

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



Filamentación y actividad proteolítica como pruebas rápidas para la identificación del género *Candida spp.* de infecciones nosocomiales.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

SUSANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR

M. en E. Q. MACARIO MORALES RODRÍGUEZ



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO 2014



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3er. Oficio E.P./553/2014
11 de julio de 2014

P. QFB. SUSANA MARTÍNEZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM
P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad TESIS, estará formado por:

M. en S.P. SERGIO HUMBERTO PAVÓN RÓMERO
PRESIDENTE

M. en E. Q. MACARIO MORALES RÓDRIGUEZ
VOCAL

Q. en A. LAURA ALEJANDRA SÁNCHEZ PAZ
SECRETARIO

QFB. GUADALUPE LASTENIA DÍAZ FLORES
SUPLENTE

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ
DIRECTORA



U. A. E. M.
FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCION



C.c.p. Archivo

www.uaemex.mx

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”

Albert Einstein

Dedicatorias

A mis padres

Con todo mi cariño y mi amor para ustedes que han hecho todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme siempre, por apoyarme de todas las maneras posibles.

A mis hermanos

para ustedes hermanos que yo sé que siempre voy a contar con su apoyo incondicional en las buenas y en las malas.

*“Il faut faire de la vie un rêve et faire d’un rêve une réalité”
(Hay que hacer de la vida un sueño y de un sueño una realidad)*

Pierre Curie

Agradecimientos

*Primeramente a Dios
que me dio fuerza y fe para creer lo que me parecía imposible terminar.*

*“Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender”
Marie Curie*

Les doy gracias a mis padres Toña y Nico por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación, pero sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. Los Amo.

A mis hermanos Chucho y Beto por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar, por llenar mi vida de alegrías y amor a pesar de los momentos no tan gratos los amo.

A mis abuelos, Julia y Enrique, Ignacia y Damaso, por todo su amor y por darme a los mejores papás del mundo.

A la familia Nava Martinez, mis tios Goyita y Pepe y sus hijas Esthelita, Lilia, Alis, Oly y Tere, por ser como una segunda familia para mí y apoyarme siempre, sobre todo en la realización de este sueño recién cumplido.

A mi tío Pbro. Ramón Martínez Ángeles por su gran apoyo durante toda mi vida, no solo para mí sino para toda mi familia.

A toda mi familia, tíos, tías, primos y primas que me han apoyado a lo largo de mi vida.

“El amigo ha de ser como la sangre, que acude luego a la herida sin esperar que la llamen”

Anónimo

Gracias a mi amigos Brisa, Jocelyn, Esthelita, Mario Iván, Anali, y Omar, que a pesar de la distancia siempre han estado conmigo apoyándome, dándome ánimos, a ustedes por ser más que mis amigos, los quiero y los llevare siempre en mi corazón, gracias por su amistad.

Quiero agradecer también a quienes no solo son mis amigos sino también mis colegas, Lupita (Meche), Aline, Lilian, Lupita DM, José Faus, Paco, Esteban, Ate, Naye, Johnny, Omar (Judas), Donovan, Liz Garcia, con quienes compartí los últimos años de mi vida, gracias por todo su apoyo y gracias por todos los momentos buenos y los no tan buenos que pasamos en la Facultad de Química, los recordare por siempre.

Al L.A.E. Martin Quintero por todo su apoyo.

“Sólo hay un bien: el conocimiento, sólo hay un mal: la ignorancia”

Sócrates

Un agradecimiento especial para el M. en E. Q. Macario Morales Rodríguez, que como director de esta tesis, me ha orientado, apoyado y corregido en mi labor científica.

ÍNDICE

Índice de imágenes	2
Resumen	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	
1.1 Infecciones nosocomiales	6
1.2 Epidemiología de las infecciones nosocomiales	8
1.3 Candidosis	11
1.4 Epidemiología de las candidosis	13
1.5 Vía de infección	14
1.6 Patogenia	16
1.7 Factores de virulencia	22
1.8 Identificación de levaduras	25
1.9 Identificación tradicional de <i>Candida</i> spp	31
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	40
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	46
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	58
CAPÍTULO VII. SUGERENCIAS	60
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO	67

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imágenes que aparecen en el Capítulo IV Resultados.

Imagen 1 y 2: Aislamiento en placa, preparación de tubos de trabajo	46
Imagen 3: Tubo germinativo positivo	47
Imagen 4 y 5: Auxonograma en placa	48
Imagen 6: Microzimograma	48
Imagen 7 y 8: Agar cromogénico	49
Imagen 9: Actividad proteolítica de diferentes especies de <i>Candida</i> spp	50

RESUMEN

Entre las infecciones nosocomiales comunes se encuentra la candidosis, una micosis infecciosa no contagiosa producida por especies de levaduras pertenecientes al género *Candida* spp. El agente etiológico más importante es *Candida albicans*, comensal de las mucosas del ser humano, que produce infección generalmente limitada en la piel, las uñas, las mucosas y el tracto gastrointestinal, o bien, infecciones sistémicas que comprometen estructuras profundas y órganos internos, manifestándose como la micosis oportunista más frecuente.

El presente trabajo se enfocó a relacionar dos conceptos que hoy en día son de gran importancia; las infecciones nosocomiales y las candidosis. Es muy común encontrar pacientes que ingresan al hospital por una afección y han tenido que aumentar su estancia por complicaciones de este tipo, que son infecciones causadas por patógenos oportunistas que aprovechan el deficiente estado de respuesta inmunológica del paciente para causar una alteración, modificando las condiciones homeostáticas en las zonas colonizadas. Es por ello que con esta investigación se pretende realizar una aportación a los métodos tradicionales para un diagnóstico oportuno.

La actividad proteolítica está muy ligada a los factores de virulencia, los cuales varían de una especie a otra, siendo este un dato importante en el presente trabajo puesto que en la actualidad es muy común encontrar especies que tienen cierta semejanza en algunos aspectos, por ejemplo *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* en múltiples ocasiones son utilizadas como sinónimos. El ensayo de actividad proteolítica permite diferenciar entre las dos especies como se muestra en los resultados observándose mayor actividad en la segunda especie y mostrando la utilidad de este ensayo para apoyar un diagnóstico temprano realizado mediante pruebas rápidas como son Tubo Germinativo y Agar Cromogénico, lo cual nos permitirá una mejor identificación y, por consecuencia, un tratamiento oportuno para el paciente.

Material y Métodos: Se caracterizaron 50 cepas de levaduras provenientes de pacientes con infección nosocomial, para la identificación rápida de *Candida albicans*; se

determinó la prueba de Filamentación (Tubo Germinativo), Auxonograma y Microzimograma (variante de Zimograma tradicional) y, finalmente, la actividad proteolítica siguiendo el ensayo de Aoki, quien propone un medio sintético compuesto por sales minerales, extracto de levadura, glucosa, albúmina sérica bovina y agar – agar.

Resultados: El 30% de las cepas fueron positivas a la prueba de filamentación y alternando con las pruebas tradicionales se determinó que el 20% corresponde al género *C. albicans*, 16% al *C. tropicalis*, 12% al *C. pseudotropicalis*, 10% corresponden a *C. stellatoidea*, 10% a *C. glabrata*, 10% a *C. parapsilosis*, 8% a *C. kruzei*, 4% a *C. guilliermondi*, 4% a *C. dubliniensis*, 4% a *C. lipolitica*, y 2% a *C. famata*.

Se encontraron variaciones en los valores de actividad proteolítica, podrían deberse a que, con el paso del tiempo, los microorganismos van modificando la secuencia del material genético mediante mutaciones creando resistencia a ciertos antifúngicos.

Conclusiones: Las especies de *Candida* se pueden identificar de acuerdo con su capacidad de filamentación; sin embargo para confirmar estos datos en la clínica, las pruebas tradicionales siguen siendo importantes aun cuando son más tardadas. Mientras que, con la actividad proteolítica, se ocupa menos tiempo, lo cual resultaría un método alternativo para la pronta identificación del agente causal de infección nosocomial, permitiendo con ello la elección de mejores terapias antimicrobianas.

Se recomienda realizar un estudio con Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para identificar las proteasas como parte confirmativa de los resultados, además de identificar genes de resistencia a los antifúngicos disponibles para tratar estos problemas.

CAPÍTULO I.

MARCO

TEÓRICO

1.1 INFECCIONES NOSOCOMIALES

El término nosocomial se deriva de la palabra griega *nosokomein* que significa nosocomio; *nosos*, enfermedad; y *komein*, cuidar; es decir, donde se cuidan enfermos. La enfermedad nosocomial se define como un padecimiento que no muestra evidencias de su presencia ni de estar siendo incubada en el momento del ingreso a un hospital; sino que se adquiere, como consecuencia, de la permanencia en el área de servicio de atención a la salud en un hospital¹. Estas infecciones nosocomiales son resultado de varios factores, los cuales pueden o no estar presentes en las instituciones de salud tales como:

- I. Los microorganismos presentes en el ambiente hospitalario
- II. El estado comprometido del huésped
- III. La cadena de transmisión en el hospital¹

Por tanto, la Infección Nosocomial (IN), en su definición tradicional, es aquella que aparece durante el ingreso hospitalario, pero en la actualidad esta definición se ha modificado para relacionar a los cuidados sanitarios en un sentido amplio, pues se ha observado que, a veces, las interacciones del paciente con el personal del hospital pueden dar pauta a la aparición de este tipo de infecciones; lo cual, en ciertas ocasiones, es el motivo de ingreso en las unidades de cuidados intensivos (UCI) y otras como consecuencia de la estancia en éstas áreas^{26,31}.

Como lo establece el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNISS), la infección es considerada como adquirida en la comunidad si los signos, síntomas y los cultivos son positivos en las primeras 48 h a la admisión; la infección es nosocomial si los signos, síntomas y cultivos son positivos después de las 48-72 h de la admisión; cuando el período de incubación se desconoce y se desarrolla en cualquier momento después de la admisión, se considera infección nosocomial, de igual manera, si padece infección en la admisión y si está relacionada o es residual de una admisión previa, también se toma como infección nosocomial³¹.

Cabe destacar que aunque se realicen todos los esfuerzos posibles por eliminar o controlar la proliferación de microorganismos en el hospital, muchos de estos forman parte de la microflora normal del cuerpo humano, que además son oportunistas lo cual representa un alto riesgo para aquellos individuos que se encuentran hospitalizados, de

hecho muchos de estos microorganismos no causan enfermedad en personas sanas sino que son patógenos para los inmunocomprometidos, cuyas defensas han sido debilitadas por una enfermedad concomitante. Además de que estos patógenos son oportunistas, se debe considerar otro punto muy importante; algunos de estos microorganismos se tornan resistentes a los agentes antimicrobianos de uso común en el hospital, un ejemplo de ello es el control de algunas bacterias Gram negativas mediante antibióticos que suele ser difícil debido a sus factores R portadores de genes determinantes para la resistencia a los antibióticos, considerando que estos factores R se recombinan. Es muy común encontrar que los pacientes y el personal del hospital se vuelven progresivamente más resistentes a la terapéutica con antibióticos, cuando son colonizados por estos oportunistas¹.

La mayoría de las enfermedades nosocomiales se deben a microorganismos oportunistas, los cuales requieren de un huésped comprometido, motivo por el cual, se define como huésped comprometido a aquella persona cuya resistencia a la infección está deteriorada a causa de una enfermedad, una terapéutica o que hayan sufrido quemaduras. Existen dos condiciones principales que pueden comprometer al huésped, cuando se altera la barrera de protección: la ruptura de la piel o las mucosas y la supresión del sistema inmunitario¹.

Usualmente en un hospital se cuenta con huéspedes comprometidos y al motivo por el cual ingresaron a la institución, se suman una gran cantidad de factores y procedimientos médicos que pueden implicar al huésped, por ejemplo, la cateterización, inyecciones, cirugías e incluso la colocación de sondas urinarias, comprometiendo al paciente, debido a que la piel es una barrera física y protectora y al romperla queda expuesta la entrada a microorganismos, asociado a esto tenemos el uso cada vez más frecuente de antineoplásicos e inmunosupresores potentes para el tratamiento del cáncer, receptores de transplantes, enfermedades autoinmunes o debilitantes como el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) e incluso la desnutrición^{29,30}.

En México se ha tomado especial atención en las infecciones nosocomiales, es así que de acuerdo a la norma mexicana, NOM-045-SSA2-2005 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales, se consideran también como nosocomiales a las infecciones adquiridas por los neonatos que se infectan por su paso a través del canal de parto, a las que se desarrollan en los 30 días

subsecuentes a una intervención quirúrgica o que ocurren en el año subsecuente a la realización de una cirugía en la que se colocó un implante². Sin embargo para verificar el cumplimiento de las medidas preventivas en materia de infecciones nosocomiales descritas en esta norma, recientemente en el año 2012 la Secretaría de Salud, a través de Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, en conjunto con la Dirección General de Epidemiología, crearon el *Proyecto de Norma PROY-NOM-017-SSA2-2012*, de este se derivó el manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica (RHoVE), en el cual se menciona que es indispensable establecer y operar sistemas integrales de vigilancia epidemiológica que permitan prevenir y controlar las infecciones de este tipo, entendiendo que su ocurrencia debe ser controlada como se describe, pero no es esperable lograr una tasa de cero.

Las tasas deberán ser evaluadas en su tendencia temporal y si hay o no cifras de referencia (buenas o malas), además dichos programas deben evaluarse por sus actividades de vigilancia y control y no solo por resultados aislados²³. De acuerdo con lo publicado en el manual se considera que el sistema de información epidemiológica de las infecciones nosocomiales comprende los siguientes casos:

- a. Notificación inmediata de brotes por IN.
- b. Notificación inmediata de defunciones con IN en las áreas de atención neonatal.
- c. Notificación mensual de casos y defunciones por IN.
- d. Estudios epidemiológicos de brote.
- e. Estudios epidemiológicos de padecimientos y situaciones especiales¹⁰.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES NOSOCOMIALES

Las infecciones nosocomiales, desde hace mucho tiempo, han sido la complicación hospitalaria más importante, no solo en nuestro país, sino también en el extranjero; por ejemplo en México se cuenta con una infraestructura de 3 500 hospitales, 62 000 camas y 7 millones de admisiones por año, aproximadamente, por lo que los estudios de vigilancia epidemiológica de infecciones nosocomiales demuestran tasas de 5 a 19% en salas de hospitalizados, y más altas aun en unidades de cuidados intensivos^{17, 30}.

Una de las consecuencias de las IN es aumentar los días de hospitalización, elevándose el uso de recursos diagnósticos y terapéuticos, los costos de atención y condicionan altas tasas de morbilidad y mortalidad. Ciertas infecciones causan hasta el 20 % de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medianos, y 9 % en los países de ingresos altos, reflejándose en la calidad de vida de los pacientes, porque afecta la economía familiar y ocasiona inseguridad en los usuarios de las instituciones de salud³¹.

Aunque las infecciones han abandonado los primeros puestos de mortalidad que ostentaban en el pasado, continúan siendo una importante causa en el mundo, sin embargo a causa de diversos factores como son la sobrepoblación, los viajes frecuentes, la producción y distribución de alimentos y otros bienes, han traído como consecuencia una rápida diseminación de las enfermedades¹.

En las décadas de 1940 y 1950, la mayor parte de las infecciones nosocomiales eran causadas por microorganismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*. En la década de 1970 fueron los bacilos Gram negativos como *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa*; después en la década de 1980, surgieron como patógenas las bacterias Gram positivas resistentes a los antibióticos como los *Enterococcus*; en los 90's estas bacterias Gram positivas fueron la causa del 34% de las infecciones nosocomiales.¹⁸

Durante el siglo XX la mortalidad por enfermedad infecciosa disminuyó de forma drástica con el consiguiente incremento en la expectativa de vida. Estos cambios se debieron principalmente a la aparición de los antibióticos y a avances en técnicas diagnósticas y terapéuticas médico-quirúrgicas. Actualmente, son la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardiovasculares²⁶.

En México, se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8%. En las unidades de cuidados intensivos la situación es más preocupante, un estudio realizado en 895 pacientes de 254 UCI en México encontró que 23.2% de éstos tenía una infección nosocomial. La neumonía fue la infección más común (39.7%), seguida de la infección urinaria (20.5%), la de herida quirúrgica (13.3%) y la del torrente sanguíneo (7.3%). La letalidad asociada a estas IN fue de 25.5%.

En las unidades neonatales y servicios pediátricos los riesgos de bacteriemia son significativos pues a los factores de riesgo conocidos se agregan la saturación de los servicios, el uso de mezclas de soluciones parenterales y el abuso en la cateterización umbilical. Por desgracia, la manipulación de soluciones puede causar un nivel endémico de contaminación, incluso en adultos; situación difícil de detectar pues no se piensa en ella y las soluciones contaminadas son tan cristalinas como las estériles. Esta contaminación de soluciones se ha correlacionado con agua contaminada en los hospitales, como consecuencia de la falta de vigilancia y de adherencia a estándares de calidad^{19, 20}.

De acuerdo con un estudio realizado por el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran en conjunto con la Secretaria de Salud, en el 2011, se reporta que hasta esa fecha la prevalencia puntual de infecciones nosocomiales (21%) se encuentra prácticamente al doble de los estándares internacionales, aunque la tasa porcentual de bacteriemias es baja (1.4%)¹⁹.

Como se ha mencionado anteriormente, las infecciones nosocomiales representan un elevado costo, en algunos casos para la sociedad pues en México hay muchas personas que no tienen seguridad social. Los sistemas de salud se financian con recursos públicos, privados y aquellos provenientes del exterior, como las donaciones. Los recursos públicos en México proceden principalmente de los impuestos y otros ingresos gubernamentales no tributarios. El gasto privado, por su parte, lo financian las familias con recursos propios, las organizaciones no gubernamentales (ONG) y las empresas privadas¹¹.

De acuerdo con un artículo publicado en 2012 en la revista digital de la UNAM las tasas de IN en países desarrollados son relativamente bajas, afectando de 5 al 10% de los pacientes hospitalizados. Sin embargo, tomando en cuenta que cada año son hospitalizados 35 millones de pacientes tan solo en Estados Unidos, el número estimado de pacientes que adquieren una infección hospitalaria sería de 1.75 a 3.5 millones. Además cada caso se relaciona con un incremento de 4.3 a 15.6 días de estancia intrahospitalaria, así como un aumento en el costo del tratamiento que va de los 1,909 a 38,656 USD según datos reportados por Chen y colaboradores¹¹. Lo anterior significaría cerca de 8 millones de días cama utilizados en IN y un costo de cuatro millones de dólares, mientras tanto en México se ha reportado que el costo promedio por episodio de

infecciones nosocomiales es de US\$8,990. Otros estudios en México han estimado que el costo promedio de atención de un caso de IN es de aproximadamente US\$4,200. En 2009, a través de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, se registraron 37,258 casos de IN; esto implicaría que se gastaron alrededor de 160 millones de dólares en ese año, por tanto, esta cifra representa casi un 2% del presupuesto total asignado a la Secretaría de Salud para el año 2012 y un 96% del rubro asignado para gastos de operación en unidades médicas.¹¹.

Sin embargo, todos los costos se podrían ahorrar puesto que aproximadamente la tercera parte de los casos de infecciones nosocomiales pueden prevenirse con la introducción de la higienización de manos y otra gran proporción con el cuidado adecuado de los dispositivos invasivos¹¹.

1.3 CANDIDOSIS

La candidosis es una micosis infecciosa no contagiosa producida por especies de levaduras pertenecientes al género *Candida*.

Clasificación taxonómica del género *Candida*, de Roberto Arenas Guzmán:

Teniendo en cuenta la reproducción sexuada de las levaduras se las incluye en las subdivisiones Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (cuando no se conoce la reproducción sexuada).

Dominio: Eucarya

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococaceae

Género: *Candida*

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

A algunas de estas especies se les conoce su teleomorfo (forma sexuada):

Candida famata: *Debaryomyces hansenii*;

Candida krusei: *Issatchenkia orientalis*;

Candida lusitanae: *Clavispora lusitanae*¹².

El agente etiológico más importante es *Candida albicans*, comensal de las mucosas del ser humano, que produce infección generalmente limitada a la piel, las uñas, las mucosas y el aparato gastrointestinal, pero puede ser sistémica y comprometer estructuras profundas y órganos internos, es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos, causada por levaduras del género *Candida spp*. La candidosis está determinada por la presencia de factores de oportunismo que predisponen a un individuo, por ejemplo: la diabetes, el SIDA, los carcinomas, a leucemia, la prematuridad, la administración de antimetabolitos, la antibioticoterapia, los anticonceptivos, la drogadicción y diversas inmunopatías como leucopenias o neutropenias².

El género *Candida* es muy heterogéneo, contiene aproximadamente 200 especies, están ampliamente distribuidas en la naturaleza pues se han encontrado en plantas, forman parte de la flora gastrointestinal de mamíferos y también de la flora normal de mucosas y piel en los humanos, es un microorganismo muy pequeño (4-6µm), ovalada, se reproduce por fisión binaria o gemación, de las cuales alrededor de 30 son levaduras de interés médico, han sido y siguen siendo relevantes aquellas que forman parte de la flora normal de nuestro organismo⁹, entre las especies con significado médico están: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, y *Candida dublinensis*³.

El género *Candida* puede crecer fácilmente en hemocultivo o en placas de agar donde la mayoría de las veces no requieren de condiciones especiales para su crecimiento. En un medio de cultivo de especies de *Candida* se pueden observar colonias suaves, cremosas, blancas y brillantes.

1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS CANDIDOSIS

Las levaduras del género *Candida* existen en la naturaleza, en el suelo y en agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples. Además, son habitantes habituales del aparato digestivo, respiratorio y regiones mucocutáneas del hombre y animales domésticos. El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de *C. albicans*. En el adulto, dos factores regulan el número de levaduras en el intestino:

- 1- Otros miembros de la flora intestinal que ejercen un control sobre la densidad de población de las levaduras (principalmente lactobacilos y bacterias anaerobias) a través de factores antimicrobianos, inhibidores de la adherencia, potenciales de óxido-reducción y competencia por los nutrientes disponibles
- 2- La dieta, ya que la ingestión excesiva de frutas frescas, dulces u otros materiales fermentables darán lugar a un aumento considerable en el número de levaduras intestinales, particularmente de *C. albicans*¹².

La candidosis es una enfermedad cosmopolita, su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. Las levaduras son causantes del 7,45% de las micosis, el 25% de las micosis superficiales y entre el 75 y 88% de las infecciones fúngicas nosocomiales, afectando a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico¹².

En las últimas décadas, las infecciones fúngicas son consideradas un suceso creciente y de preocupación a nivel mundial, *Candida* spp está en el cuarto lugar entre los microorganismos aislados de hemocultivos en Estado Unidos y el quinto en España como agente etiológico de sepsis. *C. albicans* causa entre 50-60% de las candidemias seguida de *C. parapsilosis* (10-20%) y *C. tropicalis* (6-7%). En Argentina, las fungemias causadas por levaduras fueron predominantes entre las infecciones sistémicas oportunistas y las formas invasoras presentan elevada mortalidad constituyendo un grave problema de salud pública^{22, 30}. En México, se ha reportado que el 13% de infecciones nosocomiales son debidas a *Candida*²² y en otro estudio mexicano se aisló *Candida* en 1.3% de 2,607 solicitudes de cultivo en pacientes pediátricos. En esta serie de casos la mortalidad fue de 32.2%²³, mientras que un estudio español registró una

mortalidad de 42% en pacientes con candidosis diseminada con diabetes y neoplasias como factores de riesgo asociados²⁴. En la población en general aproximadamente el 70% de las mujeres experimentan infección vaginal causada por *Candida spp* y 20% de ellas sufren de infección recurrente. *C. albicans* es la especie más comúnmente encontrada en los casos de candidosis^{25,26}.

Las micosis profundas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Las especies del género *Candida* son las de mayor incidencia, siendo *Candida albicans* comúnmente la más aislada; no obstante han surgido otras especies con marcada importancia, aunque las razones de esta emergencia no están del todo definidas, se ha sugerido que un factor importante podría ser la carencia relativa de sensibilidad al fluconazol y otros azoles administrados corrientemente para el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Se ha observado que *C. tropicalis*, *C. kruzei* y *C. glabrata* pueden ser de 4 a 32 veces menos sensibles a fluconazol que *Candida albicans*, por tal motivo, la identificación de los aislamientos fúngicos hasta el nivel de especie en un laboratorio clínico requiere el empleo de procedimientos rápidos y precisos, porque esta información es muy importante para orientar el tratamiento antifúngico hasta que se disponga de los resultados de sensibilidad *in vitro*²⁹.

1.5 VÍA DE INFECCIÓN.

Anteriormente se mencionó que en la infección por *Candida* influyen factores individuales, influencias ambientales y la virulencia del microorganismo ya que las formas mucocutáneas están a menudo relacionadas con defectos en la inmunidad celular y las formas sistémicas, en general, se asocian con neutropenia¹³. De acuerdo a que en algunos órganos los microorganismos del género *Candida spp.* son parte de la flora normal, por eso la mayor parte de las infecciones son de origen endógeno a partir de los reservorios mucocutáneos o cutáneos (introducidos a partir de catéteres u otros dispositivos de uso médico, que interrumpen la barrera cutánea), aunque también pueden ser exógenas, por ejemplo en los hospitales, donde las levaduras pueden ser transmitidas a lactantes a partir de mamaderas mal esterilizadas o a pacientes

transplantados o inmunosuprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal descontaminados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en unidades de cuidados intensivos, sin la debida protección¹². La mayoría de especies de *Candida*, cuando invaden los tejidos forman pseudohifas, que son cadenas de blastoconidias, e hifas verdaderas que se diferencian de las anteriores por la ausencia o escasa constricción en los septos y porque los septos no se producen sólo en las ramificaciones. Una excepción es la *C. glabrata*, que no produce hifas, sino que forma agregados de pequeñas células levaduriformes¹³.

Algunos de los factores que se consideran importantes para la aparición de la infección de candidosis son los siguientes:

- ∞ Adaptación al pH: la mayoría de las especies de *Candida* tiene la capacidad de adaptarse a diferentes medios y sustratos, la capacidad de soportar cambios de pH es el mejor ejemplo. Esta propiedad está determinada por dos genes, PHR1 y PHR2, los cuales se activan o inactivan a ciertas especificaciones, por ejemplo, el primero se activa en pH neutro o ligeramente ácido, y se inactiva a pH ácido, provocando la activación del segundo gen.
- ∞ Adhesinas: permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres; esta serie de sustancias influyen en la adhesión o adaptación de la levadura y han sido encontradas en *C. albicans*, y *C. glabrata*. Las más importantes son las manoproteínas, mananas.
- ∞ Enzimas: Que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador, principalmente proteinasas y fosfolipasas. Se describen con mayor gran detalle como parte de los factores de virulencia del género *Candida*.
- ∞ Enfermedades o procesos que influyen en la respuesta inmune que predisponen la aparición de este tipo de infecciones.

- ∞ Los casos exógenos se inician por el ingreso de grandes cantidades de levaduras al organismo, ejemplo de esta forma de infección es el cateterismo o drogadicción pues la levadura se inyecta directamente en el torrente sanguíneo^{6,7}.

1.6 PATOGENIA

Las infecciones de piel más comunes producidas por *Candida* spp son intertrigo, dermatitis del pañal, balanitis, paroniquia, onicomicosis, afectación perineal y foliculitis. Infecciones superficiales en membranas mucosas incluye vaginitis, estomatitis, glositis, esofagitis y otras del tracto gastrointestinal.

El término de candidiasis mucocutánea crónica comprende un grupo de infecciones por *Candida*, que afecta a piel, mucosas, pelo y uñas, que suele comenzar en el primer año de vida, de evolución prolongada y persistente a pesar del tratamiento, y que se asocia a anomalías en las células T.

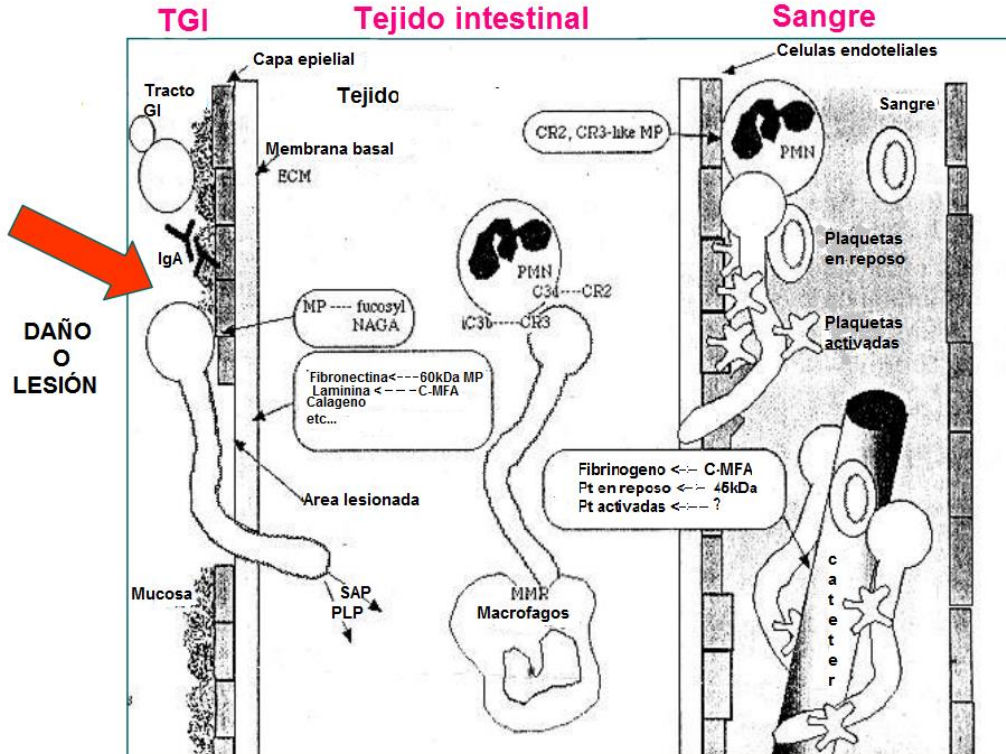
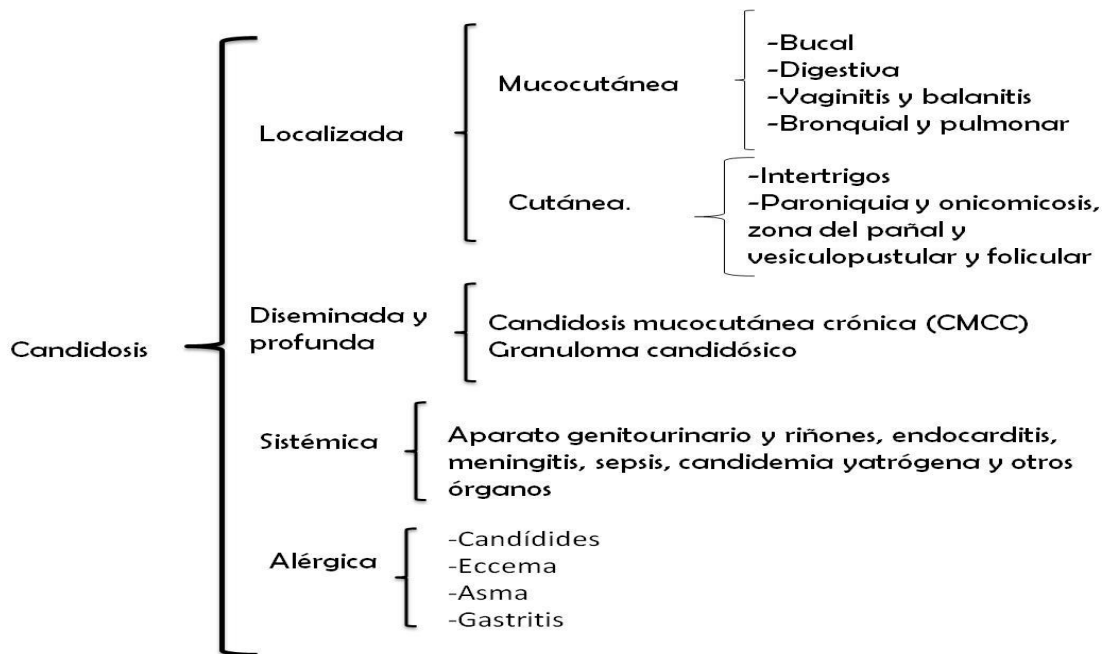


Ilustración 1: Patogénesis de la infección por *Candida* tomada del artículo Candidiasis de la Dra. Biasoli.

La colonización como consecuencia de la administración de antibióticos de amplio espectro o la aparición de un daño o cambio del epitelio intestinal, puede inducir en las levaduras adheridas al mismo, cambios en la expresión del fenotipo y las levaduras pueden emitir un tubo germinativo que invade el epitelio y la membrana basal favorecido por la producción de proteinasas y fosfolipasas; por ejemplo en un paciente inmunocompetente la colonización es limitada por macrófagos y/o polimorfonucleares, por otro lado en pacientes neutropénicos, al fallar la respuesta celular innata la levadura puede invadir el torrente sanguíneo y diseminarse. Otra vía de diseminación podría ser a través del ingreso directo de la levadura al torrente sanguíneo a través de un catéter, que puede estar contaminado o que puede arrastrar las levaduras presentes en la piel del paciente o del personal médico o paramédico que lo manipula¹².

De acuerdo con el libro Micología Médica de Roberto Arenas las Candidosis se clasifican de la siguiente manera:



Mucocutánea

La candidosis oral, muguet o pseudomembranosa se manifiesta generalmente con placas pseudomembranosas de coloración blanco-grisácea, que se desprenden fácilmente con un depresor, dejando una base eritematosa. Es muy común que *Candida*

albicans colonice a la mayoría de los neonatos al final de la segunda semana de vida, y puede ser cultivada de la boca en el 80% de niños menores de un mes, se la conoce también como afta; en los adultos, su aparición es más rara, puede manifestarse en los ancianos por el uso de prótesis, el reposo relativo de la boca y la reducción de la secreción salival, también en pacientes con tratamientos con antibióticos, quimioterapéuticos, el uso de esteroides sistémicos, enfermedades como diabetes mellitus, anemia perniciosa, VIH, entre otros. La Candidosis oral se presenta como unos parches blanquecinos aislados que pueden converger sobre la mucosa bucal, de la lengua, el paladar y las encías, el raspado de los parches deja expuesta una lesión que se puede presentar con la mucosa roja y brillante o forma eritematosa y en los casos más severos la superficie de la mucosa puede ulcerarse^{12, 15}.

La candidosis aguda atrófica comúnmente aparece después de la extracción de la pseudomembrana de muguet, este padecimiento se asocia más al uso de antibióticos de amplio espectro o de glucocorticoides y con la infección con el VIH, se localiza principalmente en la superficie de la lengua, donde se presenta en forma de parches de áreas despapiladas con mínima formación de pseudomembranas, existen dos formas de presentación una asintomática y la otra sintomática la cual se caracteriza por ardor y dolor en la zona afectada.

La otra forma que es muy común en adultos, es la candidosis atrófica crónica, y se debe principalmente al uso de prótesis dentarias, se observa en el 24 al 60% de todos los pacientes que utilizan prótesis y es más frecuente en mujeres. En el examen físico están el eritema y el edema crónico de la mucosa del paladar que entra en contacto con la prótesis y la quelitis angular.

Candidosis vaginal y vulvovaginal: es más frecuente de lo que se podría llegar a pensar, pues aproximadamente tres cuartas partes de las mujeres han sufrido o sufrirán por lo menos un episodio de Candidosis vulvovaginal a lo largo de su vida. Además se sabe que la mayoría de estas infecciones son producidas por *Candida albicans*, seguidas en frecuencia por *C. glabrata*. Sin embargo, aunque se trate de una parte del aparato reproductor femenino, estas infecciones no siempre están relacionadas con las enfermedades de transmisión sexual, en varios casos estas infecciones son predisuestas por diabetes mellitus, el uso de corticoides, la presencia de un dispositivo intrauterino

(DIU), incluso se relaciona mucho con la utilización de prendas ajustadas, dado que los factores antes mencionados favorecen la modificación de la flora normal de la vagina, compuesta normalmente por lactobacilos que son los responsables de la inhibición del crecimiento de *Candida*.

Normalmente las pacientes refieren flujo vaginal espeso asociado con ardor, prurito y en ocasiones disuria, en la exploración se observan placas blanquecinas sobre la pared vaginal con una base eritematosa y edema circundante que puede extenderse hacia labios vaginales y el periné. La vulvovaginitis se vuelve recurrente cuando se presentan 4 o más episodios al año. Otros factores que pueden dar las condiciones para este tipo de infecciones son los cambios hormonales como los que se producen en el embarazo y en la fase lútea del ciclo menstrual, aunque también el uso de enjuagues o duchas vaginales pueden asociarse a candidosis recurrente. Lo anterior podría relacionarse con respuestas alérgicas o hipersensibilidad que hacen que la susceptibilidad aumente. Sin embargo si ninguno de los factores anteriores está presente se debe sospechar del uso de antibióticos, la presencia de algún proceso inmunosupresor o de diabetes. Un dato importante es que se dice que las relaciones sexuales pueden aumentar la incidencia de las vulvovaginitis, debido a las abrasiones que se producen durante el coito y a una probable alergia al semen.

Candidosis de los genitales masculinos: también es conocida como balanitis y balanopostitis, entre los factores que predisponen estas infecciones están la infección vaginal por *Candida* en la pareja sexual, la diabetes mellitus y la ausencia de la circuncisión. La infección se presenta como pápulas pequeñas sobre el glande o sobre el surco balanoprepucial, las cuales al romperse deja erosiones superficiales eritematosas con un collar de escamas blanquecinas, pero la infección puede prolongarse hacia el escroto y la región inguinal; en los pacientes inmunosuprimidos o diabéticos puede producirse una infección más agresiva, pues los pacientes hacen mención de que poco tiempo después del coito sienten ardor en el área y se acompaña de un eritema transitorio.

Candidosis del tracto gastrointestinal: Se puede presentar como su nombre lo dice en todo el tracto gastrointestinal y encontramos los siguientes tipos:

- I. **Esofagitis:** Regularmente es una prolongación de la candidiasis oral, es muy común en pacientes leucémicos o diabéticos descompensados, etc. En la endoscopia se observan placas blanquecinas similares a las orales, la sintomatología común es disfagia, náuseas y vomito, además de que los pacientes refieren dolor y ardor que dificultan la alimentación. Es común que en el 75% de los casos de VIH aproximadamente, ellos lleguen a presentar candidosis oral con esofagitis, por lo cual, a este tipo de pacientes se les recomiendo dar tratamiento sistémico y no tratamiento localizado.
- II. **Gastritis:** es muy raro que se den este tipo de casos, solo se observa en candidosis generalizadas, porque el pH del estómago dificulta que la levadura crezca en esta región.
- III. **Peritonitis:** se da por la abundante colonización de *Candida* en el intestino, se asocia a pacientes con úlceras o cateterismo, o bien por traumatismos quirúrgicos.
- IV. **Candidosis entérica:** es muy difícil de comprobar pues su síntoma principal es diarrea, y normalmente se confunde con cuadros parasitarios, frecuentemente va acompañada de candidosis perianal. Es característico encontrarla en pacientes con VIH-SIDA en estadio C, es muy importante distinguirla de una geotricosis entérica.

Candidosis broncopulmonar: es frecuente en pacientes inmunodeprimidos, no afecta el estado general del paciente pero se presenta con tos constante acompañada de expectoración mucoide o gelatinosa. La infección se da en todo el árbol bronquial y puede ocasionar cuadros de alergia.

Candidosis pulmonar: es menos frecuente que la bronquial sin embargo con un curso más agudo y grave, casi siempre asociada a pacientes con enfermedades o padecimientos que abaten la respuesta inmune. El paciente presenta tos con expectoración mucoide y sanguinolenta, disnea, dolor torácico y fiebre nocturna. A partir de este cuadro clínico es muy fácil la diseminación a torrente sanguíneo y a sistema nervioso central.

CUTÁNEA: Puede atacar cualquier pliegue del cuerpo. No respetan ni edad, ni sexo, aunque en el adulto es más frecuente en la mujer. Una de las causas pre disponentes más frecuentes de esta afección es la diabetes pues modifica el estado bioquímico de la piel, produciendo aumento del glucógeno y de la acidez. Otros factores que favorecen esta afección son el calor, la humedad y la maceración de la piel la cual es muy común en las personas obesas cuyos pliegues tienen mayor superficie de contacto y en estos pacientes aparecen otros pliegues como el suprapúbico que no existen en personas delgadas. En los lactantes, la región perianogenital, que es epidermis frágil y delicada, irritada por las deyecciones o por el uso de los pañales, es una zona muy atacada por las levaduras, sin embargo otras zonas que se ven comúnmente afectadas son las regiones inguinal, axilar, interdigital e inframamaria.

El cuadro clínico se caracteriza por lesiones en la piel, que pasan por diferentes estadios como exantema, máculas eritematosas, pápulas, pústulas y ampollas denudadas, es muy poco común y lleva asociadas complicaciones sistémicas, sobre todo visceromegalias y respiratorias, e incluso la muerte de no ser tratada en su conjunto con antifúngicos. El diagnóstico definitivo se establece por el aislamiento e identificación del hongo, y el pronóstico, con la aplicación del tratamiento correcto y oportuno^{12, 36}.

La Candidosis diseminada constituye una infección multiorgánica que afecta las vías urinarias, los riñones, el endocardio (que se manifiesta por fiebre, soplos, esplenomegalia y tendencia a la formación de émbolos) y meninges, cuyas manifestaciones incluyen cefalea, rigidez de nuca, fiebre intermitente, hemiparesia, vértigo, signos de Kerning y estupor que puede llegar a coma. Puede confundirse con infecciones bacterinas o de otras etiologías.

La Candidemia puede presentarse con síntomas inespecíficos, incluso fiebre, pero la presencia de lesiones cutáneas nodulares y de lesiones blancas en retina “en algodón” es muy sugestiva cuando no se obtiene el cultivo. Las lesiones oculares pueden comprender conjuntivitis, queratitis, blefaritis y canaliculitis que, por lo general, se asocian a traumatismo ocular, herpes o tratamiento con glucocorticoides y antibióticos^{5,4}.

En las infantes se puede provocar la llamada “Candidiasis del pañal” en la cual *C. albicans* afecta al 4-6% de niños con una incidencia mayor en niños de 3-4 meses de

edad localizándose en los pliegues inguinales, suprapúbico e interglúteo, que se extiende a toda la zona del pañal, derivándose de aquí su nombre; en ocasiones se debe al prolongado roce con las heces y la orina. En este tipo de infección es muy característico encontrar pústulas subcórneas satélites y un anillo blanquecino en las pústulas, además la afección de los pliegues es muy sugestiva del papel patogénico de *Candida*. El empleo de pañales superabsorbentes, su cambio frecuente y la aplicación de cremas de barrera, que contienen óxido de zinc, en cada cambio de pañal favorecen la prevención de este proceso.

Se ha reportado que casos de Candidosis congénita cutánea, son infrecuentes y generalmente benignas, se presenta en el nacimiento o durante los primeros días de vida, como consecuencia de la exposición intrauterina a *Candida*. Aunque entre el 20-25% de las embarazadas desarrollan vulvovaginitis candidiásica, solo un pequeño porcentaje de neonatos padecerán una candidiasis congénita, asociada a prematuridad o a la presencia de algún cuerpo extraño por ejemplo DIU¹⁴.

Las presentaciones alérgicas no están bien estudiadas, pueden presentarse como Candidídes, que a veces son lesiones vesiculares estériles en manos, o se manifiestan por urticaria, eccema, asma y gastritis.

1.7 Factores de virulencia del género *Candida* spp.

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

El potencial patogénico de las levaduras varía considerablemente pues éstas no son un componente pasivo del proceso infeccioso, sino que poseen una serie de factores de virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección¹².

De los factores de virulencia de las levaduras del género *Candida*, los que contribuyen en mayor medida a la instalación del cuadro de candidiasis vulvovaginal, tanto aguda como recurrente son el cambio fenotípico, el dimorfismo, la adherencia y la secreción de enzimas líticas dependientes del pH. Entre las hidrolasas, las isoenzimas del grupo de las proteinasas aspárticas secretadas y un grupo heterogéneo de enzimas con actividad fosfolipasa cumplen un papel preponderante en la disrupción de las membranas de las células del epitelio, facilitando la penetración de la fase hifal a las mismas³².

Debido al incremento en la incidencia de las infecciones causadas por levaduras del género *Candida*, hay un gran interés en la investigación de sus factores de virulencia con la finalidad de establecer una relación entre estos factores y la patogenicidad, diseñar estrategias de control y prevención de la candidosis, así como desarrollar nuevos agentes terapéuticos con estos factores como posibles blancos de acción. *Candida albicans* es un patógeno oportunista ampliamente reconocido, pero cada día se está observando el aumento de infecciones causadas por levaduras del género *Candida*, que ahora son catalogadas como patógenos emergentes. Tal es el caso de *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* entre otras, un gran número de estudios ha demostrado que los factores de virulencia intervienen en los procesos de colonización e infección de *C. albicans*. No sucede así con otras levaduras oportunistas, donde estos factores sólo han podido ser detectados en algunas especies, como en *C. tropicalis* y *C. glabrata* por ejemplo³³.

Las células microbianas poseen enzimas hidrolíticas constitutivas e inducibles que ayudan a la invasión de los tejidos del hospedero: particularmente, las fosfolipasas y proteasas juegan un papel importante en el daño causado a las membranas celulares, ya que tienen la capacidad de degradar los lípidos y proteínas que las constituyen, por ejemplo las proteinasas aspárticas juegan un papel importante en la degradación de los componentes de la mucosa (colágeno, queratina, mucina), así como de componentes inmunes (citoquinas, anticuerpos, complemento), facilitando la invasión de los tejidos del hospedero. La producción o no de estas enzimas, consideradas elementos fundamentales e integrales para la patogénesis de las levaduras, puede ser un importante determinante en la capacidad de estos microorganismos de producir infecciones graves en pacientes

inmunocomprometidos^{32, 33}. Por ejemplo, *Candida albicans* tiene atributos de virulencia para colonizar el huésped y ocasiona daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo.

Los factores de virulencia expresados o requeridos por el microorganismo para causar infección pueden variar según el tipo, el sitio y la naturaleza de las defensas del huésped. Otro factor que se asocia con la virulencia en el género *Candida* son las enzimas, pues estas tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo; las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas³⁵.

En *Candida albicans* se han descrito varios miembros de una gran familia de enzimas de secreción aspártico proteinasas (SAP). Esta familia de genes *SAP* de *C. albicans* codifican a las aspartil proteinasas secretadas (Saps) y cuenta con al menos diez tipos que se expresan bajo una variedad de condiciones de crecimiento de laboratorio y durante las infecciones *in vivo* e *in vitro*, la presencia de los genes de la familia SAP en *Candida albicans* proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista.

De los diez tipos de la familia SAP codifican pre y proenzimas de aproximadamente 60 a 200 aminoácidos; ocho de ellos codifican proteinasas que son secretadas al espacio extracelular (Sap1-8), mientras que Sap9 y Sap10 son proteínas de membrana; estas enzimas son activas a pH ácido, siendo evidente las diferencias entre los rangos de pH de óptima actividad para cada isoenzima. Se han obtenido mutantes con varios genes SAP alterados y se ha demostrado que SAP1-3 (son cruciales para la infección superficial) y SAP1-6 son importantes en infección oral, mientras que SAP1 y SAP2 lo son en la candidiasis vaginal, además que SAP 4y 6 son serían importantes en la candidiasis invasiva. El papel de dichas enzimas es esencial en las infecciones de mucosas en las fases iniciales, pero no cuando el hongo se ha infiltrado en los vasos sanguíneos^{35, 12}. Se ha demostrado la presencia de dichas enzimas no solo en *Candida albicans* sino también en *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

En 2008 Ombrella Racca y Ramos, realizaron un estudio en el cual midieron en valor de Pz (Pz=Diametro del halo/Diametro de la colonia) la actividad proteolítica de las diferentes especies del género *Candida spp* usando el ensayo de Aoky et al., reportado en la literatura, con un método en placa, utilizando medio de cultivo conteniendo albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno (0,5 g K₂HPO₄; 0,04 g MgSO₄.7H₂O; NaCl 1 g; 0,2 g extracto de levadura; 4 g glucosa; 0,5 g de albúmina sérica bovina; 4 g agar; agua destilada 200 ml), y de acuerdo a la región anatómica de la cual fue tomada cada muestra, se ajustó para que el pH del medio estuviera entre 4.5 y 5.5, las placas fueron incubadas a 37 °C, durante cinco días, observándose un halo transparente que nos indica que la cepa tiene actividad proteolítica, es muy importante mencionar que las proteinasas secretadas se activan a pH ácido³².

1.8 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS.

El término levadura se refiere básicamente a un grupo de hongos unicelulares, donde las hifas y/o pseudohifas pueden o no estar presentes y tienen una fase sexual perfecta o teleomorfa. Sin embargo, las levaduras a las que no se le ha descrito aun la fase sexual, y solo se le conoce la fase anamorfa, son denominadas como “formas parecidas a levaduras” o “yeastlike”, éstas se reproducen por gemación²⁷.

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril estará plenamente justificada. Sin embargo, debido a que los organismos levaduriformes forman parte de la flora normal de piel y mucosas, el aislamiento de levaduras a partir de hisopos nasofaríngeos, esputo, lavados bronquiales, orina, raspados de uñas, muestra vaginales o heces puede cuestionar su significado clínico. No obstante, el aislamiento reiterado de levaduras en diferentes muestras clínicas del mismo paciente es sugestivo de infección por el microorganismo aislado y requiere la identificación de la especie causal.

Dado el impacto clínico y la frecuencia de presentación de candidosis, especialmente en pacientes gravemente comprometidos, se hace necesario disponer de herramientas diagnósticas que permitan una rápida y adecuada determinación de la candidosis y que faciliten la tipificación etiológica entre las especies de *Candida*. Es de

gran relevancia mencionar que de las diferentes técnicas disponibles en la literatura científica, no se conocen con exactitud cuáles serían las de mejor rendimiento y funcionamiento en nuestro medio, especialmente en pacientes en condiciones críticas³⁴.

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: morfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos.

En cuanto a los criterios morfológicos se refiere a que estos pueden ser macroscópicos o microscópicos.

- ✓ Criterios Macroscópicos: estos criterios tienen en cuenta el aspecto de las colonias de levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivo usados rutinariamente en el laboratorio de Microbiología, por ejemplo agar sangre, agar chocolate, agar Cled, etc, sin embargo, el agar glucosado de Sabouraud (SDA), con o sin antibióticos añadidos es el aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras, puesto que es en este medio en el cual las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisas o rugosas, con olor dulce agradable, volviéndose más pastosas a medida que envejecen²⁸.

Por lo general las colonias de levaduras no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracniformes en la periferia de las colonias, entonces debemos considerar la posibilidad de que se trate de un hongo dimórfico o de ciertas especies de levaduras que pueden formar micelio verdadero como es el caso de *Geotrichum*, *Trichosporon* o *Blastoschizomyces*. Por otra parte, una colonia de aspecto y consistencia mucóide sugiere la formación de cápsulas y puede ser el paso inicial para la identificación de *Cryptococcus neoformans*. De igual forma la aparición de colonias de color rojo-anaranjado o naranja, de aspecto cremoso o rugoso, son características de las especies del género *Rhodotorula*, color que manifiesta esta levadura por su riqueza en carotenoides, sin embargo, no todas las colonias blancas y cremosas son levaduras; las especies de algas aclorofílicas del género *Prototheca*, tras la

incubación a 28 °C durante 3-4 días, desarrollan unas colonias blancas cremosas muy parecidas a las producidas por el género *Candida*²⁸.

✓ Criterios microscópicos: no solo es aspecto de las colonias nos pueden guiar en la identificación de las especies de levaduras, sino que sus características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas en la práctica son las siguientes:

- **PRUEBA DEL TUBO GERMINAL O FILAMENTACIÓN PRECOZ:** es una extensión filamentosas de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans* es capaz de producir verdaderos tubos germinales; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a las tubos germinales pero con una zona de constricción característica adyacente a la célula madre, por lo que esta prueba es útil para diferenciar *C. albicans* del resto de las especies de *Candida*, aunque no está exenta de falsos negativos. La desventaja son los falsos negativos, aproximadamente un 5% de cepas de *C. albicans* son negativas para tubos germinales. Si se utiliza un inóculo demasiado abundante de levaduras, también pueden obtenerse falsos resultados negativos.

La metodología que se sigue es la siguiente:

1. Emulsionar una porción de la colonia aislada en 0.5 ml de suero humano o de conejo.
2. Incubar a 35 °C durante 2 horas.
3. Depositar una gota de la emulsión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubre-objetos y visualizar a x100, x400, x1.000.

Interpretación: la prueba es positiva si se visualizan tubos germinales, además de la técnica con suero, el test de

filamentación pueden realizarse utilizando otros medios de cultivo como Plasma de conejo, Medio de cultivo sólido Oxgell-Tween-acido cafeico (TOC).

- **FORMACION DE HIFAS, BLASTOCONIDIAS, CLAMIDOSPORAS Y ARTROSPORAS:** la formación de éstas por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras. Ante la presencia de estructuras con aspecto de hifas, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de formación de blastoconidias y, por tanto, con puntos regulares de estrechamiento) o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidias. Las clamidosporas son formas de resistencia, redondas u ovales, de 6-12 μm de diámetro y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales; su producción es característica y diagnóstica de *C. albicans*; también puede hacerse una identificación presuntiva de esta especie si se observa la formación de grupos compactos de blastoconidias en intervalos regulares a lo largo de las pseudohifas.

El procedimiento que se sigue es el siguiente:

1. En Agar Harina de maíz: la inoculación se debe realizar, según la técnica de Dalmau, haciendo tres cortes paralelos en el agar (separados 1 cm) manteniendo el asa en un angulo aproximado de 45°, posteriormente colocar un cubre-objeto sobre la superficie de agar cubriendo una parte de las estrías de siembra; incubar las placas a 30 °C durante 24-48 horas y luego examinar al microscopio a través del cubre-objetos a x100, x400 ó x1.000
2. En leche diluida: emulsionar una colonia joven en 3-4 ml del medio, incubar a 28-30 °C durante 24-48 horas, posteriormente observar al microscopio a x100 ó x40 una gota de la emulsión. *C. albicans* desarrolla abundantes pseudomicelios y clamidosporas.

- **TINCIONES:** el estudio microscópico de los organismos levaduriformes se puede llevar a cabo mediante tinciones, ya sea tinción simple o tinción de Gram; con esta tinción, las levaduras suelen comportarse como Gram positivas. Mediante estas tinciones también se puede observar la formación de blastosporas, artosporas, hifas, pseudohifas o endoesporas (autoesporas esféricas de 4-11µm de diámetro incluidas en una teca, que puede visualizarse también vacía) ²⁸.

✓ Crterios Bioquímicos

- Medios Cromogénicos: Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación de algunas especies del género *Candida* tras su incubación a 30-37 °C durante 24-48 horas. El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima; una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente cultivos mixtos. Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales²⁸. La incorporación de este tipo de medios ha sido un gran adelanto en la identificación presuntiva de levaduras a la vez que ha permitido reconocer la presencia simultánea de dos o más especies en un misma muestra clínica, y de esta forma orientar rápidamente la terapéutica antifúngica mas adecuada hasta obtener la tipificación definitiva³⁰.
 - **CHROMagar Candida®:** fue descrito por Odds y Bernaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*. CHROMagar Candida permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio. La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37 °C durante 48 horas para que las levaduras desarrollen completamente el color al cabo

de este tiempo, las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45 °C, *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea. *C. kruzei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco. *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio²⁸.

- Cromogen Albicans®: es un medio diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento e identificación de *C. albicans* en muestras vaginales, rectales, escamas, orina, pus, escobillonados bucales, etc. La siembra se realiza según las técnicas habituales y las placas se incuban a 30-37 °C, según el origen de las muestras, durante 24-48 horas. Las colonias de *C. albicans* adquieren un color azul verdoso característico, dependiendo del periodo de incubación y la temperatura, con formas redondeadas, lisas y ligeramente elevadas. Las otras especies de levaduras aparecen de color blanco cremoso y necesitan una identificación bioquímica posterior²⁸.
- Candida ID®: este medio cromogénico permite el aislamiento de organismos levaduriformes, la identificación presuntiva de *C. albicans* y cierta orientación para la identificación de otras especies no *albicans*. La inoculación e incubación son similares a las descritas para otros medios cromogénicos; en Candida ID, las colonias de *C. albicans* son redondeadas, ligeramente convexas, lisas, de bordes netos y de color azul (cuya intensidad varía en función del tiempo de incubación). Las colonias de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondi* y *C. kefyr* desarrollan un color rosa a las 48 horas de incubación. Otras especies, como *C. famata*, *C. humicola*, y *Cryptococcus neoformans*, pueden originar colonias rosas mas o

menos intensas. El resto de las especies desarrolla un color blanco-crema, requiriendo una identificación bioquímica posterior²⁸

- CandiSelect®: es un medio selectivo que permite la identificación de *C. albicans* mediante la hidrólisis del sustrato cromogénico presente lo que origina el desarrollo de un color azul por las colonias de esta especie. La inoculación e incubación son similares a los otros medios cromogénicos. *C. albicans* se identifica por la presencia de colonias lisas azules y el resto de las levaduras manifiesta un color blanco en sus colonias; a las 48 horas de incubación, algunas cepas de *C. tropicalis* y *Trichosporon* spp. pueden también desarrollar colonias azules, pero morfológicamente son diferentes a *C. albicans*²⁸.
 - Fluoroplate Candida®: permite identificar macroscópicamente *C. albicans* por su capacidad de hidrolizar el sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida, por la enzima N-acetilgalactosaminidasa (NAGasa), originando una fluorescencia blanquecina al iluminar la placa con luz ultravioleta, el resto de las especies no presenta fluorescencia. La siembra en este medio se realiza de forma convencional y las placas se incuban a 30-37 °C durante 18-24 horas; la lectura se realiza, en la oscuridad, colocando las placas sobre un transiluminador de luz ultravioleta de 365 nm²⁸.
- ✓ Identificación Rápida De Levaduras Mediante Pruebas Bioquímicas O Enzimáticas:
- ∞ Rapid Yeast Plus System®: es un sistema compuesto por un panel de 18 pocillos; cada uno contiene un sustrato convencional o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos que permite identificar hasta 43 especies de levaduras.

- Fongiscreen 4H®: es un sistema basado en el estudio del perfil enzimático de algunas levaduras permitiendo identificar en 4 h *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. neoformans*. La utilización de sustratos deshidratados por las enzimas fúngicas se manifiesta por un cambio de color, ya sea espontáneamente o después de añadir un reactivo revelador.
- ✓ Identificación Mediante Criterios Inmunológicos:
- ∞ Bichro-latex albicans®: es un método para la identificación rápida de aislamientos *C. albicans* por aglutinación de partículas látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans*. La prueba se realiza con dos reactivos distintos: a) bolas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno de *C. albicans* localizado en su pared celular, y b) un agente disociante que permite la exposición al antígeno.
 - ∞ Krusei-color®: Krusei-color (Fumouze) es un método para la identificación de aislamientos de *C. krusei* por aglutinación de partículas de látex, mediante un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el antígeno localizado en su pared. El kit contiene un reactivo Krusei-color y 5 portaobjetos²⁸.

1.9 IDENTIFICACIÓN TRADICIONAL DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *Candida* spp.

C. albicans continua siendo el aislamiento clínico más frecuente, pero la emergencia de otras levaduras, principalmente aquellas que demuestran mayor resistencia a algunos antifúngicos, hace imprescindible la identificación rápida a nivel de especie de estos microorganismos¹⁹, sin embargo, han emergido otras especies como *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* (*torulopsis*), *Candida guilliermondi*, *Candida krusei* y *Candida kefyr*, con marcada importancia. Aunque las razones de esta emergencia no están del todo definidas, se ha sugerido que un factor

importante podría ser la carencia relativa de sensibilidad a fluconazol y otros azoles, administrativos corrientemente para el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Se ha observado que *C. tropicalis*, *C. kruzei* y *C. glabrata* puede ser de 4 a 32 veces menos sensibles a fluconazol que *C. albicans*. Es por ello que como se ha mencionado ya es muy importante una identificación rápida en aislamientos fúngicos para dar una clara orientación del tratamiento antifungico

✓ Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans*

En el mercado existen varios sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. En todos ellos se detecta una o dos enzimas (β -galactosaminidasa y L-prolina aminopeptidasa), sólo presentes en *C. albicans*. Para la detección de estas enzimas, los sistemas comerciales pueden utilizar sustratos fluorogénicos o cromogénicos.

- Sistemas enzimáticos que utilizan sustratos fluorogénicos: todos estos sistemas para su utilización, requieren el empleo de una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm.
 - BactiCard Candida®: integra dos test independientes para detectar la presencia de enzimas β -galactosidasa (MUGAL) y L-prolina aminopeptidasa (PRO). La enzima MUGAL tiene la capacidad de hidrolizar al sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-galactosaminina y producir la liberación de 4-metilumbeliferona que es una sustancia fluorescente capaz de ser detectada al iluminarse con luz ultravioleta de 365 nm. La enzima PRO hidroliza al sustrato L-prolina- β -naftilamida y reacciona con el *Color Developer* originando un color rojo²⁸.
- Sistemas enzimáticos que utilizan un sustrato cromogénico: estos sistemas utilizan sustratos cromogénicos para detectar las enzimas MUGAL y PRO por lo que no requieren el uso de lámpara de luz ultravioleta²⁸.

Entre ellos destacan:

- *Candida albicans* Screen: Utiliza como sustratos p-nitrofenil-N- β -acetil, β -D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehido que requiere una incubación de 90 min a temperatura ambiente.
- Murex *C. albicans* CA50: Utiliza como sustratos p-nitrofenil-N- β -acetil β -D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehido requiriendo una incubación de 30 min a 37 °C²⁸.

De las pruebas fisiológicas y bioquímicas se han derivado los ensayos de asimilación y fermentación de carbohidratos para la identificación de levaduras. Patrones de asimilación y fermentación de muchos géneros y especies se encuentran disponible en la literatura, sin embargo, se seleccionan con mayor fiabilidad las pruebas de auxonogramas, por causa de la existencia de ciertos carbohidratos que forman parte de la estructura celular de estos microorganismos, los cuales podrían revelar resultados falsos positivos en la prueba de fermentación de determinadas sustancias carbonadas.

En la actualidad se cuenta con diversos métodos, los cuales varían con el tiempo de ensayo, especificidad, sensibilidad, costos, etcétera; varios sistemas miniaturizados, estandarizados y automatizados existen en el mercado, como API32C, *Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®*, *Sistema Vitek*, entre otros, con la finalidad de simplificar y acelerar la identificación de los hongos, no obstante, poseen elevados precios, elemento que limita su uso en la rutina del laboratorio clínico²⁹.

✓ Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes

- Zimograma: las propiedades fermentativas de cada especie de *Candida* son características y se demuestran por la producción de ácido y gas. La acidez se demuestra por el cambio de color del indicador de pH, de verde a amarillo y cuando hay producción de gas este se acumula en la campana invertida de Durham. Se puede sustituir la campana vertiendo en el tubo 2ml de vaspar a 40 °C (vaselina y parafina); la producción del gas se demuestra con el desplazamiento del tapón hacia arriba. Los sistemas de Zimograma se incuban durante 7 días a 37 °C. teniéndose tablas para la identificación de cada especie⁸.

- **Auxonograma convencional:** se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Para su realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas por filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en el agar o bien discos de papel absorbente empapados con el nutriente. Sin embargo, las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, resultando mucho más laboriosas y costosas.
 - **Medios de cultivo base:** Se prepararan según la técnica habitual y no necesitan ajustar el pH. Se expenden deshidratados como media base de levaduras. Los más utilizados son los siguientes:
 1. Medio sin carbono: Sulfato amónico (5 g/l), Fosfato monopotásico (1 g/l), Sulfato de magnesio (0,5 g/l), Agar (20 g/l).
 2. Medio sin nitrógeno: Glucosa (20 g/l), Fosfato monopotásico (1 g/l), Sulfato de magnesio (0,5 g/l), Agar (20 g/l).Como fuente de carbono se puede ensayar todos los azúcares y alcoholes conocidos; como substrato de nitrógeno se suele emplear peptona, asparagina, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio y aminoácidos diversos²⁸.
- **Auxacolor®:** La galería Auxacolor (Bio-Rad) es un sistema de identificación basado en la asimilación de 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras. El crecimiento de la levadura se visualiza por el cambio de un indicador de pH. La galería incorpora, además, una prueba de resistencia a la actidiona y otra para la detección de la actividad fenol-oxidasa de *C. neoformans*.
- **Sistema Uni-Yeast-Tek®:** esta constituido por una placa plástica con múltiples compartimentos que contienen un medio con agar para la asimilación diferencial de siete hidratos de carbono. También incorpora

una cubeta central con agar harina de maíz-Tween 80 para determinar el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas. Además, está provisto de agar urea, agar para la asimilación y reducción de nitratos y de un caldo con extracto de carne al 2,6% (con 0,05% de glucosa) para realizar la prueba del tubo germinal.

- ✓ Sistemas semiautomáticos: En la actualidad se han comercializado diversos métodos de asimilación de nutrientes que simplifican tanto su uso como su interpretación.
 - API 20C AUX®: La galería se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.
 - Galería ID 32C®: está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada. Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API. La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, 1 es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina. El procedimiento para la inoculación de la galería, incubación e interpretación es similar al descrito para el sistema API 20 C AUX, a única diferencia es la posibilidad de realizar la lectura de la galería, de forma automática, mediante el sistema ATB Expression o mini API.
 - Sistema Vitek®: Las tarjetas Yeast Biochemical Card (YBC) del sistema Vitek (bioMérieux) permiten la identificación de organismos

levaduriformes y afines de forma automatizada. Son unas tarjetas plásticas desechables que incluyen 30 celdillas: 26 pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles. Por otra parte, el sistema Vitek consta de un módulo con cámara de vacío para inoculación de las tarjetas, un lector/incubador, un sistema automático de manipulación de tarjetas, un fotómetro para medir la densidad óptica, un ordenador central y una impresora. El sistema Vitek permite identificar 36 especies diferentes de levaduras: 16 especies del género *Candida*, 6 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula*, 2 *Trichosporon*, 3 *Geotrichum*, 2 *Prototheca*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.

✓ Sistemas automáticos:

- ✚ Sistema Vitek2®: es un sistema totalmente automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15 h. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, 1 consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado. El sistema Vitek 2 permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*, y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación.
- ✚ Sistema Biolog YT MicroPlate®: permite la identificación de organismos levaduriformes mediante 94 pruebas bioquímicas, llegando a identificar hasta un total de 267 especies diferentes pertenecientes a 53 géneros.
- ✚ Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®: es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y otros microorganismos afines. Se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados²⁸.

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Actualmente la frecuencia de micosis invasoras en pacientes inmunocomprometidos o con tratamientos médico-quirúrgicos ha aumentado significativamente, siendo el género *Candida spp* uno de los principales agentes; además de la condición de los pacientes otros factores que inciden con el aumento de las infecciones fúngicas son el uso indiscriminado de antibacterianos de amplio espectro, catéteres vasculares y nutrición parenteral^{42,43}.

A pesar de que *Candida albicans* ha mantenido un bajo nivel de resistencia antifúngica, se ha descrito un aumento significativo de especies no-albicans, que exhiben resistencia a azoles; por esta razón surgió la necesidad de utilizar antimicóticos como polienos, fluocitosina, imidazoles y triazoles (fluconazol e itraconazol), para profilaxis o terapia antifúngica o para la terapia empírica, sin embargo, estas prácticas terapéuticas han generado cambios epidemiológicos entre los que se destacan la aparición de cepas que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos. Recientemente se requiere conocer la susceptibilidad *in vitro* de los aislados con el fin de orientar y conseguir el éxito terapéutico, ésta susceptibilidad antifúngica *in vitro* generalmente se cuantifica utilizando la concentración inhibitoria mínima (CIM)^{42,43}.

En un estudio realizado por Cruz y cols⁴³., todas las especies del género *Candida* fueron sensibles a fluconazol y a voriconazol, excepto *C. glabrata*, por su parte Ajenjo et al⁴³, también documentó resistencia a fluconazol en *Candida* no albicans; en otro estudio Alburquerque y cols⁴³., en 2007 observaron 92,3% de sensibilidad a fluconazol en *C. albicans*, 85,7% en *C. glabrata* y 80% en *C. tropicalis*⁴³.

Lo anterior nos demuestra que ante la resistencia a diferentes antimicóticos, es necesario cambiar la terapia antifúngica, pero no solo eso, sino que es necesario identificar a los factores que influyen para crear nuevos antimicóticos que den al paciente una pronta recuperación, además de disminuir o erradicar los factores que aumentan la resistencia antimicrobiana de estas especies oportunistas.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

γ

OBJETIVOS

Hipótesis:

La actividad bioquímica y proteolítica de la *Candida spp* pueden ser de utilidad como pruebas para la identificación rápida de especies patógenas oportunistas.

Objetivos:

Tipificar las cepas obtenidas de muestras Hospitales de Servicios de Salud del municipio de Toluca; a través de, su actividad bioquímica y filamentación.

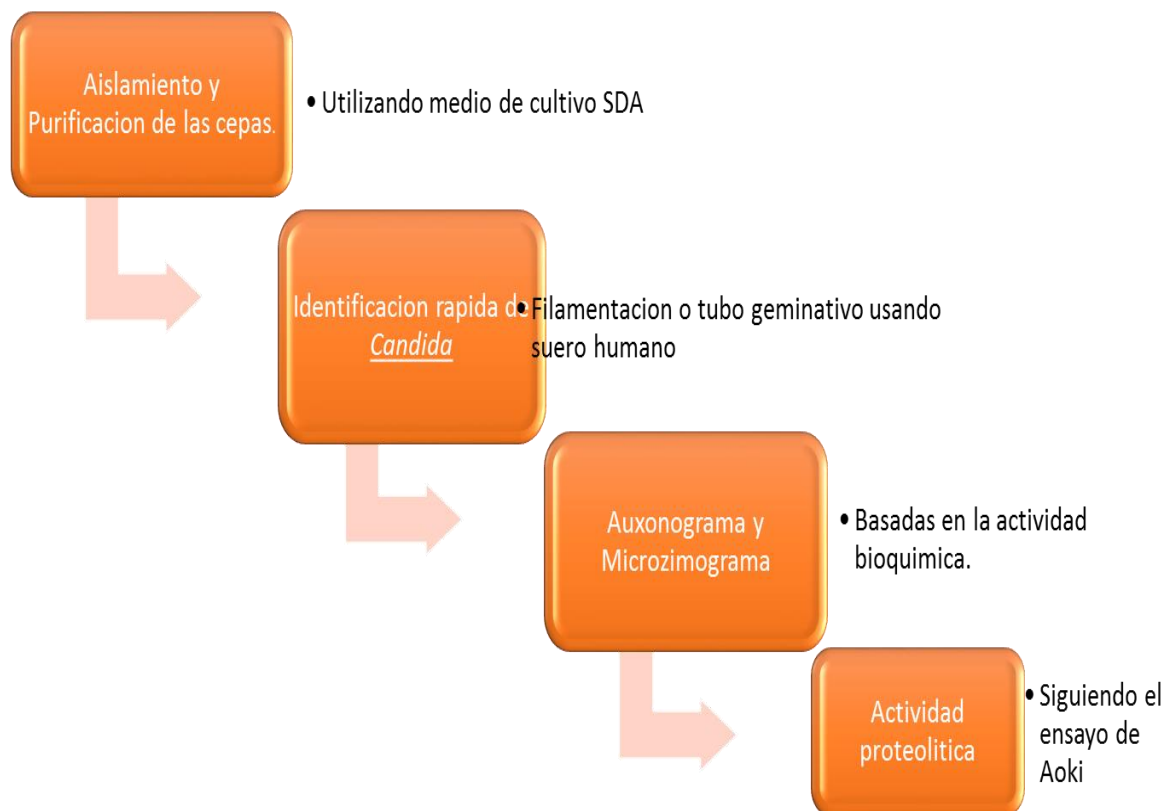
Identificar las diferentes especies del género *Candida spp* por su actividad bioquímica utilizando un método basado en la actividad proteolítica de las diferentes especies.

ΚΑΡΤΥΛΟ ΙΙΙ.

ΜΕΤΟΔΟΛΟΓΙΑ

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

Se utilizaron 50 cepas provenientes de Hospitales de Servicios de Salud del municipio de Toluca, a las cuales se le aplicaron distintos métodos de identificación, los cuales se describen a continuación.



Aislamiento y purificación de las muestras clínicas:

Las cepas se recibieron aisladas y purificadas en Agar Dextrosa Sabouraud, preparándose a partir de ellas dos tubos de trabajo para su posterior utilización en cada una de las pruebas a ensayar.

Filamentación:

Se realiza para diferenciar a la especie *Candida albicans* de las otras especies del género *Candida*, utilizando suero humano, puede utilizarse también suero de conejo.

Procedimiento:



Inocular en el suero una pequeña porción de colonia

Incubar dos horas a 37 °C

Observar al microscopio la formación de Tubo Germinativo.

En la imagen anterior se muestra la formación de tubo germinativo en las especies de *Cándida spp.*

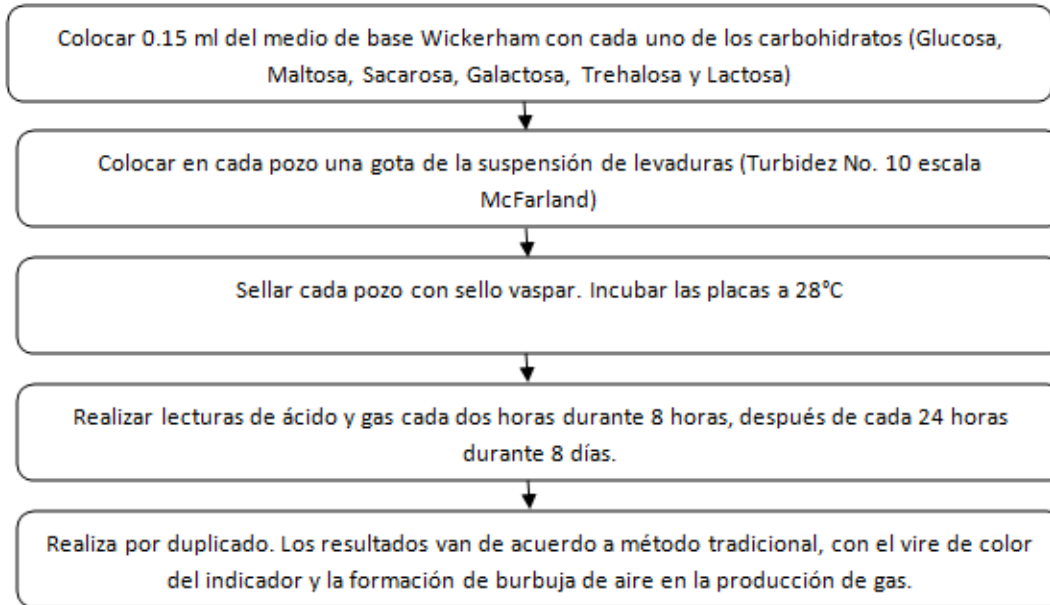
Zimograma (Fermentación de Carbohidratos):

Se realiza para observar la capacidad de fermentación de carbohidratos en un medio base + carbohidratos + un indicador de pH que en este caso será azul de bromotimol al 0.4%. Con la finalidad de ahorrar reactivos, así como reducir la cantidad de residuos, se decidió utilizar microzimograma en lugar de un Zimograma normal, para lo cual fue necesario incluir el siguiente material:

- Tubos de 0.5 mL de capacidad.
- Una gradilla de 6 x 12 para colocar los tubos
- Micropipetas de distintas capacidades.
- Medio base de Wickerham, compuesto por: extracto de levadura 4g; Peptona 7.5g; agua destilada 1000 mL, ajustándose a un pH de 7.0 se le

agrega indicador de pH azul de bromotimol hasta color verde esmeralda, esterilizar en autoclave a 15lb durante 15 minutos.

- Carbohidratos (Dextrosa, Maltosa, Sacarosa, Lactosa, Galactosa, Trehalosa) en soluciones al 6%, esterilizar por filtración.



CARBOHIDRATOS

M		1	2	3	4	5	6
U	A						
E	B						
S	C						
T	D						
R	E						
A	F						
S	G						

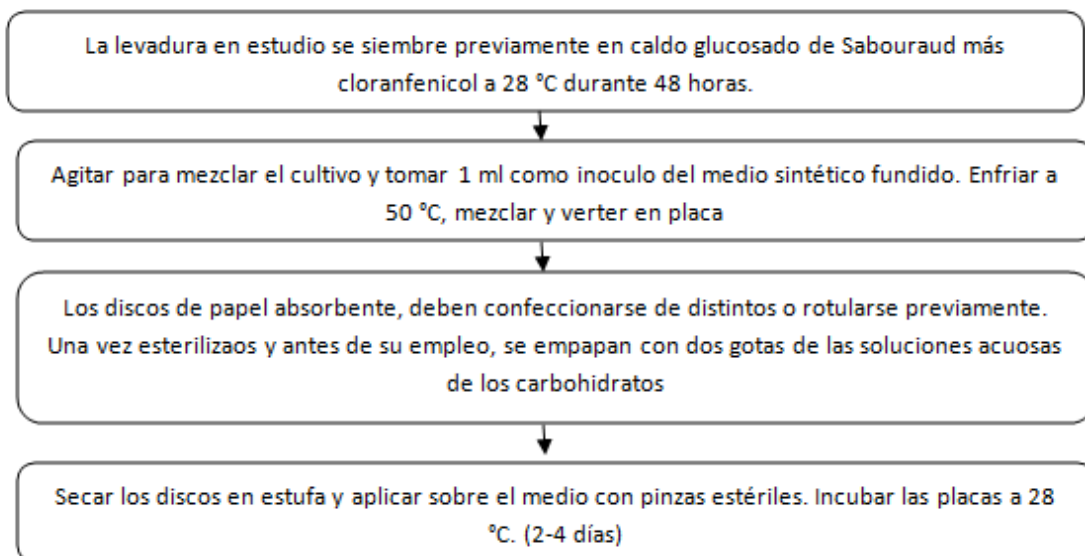
Del lado derecho se muestra la forma de organizar los pozos para el zimograma.

Auxonograma (Asimilación de carbohidratos):

Realizar esta prueba a las 50 muestras, sin embargo, no se utilizara el método tradicional, sino que se usará un método de Auxonograma modificado (en placa), para lo cual se requiere el material siguiente:

- Cajas Petri
- Caldo glucosado de Sabouraud mas cloranfenicol

- Discos de papel absorbente
- Medio de cultivo sintético libre de fuentes de carbono (MCS): sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$ 5,0 g; hidrógeno fosfato de potasio $[K_2HPO_4]$ 0,45 g; di-hidrógeno fosfato de potasio $[KH_2PO_4]$ 0,31 g; hidrógeno fosfato de sodio $[Na_2HPO_4]$ 0,92 g; cloruro de sodio $[NaCl]$ 0,1 g; cloruro de calcio $[CaCl_2]$ 0,05 g; sulfato de magnesio heptahidratado $[MgSO_4 \cdot 7H_2O]$ 0,2 g; L-histidina monoclóhidrato 0,005 g; L-triptófano 0,02 g; L-metionina 0,02 g; azul bromotimol 0,04 g; agar 20 g.
- Carbohidratos (Dextrosa, Maltosa, Sacarosa, Lactosa, Galactosa, Melecitosa, Celobiosa, Inositol, Xilosa, Rafinosa, Trehalosa, Dulcitol) en soluciones al 20% esterilizar por filtración.



Actividad proteolítica:

Esta prueba ayuda a diferenciar las especies del género *Candida* spp para cumplir con ello se sigue la siguiente metodología:

- ✓ Cajas petri.
- ✓ Medio de cultivo: 0.5g de K_2HPO_4 ; 0.04 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 g. NaCl; 0.2 g extracto de levadura; 4 g. glucosa; 0.5 g. Albumina sérica bovina; 4g. agar-agar; en 200mL de agua destilada.
- ✓ Equipo de filtración usando filtros Millipore 0.45 μ m.

✓ Pipetas de distinta capacidad.

Preparación del medio de cultivo:

0.5g de K_2HPO_4	0.04G $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g. NaCl
0.2G extracto de levadura	4 g. glucosa	4g. agar-agar
0.5 g. Albumina sérica bovina		

En 200mL de agua destilada, esterilizar por filtración.

El pH se ajustó a 3,5 con HCl 1 N
Inocular las placas con las cepas e incubar a 37 °C

Realizar lecturas a las 2, 4, 7 y 9 días de incubación posterior colorear con azul brillante de Coomassie

Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresan con el índice Prz
Donde Prz es la relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia más el halo de aclaramiento debido a la proteolisis, dando una idea de la actividad proteinasa.

Cuando el Prz = 1, no se detectó actividad de la proteasa en las cepas. Por lo tanto, bajo Prz significa una alta producción de la enzima.

CAPITULO IV.

RESULTADOS

Lo primero que se realizó fue la purificación con la finalidad de que posibles contaminaciones o interfieran con los resultados, por ello se utilizó agar Dextrosa-Sabouraud (SDA), ya que este es un de los medios específicos de micología, este medio es muy rico en glucosa y cuyo pH bajo, el cual está entre 5-5.6, dificulta el crecimiento de las bacterias asimismo facilita el crecimiento de los hongos, además en algunas ocasiones este medio contienen diversos antibacterianos como cloranfenicol, la gentamicina y ajustar el pH entre 6.5 y 7.2 haciendo más favorable para el crecimiento de los hongos.

En este medio se observan colonias cremosas, opacas de un color blanco o ligeramente beige, como las que se observan en las imágenes 1 y 2.

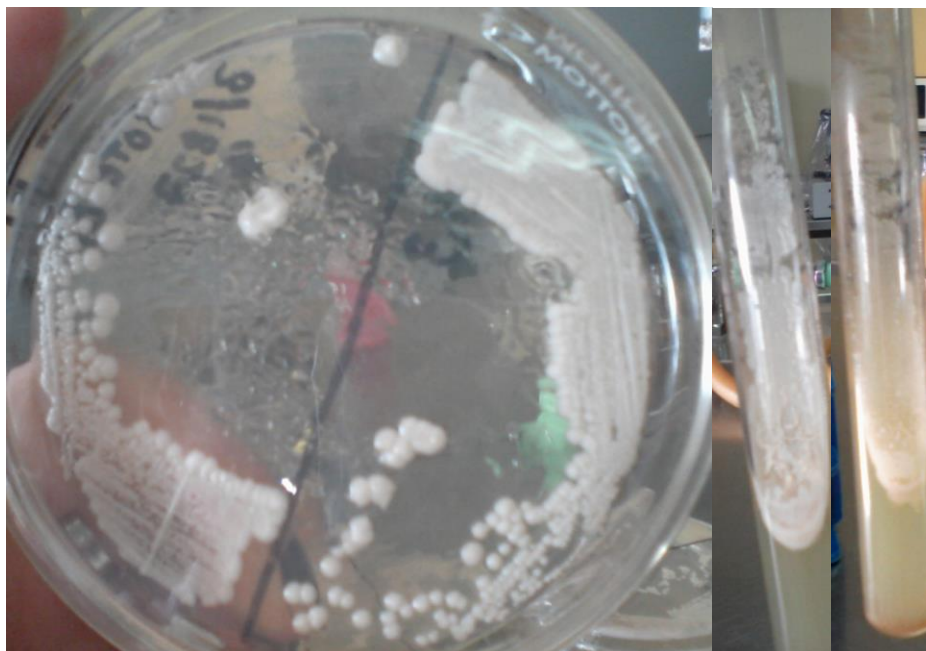


Imagen 1 y 2: Aislamiento en placa, preparación de tubos de trabajo.

Como primer paso, se les realizó la prueba de filamentación o tubo germinativo, comúnmente en la clínica es la primera prueba que se realiza, esto con el objetivo de clasificar al género *Candida* en dos grandes grupos; albicans y no albicans. Para esta prueba se utiliza suero sanguíneo, en esta ocasión se utilizó suero humano, de las 50

cepas el 30% proporcionaron un resultado positivo, sospechándose que ese 30% podrían ser *C. albicans* puesto que la prueba es específica para separar precisamente esta especie de las otras. Es importante mencionar para estandarizar las condiciones de trabajo se utilizan cepas de 48 hs para todas las pruebas. En la imagen 3 se muestra una de las 50 cepas pertenecientes al 30% positivo para tubo germinativo.

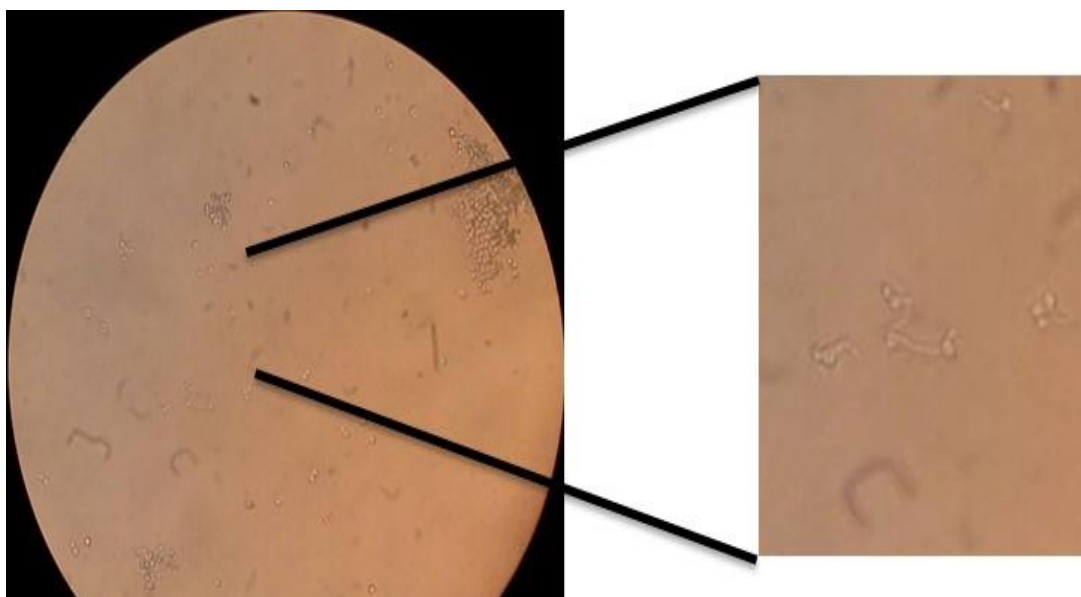


Imagen 3: Tubo germinativo positivo

Como segundo paso se realizó la identificación de las levaduras, mediante sus características metabólicas, fermentación y asimilación de diversos hidratos de carbono, haciendo variantes de las pruebas tradicionales: auxograma en placa, con la finalidad de facilitar la manipulación al utilizar placas con discos en lugar de tubos y microzimograma que al ser en pequeña escala permite un mejor manejo y reduce la generación de residuos.

Como ejemplo de los resultados se muestran las siguientes fotografías en las imágenes 4 y 5, el crecimiento de la cepa, alrededor de los carbohidratos, sin embargo la lactosa no observa crecimiento y esto se evidencia al no tener crecimiento alrededor del disco, mientras que en la imagen 6 se observa una gradilla con 13 cepas diferentes, en la modalidad de microzimograma.

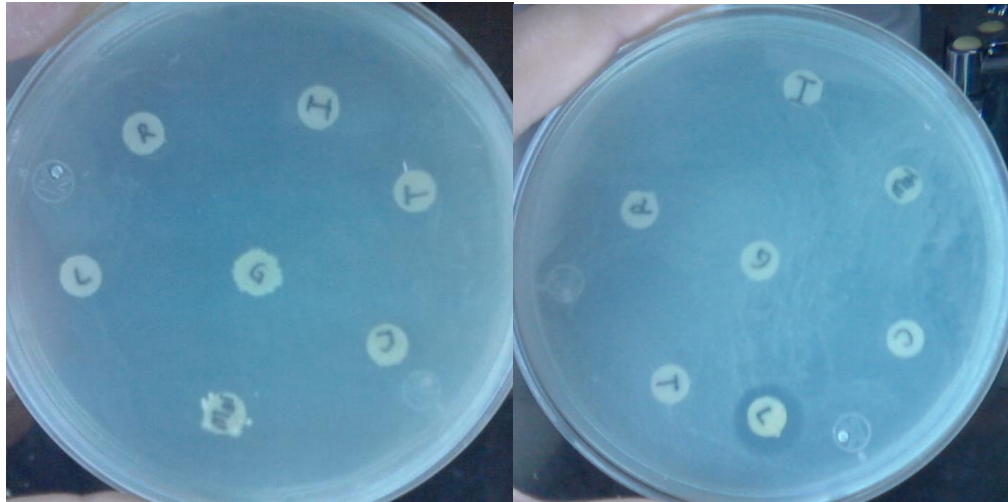


Imagen 4 y 5: Auxonograma en placa.

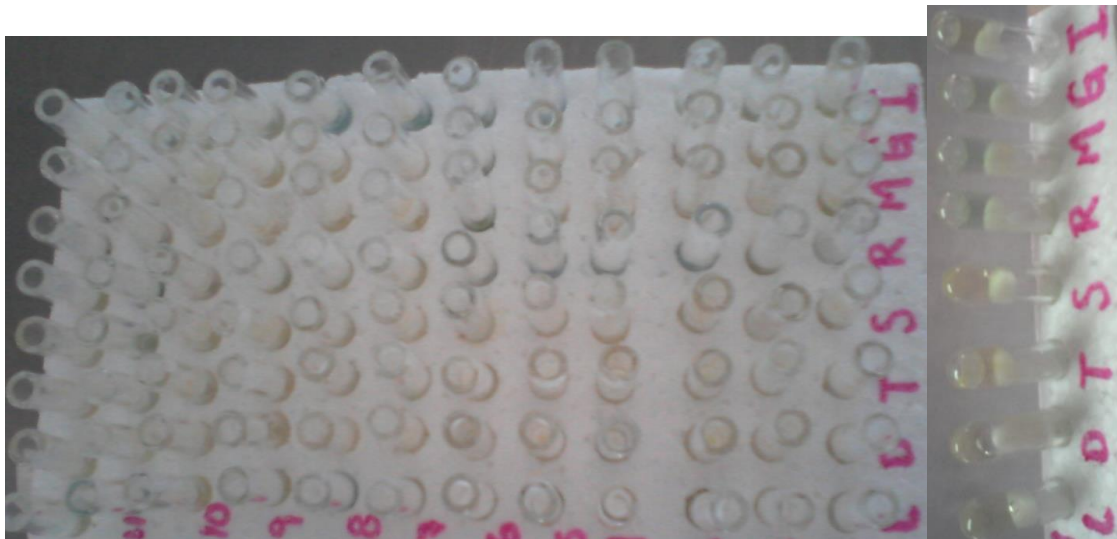


Imagen 6: Microzimmograma

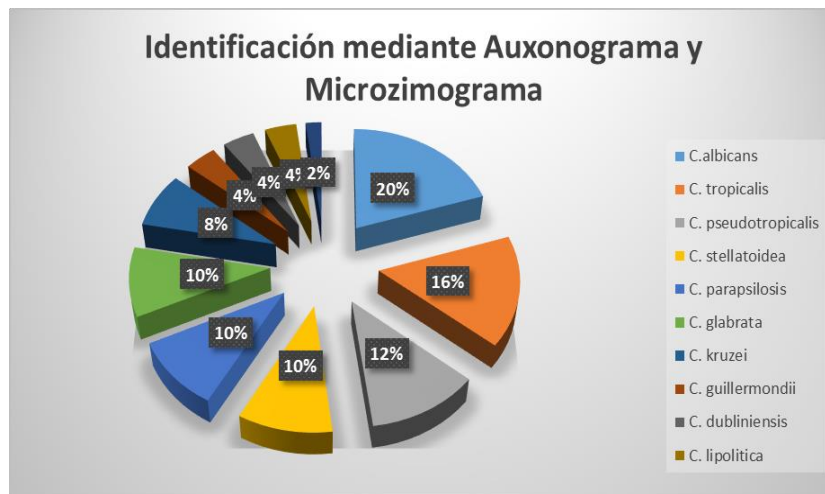
Se utilizó además el método de cromoagar para la identificación de ciertas especies de candida de importancia clínica como se observa en la imagen No. 7 y 8, que complementando con las dos técnicas anteriores podemos aportar un resultado más preciso, que ayude al diagnóstico oportuno en 28 horas.

En las imágenes 7 y 8 se observa en color verde claro las cepas de *C. albicans*, en color verde intenso *C. dubliniensis*, en azul *C. tropicalis*, Rosa mate *C. Kruzei*, Rosa mate *C. glabrata*.



Imagen 7 y 8: Agar cromogénico

Con las pruebas anteriores se identificaron las 50 cepas, encontrándose que el 20% corresponde al género *C. albicans*, 16% al *C. tropicalis*, 12% al *C. pseudotropicalis*, 10% corresponden a *C. stellatoidea*, 10% a *C. glabrata*, 10% a *C. parapsilosis*, 8% a *C. kruzei*, 4% a *C. guilliermondii*, 4% a *C. dubliniensis*, 4% a *C. lipolitica*, y 2% a *C. famata*, confirmándose estos resultados por medio de Chromagar. Como se observa en la gráfica siguiente:



Grafica: porcentajes de cada especie, según los resultados de auxonograma en placa y microzimograma.

Entre los factores de virulencia recientemente se han encontrados enzimas que facilitan la virulencia de algunas especies de *Candida* como son las SAP (enzimas de secreción aspártico proteinasas). Como ya se menciona anteriormente, esta familia de

genes *SAP* de *C. albicans* codifican a las aspartil proteinasas secretadas (Saps), la presencia de los genes de la familia *SAP* en *Candida albicans* y otras especies proporciona al hongo un sistema proteolítico eficiente y flexible que puede garantizar su éxito como patógeno oportunista, provocando así, que sea más común observar a este género como responsable de infecciones nosocomiales.

Utilizando el ensayo de Aoki et al, se pudo observar la presencia de proteasas en las diferentes especies de *Candida*, reportandose en valores Pz.

A continuación se muestran fotografías del medio de cultivo a base de albumina con algunas de las cepas en algunas se observa un halo transparente alrededor de la colonia la cual es indicativo de proteólisis.

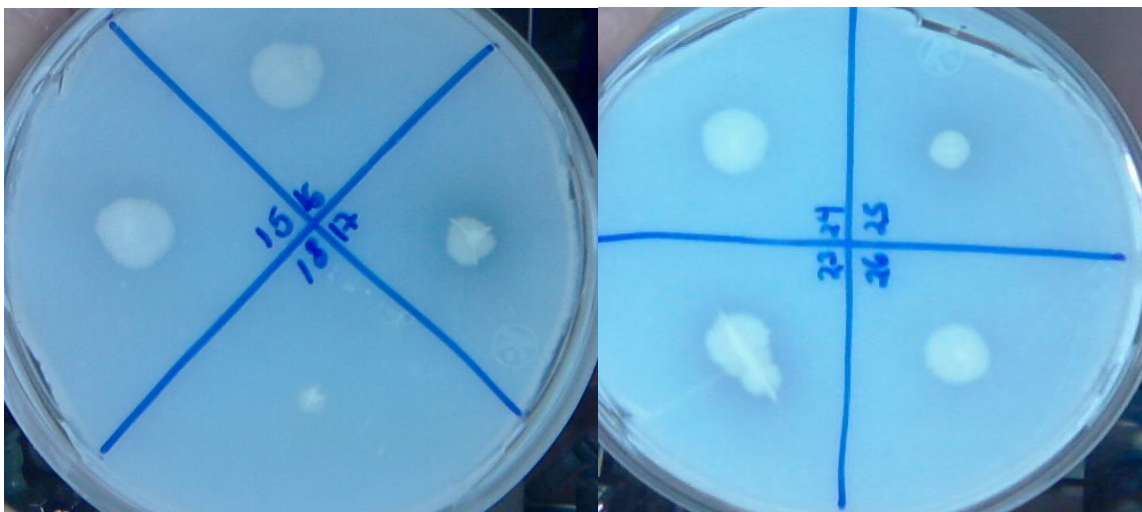


Imagen 9: Actividad proteolítica de diferentes especies de *Candida* spp.

De acuerdo a la medición de los halos siguiendo el procedimiento para la obtención de los valores Pz. se tienen que el 72% de las cepas muestran actividad proteolítica, para un mejor entendimiento se han acomodado en la siguiente tabla:

Espece	Valores de Pz. De las diferentes cepas										
<i>C. albicans</i>	0.58	0.5	0.5	0.5	0.56	0.63	0.57	0.5	0.44	0.48	10
<i>C. tropicalis</i>	0.72	0.71	0.71	0.56	0.8	0.57	0.5	0.61			8
<i>C. pseudotropicalis</i>	0.9	1	1	1	0.75	1					6
<i>C. stellatoidea</i>	1	1	1	1	1						5
<i>C. parapsilosis</i>	0.73	1	0.75	1	1						5
<i>C. glabrata</i>	0.59	0.58	0.6	0.55	0.64						5
<i>C. kruzei</i>	0.66	0.64	0.61	0.62							4
<i>C. guilliermondii</i>	0.71	0.64									2
<i>C. dubliniensis</i>	0.71	0.71									2
<i>C. lipolitica</i>	1	1									2
<i>C. famata</i>	0.63										1
										Total de cepas	50

Tabla de actividad proteolítica en valores Pz.

Se observa una gran semejanza en los valores de las diferentes cepas de la misma especie y en algunas especies es el mismo valor en todas las cepas, lo cual resulta muy relevante para los fines de este trabajo. Además de hacer evidente la presencia de enzimas proteolíticas en la mayoría de las especies del genero *Candida* spp.

A pesar de que no se hace evidente la cantidad de enzimas, si se diferencia cuál de ellas tiene enzimas con esta actividad proteolítica, aunque no sabemos el tipo de enzima de la familia SAP que esta o están presentes en cada cepa.

CAPITULO V.

DISCUSION

DE

RESULTADOS

Las pruebas realizadas en el presente trabajo son muy sencillas, esto debido a que en la clínica siempre se busca que el diagnóstico sea rápido, y más en las infecciones nosocomiales, puesto que tenemos pacientes que frecuentemente están inmunocomprometidos, motivo por el cual es necesario proveer un método eficiente pero sobretodo rápido para evitar la muerte del paciente, pues aunque estas infecciones son provocadas por microorganismos que aparentemente no causan ningún daño las condiciones de los pacientes hacen que se complique y que los microorganismos causen más daño del que podrían provocar en una persona sana.

Los resultados obtenidos de Auxonograma en placa y Microzimograma coinciden con la promoción de crecimiento en Agar cromogénico, identificándose correctamente las 50 cepas, aunado a ello, en el marco teórico se describe la importancia sobre el papel que cumplen las proteasas como factor de virulencia de las diferentes especies de *Candida* spp sustentando que la cantidad de actividad proteolítica observada en cada especie es diferente, esto se ve reflejado en los valores de Pz, no obstante también se observan variaciones que pueden deberse a que hoy en día muchos microorganismos han sufrido cambios en el material genético a través de mutaciones que codifican información específica en ciertos genes para hacerlos resistentes a ciertos antifúngicos y a la vez explicar una de las causas que estimulan a mostrar estas variaciones entre los valores de Pz en la misma especie de *Candida*.

En la literatura se reporta que se ha demostrado la presencia de proteinasas en *Candida albicans*, pero no se limitan solo a esta especie también se han encontrado en *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, los resultados obtenidos coinciden mucho con lo que se reporta en la literatura, sin embargo en este ensayo también se observó presencia de proteinasas en *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. famata*. Aunque en los artículos no se ha reportado que se utilice este método como medio de identificación como es el propósito de este trabajo, se reporta principalmente para observar la actividad proteolítica como indicador de la presencia de las enzimas de la familia SAP que influyen en los factores de virulencia del género *Candida*, los resultados coinciden, las especies que se reportan con actividad proteolítica en la literatura en diversos artículos, son las mismas que presentaron actividad proteolítica.

Durante la revisión bibliográfica algunos autores coinciden al describir algunas características tan parecidas que comparten *C. albicans* y *C. stellatoidea* se sugeriría tomarlas como “sinónimos”, sin embargo, de acuerdo con los resultados que se obtuvo la cantidad de actividad proteolítica de estas dos especies muestran una diferencia significativa, como ya se mencionó, la actividad proteolítica está muy relacionada con la virulencia de cada una de las especies, mientras que *C. albicans* tiene gran actividad *C. stellatoidea* tiene muy poco o es nula, siendo éste, un factor importante en la identificación pues se propone un método de diferenciar estas dos especies tan parecidas.

En la clínica es muy común la promoción de crecimiento en agar cromogénico para identificar de una manera rápida las diferentes especies de *Candida spp*, de acuerdo con este método, que se ha considerado como efectivo, solo se pueden identificar las principales especies, entre ellas *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kruzei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, pero las dos primeras se diferencian por la tonalidad que alcanza el color verde uno es más oscuro que el otro, lo cual es muy subjetivo pues puede haber variaciones en la interpretación dependiendo del analista que le corresponda llevar a cabo la lectura de los medios de cultivo, las cuales van desde la perspectiva de cada persona; lo que para uno puede ser verde oscuro para otro no lo será, provocándose un falso resultado. Se podría pensar que con la prueba de filamentación o tubo germinativo se diferencian estas especies, pero se ha reportado que después de 4 horas *C. dubliniensis* produce un alto porcentaje de filamentación, pero el medio de albumina puede ayudar a diferenciar estas dos especies, pues es notorio que *C. albicans* tiene mayor actividad proteolítica que *C. dubliniensis*. Y es importante diferenciar estas dos cepas que en la actualidad son muy parecidas además de que ambas se relacionan mucho con casos de VIH, por lo cual su importancia aumenta y aunque los casos de este virus no van en aumento, tampoco han disminuido, haciendo este grupo muy vulnerable a los contagios de candidosis.

Algo que es importante señalar es que al comparar resultados obtenidos por los métodos convencionales y tradicionales, el ensayo propuesto en comparación con los métodos automáticos es más lento, sin embargo, el uso de este medio de albumina como ayuda a la identificación de las diferentes especies de *Candida* es más económico, pues

como se sabe, la mayor parte de los hospitales no cuentan con una infraestructura y con equipos automatizados para llevar a cabo una identificación rápida, lo cual al momento de diagnosticar es de gran valor, porque resulta que cuando se tiene un paciente con candidosis es importante saber qué tipo de *Candida* es la que está infectando al paciente, lo que nos permite dar al paciente el mejor tratamiento para asegurar su pronta recuperación.

De acuerdo con los objetivos planteados, se han cumplido los dos, puesto que se identificaron las 50 cepas procedentes del hospital, basándonos principalmente en su actividad metabólica y su capacidad de filamentación y, a pesar de que no se propone el uso de la actividad proteolítica como medio de identificación por sí solo, sino como un medio de apoyo en la identificación por los métodos rápidos como tubo germinativo o filamentación y los medios Cromogénicos, especialmente a hospitales y/o laboratorios pequeños que no cuentan con recursos suficientes para adquirir un equipo de identificación más sofisticado como son las pruebas moleculares que hoy en día son las "de moda", por su gran eficiencia, sin embargo, al ser métodos nuevos, son costosos, lo que hace que solo una minoría pueda adquirirlos y usarlos, además de que se necesitara de una capacitación para el uso de los nuevos métodos lo cual eleva el costo. El presente ensayo es un método de ayuda barato, que si bien no es 100% confiable combinándolo con otras pruebas rápidas es de gran ayuda en el diagnostico medico.

Es de gran relevancia mencionar que tal vez este método aún no está estandarizado como lo establece las buenas prácticas de laboratorio por lo que se recomienda realizar repeticiones que permitan establecer la mínima variación de las variables fisicoquímicas que intervienen en el ensayo con la inclusión de cepas de referencia como controles del ensayo, y así, asegurar el nivel de confianza de la reproducibilidad del procedimiento como una prueba rápida, además sería muy provechoso realizar estudios de PCR, para identificar los genes en cada cepa y observar si hay variaciones entre las diferentes especies, así como entre cepas de la misma especie, pues como se observó en la tabla de actividad proteolítica en valores Pz. hay cepas de la misma especie con diferentes valores de proteólisis.

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La actividad proteolítica está ligada estrechamente con la virulencia de las diferentes especies del género *Candida* spp por lo cual se puede hacer uso de esta propiedad para identificar especies que son parecidas entre sí.
- El ensayo de la actividad proteolítica es de gran utilidad para apoyar un diagnóstico temprano junto con las pruebas rápidas como la determinación de Tubo germinativo y la promoción de crecimiento en agar cromogénico, orientando a un tratamiento oportuno para el paciente.
- Aunque se han realizado grandes avances en el campo de la medicina, aún existen muchos espacios que no cuentan con los recursos necesarios para atender las necesidades de toda la población , es por ello, que en la necesidad de ofrecer al paciente una mejor calidad de atención, se propone este método como apoyo a las pruebas rápidas; la actividad proteolítica como medio de identificación, resulta ser un método costeable para la mayoría de las clínicas, hospitales y laboratorios no cuentan con la infraestructura y recursos para métodos tradicionales automatizados y, a pesar de que el tiempo de realización es una desventaja es un método de gran utilidad.

CAPITULO VII.

SUGERENCIAS

SUGERENCIAS

- Se recomienda el uso de PCR para confirmar los resultados obtenidos en este trabajo; además de identificar los genes de cada especie y ver cuáles de ellos tienen actividad proteolítica, lo cual mejoraría el método descrito en el presente trabajo.
- Se observan algunas variaciones en los valores de actividad proteolítica, esto puede deberse a que con el paso del tiempo, los microorganismos van variando el material genético mediante mutaciones en genes, que codifican resistencia a ciertos antifúngicos, por lo que se sugiere un estudio de identificación de genes de resistencia en las cepas que tienen variación.

BIBLIOGRAFIA

1. Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2007) *Introducción a la Microbiología*, 9ª. Edición, Buenos Aires, Ed. Medica Panamericana pp.435-438 <http://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwplC&pg=PA435&dq=infecciones+nosocomiales&hl=es&sa=X&ei=kMgsUumxLOjO2AWwmYDYBA&ved=OCCOQ6AEwAA#v=onepage&q=infecciones%20nosocomiales&f=false>
2. López M. R., Méndez T. L.J., Hernández H. F., Castañón O. R. (1995) *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*, México, Ed. Trillas pp99
3. Dismukes W.E., Pappas P.G., Sobel J.D. (2003) *Clinical Mycology*, United States of America, Oxford University Press Inc. pp 143-175.
4. Rippon J. W. (1988) *Medical Mycology, The Pathogenic Fungi ant the Pathogenic Actinomicetes*, 3ª edición, United States of America, W.B. Saunders company pp. 532-575
5. Arenas G. R. (2011) *Micología Médica ilustrada*, 4ª edición, México, Ed. Mc Graw Hill pp. 47, 222-241
6. Bonifaz A. (2010), *Micología Médica Básica*, 3ª edición, México D.F., Ed. Mc Graw Hill, pp. 280-300
7. Méndez Cervantes F., (1990), *Micología Médica Básica*, México, Ed. Méndez Cervantes, pp. 277-301
8. López M.R., Méndez T.L.J., Hernández H.F., Castañón O.R. (2004), *Micología Médica, procedimientos para el diagnostico de laboratorio*, México, Ed. Trillas, pp. 99-106
9. Loaiza L.M.S., (2008), *Expresión de genes SAP (codificantes de aspartil proteasas) de Candida dubliniensis en diferentes condiciones fisiológicas y durante la infección experimental de queratinocitos*. Tesis de Doctorado, México, Instituto Politecnico Nacional.
10. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la vigilancia Epidemiológica*, Secretaria de Salud, Subsecretaria de Prevención y promoción de la Salud, Septiembre de 2012, Dirección general de Epidemiologia.

11. Arreguín N.R., González G.R., De La Torre R.A., (2012) "Infecciones Adquiridas En Los Hospitales ¿Cuánto Cuestan Y Cómo Se Calcula?", *Revista Digital Universitaria*, Volumen 13, Número 9, Septiembre 2012, ISSN 1067-6079, en: <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num9/art88/index.html> {consultado el 15-febrero-2014}
12. Biasoli M., (2013), *Candidiasis*, pp. 1-31 [en línea] Centro de Referencia Micológica (COREMIC), disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf [consultado el 09 de marzo de 2013]
13. Vilata J.J. (2005) *Micosis cutáneas*, Ed. Medica Panamericana, pp11-119 [en línea], Buenos Aires, disponible en: <http://books.google.com.mx/books?id=ML5kocizMKgC&pg=PA111&dq=genero+Candida+spp.&hl=es&sa=X&ei=J8YsUtOuO6-02AXJv4DADg&ved=OCC8Q6AEwAA#v=onepage&q=genero%20Candida%20spp.&f=false> [consultado el 13 de septiembre de 2013]
14. Vilata J.J. (2005), *Micosis Cutanea*, [En línea], Editorial Medica Panamericana, España, pp.86-110 disponible en: <http://books.google.com.mx/books?id=ML5kocizMKgC&pg=PA91&dq=candidiasis+cut%C3%A1nea&hl=es&sa=X&ei=tdJaU6T5JMGR8AGUj4CwDA&ved=OCCwQ6AEwAA#v=onepage&q=candidiasis%20cut%C3%A1nea&f=false> [Consultado el 23 de Abril de 2014]
15. Fitzátrick, Wolf, Goldsmith, Katz, Gilchrest, Paller, Leffell, (2009), *Dermatología En Medicina General*, 7ª edición, Ed. Panamericana, Buenos Aires Argentina, pp. 1823-1828. Disponible en http://books.google.com.mx/books?id=83VOI_tJbggC&pg=PA1823&dq=formas+clinicas+de+la+candidiasis&hl=es&sa=X&ei=xCddU6eqKMWs2wWvioCoCg&ved=OCCwQ6AEwAA#v=onepage&q=formas%20clinicas%20de%20la%20candidiasis&f=false [Consultado el 23 de Abril de 2014]
16. NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.
17. Ángeles G.U., Gayosso R.JA, Díaz R.RD, Velázquez C.Y., Marcial Z.C., Zambrana A.MR, Anaya F.VE., (2010), ENF INF MICROBIOL, Factores de riesgo específicos en cada tipo de infección nosocomial, 30 (3): 91-99

18. Ramirez BEJ, Rosenthal VD, Higuera F, Sobreira OM, et al. (2006), Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units in four Mexican public hospitals. *Am J Infect Control*; 34, pp:244-7
19. Secretaria de Salud, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran, 2011, "MEDICIÓN DE LA PREVALENCIA DE INFECCIONES NOSOCOMIALES EN HOSPITALES GENERALES DE LAS PRINCIPALES INSTITUCIONES PÚBLICAS DE SALUD", México, D.F. pp. 3,4,49,50
20. Jarvis WR, Cookson ST, Robles B. (1996), Prevention of nosocomial bloodstream infections: a national and international priority. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 17, pp: 272-275.
21. Mendoza M., (2005), "Importancia de la identificación de levaduras", *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; Numero 25, pp. 15-23
22. Valenzuela F.A.A., Sigfrido R.F.M., Gutiérrez G.N., Valenzuela F.A. G., Tabal G.N. (2004) "Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia de un hospital de cardiología en México". *Cir. Ciruj.* 72: 41-46
23. Reyna F.J., Fragoso D.A., Ortiz I.F. J., Soriano B.D., Bermúdez G., Plazola C.N. (2007) "Epidemiología hospitalaria de candidiasis neonatal en el Instituto Nacional de Perinatología en un período de 5 años". *Enf. Inf. Microbiol.* 27:110-113.
24. Hernández S.B., Prieto P.M. A., Muñoz B.J., Curiel B.E., Mora O.J., Arias V.L. (2008) "Clinical, Epidemiological and Taxonomic Aspects of Systemic Candidiasis in an Intensive Care", *Unit. Medicrit.* 5:1-12
25. Yang Y.L. (2003) "Virulence factors of *Candida* species". *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36:223-228.
26. Olachea, P.M., Insausti, J., Blanco A., Luque, P., (2010) "Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales", *Med. Intensiva*, pp: 256-267
27. Mendoza M., (2005) "Importancia de la identificación de levaduras", *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 25: 15-23
28. Linares S.M.J., Solís Cuesta F,(2001) "Identificación de levaduras", *Revista Iberoamericana de Micología* ISBN: 84-607-3050-6
29. Lobaina R.T., Zhurbenko R., Rodriguez M.C., Zayas R.Y., Rodriguez R.A. (2010), "Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método de auxonograma modificado", *Rev Cubana Med Trop*;62(1):48-57

30. Alfonso C., López M., Arechavala A., Perrone M.C., Guelfand L., Bianchi M., (2010), "Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance *Candida* Agar", *Rev Iberoam Micol*;27(2):90–93
31. Velazquez B. I.E., Aranda G. J., Camacho C. J.L., Gabriel O. G., (2013), "Epidemiología de infecciones nosocomiales en el Instituto Jalisciense de Cancerología", *Revista Cubana de Salud Pública*; 39(1) 19-31
32. Ombrella A.M., Racca L., Ramos L., (2008), "Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH", *Rev Iberoam*; 25: 12-16
33. Panizo M.M., Reviákina V., Flores Y., Montes W., González G., (2005), "Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp.", *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.25 n.2 Caracas (*versión impresa* ISSN 1315-2556).
34. Cortés J.A., Concha M. A., Cediel T. L.E., Castillo J.S., (2011), "Métodos diagnósticos en candidemia: una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis" *Rev Chil Infect*; 28 (5): 423-428
35. Castrillón Rivera L.E., Palma Ramos A., Padilla Desgarenes C., (2005) "Factores de virulencia en *Candida* spp". *Dermatología Rev Mex*; 49:12-27.
36. Husein H, Cañadas D.G.A, Fernández C.R., González J.E., Cantero H.J., Lardón F.M., (2012), "Candidiasis cutánea generalizada en recién nacido a término". *Biomedica*, 32: 170-3
37. Colmero E.M J., Sanchez O.A., (2008), "Estadística bacteriológica de las infecciones nosocomiales en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos. Nueve años de seguimiento", *Revista de Especialidades Medico-Quirurgicas*, 13 (1): 3-7
38. Mondelli AL, Niero-Melo L., Bagagli E., Camargo CH., Bruder-Nascimento A., Sugizaki MF., Carneiro MV., Villas Boas PJF., (2012), "*Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform)", *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18 (3): 335-339
39. Hernandez S.SE., Rojas H.R., Rueda G.F., (2013) "Determinación de la enzima aspartil proteinasa secretora en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad bucal de diferentes grupos de pacientes", *Foro de Ciencias Químicas y bioquímicas libro de resúmenes* pp. 42

40. Gonzalez S.N., Castañeda N.JL., Saltigeral S.P., Rodriguez MA., Lopez C.C., (2011), "Infecciones Nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales", *Acta Pediatr Mex*, 32(1): 28-32
41. Angeles G.U., Gayosso R.JA., Diaz R.RD., Velazquez C.Y., Marcial Z.C., Zambrana A.MR., Anaya F.VE., (2010), "Factores de Riesgo Específicos en cada tipo de infección nosocomial", *Enf Inf Microbiol*, 30(3): 91-99

ANEXO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

I. SOLUCIONES DE AZUCARES AL 6%.

Azúcar.....6.0g

Agua destilada.....100 ml.

Disolver cada uno de los azúcares en un matraz aforado de 100 ml. Para su esterilización filtrar por Millipore.

II. SOLUCIÓN DEL INDICADOR AL 0.4%

Azul de bromotimol.....0.4 g.

Etanol.....100 ml.

Disolver el azul de bromotimol en el etanol y agitar hasta disolución total para luego aforar en un matraz de 100 mL.

III. SELLO DE VASPAR

Parafina blanca.....5 partes

Aceite mineral.....1 parte

Fundir la parafina y colocar en la parte proporcional con el aceite y esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión durante 15 minutos.

PREPARACIÓN DE MEDIOS:

I. MEDIO AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Peptona de caseína.....5.0 g

Peptona de carne.....5.0 g

Dextrosa.....40.0 g

Agar.....15.0 g

Suspender 65 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

II. MEDIO BASE DE WICKERHAM PARA LA FERMENTACIÓN DE SUSTANCIAS HIDROCARBONADAS.

Extracto de levadura.....4 g

Peptona.....7.5 g

Agua destilada.....1000 ml.

Ajustar pH a 7.0

Disolver cada uno de los componentes y agitar hasta disolución total en el agua. Adicionar de la solución de azul de bromotimol al 5% la cantidad suficiente hasta obtener un color verde esmeralda. Distribuir 4.0 ml en tubos de 16 x 150 mm los cuales deben contener una campana Durham y esterilizar a 15 lb durante 15 minutos. Añadir a cada tubo 1.0 ml. De los azucres al 6 % previamente esterilizados.

III. MEDIO DE CULTIVO SINTÉTICO LIBRE DE FUENTES DE CARBONO (MCS)

Sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄].....5,0 g;
 Hidrógeno fosfato de potasio [K₂HPO₄]0,45 g;
 Di-hidrógeno fosfato de potasio [KH₂PO₄].....0,31 g;
 Hidrógeno fosfato de sodio [Na₂HPO₄].....0,92 g;
 Cloruro de sodio [NaCl].....0,1 g;
 Cloruro de calcio [CaCl₂].....0,05 g;
 Sulfato de magnesio heptahidratado[MgSO₄.7H₂O].....0,2 g;
 L-histidina monoclhidrato.....0,005 g;
 L-triptófano.....0,02 g;
 L-metionina.....0,02 g;
 Azul bromotimol.....0,04 g
 Agar.....20 g.

IV. MEDIO PARA OBSERVAR LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA

K₂HPO₄.....0.5 g
 MgSO₄ · 7H₂O.....0.4 g
 NaCl.....1.0 g
 Extracto de levadura.....0.2 g
 Glucosa.....4.0 g
 Albumina sérica bovina.....0.5 g
 Agar-agar.....4.0 g

Disolver K₂HPO₄, MgSO₄ · 7H₂O, NaCl, extracto de levadura, glucosa, y Agar-agar en 190 mL de agua destilada. Mezclar perfectamente calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Disolver Albumina serica en 10 mL de agua destilada y esterilizar por microfiltración.

Agregar albumina hidratada al medio de cultivo esteril agitar para homegenizar.

V. McFarland Nefelometro

Para la medición de la turbidez, por ejemplo, la densidad bacteriana en cultivos líquidos.

1% cloruro de bario acuoso (BaCl₂)

1% Acido sulfúrico acuoso (H₂SO₄)

10 Tubos con tapón de rosca.

Método:

De acuerdo a la siguiente tabla agregar las cantidades en los tubos.

Tubo #	ml de BaCl ₂ al 1%	ml de H ₂ SO ₄ al 1%	Densidad aproximada de bacterias en millones/ml
1	0.1	9.9	300 = 3 x 10 ²

2	0.2	9.8	600 = 6×10^2
3	0.3	9.7	900 = 9×10^2
4	0.4	9.6	1200 = 1.2×10^3
5	0.5	9.5	1500 = 1.5×10^3
6	0.6	9.4	1800 = 1.8×10^3
7	0.7	9.3	2100 = 2.1×10^3
8	0.8	9.2	2400 = 2.4×10^3
9	0.9	9.1	2700 = 2.7×10^3
10	1.0	9.0	3000 = 3×10^3

Etiquetar y sellar los tubos. Colocar una alícuota del caldo de cultivo dentro de un tubo del mismo diámetro que el estándar. Agregar solución salina necesaria para obtener la turbidez similar al estándar. Esto puede ser usado para estimar la densidad de un cultivo, o para producir un cultivo de la densidad deseada, por ejemplo si se desea una densidad de 10^2 bacterias por mililitro, un cultivo correspondiente al tubo No.1 (3×10^2), es diluido 1:3, para dar 10^2 , entonces diluir otra vez 1:1000

Para un caldo que no está muy claro, el valor de McFarland del medio sin inocular, se resta al valor del cultivo incubado para conseguir la correcta densidad bacteriana. McFarland, Branson D., (1972) *Methods in clinical bacteriology, a manual of test and procedures*, Ed. Charles C Thomas. U.S.A. pp. 106, 219.