, Mitsani D, Vadnerkar A, Silveira FP, Kleiboeker SB, Clancy CJ. 2012. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54:1240-1248.
  51. Festekjian A, Neely M. 2011. Incidence and predictors of invasive candidiasis associated with candidaemia in children. *Mycoses* 54:146-153.
  52. Hovi L, Saarinen-Pihkala UM, Vettenranta K, Saxen H. 2000. Invasive fungal infections in pediatric bone marrow transplant recipients: single center experience of 10 years. *Bone marrow transplantation* 26:999-1004.
  53. Freydiere AM, Guinet R. 1997. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Revista iberoamericana de micologia* 14:85-89.
  54. 2013, posting date. CHROMagar™ *Candida*, Instrucciones de Uso. [Online.]
  55. GmbH BD 2014, posting date. BBL™ CHROMagar™ *Candida* Medium, instrucciones de uso. [Online.]
  56. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Tauber MG, Pittet D. 2004. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38:311-320.
  57. Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila VJ, Koivula I, Lumio J, Kotilainen P, Syrjala H, Ruutu P. 2010. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC infectious diseases* 10:312.
  58. Arendrup MC. 2013. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Danish medical journal* 60:B4698.
  59. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, Knudsen JD, Kristensen L, Moller J, Nielsen L, Rosenvinge FS, Roder B, Schonheyder HC, Thomsen MK, Truberg K. 2011. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *Journal of clinical microbiology* 49:325-334.
  60. Hsueh PR, Graybill JR, Playford EG, Watcharananan SP, Oh MD, Ja'alam K, Huang S, Nangia V, Kurup A, Padiglione AA. 2009. Consensus statement on the management of invasive candidiasis in Intensive Care Units in the Asia-Pacific Region. *International journal of antimicrobial agents* 34:205-209.
  61. Hsu LY, Lee DG, Yeh SP, Bhurani D, Khanh BQ, Low CY, Norasetthada L, Chan T, Kwong YL, Vaid AK, Alejandria I, Mendoza M, Chen CY, Johnson A, Tan TY. 2015. Epidemiology of invasive fungal diseases among patients with haematological disorders in the Asia-Pacific: a prospective observational study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21:594.e597-511.

62. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 62:e1-50.
63. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. 2011. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55:532-538.
64. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews* 36:288-305.
65. Reiss E, Morrison CJ. 1993. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clinical microbiology reviews* 6:311-323.

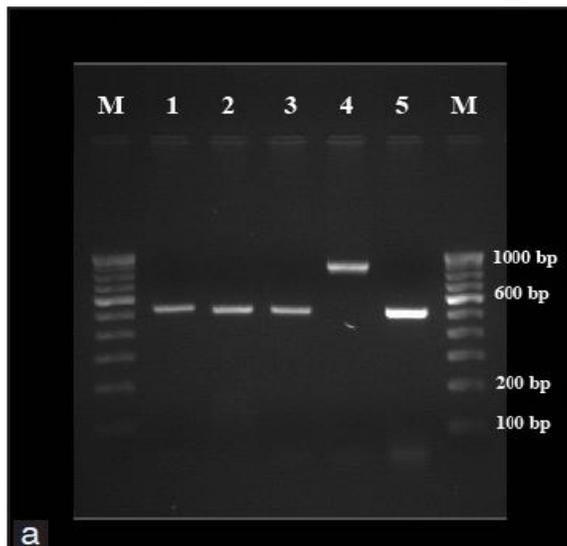
# ANEXOS

## Anexo 1: Flujoograma de Trabajo

“Caracterización molecular de especies de *Candida spp.* en pacientes de diversas áreas del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU), Noviembre 2015- Abril 2016.”

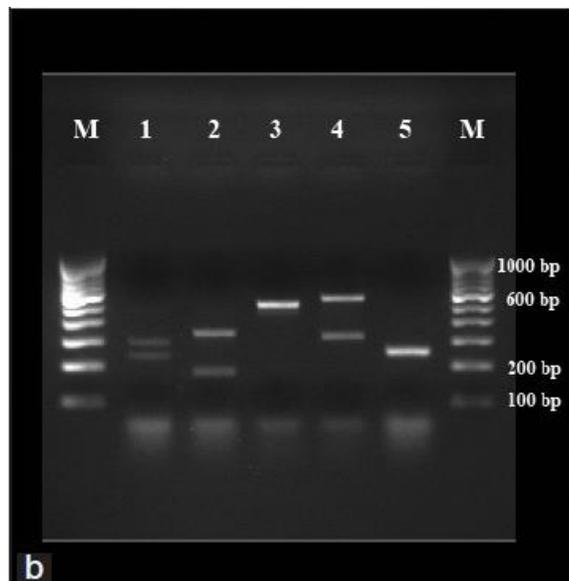


**Anexo 2. Patrones de referencia de PCR- RFLP esperados en este estudio según la literatura**



**Resultado de PCR:  
Amplicón de un tamaño  
de 500-800 pb.**

**Carriles 1-5:** 535 pb *C. albicans*, 524 pb *C. tropicalis*, 520 pb *C. parapsilosis*, 871 pb *C. glabrata*, 510 pb *C. krusei*.



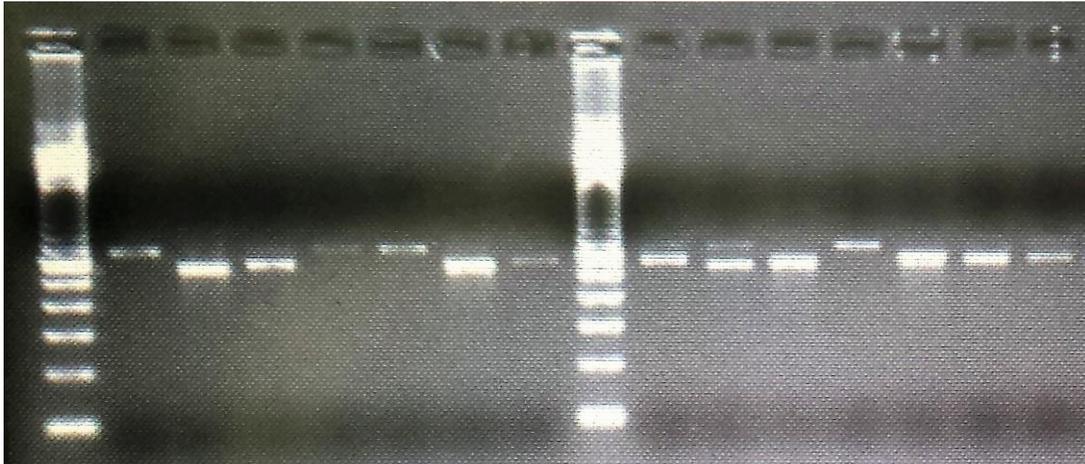
**Resultados de RFLP:  
Tamaños esperados  
de productos de  
digestión:**

**Carriles 1.5:** : 297,238 pb *C. albicans*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 520 pb *C. parapsilosis*, 557,314 pb *C. glabrata*, 261,249 *C. krusei*.

### Anexo 3. Resultados obtenidos mediante la técnica de PCR- RFLP

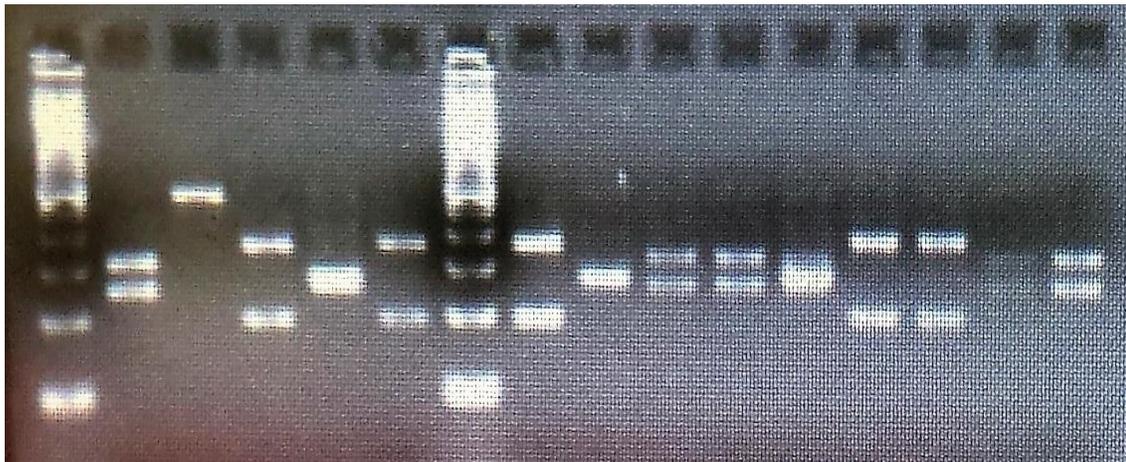
**Resultado de PCR: Amplicón de un tamaño de 500-800 pb. para el género *Candida*:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



**Resultado de RFLP:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



**Carriles 1-14:** 297,238 pb *C. albicans*, 520 pb *C. parapsilosis*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 261,249 *C. krusei*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 261,249 *C. krusei*, 297,238 pb *C. albicans*, 297,238 pb *C. albicans*, 261,249 *C. krusei*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 297,238 pb *C. albicans*, 297,238 pb *C. albicans*



PA-257480.05

#### Anexo 4: Instrucciones de uso del medio CRHOMagar *Candida*

### BBL<sup>TM</sup> CHROMagar<sup>TM</sup> *Candida* Medium

#### USO PREVISTO

**BBL CHROMagar *Candida* Medium** es un medio para el aislamiento y la identificación de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de muestras clínicas. Inhibe el crecimiento de bacterias y también puede utilizarse como medio de aislamiento selectivo para otras especies de levaduras y para hongos filamentosos.

#### PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico.

**BBL CHROMagar *Candida* Medium** es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento<sup>1,6</sup>.

Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida* [*Torulopsis*] *glabrata* y otras especies). Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias<sup>1,5,6</sup>.

Peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes en **BBL CHROMagar *Candida* Medium**. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de confirmación. El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos.

CHROMagar *Candida* Medium fue desarrollado por A. Rambach y lo distribuye BD Diagnostic

Systems bajo acuerdo de licencia con CHROMagar, París, Francia.

## PRECAUCIONES

**IVD** . Solamente para uso profesional. 

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro.

Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento.

## ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y ecalentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los períodos de incubación recomendados.

Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

## CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes (para obtener los detalles, véase el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**). Incubar las placas en atmósfera aerobia durante 20 – 48 h a 35 ± 2 °C. Tener en cuenta que se requiere una incubación de 42 h para que las colonias desarrollen por completo el color.

Cepas	BBL CHROMagar Candida Medium
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color verde claro a mediano
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Crecimiento de bueno a excelente; colonias grandes y planas, de color de rosado claro a rosa, con un borde blancuzco
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 9968	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color gris azulado, con o sin halos de color violeta
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Inhibición de parcial a completa
Sin inocular	De incoloro a beige claro, transparentes

## PROCEDIMIENTO

### Materiales suministrados

**BBL CHROMagar Candida Medium** (placas **Stacker** de 90 mm). Controladas microbiológicamente.

### Material no suministrado

Medios de cultivo auxiliar, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

### Tipos de muestras

Este medio se utiliza para el aislamiento y la identificación directa de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* a partir de todos los tipos de muestras clínicas. También puede utilizarse para el aislamiento de otros hongos (véase también **CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**).

### Procedimiento de análisis

Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa. Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 20 – 48 h en posición invertida.

Se requiere una incubación de 42 h para que se desarrolle por completo el color de las colonias *Candida*. Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.

Ciertos aislados, tales como *Cryptococcus neoformans* y hongos filamentosos, requieren una incubación más prolongada y posiblemente una temperatura de incubación inferior para obtener un crecimiento óptimo. Por tanto, debe inocularse e incubarse a 20 – 25 °C una placa con un segundo medio fúngico (por ejemplo **BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol**) si se prevé la presencia de hongos diferentes de la especie *Candida*.

### Resultados

Después de la incubación, las placas de las muestras con hongos presentarán crecimiento. Se recomienda efectuar la lectura de las placas sobre un fondo blanco. Si están presentes especies de *Candida*, las colonias presentarán un color verde de claro a mediano (*C. albicans*), rosado claro a rosa con un borde blancuzco (*C. krusei*) o bien azul verdoso a azul metálico con o sin halos violetas (*C. tropicalis*). Otras especies de *Candida* y otras levaduras presentan un color malva de claro a oscuro (rosado a violeta) o, si no se utilizan sustratos cromógenos, presentarán su color natural de colonias (de crema a blanco).

Los datos de estudios diversos indican que no es necesario realizar pruebas de identificación adicionales para *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*<sup>1-3</sup>.

## CARACTERISTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El uso de CHROMagar Candida Medium para la identificación directa de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* ha sido documentado en numerosos estudios que también pueden consultarse para obtener información adicional acerca de los procedimientos recomendados<sup>1-5</sup>. Los resultados de una evaluación de rendimiento reciente de **BBL CHROMagar Candida Medium** fueron notificados por Jabra-Rizk y colegas<sup>4</sup>.

*Candida (Torulopsis) glabrata* habitualmente produce colonias de color malva a malva oscuro en este medio<sup>2</sup>. No obstante, se recomienda que los organismos que aparecen con este color se confirmen mediante pruebas bioquímicas adicionales, dado que este color de colonia puede ser producido por diversas especies de levaduras. Las colonias que presenten un color de rosado pálido o malva claro a oscuro, o bien muestren su color crema natural en este medio, deben identificarse mediante métodos estándar<sup>7,8</sup>.

Las levaduras diferentes de las especies anteriormente mencionadas y los hongos filamentosos también pueden aislarse en este medio si se incuban a una temperatura y durante un período apropiados para estos organismos.

Dado que los mohos y otros hongos filamentosos pueden metabolizar los sustratos cromógenos, los colores presentados por estos organismos en **BBL CHROMagar Candida Medium** pueden ser diferentes de los mostrados en otros medios fúngicos. No utilizar el aspecto del crecimiento de los hongos filamentosos en este medio para su identificación morfológica tradicional.

Se ha informado que *C. dubliniensis* produce un color verde oscuro distintivo al realizar el aislamiento primario en **BBL CHROMagar Candida Medium**<sup>9-11</sup>. Sin embargo, esta propiedad tal vez no se conserve en el subcultivo. Se requieren pruebas fenotípicas y genotípicas adicionales para la confirmación de *C. dubliniensis*.

Antes de utilizar **BBL CHROMagar Candida Medium** por primera vez, se recomienda practicar con el aspecto de colonia característico de cepas definidas de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, por ejemplo, las cepas mencionadas en **CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO**.

## REFERENCIAS

1. Odds, F.C., and R. Bernaerts. 1994. CHROMagar Candida Medium, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32: 1923-1929.
2. Pfaller, M.A., A. Huston, and S. Coffman. 1996. Application of CHROMagar Candida Medium for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J. Clin. Microbiol. 34: 56-61.
3. Beighton, D., R. Ludford, D.T. Clark, S.R. Brailsford, C.L. Pankhurst, G.F. Tinsley, J. Fiske, D. Lewis, B. Daly, N. Khalifa, V. Marren, and E. Lynch. 1995. Use of CHROMagar Candida Medium medium for isolation of yeasts from dental samples. J. Clin. Microbiol. 32: 3025-3027.
4. Jabra-Rizk, M.A. et al. 2001. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida Medium. J. Clin. Microbiol. 30: 2015-2016.
5. Bauters, T.G., and Nelis, H.J. 2002. Comparison of chromogenic and fluorogenic membrane filtration methods for detection of four *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 40:

- 1838-1839.
6. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington,
  7. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 1998. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc., St. Louis.
  8. Larone, D.H. 1995. Medically important fungi. A guide to identification. ASM Press, Washington, D.
  9. Schoofs, A., F.C. Odds, R. Coleblunders, M. Ieven, and H. Goossens. 1997. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16: 296-300.
  10. Kirkpatrick, W.R., S.G. Revankar, R.K. McAtee, J.L. Lopez-Ribot, A.W. Fothergill, D.I. McCarthy, S.E. Sanche, R.A. Cantu, M.G. Rinaldi, and T.F. Patterson. 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from Human Immunodeficiency Virus-infected patients in North America by primary CHROMagar Candida Medium screening and susceptibility testing of isolates. J. Clin. Microbiol. 36: 3007-3012.
  11. Odds, F.C., L. Van Nuffel, and G. Dams. 1998. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J. Clin. Microbiol. 36: 2869-2873.

## ENVASE Y DISPONIBILIDAD

### BBL CHROMagar Candida Medium

Nº de cat. 257480                      Medios preparados en placas, 20 placas  
Nº de cat. 254106                      Medios preparados en placas, 120 placas

## INFORMACIÓN ADICIONAL

Para obtener más información, diríjase a su representante local de BD.



### Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12  
D-69126 Heidelberg/Germany  
Phone: +49-62 21-30 50      Fax: +49-62 21-30 52 16  
Reception\_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.  
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection  
BD, BD Logo and all other trademarks

---

## Anexo 5: Aplicación al comité de Bioseguridad



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y ZONÓTICAS  
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD  
FORMULARIO DE EVALUACIÓN



Si tiene alguna consulta o requiere asistencia para completar este formulario, favor contactar a la Oficial de Bioseguridad de la MEIZ al teléfono (504) 2252 0282 o al correo electrónico <adazelaya@yahoo.com>

### Datos Generales

<b>Nombre de proyecto:</b>  Caracterización molecular de especies de <i>Candida spp.</i> en pacientes de diversas áreas del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU), Noviembre 2015- Abril 2016.	<b>Departamento o unidad ejecutora:</b>  Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.
<b>Alumno (s) responsable de la investigación:</b>  Erika Waleska Pérez Alemán	<b>Profesor (s) responsable:</b>  Dra. Carmen Galo M.Sc.
<b>Laboratorio (s) en que se llevará a cabo la investigación:</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Laboratorio Teasdale – Corti, Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Escuela de Microbiología, UNAH.</li><li>2. Centro de Investigaciones Genéticas (CIG) de la Escuela de Microbiología</li></ol>	<b>Instituciones participantes:</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Escuela de Microbiología, UNAH</li><li>2. Laboratorio Clínico, sección de Micología del Hospital Escuela Universitario (HEU).</li></ol>

**Naturaleza de la Investigación**

<p><b>Nombre de los agentes infecciosos que manipulará:</b> <i>Diversas especies de <b>Candida spp.</b></i></p> <p><b>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) impresas de los microorganismos que manipulará?</b> Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>	<p><b>¿En qué nivel de riesgo están clasificados Los agentes infecciosos que manipulará?</b> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p> <p><b>¿Cuál es el nivel de bioseguridad con que trabaja el laboratorio en el que desarrollará la investigación?</b> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p><b>¿Utilizará reactivos químicos?</b> Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p><b>Enumere las sustancias químicas que utilizará con mayor frecuencia</b></p> <p>Etanol al 70%</p> <p>Cloroformo</p> <p>Isopropanol frío</p> <p>Fenol saturado</p> <p>PBS 1X.</p> <p>TAE 0.5X</p> <p>Agarosa</p> <p>Bromuro de etidio</p>	<p><b>¿Cuenta con las hojas de seguridad (MSDS) de los reactivos químicos que utilizará?</b> Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**¿En qué estado manipulará el o los agentes infecciosos?**

Cultivos puros en placa  Cultivos en Tubo   
ADN/ARN  Cultivo de Tejidos

**Tipo de muestras que manipulará**

Tejidos

Sangre

Orina

Animales

Heces

Otros líquidos biológicos

Muestras ambientales\*

Cultivos puros

**Cultivos de diferentes tipos de  
Otras muestra**

\*Tipo de muestras ambientales

**Describe las técnicas que utilizará:**

1. Ruptura de la pared celular de *Candida spp.* y extracción del material genético por el método de Fenol-cloroformo
2. Cuantificación del material genético por el NANODROP
3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para las regiones ITS-1 e ITS-2 de *Candida spp.* mediante primers *ITS1* e *ITS4*
4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio, interpretación de resultados
5. PCR-RFLP Enzima de restricción MspI
6. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, interpretación de resultados
7. Secuenciación de especies no reconocidas según los patrones establecidos
8. Resiembra en medio de CROMagar para identificación de especie

**CONTROLES PRIMARIOS**

**Controles de Ingeniería**

¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con cabina de seguridad biológica? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con autoclave dentro del laboratorio? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con campana de seguridad química? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	¿El laboratorio en que desarrollará la investigación cuenta con espacio adecuado para realizar la investigación? Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si su respuesta es negativa ¿Cómo suplirá esta carencia?

**Equipo de Protección Personal (EPP)**

¿Qué tipo Equipo y materiales de protección personal usará en su investigación?

Gabacha  Guantes  Cabina de bioseguridad   
 Mascarilla quirúrgica  Mascarilla N95  Lentes

**Procedimientos Operativos Estándar (POE)**

¿Cuenta con los POE's siguientes?	Si	No	No aplica
1.- Toma de muestras	X		
2.- Manejo de desechos bioinfecciosos	X		
3.- Transporte de muestras	X		
4.- Uso de la CSB	X		
5.- Almacenamiento de muestras	X		
6.- Puesta y quitado de EPP	X		
7.- Limpieza de derrames	X		
8.-Otro			

### Controles Administrativos

	Si	No	No aplica
1.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la CSB?	X		
2.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso del autoclave?	X		
3.- ¿Ha recibido entrenamiento para puesta y quitado de EPP?	X		
4.- ¿Ha recibido entrenamiento para limpieza de derrames?	X		
5.- ¿Ha sido vacunado contra la Hepatitis B?	X		
6.- ¿Ha recibido entrenamiento para el uso de la campana de seguridad química?	X		
7.- ¿Conoce las características químicas de los reactivos que utilizará en la investigación	X		
8.- Otros			

## Anexo 6: Procedimiento Operativo Estándar

**Universidad Nacional Autónoma de Honduras  
Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas  
Escuela de Microbiología  
Sección de Micología**



Procedimiento Operativo Estándar para:

**Caracterización molecular de especies de *Candida spp.***

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>
Erika Pérez Alemán Abril/2016	Dra. Carmen galo Julio/2016	Dra. Carmen galo Julio/2016

Tegucigalpa, Honduras 2016

## **I. Objetivo del POE**

Contar con las metodologías adecuadas y necesarias en el desarrollo de los procedimientos para la realización de la investigación de tesis: **Caracterización molecular de especies de *Candida spp.* aisladas del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU) Noviembre 2015- Abril 2016.**

## **II. Alcance**

Se aplica a todas las actividades que se realizarán para llevar a cabo la recolección y el procesamiento de las muestras en el laboratorio que se relacionan con el diagnóstico molecular de especies de *Candida spp.*, y que por su importancia requieran una descripción escrita de las metodologías necesarias para su realización.

## **III. Responsabilidad**

Estará bajo el investigador encargado de realizar los procedimientos para el diagnóstico molecular de especies de *Candida* así como los demás investigadores y personal del laboratorio encargado de la elaboración, revisión, aprobación, distribución y control de los procedimientos operativos estándar creados para llevar a cabo la investigación.

#### **IV. Contenido**

##### **A. Procedimientos Operativos Estándar para técnicas de análisis:**

1. Preparación del medio de cultivo Sabouraud
2. Resiembra y Transporte de medios
3. Rompimiento de la pared celular de *Candida* mediante perlas de zirconio
4. Extracción de ADN de *Candida*
5. Cuantificación del material genético por el NANODROP
6. Preparación de mastermix para PCR de *Candida*
7. Electroforesis en geles de Agarosa
8. Revelación del gel de Agarosa
9. RFLP (digestión con enzimas de restricción)

##### **B. Procedimientos operativos estándar para uso de equipo de laboratorio**

1. Uso de la Balanza
2. Uso del aparato mini bead beater
3. Uso de la Centrifuga
4. Uso del Termociclador
5. Uso del esterilizador a vapor de alta presión
6. Uso de la cabina de bioseguridad

##### **C. Procedimiento Operativos Estándar para Lavado y Descarte de Material**

1. Lavado de Material reusable
2. Descarte de material conteniendo sustancias Infecciosas

##### **D. Condiciones de bioseguridad**

1. Equipo de bioseguridad y Tratamiento de derrames en el laboratorio

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Preparación del medio de cultivo Sabouraud</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Materiales necesarios:**

- Tubos de vidrio estériles con taparrosca
- Agua destilada
- Medio Sabouraud deshidratado
- Estufa
- Balanza
- Espátula
- Recipiente para pesar
- Autoclave
- Inclinator de medios
- Guantes de latex
- Guantes térmicos
- Probeta
- Erlenmeyer
- Torunda grande de gaza o algodón
- Gorro de papel

Procedimiento

1. Pesar 65 gramos del medio deshidratado Sabouraud en la balanza para 1,000 ml de agua destilada que mediremos en una probeta
2. Colocar el medio deshidratado en un Erlenmeyer y añadir el agua destilada medida
3. Tapar el recipiente con una tapa de gaza o algodón mezclar , homogenizar llevar el medio a la estufa para disolverlo, agitar aproximadamente cada 3 minutos y retirar de la estufa cuando comience a hervir
4. Llevar el medio al autoclave y esterilizarlo por 15 minutos a 120 libras de presión.
5. Servir aproximadamente 4 ml del medio en cada tubo con taparrosca y dejar enfriar sobre el inclinador de medios. <sup>(1)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Resiembra y Transporte de medios</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Materiales necesarios:**

- Marcador indeleble, lápiz
- Asas microbiológicas
- Mechero bunsen
- Alcohol al 70%
- Papel toalla
- Guantes de látex
- Libreta de apuntes
- Gradillas de transporte
- Cajas de bioseguridad para transporte

**Procedimiento:**

1. Rotular los medios de Sabouraud estériles con los códigos necesarios
2. Desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70%
3. Resembrar los cultivos de *Candida* seleccionados utilizando el asa microbiológica y mechero bunsen.
4. Anotar los códigos y la información obtenida en cada boleta de petición de análisis micológico en una libreta.
5. Transportar los medios resembrados en una gradilla de forma vertical dentro de una caja de bioseguridad para transporte.
6. Llevar al laboratorio de micología y conservar las muestras en refrigeración a 6°C hasta su posterior análisis.<sup>(2)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Rompimiento de la pared celular de <i>Candida</i> mediante perlas de zirconio</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Materiales:**

- TRIS-HCl, 1 M, pH 7.8
- EDTA 0,5 M (pH 8)
- CTAB al 10%
- NaCl 5M
- Agua destilada
- Mercaptoetanol
- Erlenmeyer
- Pipetas y puntas de 10-100, 100-1000
- Asas microbiológicas en anillo
- Viales estériles de 1.5 ml
- Gradillas porta viales
- Tubos de plástico de 2.0 ml con cierre hermético
- Perlas de zirconio (0.5 mm de diámetro)
- Papel Parafilm

**Procedimiento**

1. Preparar buffer de lisis compuesto por: [(10ml TRIS-HCl, 1 M, pH 7.8, 4ml EDTA 0,5 M pH 8, 20 ml de CTAB al 10% y 30 ml de NaCl 5M) aforar con agua destilada hasta llegar a 100 ml de esta solución, luego agregar 1% del volumen final de Mercaptoetanol];
2. Colocar en un vial 1 ml del Buffer de lisis y agregar una asada completa de las muestras del cultivo de *Candida*, re-suspender
3. Cerrar bien y colocar esta mezcla en baño maría a 100°C por 1 minuto.
4. Colocar 700 µl de la mezcla anterior a un vial especial con cierre hermético al que previamente se le han colocado 0.13 g de perlas de zirconio.
5. Asegurar el cierre de dichos tubos con papel parafilm y colocar en el aparato Mini Bead Beater para su agitación durante 1 minuto con 3 segundos cada una de las muestras.
6. recuperar en un vial nuevo la mayor cantidad de sobrenadante evitando tomar las perlas, dicho sobrenadante se utilizará en los siguientes pasos de extracción de ADN de *Candida*.<sup>(3)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Extracción de ADN de <i>Candida</i></b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

### **Materiales**

- Fenol saturado
- Cloroformo
- Viales de 1.5 ml
- Acetato de Sodio a 3M pH 5.2
- Isopropanol frío
- Etanol al 70%
- TE1X o agua estéril libre de nucleasas
- Microcentrífuga
- Bloque caliente
- Pipetas y puntas de 10-100, 100-1000

### **Procedimiento:**

1. Agregar a cada muestra recuperada del paso anterior 400 ul de la mezcla de fenol:cloroformo en proporción 1:1 previamente homogenizada en un vortex,
2. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm , recuperar la fase acuosa y transferir a un nuevo vial ( anotar el volumen recuperado)
3. Agregar 1/10 volumen de Acetato de Sodio a 3M pH 5.2 y un volumen similar al obtenido de Isopropanol frío
4. Centrifugar 3 min a 13,000 rpm, eliminar el sobrenadante
5. Lavar 3 veces con 200 ul de Etanol al 70%
6. Dejar evaporar el etanol residual en un bloque caliente
7. Resuspender el material genético recuperado en 50 ul de TE1X o en 50 ul de agua estéril libre de nucleasas,
8. Guardar a -20°C hasta el uso. <sup>(4)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Cuantificación del material genético por el NANODROP</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Materiales:**

- Agua destilada
- Micropipetas 1 ul, puntas
- Muestras problema
- Papel de limpieza

**Procedimiento:**

1. Calibrar el aparato levantando el brazo de este y pipeteando 1 µl de agua destilada, sobre el pedestal del Nanodrop. Se baja el brazo, el agua destilada sube ligeramente y se forma una columna de líquido. En la computadora que contiene el software para el Nanodrop, se pulsa el botón “Blank”, como el agua es el blanco, el resultado de la absorbancia tiene que ser 0 ng/µl.
2. Una vez ajustado el Nanodrop con el blanco, se pipetea 1µl de la muestra que se quiere cuantificar.
3. En el programa de la computadora se selecciona la casilla “Measure” que determina la absorbancia de la muestra. La medición se hace en menos de 10 segundos y el rango de cuantificación va desde los 2 ng hasta los 3000 ng/µl.
4. Cuando la lectura se completa, la superficie se limpia solamente con un papel especial y así queda listo para la siguiente medida. <sup>(5)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Preparación de Mastermix para PCR de <i>Candida</i></b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Materiales necesarios:**

- Viales de 25 ul
- Gradillas porta viales
- 25 ul de mix de PCR comercial
- 1 µl de primer forward (ITS-1)
- 1 µl de primer reverse (ITS-2)
- Agua estéril libre de nucleasas
- Termociclador
- Micropipeta y puntas de 0.1- 1, 10-100, 100-1

**Procedimiento:**

1. Colocar en un vial 25 ul de mix para PCR comercial,
2. Agregar 1ul del ADN extraído en el paso anterior
3. Añadir a la mezcla: 1 µl de primer forward (ITS-1) 1 µl de primer reverse (ITS-4)
4. Llevar **la mezcla** a un volumen final de 50 µl con agua estéril libre de nucleasas
5. Colocar en el termociclador con la programación correspondiente.<sup>(4)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Electroforesis en geles de Agarosa</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Materiales**

- Buffer de corrida
- Horno Microondas
- Molde para gel con peine
- Cámara electroforética
- Fuente de voltaje
- Gel de Agarosa
- Buffer TEA o TBE
- Agua destilada
- Micropipetas, punta

- Bromuro de Etidio
- Papel parafilm
- Marcador de peso molecular

**Procedimiento:**

1. Preparar en un matraz gel de agarosa al 1.5% disuelta en buffer TEA o TBE
2. Se calienta la mezcla anterior en un horno microonda a temperatura media hasta que se funda la agarosa, aproximadamente 2-3 minutos (se observa totalmente transparente).
3. Se deja enfriar la agarosa (aproximadamente a unos 40°C) y se añade 5 ul de bromuro de etidio por cada 100 ml de agarosa.
4. Colocar la agarosa todavía en solución en la cámara de molde previamente nivelada, colocar el
5. peine para formar los pocitos y dejar que solidifique.
6. Una vez solidificado, retirar el peine y colocar el gel en la cámara electroforética.
7. Llenar la cámara con el buffer de corrida (generalmente TAE o TBE 1X) hasta que cubra el gel.
8. En un papel para film, colocar 2 ul del buffer de corrida para cada muestra a dispensar en el gel.
9. Tomar 5 ul de cada muestra amplificada en refrigeración o saliendo del termociclador, mezclar la muestra con el buffer de corrida antes de colocarla en el gel.
10. Colocar las muestras en los pocitos con cuidado para evitar derrames o paso de un pocito a otro y colocar el marcador de peso molecular respectivo.
11. Colocar la tapa de la cámara electroforética haciendo coincidir los colores de los electrodos y conectarla a la fuente de poder.
12. Iniciar la electroforesis programando un voltaje constante de 400 Ma, 110 voltios por 30 minutos.
13. Una vez concluido este proceso se retira la placa del gel de la cámara y se coloca dentro del foto-documentador, con el fin de obtener una imagen de las bandas.<sup>(6,7)</sup>

**Programación del Termociclador:**

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	95 °C	5 min	Desnaturalización Inicial
1	95°C	30 seg	Desnaturalización
1	56°C	30 seg	Alineamiento
1	72°C	30 seg	Extensión
1	72°C	5 Min	Extensión final

Procedimiento Operativo Estándar		
Revelación del Gel de agarosa		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

1. Colocar el gel en la bandeja del transiluminador Gel Doc.
  2. Buscar el programa de visualización de geles QuantityOne.
  3. Entrar a los archivos, buscar Gel Doc XR, y a continuación aparecerá la pantalla de visualización de geles.
  4. Seleccionar con el botón de Trans UV en el Gel Doc y la imagen comenzara a aparecer en la pantalla.
  5. Para guardar la imagen ir a mis documentos y seleccionar la opción Export to JPEG imagen y seleccionar el sitio en donde se guardará la imagen.
  6. Retirar el gel de la bandeja del equipo.
  7. Limpiar la humedad dejada por el gel de la bandeja del transiluminador.
  8. Cerrar programas, apagar el equipo.
- Con el revelado de los productos de PCR para *Candida* se espera obtener un amplicón de un tamaño de 500-800 pb.,(535 pb C. albicans, 524 pb C. tropicalis, 871 pb C. glabrata, 510 pb C. krusei, 520 pb C. parapsilosis) dichos resultados serán fotografiados y almacenados. <sup>(7)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>RFLP (digestión con enzimas de restricción)</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Material:**

- Viales estériles
- Gradillas porta viales
- Buffer enzimático
- Enzima MspI
- Agua estéril libre de nucleasas.
- Incubadora a 37°C
- Micropipeta y puntas

**Procedimiento:**

1. Colocar en un vial con capacidad de 200 µl la mezcla de la reacción que contendrá: 2 µl de buffer enzimático, 5 unidades de enzima MspI, 10 µl de producto de PCR del paso anterior
2. Llevar la mezcla a un volumen final de 20 µl con agua estéril libre de nucleasas.
3. Incubar dicha mezcla por 1 hora a 37 °C. <sup>(4)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Visualización de productos de PCR- RFLP en gel de agarosa</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

Los productos de PCR-RFLP se someterán a electroforesis en 2.0% de concentración en gel de agarosa, estos se teñirán con bromuro de Etidio (0,5ug/ml) se visualizarán bajo luz UV y se compararán con los patrones de peso molecular establecidos, esperando obtener los siguientes tamaños en los productos de restricción: 297,238 pb *C. albicans*, 340,184 pb *C. tropicalis*, 557,314 pb *C. glabrata*, 261,249 *C. krusei*, 520 pb *C. parapsilosis*, dichos resultados serán fotografiados y almacenados. <sup>(4)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
Uso de la balanza		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

1. Colocar la balanza en una superficie plana y alejada de las corrientes de aire.
2. Conectar la balanza a la fuente de energía eléctrica.
3. Oprimir el interruptor localizado por debajo de la pantalla para encenderla.
4. Calibrar la balanza oprimiendo de nuevo el interruptor del paso anterior.
5. Esperar hasta que se estabilice para comenzar con la medición.
6. Colocar el recipiente para pesar encima del plato de la balanza.
7. Tarar con el interruptor localizado en la parte frontal de la balanza.
8. Pesar la cantidad correspondiente.
9. Al terminar de pesar retirar el recipiente o material del plato.
10. Limpiar con una escobilla o gaza.
11. Apagar la balanza oprimiendo el interruptor localizado en la parte frontal superior de la balanza.
12. Desconectar la balanza y colocar el cobertor especial de protección. <sup>(8)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Uso de la centrifuga</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

1. Conectar el cable a la conexión eléctrica de 110 voltios.
2. Accionar el botón OPEN para abrir la tapadera.
3. Colocar los tubos en los porta muestra, teniendo en cuenta la carga en el rotor deforma balanceada.
4. Fijar la velocidad y el tiempo de centrifugación con las teclas especiales para este fin.
5. Accionar el botón STAR para dar inicio.
6. Observar detenidamente el funcionamiento, si no existe ningún problema continúe, de lo contrario detenga la centrifuga.
7. Accionar el botón OPEN, abrir la tapadera para sacar los tubos.  
Apague y desconecte el equipo. <sup>(9)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Uso del equipo mini bead beater</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

1. Conectar el cable a la conexión eléctrica de 110 voltios.
2. Encender el equipo del interruptor localizado en la parte trasera
3. Ajustar el tiempo con los controles del equipo (1 min, 3 seg)

4. Abrir la tapadera y colocar el tubos con taparrosca de forma horizontal de forma adecuada para evitar que se desprendan al momento de agitar
5. Cerrar dicha compuerta, accionar el botón STAR para dar inicio.
6. Observar detenidamente el funcionamiento, si no existe ningún problema continúe, de lo contrario detenga el equipo.
7. Retire la muestra, dejar reposar el equipo 5 minutos luego de agitar 3 tubos
8. Apague y desconecte el equipo. <sup>(3)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Uso del Termociclador</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

1. Prepare las muestras en los tubos desechables MicroAmp® PCR.
2. Coloque los tubos en los espacios del aparato utilizando una plantilla de plástico especial para protección, cierre la tapa.
3. Seleccione un método.
4. Use las teclas de función variable (teclas F), las flechas y el teclado numérico ubicado debajo de la pantalla para ejecutar los comandos y funciones, para desplazarse y para introducir los datos.
5. Para ejecutar las funciones que se muestran a lo largo de la parte inferior de la pantalla, presione la tecla F correspondiente ubicada debajo de la pantalla.
6. En el menú principal (Main), presione **Run**. Elija un método. Presione **Start** (Iniciar). En la pantalla Stored Methods, presione **Start** para iniciar la reacción

**Notas:**

-Para detener una reacción en cualquier momento, presione la tecla Stop (Detener) en el teclado. La reacción se detiene por un tiempo y luego se cancela el proceso. La reacción

puede reanudarse durante este período de pausa presionando **Resume**. En el menú Main, presione **Edit** (para modificar).

-**Para cambiar los parámetros** de un método determinado seleccione un segmento de tiempo o temperatura. Presione **More** (Más) para acceder a la función de inserción. Presione **Insert** (Insertar). Presione **Hold** (Espera) para insertar un nuevo segmento o presione **Cycle** para insertar un ciclo.

-**Para insertar un nuevo método:** desde la pantalla pulse **Create** estando en la etapa PCR del método, presione **Store** (Almacenar). Para aceptar el nombre predeterminado, presione **Accept** (Aceptar). Presione **Method** (Método) para indicar el nombre deseado para el método. Presione **Accept** para almacenar el método con el nombre específico.<sup>(10)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
Esterilización por presión de vapor		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

#### Procedimiento:

1. Asegurarse que la válvula de drenaje este cerrada.
2. Verificar que este colocada la placa inferior al interior de la cámara del autoclave.
3. Verificar que el nivel del agua dentro de la cámara sea la recomendada.
4. Corroborar que el recipiente lateral este colocado y contenga 1.5 litros de agua.
5. Colocar el material a esterilizar dentro de canastas de metal.
6. Cerrar correctamente el autoclave.
7. Encender el equipo presionando el interruptor.
8. Presione la tecla **menú** y seleccionar **sterilize**. Si desea esterilizado y secado escoja la opción **esterilize&dry**
9. Fijar la temperatura de esterilización y el tiempo deseado (generalmente 121°C, 15lb de presión por 15 minutos para material limpio y para sucio 20 minutos)
10. Presione la tecla **enter** para iniciar el proceso de esterilizado, hasta que alcanza la temperatura deseada se comienza el proceso de conteo del tiempo.

11. Al terminar de esterilizar aparecerá en la pantalla **end**, presione la tecla **enter** y a continuación abra la cámara del autoclave y sacar el material ya estéril cuando el aparato muestre que la presión de vapor haya llegado a cero.<sup>(11)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Uso de cabina de bioseguridad</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

1. Contar con el equipo de protección adecuado.
2. Limpiar la mesa y las paredes de la cabina con una gaza impregnada con una solución de cloro al 10%, y luego con alcohol etílico al 70%.
3. Luego introducir el material a necesitar, asegurándose se encuentre limpio al momento de colocarlo en la cabina.
4. Encender la lámpara de luz U.V. y dejar por 15-30 minutos.
5. Apagar la luz U.V. y encender la luz normal.
6. Asegurarse de tener todo el material a necesitar cerca o dentro de la cabina de trabajo.
7. Colocar un recipiente con bolsa de bioseguridad para descarte y esterilización del material descartable.
8. Al terminar de trabajar dentro de la cabina retirar el material utilizado y continuar con el procedimiento de limpieza mencionado en el paso número dos.<sup>(11)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
<b>Lavado de material reusable</b>		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

**Material utilizado en el área de PCR (área negra)**

1. Sumergir el material en una solución de cloro al 10% por 24 horas.
2. Sacar el material y lavar con agua corriente.
3. Luego enjuagar con agua dulce y luego con agua destilada.
4. Dejar secar a temperatura ambiente o en horno.<sup>(11)</sup>

Procedimiento Operativo Estándar		
Descarte de material conteniendo sustancias Infecciosas		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Procedimiento:**

1. Colocar el material infeccioso en un recipiente impermeable (bolsas de seguridad biológica).
2. Las agujas deberán ser colocadas en recipientes impermeables e imperforables antes de su esterilización.
3. Colocar el material en el recipiente de descarte de material infeccioso.
4. Colocar el material a descartar en el autoclave por 20 minutos a 121 °C y 15 libras de presión.
5. Luego de esterilizar colocar el material en el recipiente para la basura normal.

Procedimiento Operativo Estándar		
Tratamiento de derrames en el laboratorio		
Elaborado por: Erika Pérez Alemán	Revisado por: Dra. Carmen Galo	Aprobado por: Dra. Carmen Galo
Fecha: Abril /2016	Fecha: Julio/ 2016	Fecha: Julio/ 2016

**Se debe de contar con un kit especial para la acción en caso de derrames que contenga:**

Equipo de protección personal (guantes, mascarilla, etc.), bolsas plásticas para desechos de sustancias bio-infecciosas, paños o papel absorbente, solución de hipoclorito de sodio al 1% como agente desinfectante, soluciones de HCl 0.1N y NaHCO<sub>3</sub> al 3% como agentes neutralizantes comunes (en caso de derrame de bases o ácidos respectivamente), recogedores y pinzas.

**Acciones a tomar en caso de derrame de material bio-infeccioso:**

1. Cubrir el derrame con un paño o papel absorbente.
2. Verter hipoclorito de sodio 1% sobre este material absorbente y dejar actuar durante 20-30 minutos.
3. Retirar el paño o papel absorbente y descartar en el recipiente de material bio-infeccioso.
4. En caso de existir fragmentos de vidrio estos se manipularan con recogedor y/o pinza y se depositarán en el contenedor de punzocortantes.
5. El material infeccioso obtenido del derrame se tratará en autoclave o se sumergirá en solución de hipoclorito de sodio 1% para su desinfección.

**Acciones a tomar en caso de derrame de sustancias químicas:**

1. Colocar sobre el derrame el material absorbente adecuado considerando la naturaleza de la sustancia química implicada.
2. Neutralizar la sustancia química de acuerdo a lo especificado en la MSDS.
3. Lavar la superficie afectada con agua y jabón. <sup>(11)</sup>

**Nota:**

Se deberán tener al alcance las MSDS de los agentes infecciosos con los que se trabaja y las MSDS de las sustancias químicas que se utilizan en el laboratorio a fin de conocer la forma adecuada de actuar ante un derrame.

## Referencias del POE

1. Sigma M. Sabouraud Dextrose Agar + LT - ICR. Canadá.
2. (OMS) OMdIS. 2013. Guia sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas.
3. OPS Diagnostics L. 2014. Bead Beating: A Primer
4. Vijayakumar R, Giri S, Kindo AJ. 2012. Molecular species identification of Candida from blood samples of intensive care unit patients by polymerase chain reaction - restricted fragment length polymorphism. Journal of laboratory physicians 4:1-4.
5. Scientific TF. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer USA.
6. Laboratories. B-R. 2006. Quantity One User Guide.
7. Douches GG-qSAD. 2001. AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS.
8. GmbH KS. 2007. Manual de instrucciones Balanza analítica
9. University N. 2007. Centrifuges, user manual.
10. ESCO. 2008. PCR Thermal Cycler, user manual.
11. SALUD OMDL. 2017. MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.