



Universidad de Buenos Aires.

*Facultad de Medicina- Farmacia y Bioquímica-
Ciencias Exactas y Naturales.*

**Identificación molecular de especies de
Candida en pacientes quemados.**

**Tesis para optar el título de Magíster en Biología Molecular
Médica María Gabriela M. Badino Varela.**

Dirección: Prof. Dra. María T. Mujica.

Dirección Adjunta: Médica María F. Landaburu.

LUGAR DE TRABAJO: Facultad de Medicina- Universidad de Buenos Aires- Centro de Micología- Dpto de Microbiología, Parasitología e Inmunología en forma conjunta con el Hospital de Quemados. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.

Mayo 2017.

Quiero manifestar mi agradecimiento a algunos de quienes, directa o indirectamente, contribuyeron al resultado de esta tesina:

A la infinita enseñanza, dedicación, interés, ánimo, valioso aporte constante y permanente de la Profesora Dra. María Teresa Mujica, como así también de la Dra. Fernanda Landaburu.

Al incentivo, la gratitud, la pasión por enseñar del Profesor Dr. José Oubiña, por él, mi gran admiración y respeto.

A todos los profesores de cada una de las materias de esta Maestría, que hicieron posible que yo, prestando una formación basada en la medicina de la evidencia, de la emergencia, comience el largo camino de la investigación.

Al tec. Santiago Pola, la Dra. Cecilia Veciño y a la Dra. María Lujan Cuestas.

Al Hospital de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, en especial al Servicio de Laboratorio, a la colaboración, generosidad y aporte invaluable de la Dra. Gabriela Snitman, como a sí mismo del Dr. Jaime Kovensky. A la Unidad de Cuidados Críticos, a su jefe el Dr. José Carballido, al Sr. Director Dr. Armando Escobar y al Lic. Sergio Kaplan.

A los que viven los procesos de mi vida, en especial a mi madre Carmen, a Daniel mi esposo y a mi eterno amado Tomy, que siempre entienden y respetan mi inmersión en la medicina.

	ÍNDICE TEMÁTICO	Número página
1	INTRODUCCIÓN.	1
1-1	Epidemiología de las infecciones fúngicas en pacientes quemados con especial énfasis en especies de <i>Candida</i> .	1
1-2	Características de las especies de <i>Candida</i> más frecuentemente implicadas en pacientes quemados identificación molecular.	2
1-3	Patogénesis de la quemadura.	6
1-4	Factores de Riesgo.	9
1-5	Diagnóstico.	13
1-6	Tratamiento.	14
2	HIPÓTESIS DE TRABAJO.	16
3	OBJETIVOS.	17
4	MATERIALES Y MÉTODOS.	18
4-1	Población– Muestra. Procesamiento por métodos microbiológicos convencionales.	18
4-2	Matriz de variables.	19
4-3	Unidades experimentales o unidades de análisis.	25
4-4	Procesamiento de las muestras.	25
4-4-1	Identificación de las levaduras por los métodos microbiológicas tradicionales.	26
4-4-2	Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>).	26
4-4-2-1	Análisis de un amplicón doble obtenido como producto de amplificación de <i>C. albicans</i> con los cebadores que amplifican el gen <i>HWPI</i> .	28
4-4-3	Identificación molecular del complejo de colonias rosadas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>) <i>C. parapsilosis</i> : <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> .	28
4-4-4	Identificación molecular del complejo de colonias purpuras-blancas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>) <i>C. glabrata</i> , <i>C. bracarensis</i> y <i>C. nivariensis</i> .	30

4.4.5	Procesamiento y análisis de los datos.	31
5	RESULTADOS.	31
5-1-1	Características de la población estudiada.	31
5-1-2	Características de las quemaduras.	32
5-1-3	Antecedentes patológicos de los pacientes quemados.	37
5-1-4	Infecciones bacterianas en pacientes quemados.	38
5-1-5	<i>Candida</i> Score y APACHE II (<i>Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II</i>).	38
5-1-6	Nutrición y tratamiento de pacientes quemados.	39
5-1-7	Mortalidad en los pacientes quemados.	41
5.2	Identificación por los métodos microbiológicos convencionales de las especies de <i>Candida</i> .	43
5-3-1	Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>).	48
5-3-1-1	Análisis de un amplicón doble obtenido como producto de amplificación de <i>C. albicans</i> con los cebadores que amplifican el gen <i>HWPI</i> .	50
5-3-2	Identificación molecular del complejo <i>C. parapsilosis</i> .	53
5-3-3	Identificación molecular del complejo de colonias púrpuras-blancas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, <i>Candida</i>) <i>C. glabrata</i> , <i>C. braccarensis</i> y <i>C. nivariensis</i> .	56
5-4	Muestras clínicas en pacientes quemados.	57
6	DISCUSIÓN.	60
7	CONCLUSIÓN.	74
8	RESUMEN- ABSTRACT.	78
9	ANEXO I-II.	85
10	BIBLIOGRAFÍA.	94

1-INTRODUCCIÓN.

1.1 Epidemiología de las infecciones fúngicas en pacientes quemados con especial énfasis en especies de *Candida*.

La Asociación Argentina de Quemaduras informó que la incidencia de quemaduras en la Argentina es de 5/ 1000 habitantes por año. Se supone entonces que en nuestro país 190.000 personas por año sufren este accidente (1).

En los pacientes quemados la candidiasis es una enfermedad infecciosa emergente, en este grupo el aumento de la sobrevida observado en las últimas décadas ha llevado a una mayor incidencia de las infecciones, y entre ellas a la etiología fúngica (2, 3, 4, 5).

La incidencia de la infección fúngica documentada en la literatura oscila entre el 6,3 % y el 44 % y se estima que entre un 2 y un 21 % de los pacientes quemados desarrollan una candidiasis invasora, con una mortalidad atribuible que oscila entre un 14 y un 70 %. La mortalidad asociada con colonización del tejido quemado fue de 27 % vs. el 76 % en la candidiasis. Sin embargo, son muy escasos los trabajos que evalúan la mortalidad atribuible a los hongos por especies fúngicas en los pacientes quemados (3, 5, 6, 7).

En la infección fúngica de los pacientes críticos quemados *C. albicans* es la especie más frecuentemente implicada, aunque en los últimos años se observa un aumento de las infecciones por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata* (2, 3, 4, 5,7). Con respecto a las infecciones urinarias en estos pacientes el organismo más

frecuente es *C. albicans* (74 %), seguido de *C. parapsilosis* (7 %) y *C. tropicalis* (3 %) (8).

1.2 Características de las especies de *Candida* más frecuentemente implicadas en pacientes quemados identificación molecular.

La especie *C. albicans* es una levadura comensal que reside en las membranas mucosas de las cavidades oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal de los humanos. Normalmente es inofensiva en el hospedero sano, pero su patogenicidad se dispara en el hospedero inmunocomprometido y en aquellos con alteración de las barreras cutáneas como los pacientes quemados. Aunque la invasión inicial depende de los mecanismos inmunes del hospedero, *C. albicans* posee características intrínsecas que promueven su habilidad de causar enfermedad. Entre sus factores de virulencia se incluyen las adhesinas, la conversión morfogénica del microorganismo de la fase levaduriforme a la fase filamentosa, la secreción de enzimas como proteasas y fosfolipasas y la inmunomodulación de los mecanismos de defensa del hospedero (9).

La evolución de este microorganismo de comensal a patógeno es el resultado de su habilidad para colonizar células epiteliales en la mucosa y factores del huésped que promueven la invasión.

C. dubliniensis es una especie que comparte características fisiológicas y morfológicas con *C. albicans*. Los métodos basados en la amplificación de determinados genes por PCR permiten su identificación en forma correcta (10). La incidencia de *C. dubliniensis* en infecciones sistémicas es baja y da cuenta de solo un 2 % de los casos de candidemias (11).

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

C. africana es considerada un aislamiento atípico de *C. albicans* que no forma clamidoconidios, por lo que se ha propuesto considerarla una nueva especie dentro del género *Candida*. *C. africana* es primariamente un patógeno recuperado de muestras genitales y especialmente de secreciones vaginales (12). Estas especies y/o variantes se discriminan fácilmente con el uso de técnicas moleculares (10, 11, 13). En el 2001, Tietz et al. (12) describieron a *C. africana* como una nueva variante de *C. albicans* aislada de humanos en Angola, Madagascar y Alemania. Esta levadura se recuperó de vagina, región perianal y muestras de piel. Posteriormente, se reportó la presencia de *C. africana* en muestras de secreción vaginal aisladas de Arabia Saudita, España e Italia. Es de destacar, la identificación de *C. africana* por Odds et al. (14) a partir de una muestra de sangre proveniente de Chile, sugiriendo que esta levadura podría estar geográficamente más difundida y presente en diversos materiales clínicos. Romeo et al. (13) describieron un método molecular que permite discriminar entre *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* usando un par de cebadores derivados del gen que codifica para una proteína de la pared de la hifa 1 (HWP1: *hyphal wall protein*). La HWP1 es inducida durante la formación del tubo germinativo y es característica de cada una de estas tres especies. Las características fenotípicas compartidas entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* han llevado en el pasado a una incorrecta identificación de los aislamientos de *C. dubliniensis* y *C. albicans*. En los últimos años se describieron diversos métodos fenotípicos para la identificación de *C. dubliniensis* y su diferenciación de *C. albicans* (10, 14). Sin embargo, variaciones fenotípicas en *C. dubliniensis* pueden dar lugar a dificultades para su correcta identificación (12,15). Por ello, las técnicas moleculares son más adecuadas

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

para la exacta identificación y diferenciación de *C. albicans* (16, 17, 18) de las otras especies de *Candida* relacionadas (10).

C. parapsilosis puede ser encontrada en la piel y en mucosas (20). Es conocida por su capacidad para formar biopelículas en catéteres y otros dispositivos implantados (21). Puede propagarse a través de las manos del personal de salud o en fómites; y la persistencia en el ambiente hospitalario se asocia particularmente con candidemias asociadas a catéteres en pacientes neutropénicos y en aquellos que reciben nutrición parenteral (19, 22). La implementación de técnicas de control, como la higiene de manos y la apropiada colocación del catéter (23) son medidas de importancia para disminuir las infecciones asociadas a este patógeno nosocomial. Es considerada la menos patógena de las especies con una mortalidad cruda atribuible del 30 %, mientras que la mortalidad media de las otras especies alcanza al 78 % (24). *C. parapsilosis* es un complejo de tres especies (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*) que los métodos microbiológicos convencionales no pueden diferenciar. Estudios moleculares (25), permitieron establecer que *C. parapsilosis* es un complejo de tres grupos (I, II y III). Detallados estudios, que incluyen a MLST (*Multilocus Sequence Typing*) reconocieron a *C. parapsilosis* Grupo I, *C. orthopsilosis* Grupo II y *C. metapsilosis* Grupo III. Actualmente, se cuentan con cebadores específicos derivados de la región de los ITS (*internally transcribed spacer*), esto es ITS1–5.8 rRNA–ITS2 para cada una de las especies del complejo de *C. parapsilosis* que permiten su identificación (26).

La rápida identificación de las cepas involucradas en la infección y la diversidad de los patrones genéticos circulantes son temas de importancia médica ya que su conocimiento puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para prevenir y tratar

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

las infecciones. *C. parapsilosis* es sensible a la mayoría de los compuestos antifúngicos en uso actualmente, pero se han observado valores elevados de CIM (concentración inhibitoria mínima) para las equinocandinas debido a una mutación intrínseca en el gen *FKS* (gen que codifica para la glucansintetasa) (19).

C. glabrata ha surgido como un importante patógeno oportunista, puede ser adquirido, directa o indirectamente, de las superficies ambientales contaminadas. Sin embargo, tras el extendido y el creciente uso de terapias inmunosupresoras, junto con el tratamiento con antibióticos (en especial el uso de piperacilina-tazobactam y de vancomicina), la frecuencia de las infecciones de la mucosa y sistémicas causadas por *C. glabrata* ha aumentado de manera significativa, en especial en pacientes ancianos o con algún proceso oncológico subyacente.

Recientemente, se describieron dos especies muy relacionadas con *C. glabrata* estas son, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*. Estas especies son difíciles de identificar y basado en las características fenotípicas se interpretan a todas las especies del complejo como *C. glabrata* (2, 27). La identificación molecular se realiza con una PCR para el gen *RLP31* que codifica para una proteína ribosomal de 60S (28).

C. tropicalis, se puede asociar con el desarrollo de una infección invasora, pues su nicho ecológico se encuentra especialmente en el tracto gastrointestinal en huéspedes susceptibles (29). Afecta con más frecuencia a pacientes con enfermedad hematológica o receptores de células progenitoras hematopoyéticas y suele adquirirse, mediante un mecanismo de transmisión endógeno, en los primeros días de hospitalización en ausencia de profilaxis antifúngica (30). *C. tropicalis* parece mostrar una mayor presencia en neutropénicos en comparación con *C. albicans* y otras especies no *C. albicans* (31).

C. krusei también es un importante patógeno entre pacientes oncohematológicos y trasplantados de células progenitoras hematopoyéticas, y en especial los que reciben profilaxis con fluconazol. Esta especie representa el 2 al 4 % de las infecciones del torrente circulatorio (32).

1.3 Patogénesis de la quemadura.

La lesión cutánea provocada por la agresión térmica interfiere con las funciones que posee la piel. Estos son: el control de la temperatura corporal, por su gran superficie, vascularización y producción de sudor, la protección de las infecciones y el control de los fluidos corporales (33).

La gravedad de la lesión celular está determinada por tres factores fundamentales: intensidad, duración de la exposición y la conductancia del tejido expuesto. Por debajo de 44 °C de temperatura corporal, la capacidad de disipar el calor del organismo impide la quemadura. Cuando la temperatura es de 44 °C, sólo si el tiempo de exposición supera las seis horas se produce lesión celular. Por el contrario, es necesario menos de 1 segundo para producir lesiones cuando la temperatura alcanza o supera los 70 °C. El grado de conductancia del tejido influye, aunque es probable que lo haga en menor medida que la potencia de la fuente térmica (34).

Existe un efecto directo de destrucción celular por el calor y la aparición de edema en el tejido quemado. Este edema puede afectar al tejido quemado y generalizarse en el caso de quemaduras que afectan más del 20 % de la superficie corporal total. La presencia de edema en los tejidos quemados provoca una disminución de la volemia que se agrava por una evaporación masiva asociada a la pérdida de la regulación hidroelectrolítica que normalmente efectúa la piel íntegra. Tras la quemadura la respuesta

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

edematosa tisular sigue una evolución por fases. Inicialmente aparece un incremento de la permeabilidad prácticamente inmediato por la liberación de histamina, que continúa con una fase retardada que se prolonga entre 8 y 48 horas. La respuesta retardada tiene dos efectos fundamentales, la lesión directa a las células endoteliales y el aumento de la permeabilidad, que permiten el paso de células y macromoléculas que se mantienen días después de la lesión (35).

Se han involucrado numerosos efectores locales del edema, entre éstos, la histamina que es un factor importante también en la fase de respuesta retardada provocando no sólo edema en el área quemada, sino también a distancia, la serotonina y los derivados de la acción de la ciclooxigenasa sobre el ácido araquidónico, como los leucotrienos y los tromboxanos. El ácido araquidónico puede estar involucrado en la vasoconstricción renal observable tras las quemaduras y en los trastornos hemodinámicos y reológicos (36).

Se produce una masiva activación del complemento a través de la vía alterna que incluso lleva al agotamiento del sistema, con el riesgo de desencadenar infecciones. Los radicales libres de oxígeno están involucrados en la lesión endotelial, hay un incremento de la actividad de estos y de la activación de los neutrófilos y macrófagos. Este mecanismo no sólo sucedería a nivel local, sino que, tendría un importante papel en la producción del daño térmico sistémico. Por ejemplo, en las lesiones agudas de la mucosa gástrica, en la lesión endotelial pulmonar y la hemólisis de los glóbulos rojos (37). Los leucocitos polimorfonucleares se adhieren a la pared de los vasos, se acumulan en las lesiones y aumentan la resistencia venosa. Todo esto produce edema, incremento en la viscosidad de la sangre, aumento del volumen celular sanguíneo en vasos pequeños

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

generando trombosis, es decir la zona de hiperemia y de estasis puede convertirse en una zona de coagulación.

La disfunción cardíaca posquemadura se ha relacionado con una lesión secundaria a radicales libres (38).

Las endotelinas se producen como respuesta del endotelio a la lesión, a la isquemia o a mediadores inflamatorios, generando una acción vasoconstrictora renal y pulmonar con efecto broncoconstrictor, ulcerogénico e inotrópico cardíaco negativo. Los niveles sistémicos de endotelinas en pacientes con quemaduras que afectan más del 20% de la superficie corporal total son al menos cinco veces mayores que los de los voluntarios sanos. Asociado a esto se han observado grandes incrementos de prostaglandina E2 (39). La fuga proteica en los tejidos quemados es causa de la disminución en la presión oncótica del plasma y causa edema a distancia en los tejidos sanos, incluido el pulmón, en los cuales se produce pérdida de agua y solutos de moléculas pequeñas (40).

Tras la quemadura se observa que existe translocación intestinal. Se producen cambios hemodinámicos que afectan a la microcirculación del tubo digestivo, lo que provoca la aparición de lesiones en la mucosa gástrica (41), y una disminución de un 50% del flujo mesentérico, sin disminución del gasto cardíaco, ni de la presión arterial media, ni del flujo urinario. La vasoconstricción gastrointestinal posquemadura disminuye el aporte mesentérico de oxígeno y hace caer el pH de la mucosa intestinal. Con ello se elevan los niveles de endotoxina en la vena mesentérica superior, quizá reflejando que existe un incremento en la permeabilidad intestinal a las moléculas tanto de alto como de bajo peso molecular (42). Desde un punto de vista clínico, lo verdaderamente importante

es que se demostró la existencia de correlación entre el aumento de la permeabilidad y la tasa de infecciones tempranas, consideradas éstas como las que ocurren en las primeras dos semanas posquemadura (43).

Los impulsos aferentes originados en las zonas lesionadas al llegar al hipotálamo aumentan el nivel de catecolaminas y la alteración de la relación entre insulina y glucagón originan un aumento del metabolismo, con el consecuente aumento del consumo de oxígeno.

1.4 Factores de Riesgo.

En estos pacientes coexisten numerosos factores de riesgo conocidos para la colonización e infección por *Candida*.

1-El uso de **catéteres intravasculares**: el CDC (Centers for Disease Control and Prevention), ha demostrado que las unidades de quemados de cuidados intensivos (UCI) tienen las tasas más altas de infección del torrente sanguíneo principalmente en pacientes con catéteres venosos centrales (44). La colonización del catéter cercano al área quemada es más frecuente, por lo que debe evitarse la inserción sobre dicha área o hacer recambios frecuentes. Se ha planteado también el cambio periódico de las vías como prevención de las bacteriemias relacionadas. Sin embargo, esta rotación de catéteres en forma sistemática es controvertida (45).

2-La **ventilación mecánica invasiva** por más de 48 hs (15): la quemadura **directa** y la **inhalación**, son causas de lesión tóxica y química del epitelio traqueobronquial como consecuencia de la quemadura. Esto origina el síndrome de distress respiratorio agudo, aumentando así el riesgo de infección. Las temperaturas de más de 150 °C, causan lesiones directas en cara, orofaringe y vía aérea superior por

encima de las cuerdas vocales. Esto es debido a la gran capacidad de absorber calor que poseen la nasofaringe y orofaringe. En presencia de vapor (que posee una capacidad de almacenar calor 4000 veces superior a la del aire), o cuando las temperaturas son superiores a 500 °C, es posible la afectación de la vía aérea por debajo de las cuerdas. El calor provoca una lesión inmediata en la mucosa que se traduce en eritema, edema (compromete la permeabilidad de la vía aérea, e impide abrir la boca o extender el cuello) y ulceración.

Las lesiones por inhalación (LIH), son de mayor gravedad que las producidas por calor. La afección puede localizarse en las vías aéreas superiores, inferiores o ambas, influyendo en la localización la solubilidad y el tamaño de las partículas, así como la duración de la exposición. La presencia de LIH en un quemado aumenta la mortalidad relacionada con la edad y el tamaño de la quemadura en un 20 % a 40 %, en diferentes series y si además hay una neumonía, se incrementa en un 60 % por encima del estimado por la edad y la extensión de la quemadura. La mortalidad de la LIH sin quemadura fue de 10% pero, en los que además había quemaduras fue de 30 % a 50 % (46).

3-La extensión de la superficie corporal, profundidad de la quemadura, el índice de Garcés y el sitio de la quemadura: con una superficie total afectada superior al 30 % aumenta el riesgo, al igual que con una quemadura tipo B. Según algunos autores, el riesgo de adquisición de infección micótica disminuye con una cobertura precoz del área de la quemadura con injertos (2, 4).

La escarectomía del tejido necrótico se ha mencionado como un factor protector de infección. Lloyd et al. informaron que la incidencia de sepsis descendió del 6 % al 1 %

con la incisión temprana y constataron una reducción significativa en la mortalidad con la escarectomía precoz, en comparación con el tratamiento quirúrgico convencional.

En pacientes con quemaduras, el sitio más común de infección por hongos es la propia quemadura, aunque los pacientes también presentan infección de las vías respiratorias y urinarias. Debemos destacar que es poco frecuente el aislamiento fúngico en hemocultivos .

Los pacientes con mayor superficie corporal total quemada que deben ser sondados, son propensos a mostrar infección urinaria por hongos levaduriformes en forma más temprana.

4-Presencia de **infecciones bacteriana previas o concomitantes** y el **uso previo de antimicrobianos**, alteran la flora del tracto gastrointestinal, la de la piel y promueven el crecimiento de levaduras (47, 48). El injerto se considera el mejor tratamiento definitivo y ha resultado útil en la prevención de las infecciones (49).

5-La **nutrición parenteral total**.

6- Alteraciones del **sistema inmunológico**, así como la terapia con esteroides.

Las células T CD4⁺ y las Th17 son productoras de la citoquina IL-17, descrita recientemente como efectora en la resistencia antifúngica del huésped (16). Después de una lesión por quemaduras es elevada la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias (50). La IL-10, una citoquina comúnmente detectada en el suero de pacientes quemados, se demostró que era inhibitoria sobre la generación de células Th17. La falta de acción de las células Th17 en pacientes con quemaduras graves puede explicar la mayor susceptibilidad a las infecciones por especies de *Candida*.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

La IL-10 se asocia con la aparición de sepsis y de una alta tasa de mortalidad en pacientes con quemaduras graves. Durante la infección, IL-10 inhibe la actividad de las células Th1, células NK y macrófagos, todos los cuales juegan un papel en el control óptimo del patógeno invasor (18). La IL-10 permite la evasión de *Candida* spp. de la defensa del huésped y se asocia a la persistencia de la infección del patógeno.

7-La **profilaxis de la úlcera de estrés**, con inhibidores de la bomba de protones y/o ranitidina.

8-**APACHE II** (*Score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) - **Candida Score**. Los pacientes con mayor riesgo de candidiasis invasora son aquellos críticamente enfermos, con más de un factor de riesgo, y que presentan puntajes elevados en las escalas de (APACHE II). Este *score* es un sistema de valoración pronóstica de mortalidad, que consiste en detectar los trastornos fisiológicos agudos que atentan contra la vida del paciente. Se fundamenta en la determinación de las alteraciones fisiológicas y de parámetros de laboratorio, cuya puntuación es un factor predictivo de mortalidad. Este índice es válido para un amplio rango de diagnósticos, fácil de usar y que puede sustentarse en datos disponibles en la mayor parte de las UCI (51). El índice APACHE II es calculado en el momento del ingreso de internación del paciente, por lo tanto brinda un perfil momentáneo del estado, no pudiendo aportar información dinámica (52).

Un grupo español ha desarrollado un sistema de puntuación (*score*) que permite identificar a los pacientes críticos no neutropénicos, con sospecha de candidemia, que se beneficiarían con un tratamiento antifúngico temprano. El *Candida Score* se basa en el valor predictivo de diferentes factores de riesgo previamente demostrados. La puntuación asignada para cada factor de riesgo es: nutrición parenteral 1, cirugía previa 1,

colonización multifocal por *Candida* 1 y sepsis grave 2. Según los autores del estudio, un *Candida Score* superior a 2,5 puede seleccionar a los pacientes que se beneficiarían de un tratamiento antifúngico temprano (sensibilidad del 81 % y especificidad del 74 %). Posteriormente, se validó de forma prospectiva este índice y se demostró la hipótesis de que menos del 5 % de los pacientes con un *Candida Score* menor de 3 desarrollan una candidiasis (53).

9- La **hospitalización** en la UCI permite la transmisión horizontal de *Candida*, el riesgo de contraer y transmitir infecciones fúngicas de su entorno inmediato en una unidad de quemados y durante el tiempo de su hospitalización, y la colonización por *Candida* constituyen todos factores de riesgo independientes para el desarrollo de la candidiasis invasiva (27). Entre el 3 y el 60 % de los pacientes pueden ser colonizados por *Candida* spp. durante la hospitalización y menos de 5% de ellos desarrollará una candidemia. El grado de colonización por *Candida* en los pacientes críticos puede predecir el desarrollo de infecciones posteriores. Se sugiere que la presencia de *Candida* spp. en más de dos sitios del cuerpo puede justificar el inicio de la terapia antifúngica (54).

1.5 Diagnóstico.

Para el diagnóstico de las infecciones en quemados resultan importantes las técnicas histopatológicas. La prueba de Papanicolaou mostró aceptable sensibilidad y especificidad. Esto ha llevado a sugerir que se puede confiar en la citología para iniciar el tratamiento antifúngico en forma empírica para reducir demoras por la confirmación del cultivo. Di Lonardo y col. constató la infección fúngica en el examen histopatológico en 16 de 176 muestras de biopsias en 40 pacientes (55).

Mc Manusetal llevó a cabo la comparación de la microbiología cuantitativa y de la histopatología en biopsias de heridas por quemaduras encontrando una concordancia de 96,1% entre cultivos negativos y ausencia de infección invasiva. En contraste, sólo el 36% de las muestras con cultivos positivos muestran un equivalente histológico (56). Resulta así, inconstante la correlación entre la histopatología y la identificación de los hongos por cultivo (57).

1.6 Tratamiento.

El tratamiento inicial adecuado del paciente quemado, que disminuye la morbi-mortalidad, se basa en tres pilares: 1-la **resucitación hídrica precoz** del shock hipovolémico secundario a las quemaduras, mediante diferentes fórmulas (estabilización hemodinámica sistémica y local). 2-asegurar la **ventilación y oxigenación** (intubación orotraqueal en LIH o estado de shock). 3-el tratamiento **quirúrgico** (bañoterapia, debridamiento, escarectomía, escarotomía).

Las lesiones vasculares que se producen en las quemaduras tienen gran importancia. Por una parte, se observan lesiones producidas directamente por el calor y, por otro lado, las producidas por la vasoconstricción, la agregación plaquetaria y la activación del sistema de coagulación que tiene lugar inicialmente. Así, la posibilidad de restauración de la herida va a estar directamente relacionada con la afectación mayor o menor de los vasos dérmicos, lo que va a influir en la producción de tejido de granulación que colabora en la reparación por cicatrización de las quemaduras. En aquellos casos en los que la zona quemada no comprometa a todo el espesor de la piel se inicia un proceso (favorecido por el ambiente anóxico de la herida) que afecta a la formación del tejido de granulación, con proliferación fibroblástica y de macrófagos que segregan factores

angiogénicos estimuladores de la formación de la red capilar a partir de los vasos no dañados, lo que dará lugar al soporte suficiente para la reepitelización de la superficie por multiplicación de las células epiteliales.

Cuando la quemadura afecta a todo el espesor cutáneo, la producción de tejido de granulación es más lenta, circunstancia que facilita la posibilidad de infección, además de dificultar la reepitelización al estar afectados también los anexos cutáneos. En estos casos es necesario ayudar a la cicatrización con injertos.

La escisión de la escara (debridamiento) debe realizarse tan pronto como sea posible. Idealmente, siempre que el estado hemodinámico del paciente lo permita, la escisión quirúrgica de la quemadura debe realizarse dentro de las primeras 72 horas (entre el segundo al quinto día posquemadura). Las ventajas de la realización de esta escisión precoz estriban, por un lado, en la esterilidad de la escara y, por otro, en que a partir de las 72 horas posquemadura, se desarrolla una respuesta hiperémica a la inflamación que puede asociarse a una mayor pérdida sanguínea durante el acto quirúrgico (58).

El tratamiento tardío abarca: 1- el tratamiento **quirúrgico** donde se diferencia la bañoterapia, el debridamiento, escarectomías, escarotomías, fasciotomías e injertos. 2- el tratamiento **farmacológico**.

La infección por *Candida* puede ocurrir entre la primera y tercera semana después de la quemadura. El reconocimiento y el tratamiento de estas infecciones con terapias antifúngicas puede resultar en la disminución de la morbilidad y mortalidad asociada a estas infecciones en pacientes con quemaduras (59).

Así, Morrell et al. (60) comunicaron que, en los pacientes con candidemia, un retraso del tratamiento superior a 12 horas o la administración de un antifúngico inadecuado era suficiente para observar un aumento significativo de la mortalidad.

Para lograr una importante reducción de la colonización bacteriana, disminuir el riesgo de sepsis y de muerte, es prioritario combinar la escisión de la quemadura, con el injerto de piel y la aplicación de antimicrobianos tópicos eficaces (61). Se usan, la crema con sulfadiazina de plata, eficaz contra microorganismos incluyendo *Pseudomonas* spp. con efectos secundarios mínimos, y el acetato de mafenida, que tienen actividad de amplio espectro y penetra el espesor completo de la escara. Se ha postulado que el uso de agentes antimicrobianos tópicos ha contribuido a un cambio en el espectro de los microorganismos hacia una mayor importancia de los hongos como patógenos en unidades de quemados (62).

El tratamiento farmacológico para las infecciones fúngicas se basa principalmente en tres clases de drogas: a- polienos (anfotericina B (AMB), nistatina), b- azoles de espectro extendido (fluconazol, itraconazol, voriconazol) y c- equinocandinas. Azoles y equinocandinas son eficaces y menos tóxicos que la anfotericina B para el tratamiento de pacientes con candidemia (29).

2-HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Los pacientes quemados son susceptibles a las infecciones por especies de levaduras y en particular por *Candida*. Existe correlación entre la identificación de las levaduras por métodos convencionales de laboratorio y por medio de reacciones de amplificación de la polimerasa en cadena (PCR). Los datos de las historias clínicas se

relacionaron con las causas de quemadura, edad, sexo, extensión de la superficie, profundidad, antecedentes patológicos, infecciones concomitantes, muestras clínicas y tratamientos en los pacientes.

3-OBJETIVOS.

-Caracterizar a la población de los pacientes quemados según antecedentes personales: edad, datos clínicos (por ejemplo antecedentes patológicos, superficie corporal quemada, profundidad y se consignara cual fue la causa del accidente).

-Determinar la incidencia de la infección por especies de *Candida* en la población de quemados.

-Establecer la prevalencia de las distintas especies de *Candida*. en la población estudiada.

-Identificar mediante técnicas moleculares a *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana*, *C. tropicalis*, Complejos de *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis* sensu estricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*) y de *C. glabrata* (*C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis*) en los materiales clínicos estudiados.

-Comparar las identificaciones microbiológicas convencionales con los métodos moleculares.

-Determinar la mortalidad para el complejo *C.parapsilosis*, *C.glabrata* *C.albicans* y *C.krusei* en la población estudiada.

4-MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Población– Muestra-Procesamiento por métodos microbiológicos convencionales.

La población blanco de este estudio fueron los pacientes quemados con infección fúngica documentada, internados durante el período comprendido entre enero 2011 y diciembre del 2014 en el área de internación de Cuidados Críticos del Hospital Municipal de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.

Los datos se recuperaron de las historias clínicas de los pacientes y los aislamientos fúngicos se obtuvieron de la colección de cultivo de especies de *Candida* que el Laboratorio del Hospital de Quemados conserva a -20 °C.

Criterios de inclusión: pacientes quemados adultos, mayores de 18 años de edad, de distinto sexo, con evidencia clínica de infección fúngica documentada obtenida de una muestra representativa: biopsia del tejido viable profundo quemado y/o hemocultivos y/o urocultivos y/o aspirado traqueal y/o cultivo de punta de catéter venoso central. La evidencia clínica de infección, fue definida en base a los signos y síntomas de infección como: fiebre, inadecuada perfusión periférica, alteración del estatus neurológico, disminución en el ritmo diurético, drenaje de material purulento, eritema o edema del margen de la superficie quemada, separación inesperada de la escara, necrosis localizada, lesiones vesiculares y/o falta de adherencia de los injertos. La presencia de infección se confirma por el aislamiento microbiológico en muestras de biopsia del tejido viable profundo quemado y/o hemocultivos y/o urocultivos y/o aspirado traqueal y/o cultivo de punta de catéter venoso central.

Criterios de exclusión: pacientes neutropénicos (recuento < 500 neutrófilos/mm³) y menores a 18 años de edad.

Aislamientos clínicos: los aislamientos clínicos que se estudiaron provienen de diferentes muestras clínicas de los pacientes quemados: hemocultivo, muestra respiratoria (aspirado traqueal), orina, biopsia de tejido quemado viable y cultivo de la punta de catéter venoso central.

4.2 Matriz de Variables.

-Obtención de datos: Se diseñó un cuestionario estandarizado que fue completado a partir de los datos obtenidos de las historias clínicas (edad, sexo, antecedentes patológicos, porcentaje de superficie corporal quemada, profundidad y localización de la quemadura, lesión por inhalación, causa de quemadura, muestras clínicas que permitieron la documentación de la infección, naturaleza del tratamiento quirúrgico, colocación de vías venosas centrales, tipo de nutrición, intubación orotraqueal, uso de antibióticos, antimicóticos, uso de inotrópicos, riesgo de infección bacteriana, patologías concomitantes, días de internación, *score* de mortalidad –APACHE II, *Candida Score*- y mortalidad (Anexo I). Se definió para las variables, en forma teórica y operativa, especificando una valoración posible para cada una de ellas. (Anexo II).

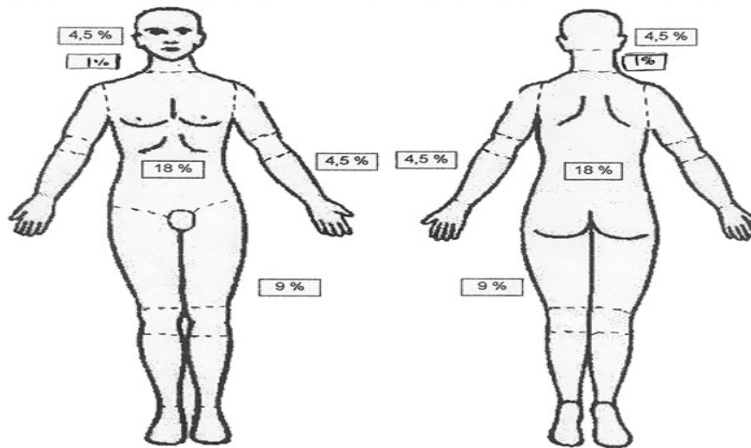
-Cálculo de Extensión de la Quemadura:

Los métodos de cálculo de dicha extensión que se usó en este trabajo fueron:

A) **Regla de la palma de la mano del paciente:** es un método rápido y aproximado.

La palma de la mano de cada paciente equivale al 1% de su superficie corporal (63).

B) **Regla de los nueves:** se muestra en el siguiente esquema (64).



Esquema de estimación de la quemadura, utilizando la regla de los nueve.

En este trabajo, se dividió la extensión de quemadura de superficie corporal de manera aleatoria en 5 grupos representados con números abstractos del 0 al 4. Estos grupos de extensión son: 0= 0%-10%; 1=11%-30%; 2=31%-50%; 3=51%-70%; 4=71%-100%.

-Cálculo de la profundidad de la Quemadura:

Se las clasifica en grados (I al IV) o en tipos A-AB y B.

En este estudio elegimos categorizar por grados del I al IV.

Grado I: Son las más leves, y el ejemplo más frecuente son las quemaduras por exposición a los rayos ultravioletas del sol, que rara vez tienen significado clínico. Se trata de lesiones epidérmicas con áreas eritematosas producidas por la vasodilatación de los capilares dérmicos, y dolorosas debido a que las terminaciones nerviosas, aunque permanecen intactas, están irritadas por el edema intersticial. Curan espontáneamente sin cicatriz pero pueden dejar una zona de hiperpigmentación.

Grado II: Se dividen en superficiales y profundas. Las superficiales afectan a la epidermis y a la dermis papilar. La característica de este grado es la formación de ampollas por el depósito de exudado que sale al intersticio desde los capilares dilatados y

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

con lesiones endoteliales producidas por el calor. Por debajo de la ampolla la quemadura tiene color rojo intenso, siendo más dolorosa que las anteriores, pero si no existen complicaciones se reepitelizan en dos semanas (63, 65).

En las profundas la quemadura afecta a la dermis reticular pero respeta parte de los anexos cutáneos. También son de color rojo, aunque menos intenso que en las anteriores, no hacen ampollas y son poco dolorosas o indoloras debido a la destrucción de las terminaciones nerviosas; sin embargo, está conservada la sensación de presión al encontrarse estos receptores situados más profundos que el área lesionada. La curación es más retardada (hacia la tercera semana) y la reepitelización más lenta. En estas quemaduras se pueden producir cicatrices hipertróficas.

Grado III: Afectan a todo el espesor de la piel y tienen un color variable, marrón, amarillo o blanquecino, con una consistencia parecida a cartón; pueden verse vasos trombosados. Si la quemadura se extiende a mayor profundidad que la zona donde están las glándulas sebáceas, la curación sólo se puede hacer por la proliferación epitelial desde los bordes no afectados y se produce una considerable contractura causada por el tejido fibroso. Para acelerar la curación y reducir la incidencia de contractura si la quemadura es mayor de 1-2 cm se debe hacer un injerto.

Grado IV: Son aquellas que afectan a estructuras profundas, músculos, tendones o huesos, o bien son aquellas no profundas, pero muy extensas y que afectan a zonas como cara, cuello, axila, pies o genitales. En estas quemaduras el tratamiento será el desbridamiento, siendo necesaria, en ocasiones, la amputación de un miembro (65).

Superficial- tipo A: Eritema. Hiperalgnesia. Flictenas. Buen relleno capilar.

Intermedia-tipo AB: Hipoalgesia. Lecho rosado, pálido o moteado. Flictenas o no (signo del dedo positivo). Regular a nulo relleno capilar.

Profunda- tipo B: Analgesia. Lecho blanco, pardo, marrón. Escara dura. Nulo relleno capilar.

Prueba del relleno capilar: Se ejerce presión sobre la superficie quemada y se obtendrá o no retorno circulatorio, según la profundidad de la lesión, salvo estado de shock.

Signo del dedo: Ante la falta evidente de ampollas, se presiona con el dedo la zona quemada y se arrastra la piel con el objeto de desprenderla, dejando en descubierto un lecho cruento rosado pálido o blanquecino propio de quemaduras intermedias (61).

-Tratamiento quirúrgico.

Desbridamiento simple: eliminación de todas las flictenas, restos epidérmicos y material adherido a la quemadura. Requiere tan sólo la eliminación del tejido no viable, seguida de un frotado de la herida con solución salina templada y de la aplicación de antibióticos tópicos como la sulfadiazina argéntica para controlar el crecimiento bacteriano en la quemadura. La aplicación de antibióticos tópicos activos contra los gérmenes patógenos tan pronto como sea posible resulta de gran importancia, ya que datos experimentales y clínicos indican que existe crecimiento bacteriano a las 6 horas tras la quemadura.

La eliminación precoz de las áreas quemadas y su cobertura, ya sea temporal o definitiva, minimizan de forma significativa el riesgo de complicaciones infecciosas y en consecuencia la mortalidad.

Las quemaduras que afectan sólo a la dermis superficial (grados I y IIA) curan dentro de las 3 primeras semanas sin dejar apenas secuelas funcionales o estéticas, gracias a que las células epiteliales residuales, que quedan ancladas en la profundidad de la dermis, permiten una rápida regeneración celular (66).

En líneas generales podemos decir que el tratamiento quirúrgico precoz de las quemaduras constituye el procedimiento de elección en aquellas quemaduras dérmicas profundas (grado IIB) de extensión significativa, así como las de espesor total (grado III) y subdérmicas (grado IV), en las que la destrucción de la totalidad de las células basales de la dermis imposibilitaría la curación espontánea de la quemadura en las primeras tres semanas (67).

Todos los tipos de quemaduras deben cubrirse con gasa vaselinada para evitar la profundización por desecación.

Escarectomía: esto es la eliminación de la escara (tejido cutáneo desvitalizado cuyo componente principal es la piel y a veces el tejido subyacente, que se tornan duros, secos y de un color blanco perlado, grisáceo o negruzco). Existen dos tipos de escarectomías, la escisión tangencial (eliminar láminas de tejido no viable hasta obtener un tejido viable, sangrante, apto para injertar) y la escisión a fascia (eliminación de la piel y tejido subcutáneo siguiendo el plano superficial) (58).

Escarotomías: incisión quirúrgica de un tejido necrótico producido por una quemadura grave. Es necesaria para evitar que el edema aumente la presión intersticial que pueda afectar a la repleción capilar, producir isquemia o que impida la expansión torácica y que comprometa la ventilación (figura 1).



Figura 1: Escarotomía de tronco en hombre de 20 años con 70% de superficie corporal quemada. Se visualizan dos incisiones longitudinales paralelas en sentido craneocaudal en todo el espesor de la escara.

Indicaciones: quemaduras profundas (tipo B) circulares en los miembros y el cuello quemaduras tóraco-abdominales con mala excursión respiratoria (58).

Fasciotomías: incisión quirúrgica de una fascia o aponeurosis para aliviar la tensión o presión y tratar la pérdida resultante de la circulación a un área de tejido o músculo así mejorar síndromes compartimentales por edema muscular inextensible que compromete la circulación profunda (figura 2).

Indicaciones: quemadura eléctrica directa, quemadura profunda (carbonizaciones), para determinar amputaciones posteriores, quemaduras en las que se efectuaron escarotomias tardías (63).



Figura 2: Fasciotomía del antebrazo correspondiente al compartimiento anterior: se observa la incisión longitudinal de la fascia o aponeurosis, quedando al descubierto el compartimiento muscular y de tendones.

Cobertura de la herida: una vez eliminada la escara, y tras obtener un lecho de tejido viable, se ha de proceder a la cobertura de la herida. Para ello, disponemos de diferentes métodos que pueden ofrecer ya sea una cobertura definitiva, como los autoinjertos; o temporal, como los sustitutos de piel (58).

Autoinjertos: siempre que se disponga de piel sana suficiente, debe realizarse la cobertura de la quemadura mediante autoinjertos. A las áreas de donde se obtiene piel se denominan zonas donantes, la piel debe ser obtenida de todas aquellas zonas no quemadas excepto la cara y las manos (66).

Sustitutivos de piel: en los grandes quemados, donde la disponibilidad de piel para una cobertura definitiva es escasa, puede recurrirse al empleo de sustitutos de piel como cobertura temporal de las zonas cruentas hasta disponer de autoinjertos suficientes. Estos son: los homoinjertos, injerto realizado con un tejido de otro individuo de la misma especie que el sujeto que lo ha de recibir; los heteroinjertos (por ej: piel de cerdo) y por último los injertos de cadáver (aloinjertos) que constituyen una excelente cobertura temporal ya que, además de proteger a la quemadura de la desecación, presenta propiedades antibacterianas que contribuyen a evitar la infección (67).

4.3 Unidades experimentales o unidades de análisis.

Cultivos de *Candida* spp constituyeron la muestra en estudio obtenidos de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

4.4 Procesamiento de las muestras.

Se procedió a cultivar una suspensión de la colonia de *Candida* spp en solución fisiológica estéril proveniente de pacientes quemados, durante 48 hs a 37 °C en el medio CHROMagar Candida (CHROMagar Candida Company, Paris, France). Este medio

cromogénico permite evidenciar la presencia de levaduras, las posibles asociaciones entre ellas y por el color de las colonias y su aspecto lograr la identificación microbiológica de cierto número de especies de *Candida*.

4.4.1 Identificación de las levaduras por los métodos microbiológicos tradicionales.

Los aislamientos se identificaron de acuerdo al color de las colonias desarrollado en el medio cromogénico y al estudio micromorfológico en lámina con agar leche con Tween 80 al 1 % (68). A las colonias verdes se les estudió la producción de clamidoconidios sobre medio de Staib para la eventual identificación de *C. dubliniensis* (10, 69). A las colonias púrpuras, que no formaron pseudohifas en la lámina en agar leche con Tween 80 al 1 % se les investigó la asimilación de trehalosa y sacarosa para la eventual identificación de *C. glabrata* mediante el uso de tabletas de diagnóstico (Rosco Diagnostica A/S, Dk 2630 Taastrup) (70). Por último, se completó la identificación de las levaduras mediante el uso del método semiautomatizado API ID32C (BioMérieux, Francia). Las levaduras obtenidas se conservaron a -20 °C en agua destilada a temperatura de 4 °C para los posteriores estudios moleculares.

4.4.2 Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*).

El ADN genómico se extrajo durante el proceso de amplificación por PCR (71, 72). La PCR se realizó con los siguientes cebadores CR-f: 5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3'/ CR-r: 5'-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3' y con el empleo de la siguiente mezcla de reacción: buffer PCR 1X, 0,200 mM de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs); 0,4 µM de cada iniciador, 10 µl de suspensión de levadura, 1,25 U de Taq DNA Polimerasa (Life Technologies Corp.), en un volumen

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

final de reacción de 50 µl. La amplificación se realizó en un termociclador (Minicycler DNA thermal cyler, TM MJ Research Inc. USA) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización del ADN a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 53 °C durante 60 s y extensión a 72 °C por 90 s; y una extensión final a 72 °C por 10 min (13). Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa 1,3 % p/v en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) junto a un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100V durante 60 min. El tamaño esperado de de los amplicones es de 569 pb para *C. dubliniensis*, 941 pb para *C. albicans* y 700 pb para *C. africana*. Luego de la corrida electroforética se visualizaron las bandas en un transiluminador de UV. Como controles positivos se usaron a *C. albicans* ATCC 90028 y *C. dubliniensis* del Centro micología Facultad de Medicina UBA inscripta en el GenBank como FJ8116791.1.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 1.

	Solución stock	solución de trabajo	µl por tubo
H2O			31,45
<i>Buffer</i> PCR	10 x	1x	5 µl
Mg ₂ Cl	50mM	1,5mM	1,5 µl
dNTP	10mM	0,200 mM	1µl
Cebadores CR-F	50 mM	0,4µM	0,4µl
Cebadores CR-R	50 mM	0,4µm	0,4µl
<i>Taq</i> DNA polimerasa	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
Suspensión de levadura			10 µl

Tabla 1: Mezcla de reacción para amplificar el gen *HWPI* mediante PCR.

4.4.2.1 Análisis de un amplicón doble obtenido como producto de amplificación de *C. albicans* con los cebadores que amplifican el gen *HWPI*.

El producto de amplificación por PCR del gen *HWPI* de un aislamiento de *C. albicans* que presentó doble banda en el gel de agarosa se envió a secuenciar a *Macrogen* (*Macrogen Company South Korea*). El producto de PCR mencionado se clonó en un vector, se transformó en *Escherichia coli* y se aislaron 10 clones para la posterior purificación y secuenciación de la con el primer M13F.

Las secuencias obtenidas se editaron y se eliminó la correspondiente al vector (*vector contamination (vecscreen)* de baja calidad. Con estas secuencias se realizó un Blastn (*National Center for Biotechnology Information [NCBI] Internet homepage* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y un alineamiento múltiple con los genes *RBT1* y *HWPI*. Además, se estableció sobre la secuencia del gen *HWPI* correspondiente a *C. albicans* número de acceso al Genbank XM 704869 el pegado de los primers (CR-f y CR-r) y el tamaño de bases del amplicón esperado. Asimismo, se construyó sobre la secuencia del gen *RBT1* de *C. albicans* número de acceso al Genbank AF254142 el pegado de los primers (CR-f y CR-r) y el tamaño de bases del amplicón esperado.

4.4.3 Identificación molecular del complejo de colonias rosadas recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, Candida) *C. parapsilosis*: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

El ADN genómico se extrajo durante proceso de amplificación por PCR (71, 72). La PCR se realizó con los cebadores CPDET (5'-ACAAACTCCAAACTTCTTCCA-3') y CTS1R (5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG-3') que permitirán la confirmación del aislamiento como *C. parapsilosis*. Se usarán además pares de cebadores

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

específicos CPAF-CPAR (5'-TTTGCTTTGGTAGGCCTTCTA-3';
5'GAGGTCGAATTTGGAAGAAGT-3'), CORF-CORR
(5'TTTGGTGGCCCACGGCCT-3'; 5'-TGAGGTCGAATTTGGAAGAATT-3') y
CMEF-CMER (5'-TTTGGTGGGCCCACGGCT-3'; 5'-
GGTCGAATTTGGAAGAATGT-3') para *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*
y *C. metapsilosis*, respectivamente (25). La reacción de amplificación por PCR se
optimizó en el laboratorio con las siguientes condiciones: desnaturalización del ADN a
95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 63 °C por 1 min y 72 °C por 1
min con una extensión final a 72 °C por 10 min (3). Los productos de PCR se separaron
por electroforesis en gel de agarosa 1,3 % p/v. El tamaño de los amplicones con CPAF-
CPAR es de 379 pb para *C. parapsilosis sensu stricto*, de manera similar el tamaño del
amplicón con CORF-CORR y CMEF-CMER es de 367 pb y 374 pb para los productos
de PCR de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente. Se usaron como cepas
controles *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. metapsilosis* Dmic 134285 (Instituto
Malbrán), *C. metapsilosis* NRRL Y- 48469, *C. orthopsilosis* Dmic 113916 (Instituto
Malbrán) y *C. orthopsilosis* NRRL Y-27733. Las reacciones se realizaron en un volumen
final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 2.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

	Solución stock	solución de trabajo	µl por tubo
H2O			31,25 µl
Buffer PCR	10 x	1x	5 µl
Mg2Cl	50mM	3mM	3 µl
dNTP	10mM	0,1 mM	0,5µl
Cebadores	50 µM	10 µM	0,2µl
Cebadores	50 µM	10 µM	0,2µl
Taq DNA polimerasa	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
Suspensión de levadura			10 µl

Tabla 2: Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la región de los ITS para las levaduras del complejo *C. parapsilosis*.

4.4.4 Identificación molecular del complejo de colonias purpuras-blancas (27) recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) *C. glabrata*, *C. braccarensis* y *C. nivariensis*.

El ADN genómico se extrajo durante proceso de amplificación por PCR (71,72). La PCR se realizó con los cebadores (RPL31cgF 5'-GCCGGTTTGAAGGACGTTGTTACT-3' y RPL31cgR 5'-GAACAATGGGTTCTTGGCGT-3'). La reacción de amplificación se realizó en un volumen de reacción de 50 µl conteniendo 1x de buffer de PCR, 0,5 µM de cada cebador, 0,25 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,5 U de Taq DNA Polimerasa (Life Technologies) y 10 µl de la suspensión de levadura (ADN molde). Las condiciones de amplificación según lo indicado por Enache-Angoulvant et al. (28) excepto en la temperatura de *annealing* que se realizó a 55 °C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2 % p/v. Los productos de amplificación esperados son de 1061 pb para *C. glabrata* y 691 pb para *Sacharomyces*

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

cerevisiae. Las especies *C. bracarensis* y *C. nivariensis* se evidencian con un tamaño de banda de 900 y 670 pb respectivamente. Como controles positivos se usaron: *C. nivariensis* DMIC 134286 proveniente del Instituto Malbrán,

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl siguiendo las condiciones indicadas en la tabla 3.

	Solución stock	Solución de trabajo	µl por tubo
H ₂ O			29,5
Buffer PCR	10 x	1x	5 µl
Mg ₂ Cl	50mM	3mM	3 µl
dNTP	10mM	0,25 mM	1,25µl
Cebador RPL31cgF	50 µM	0,5 µM	0,5µl
Cebador RPL31cgF	50 µM	0,5µM	0,5µl
Taq DNa polimerasa	5U/ml	1.25 U	0,25 µl
Suspensión de levadura			10 µl

Tabla3: mezcla de reacción para la amplificación del gen *RPL31* que codifica para la proteína ribosomal 60S (30).

4.4.5 Procesamiento y análisis de los datos: Los resultados se volcaron en tablas del programa Excel para su procesamiento. Los datos se trataron con el programa Epi Info 6.04 (Universidad de Atlanta) para el cálculo de la significación estadística.

5- RESULTADOS

5.1.1 Características de la población estudiada.

Se estudiaron 52 muestras clínicas de pacientes quemados dentro del área de cuidados críticos del Hospital de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, que correspondieron a un total de 36 pacientes. Los pacientes permanecieron internados en promedio 46,7 días, con un rango entre 9 y 218 días. Pertenecieron al sexo femenino el 63,9 % (n=23) y al masculino 36,1 % (n=13). La edad promedio fue de 46,1 años; para las mujeres 48,1 años y para los hombres 42,5 años, que se distribuyeron en edades entre

18 a 87 años, con un rango de entre 19-87 para las mujeres y 18-83 para los hombres; (Tabla 4).

Edad	Femenino	Masculino	Total
Media	48,1	42,5	46,1
Mediana	47,0	36	44,5
Moda	20	23	20
Rango	19-87	18-83	18-87
Desvío Estándar	24,4	21,7	23,3

Tabla 4: distribución en edades según sexo en los 36 pacientes dentro del área de cuidados críticos del Hospital de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, en porcentajes.

5.1.2 Características de las quemaduras.

La extensión de la superficie quemada predominante osciló entre 31 y 50 % (categorizado como grupo 2) con un 33,3 % (n=12) de los pacientes ($p=0,03$) (Gráfico 1).

El mayor número de pacientes, con una extensión de superficie quemada entre 31 a 50%, se observó en el grupo etario de mayor edad, 59 años. En cambio, entre el 71 a 100% (grupo 4), se presentó sólo en un paciente (2,8 %) y la edad fue de 19 años.

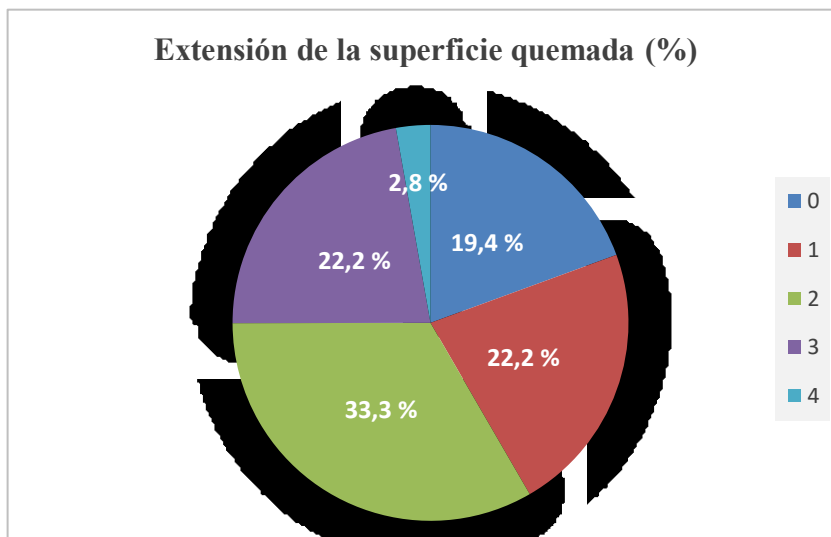


Gráfico 1: extensión de la superficie quemada en los pacientes (correspondiente %) categorizada como **grado 0** (0%-10% de quemado): 19,4 % (n=7 pacientes); **grado 1** (11%-30%):22,2% (n=8); **grado 2** (31%-50%):33,3 % (n=12); **grado 3** (51%-70%): 22,2% (n=8) y **grado 4** (71%-100%): 2,8% (n=1).

La profundidad de la quemadura estuvo representada con el grado 4 en el 69,4 % de pacientes (n=25), esto marca la severa gravedad de las lesiones en los pacientes estudiados. Con el grado 2 observamos al 19,4 % (n=7) de los quemados y por último el grado 3 con un 11,1 % (n=4), es importante destacar que ningún paciente quedó incluido en el grado 1 (Gráfico 2).



Gráfico 2: grados de profundidad de la quemadura en porcentajes en los pacientes quemados.

Los agentes causantes de la quemadura en los pacientes fueron: por combustible (alcohol, nafta, explosión) 41,7% (n=15), fuego directo 25,0 % (n=9), estufa 13,9 % (n=5), agua 16,7 % (n= 6) y por último electricidad 2,8 % (n=1) (Gráfico 3). Debemos destacar que cuando el agente causal de la quemadura resultó el combustible, el alcohol fue el agente de mayor prevalencia en el 73,3 %.

Al relacionar el agente de la quemadura y el sexo de los pacientes, podemos observar que en el sexo femenino las fuentes alcohol, fuego y agua caliente fueron las más relevantes. En tanto que en el sexo masculino la estufa, la electricidad y la nafta fueron las etiologías prevalentes de las quemaduras (Gráfico 4). Apreciamos que para el

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

elemento alcohol, 10 correspondieron a mujeres y sólo 1 a hombres. La quemadura por electricidad y nafta fueron exclusivas del sexo masculino.

Con respecto a la edad promedio de los pacientes quemados y el origen de la quemadura se puede observar en el grafico 5 que cuando la fuente fue la estufa y el fuego, las quemaduras se presentaron a mayor edad promedio, en tanto que cuando lo fue el alcohol, nafta y electricidad se detentan a menor edad relacionado esto con la violencia de género en el caso del alcohol y la actividad laboral los otros dos agentes.

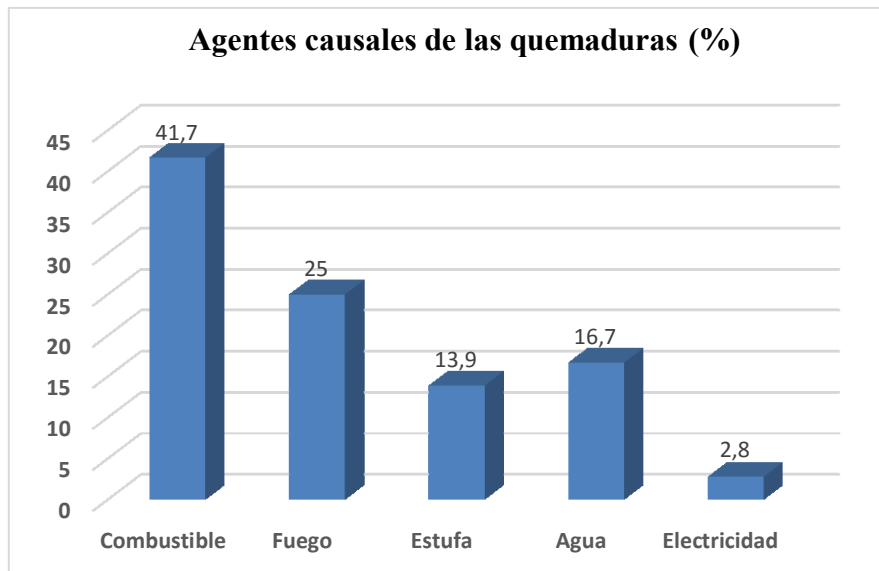


Gráfico 3: agentes causales de las quemaduras en los 36 pacientes estudiados. Combustible como causa de quemadura: nafta, alcohol y explosión.

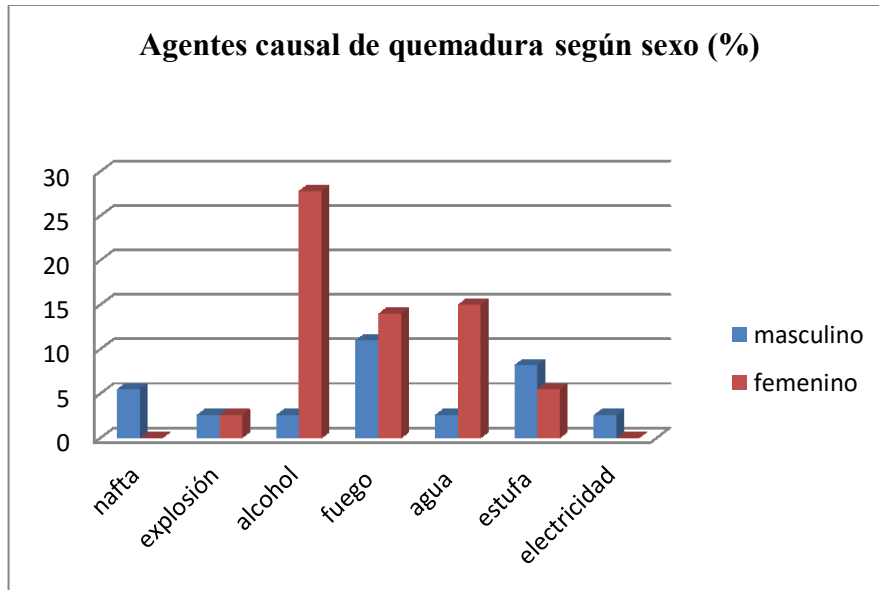


Gráfico 4: agentes causales de las quemaduras en 23 mujeres y en los 13 varones.

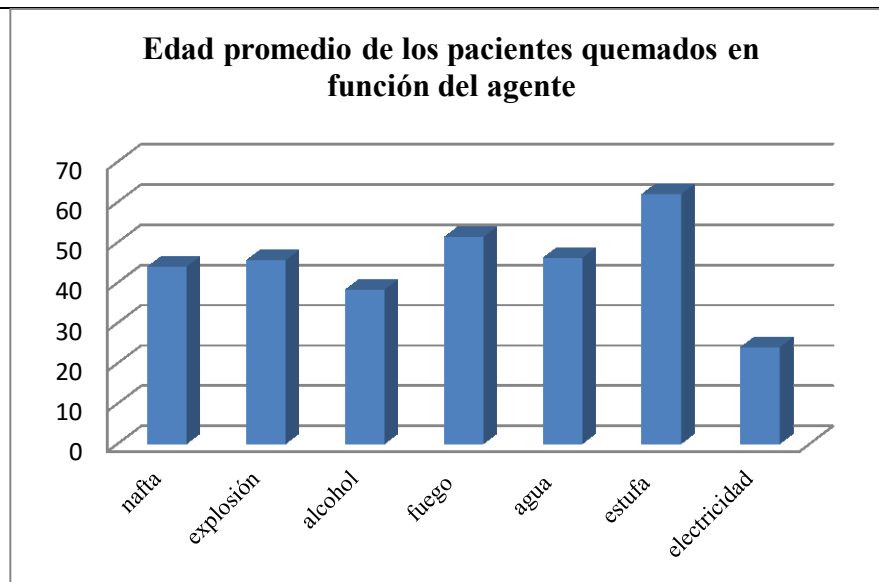


Gráfico 5: edad promedio de los pacientes quemados y el agente causal de la quemadura.

Con respecto a la superficie quemada y la causa: combustible vs. otros agentes, observamos que con la menor extensión de superficie quemada (grado 0) fue significativa la observación en otras causas (no combustibles), en tanto una extensión de grado 2 se presentó con mayor frecuencia cuando el agente es combustible (alcohol, nafta, explosión) como significativa (Tabla 5).

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

% de sup. quemada		Combustible	Otras causas	p
0%-10%	Grado 0	-	33,3	0,01*
11%-30%	Grado 1	13,3	28,6	0,28
31%-50%	Grado 2	53,3	19	0,03*
51%-70%	Grado 3	26,7	19	0,59
71%-100%	Grado 4	6,7	-	0,23

Tabla 5: extensión de superficie quemada (grado) y causas combustibles vs. otras causas.

La localización topográfica de la quemadura en los pacientes fue en tronco 75 % (n= 27), miembros superiores 72,2 % (n= 26), cara 55,5 % (n=20) y miembros inferiores: 36,1 % (n=13). El 75 % (n=27) de los pacientes presentaron una combinación de sitios quemados (tronco, cara, miembros inferiores y miembros superiores) (Gráfico 6) y solo el 25 % (n=9) presentaron únicamente lesiones en miembros inferiores (n=5), en miembros superiores (n=3) y en tronco (n=1).

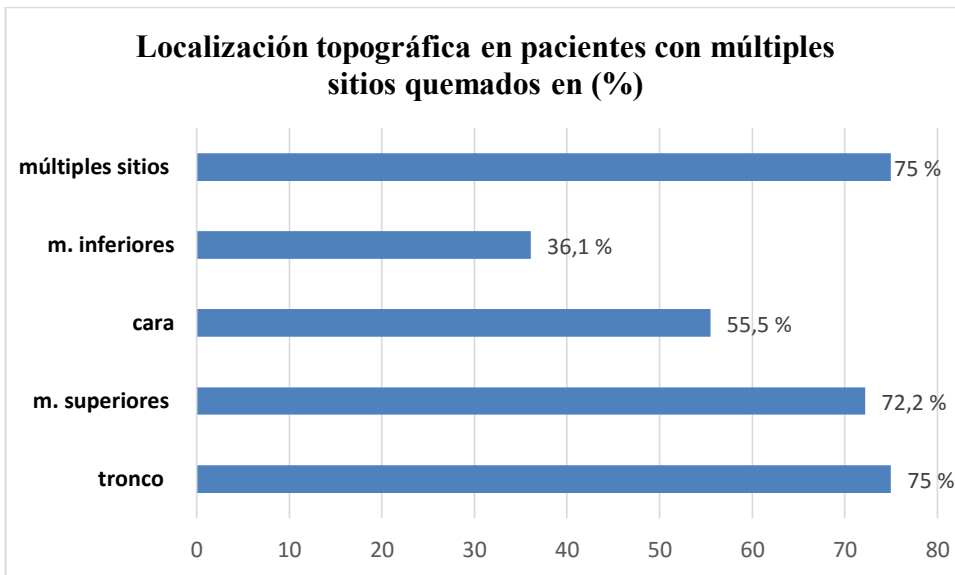


Gráfico 6: localización de las quemaduras en pacientes con múltiples sitios quemados 75% (n=26).

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

Por otro lado, debemos mencionar que como consecuencia de la quemadura se presentaron LIH en el 50% (n=18) de los pacientes con una mortalidad global del 55,6 % (n=10) (Tabla 6). Los pacientes con LIH tuvieron un mayor mortalidad ($p= 0,04$). En el 88,9 % (n=16), de los que presentaron LIH, las mismas se localizaron en cara y otros sitios. Por otro lado, en el 83,3 % (n=15) de los pacientes que evidenciaron LIH estuvo implicado el combustible y el fuego como agente de la quemadura.

		Lesión inhalación		Total	
		no	si		
falleció	no	Recuento	14	8	22
		% dentro de lesión inhalación	77,8%	44,4%	61,1%
	si	Recuento	4	10	14
		% dentro de lesión inhalación	22,2%	55,6%	38,9%
Total		Recuento	18	18	36
		% dentro de lesión inhalación	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 6: de contingencia mortalidad vs. lesión inhalación

5.1.3 Antecedentes patológicos de los pacientes quemados.

Al analizar los antecedentes patológicos el 44,4 % (n=16) de los pacientes no los refirió (edad promedio de 28 años) y el 55,6 % (n=20) presentaron uno o más factores de riesgo, como enfermedad obstructiva crónica (EPOC) (n=10), enfermedades cardiovasculares (arritmias, hipertensión arterial -HTA-) (n=9), diabetes (DBT) (n=4), obesidad (n=3), hipotiroidismo (n=1), embarazo (n=1), enfermedad neurológica (accidente cerebro vascular, ACV) (n=1) y enfermedad oncológica (n=1) con una edad promedio mayor a 60 años (Gráfico 7).

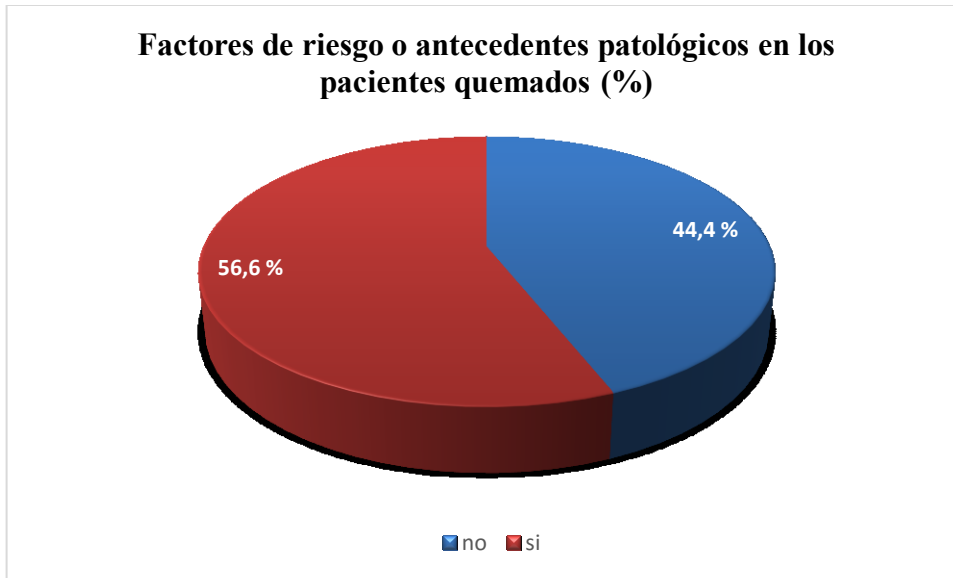


Gráfico 7: factores de riesgo observados en los pacientes quemados.

5.1.4. Infecciones bacterianas en pacientes quemados

Las infecciones bacterianas estuvieron presentes en el 100 % de los pacientes quemados y los microorganismos fueron: bacterias Gram negativas multirresistentes como, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC). Entre los Gram positivos, *S. aureus* meticilinoresistente (SMR) fue el más prevalente. El momento de aparición de las infecciones bacterianas en promedio fue 4 días pos ingreso a la unidad de cuidados intensivos. A los 36 pacientes (100%) se les indicó antibióticos tópicos y sistémicos (colistina, piperacilina tazobactam, imipenem y vancomicina). Es de destacar el uso combinado de dos o más antibióticos, así como los aislamientos polimicrobianos.

5.1.5. Candida Score y APACHE II (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*)

Al categorizar los pacientes según el valor de APACHE II observamos que el mayor número de pacientes presentó un valor entre 31- 40 (n= 14, 38,9 %), con valor

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

entre 41 – 46 (n=3, 8,3 %) (Gráfico 8) y con valores mayores de 21 (n=26; 72,2%). El *Candida score* fue de 3 en el 77,7% de los pacientes. (Gráfico 9).

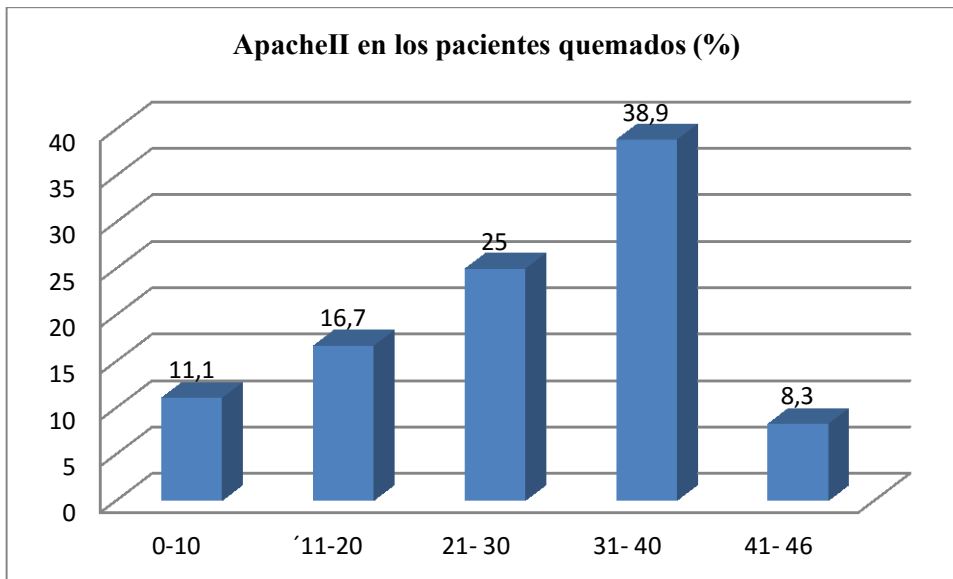


Gráfico 8: APACHE II en pacientes quemados.

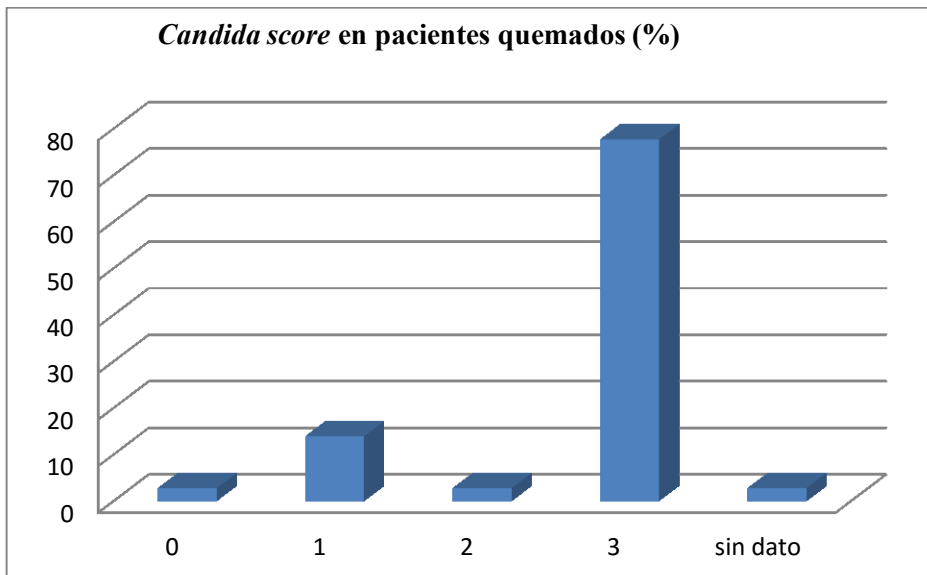


Gráfico 9: *Candida score* en pacientes quemados.

5.1.6 Nutrición y tratamiento de pacientes quemados.

Al considerar la nutrición de los pacientes quemados, fue por la vía oral en el 19,4 % (n=7), enteral y oral en el 52,8 % (n=19), enteral y parenteral en el 8,3 % (n=3), enteral

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

parenteral y oral en el 13,9 % (n=5) y por último enteral en el 5,6 % (n=2) (Gráfico 10).
Recibieron nutrición parenteral en un 22, 2 % (n=8).

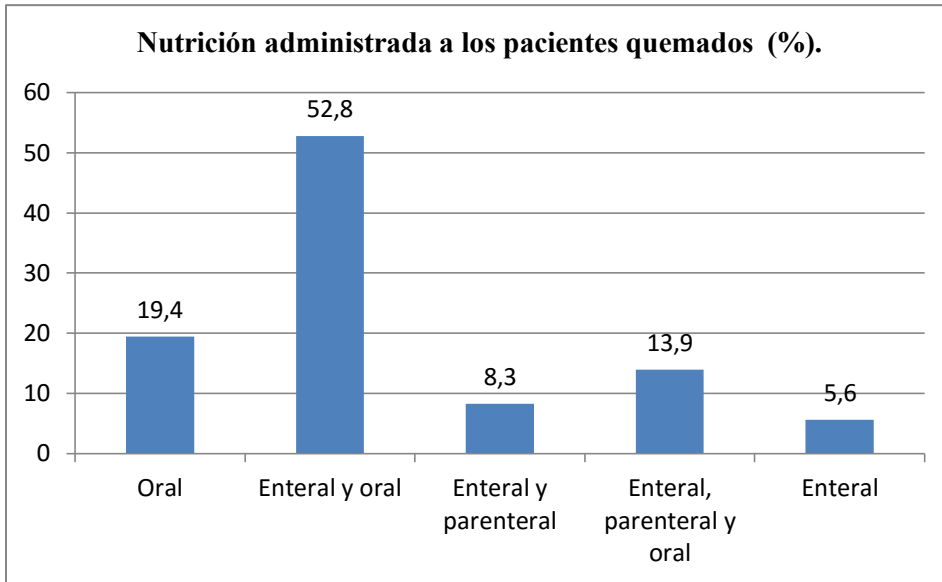


Gráfico 10: forma de nutrición administrada a los pacientes quemados.

El porcentaje de utilización de vías centrales fue de 88,9% (32/36), la vía femoral se usó en el 90,6 % (n=29), las vías superiores (subclavia y/o yugular) en el 58,3 % (n=21). El promedio de vías utilizadas en cada paciente fue de 5,8 (rango de 0 a 23).

La intubación orotraqueal se realizó en el 72,2% (n= 26/36) y la traqueotomía se practicó en el 41,7 % (n=15/36).

La totalidad de los pacientes recibieron tratamiento antibiótico (100%) y el 72,2% (n=26) requirieron el uso de inotrópicos. El tratamiento antifúngico se administró en el 91,7% (n=34), inicialmente fluconazol en el 58,8% y el resto anfotericina B liposomal (41,2%). De los que iniciaron tratamiento con polienos se cambió luego a fluconazol, con la excepción de un caso que completó tratamiento con anfotericina B por una infección por *C. krusei*.

Con respecto al tratamiento quirúrgico, se aplicó en el 91,7 % (n=33) de los pacientes. Se practicó escarectomías 33/33 (100%), escarotomías 14/33 (42,4%),

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

fasciotomías 18/33 (54,5%), amputación de miembros 2/33 (6,1%). Sin tratamiento quirúrgico (sólo curación con lavados) se encontró 8,3 % (n=3) de los quemados. Es de destacar que en todos los casos los tratamientos fueron combinados. Al considerar los distintos tratamientos podemos observar en la tabla 7 que la mortalidad fue mayor en pacientes que recibieron la fasciotomía como tratamiento quirúrgico ($p=0.04$). No se hallaron diferencias significativas de mortalidad con respecto a los pacientes que se les realizó escarectomía, escarotomías y amputación ($p= 0,15$), ($p=0,07$) y ($p= 0,74$), respectivamente.

Tabla 7 de contingencia falleció con fasciotomía.

		fasciotomía		Total	
		no	si		
falleció	no	Recuento	14	8	22
		% dentro de fasciotomía	77,8%	44,4%	61,1%
	si	Recuento	4	10	14
		% dentro de fasciotomía	22,2%	55,6%	38,9%
Total		Recuento	18	18	36
		% dentro de fasciotomía	100,0%	100,0%	100,0%

Luego de los tratamientos quirúrgicos y tras obtener un lecho de tejido viable, se debe proceder a cubrir la herida con injertos de piel. Se les aplicó autoinjerto a el 97,2% (n=35). El mismo exhibió buena adherencia al tejido subyacente en un 75% (n=27). En el 25% (n=9) que no fue exitoso, el porcentaje de mortalidad fue de 100 % ($p < 0,01$), cuya causa principal es el shock séptico (requirieron el uso de inotrópicos).

5.1.7 Mortalidad en los pacientes quemados.

El óbito ocurrió en el 38,8 % de los pacientes (n=14). Entre los mayores de 65 años la mortalidad global fue del 70 % ($p= 0,018$), tabla 8. Con el uso de inotrópicos (noradrenalina) la mortalidad fue mayor ($p < 0,001$), así mismo el grupo con antecedentes

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

o factores de riesgos presentaron mayor mortalidad ($p = 0,002$) Tablas 9 y 10, respectivamente.

			óbito		Total
			no	si	
más 65 años	no	Recuento	19	7	26
		% de más 65 años	73,1%	26,9%	100,0%
	si	Recuento	3	7	10
		% de más 65 años	30,0%	70,0%	100,0%
Total		Recuento	22	14	36
		% de más 65 años	61,1%	38,9%	100,0%

Tabla 8: tabla de contingencia de mortalidad en mayores de 65 años.

			inotrópicos		Total
			no	si	
falleció	no	Recuento	14	8	22
		% de inotrópicos	100,0%	36,4%	61,1%
	si	Recuento	0	14	14
		% de inotrópicos	,0%	63,6%	38,9%
Total		Recuento	14	22	36
		% de inotrópicos	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 9: tabla de contingencia de mortalidad con el uso de inotrópicos

			antecedentes		Total
			no	si	
falleció	no	Recuento	15	7	22
		% de antecedentes	88,2%	36,8%	61,1%
	si	Recuento	2	12	14
		% de antecedentes	11,8%	63,2%	38,9%
Total		Recuento	17	19	36
		% de antecedentes	100,0%	100,0%	100,0%

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

Tabla 10: tabla de contingencia de mortalidad en relación a los antecedentes o factores de riesgo.

La mortalidad en pacientes tratados con antifúngicos se observa en la tabla 11. Esta fue mayor en los pacientes tratados con anfotericina B (AMB) (droga de elección ante la gravedad del paciente) ($p= 0,003$). Al considerar la tabla de contingencia de AMB e inotrópicos observamos que el 54,5% fueron tratados con AMB ($n= 12$), es decir, la mayoría de los pacientes del grupo anterior (12 de los 14, 85,8%) (tabla 12).

			Anfotericina B (AMB)		Total
			no	si	
falleció	no	Recuento	16	4	20
		% de AMB	80,0%	28,6%	58,8%
	si	Recuento	4	10	14
		% de AMB	20,0%	71,4%	41,2%
Total	Recuento		20	14	34
	% de AMB		100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 11: tabla de contingencia de mortalidad en relación al uso de AMB

	AMB	AMB	Total
	No	Si	
Inotrópicos	10 45,50%	12 54,50%	22 100%

Tabla 12: tabla de contingencia de relación entre al uso de AMB e inotrópicos

5.2 Identificación por los métodos microbiológicos convencionales de las especies de *Candida*.

Los criterios morfológicos basados en la coloración de las colonias en medio cromogénico, la observación micromorfológicas con agar leche y Tween 80 al 1 % (figura 3A y 3B), la observación de clamidoconidios en medio de Staib (figura 4A y 4B),

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

las pruebas bioquímicas como la utilización de sacarosa y de trehalosa (figuras 5A, 5B y 5C), permitieron la identificación de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. galbrata* en pacientes quemados. La coloración azul en medio cromogénico y la observación de la lámina de agar leche y Tween 80 al 1 % (figura 6 A y 6 B) logragron la identificación presuntiva de *C. tropicalis*. La correspondiente a *C. parapsilosis* se observa en la figura 7A, 7B y 7C y para *C. krusei* en la figura 8 A y 8 B.

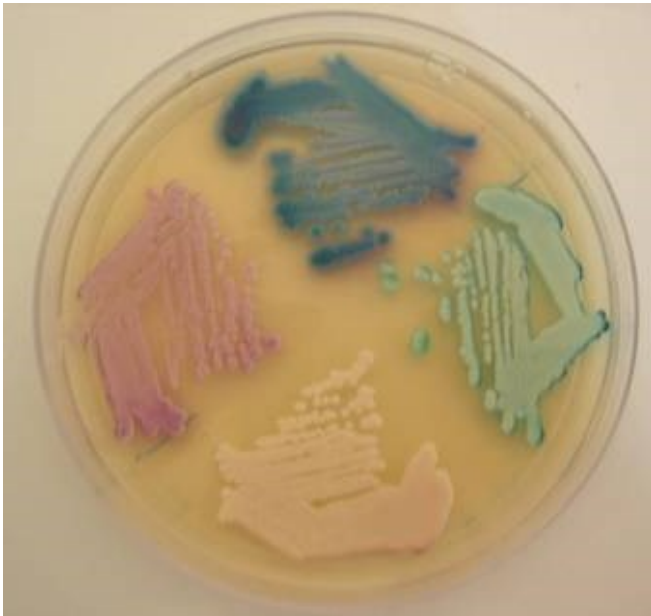


Figura 3 A.: Aislamiento de *Candida* spp a partir muestras de pacientes quemados en CHROMagar, *Candida*. Colonias verdes corresponde a *C. albicans*, las colonias azules corresponden a *C. tropicalis* y las rosadas a *Candida* spp.



Figura 3.B.: Observación de clamidoconidios de *C. albicans* con agar leche y Tween 80 al 1% (40x).

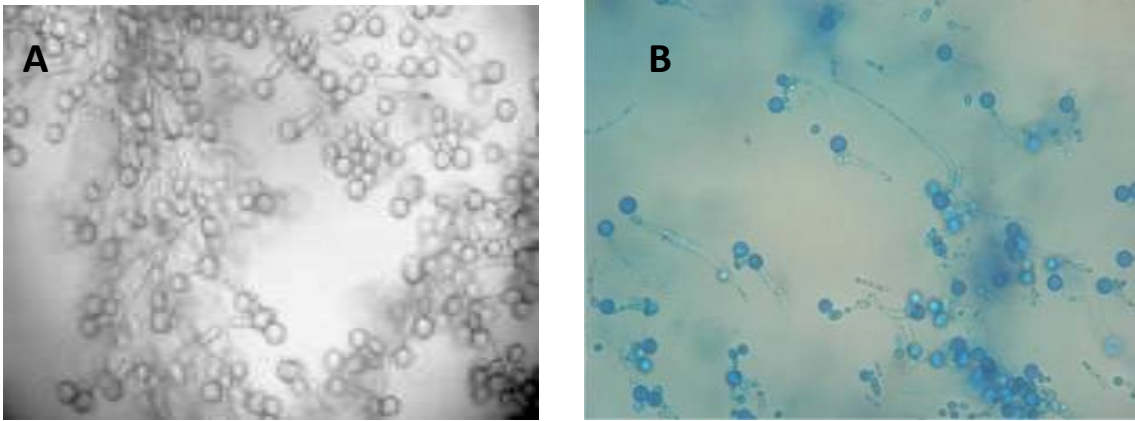


Figura 4.: Observación de clamidoconidios de *C. dubliniensis* **A:** agar leche y Tween 80 al 1% y **B:** en medio de Staib (20x).

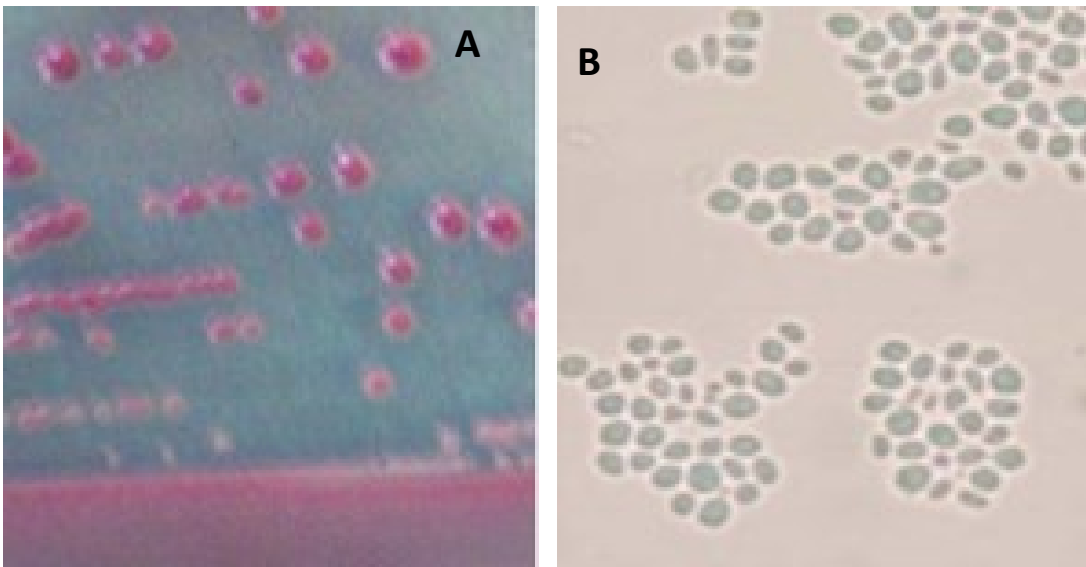


Figura 5.: Observación **A)** Macromorfológica en ChromAgar Candida y **B)** Micromorfolología en agar leche Tween 80 al 1 % de *Candida glabrata*

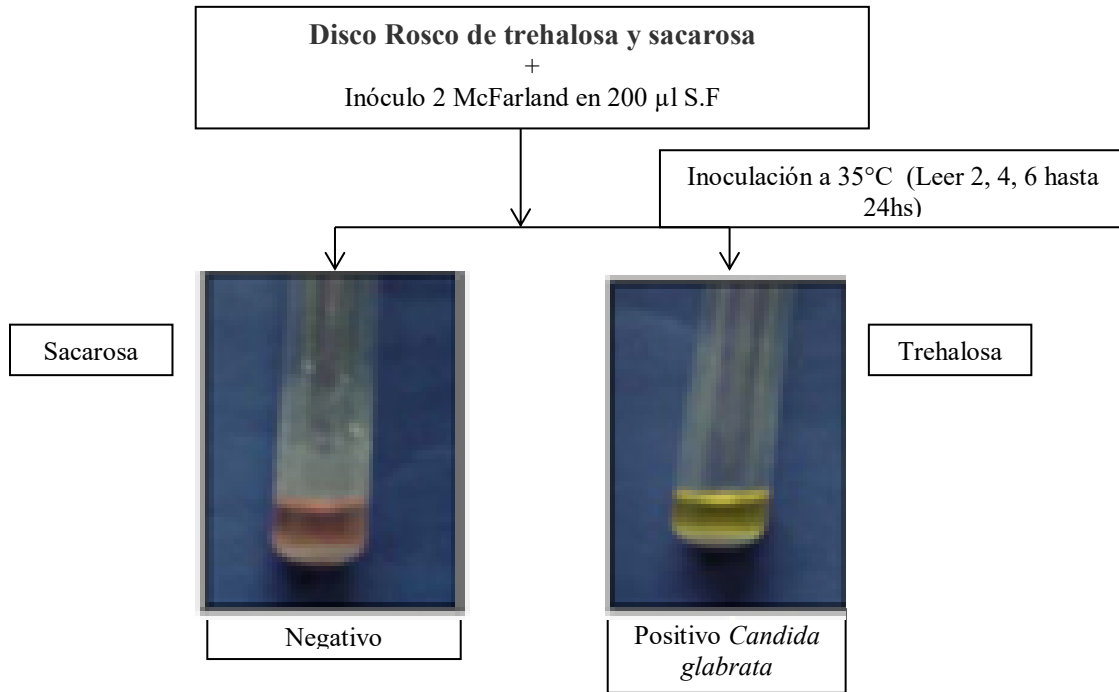


Figura 5 C.: Pruebas de identificación de *C. glabrata*.

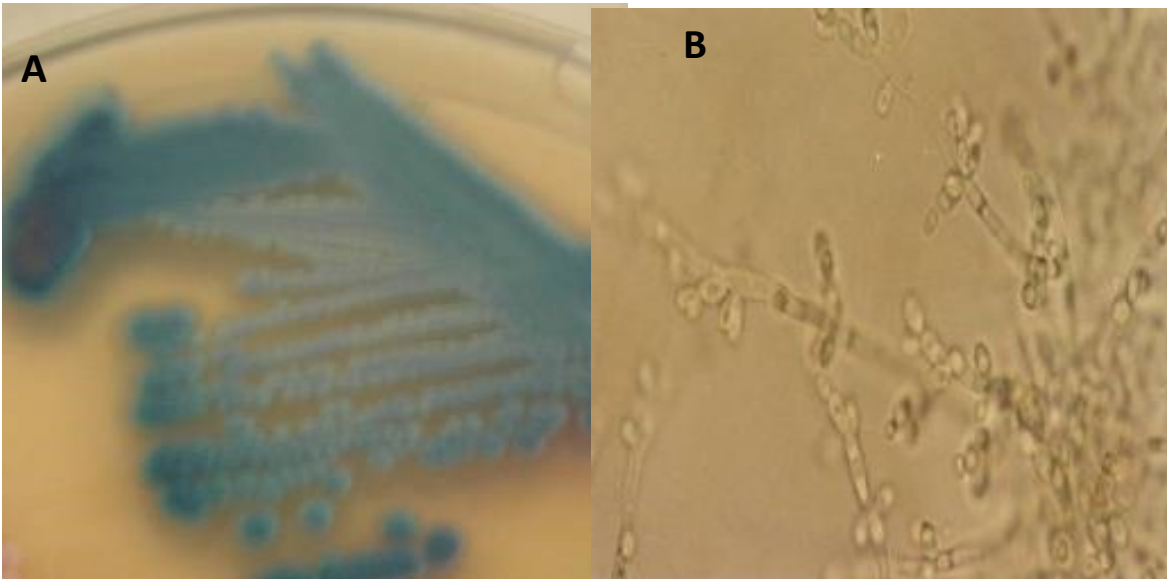


Figura 6.: Observación **A)** macromorfológica en Chromagar Candida y **B)** micromorfológica en agar leche Tween 80 al 1% de *C. tropicalis*

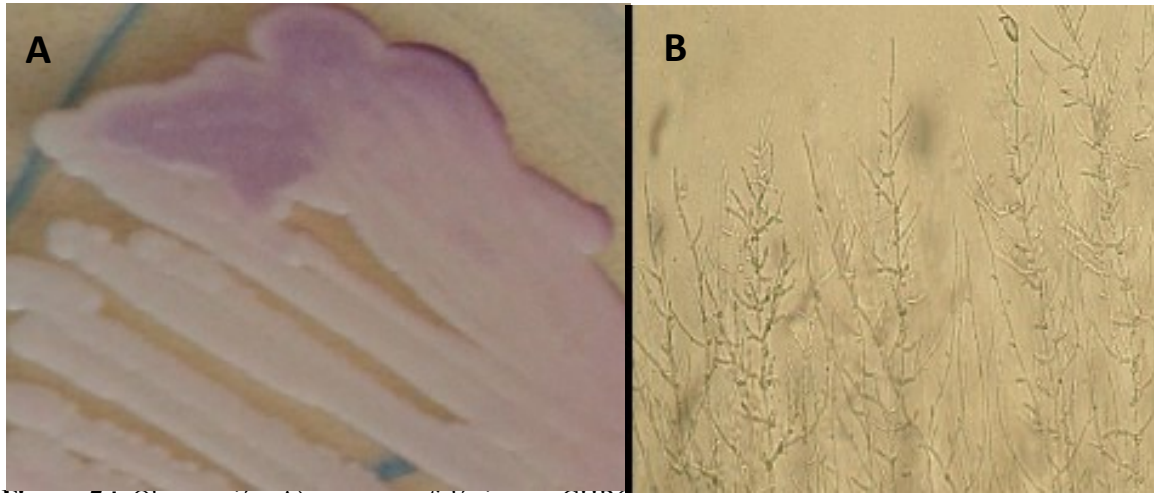


Figura 7.: Observación **A)** macromorfológica en CHROMagar Candida y **B)** micromorfología en agar leche Tween 80 al 1%.



Figura 7 C: Perfil de asimilación en API 20 Aux (bioMérieux SA, Marcy L'Étoile France) de *C. parasilopsis*.

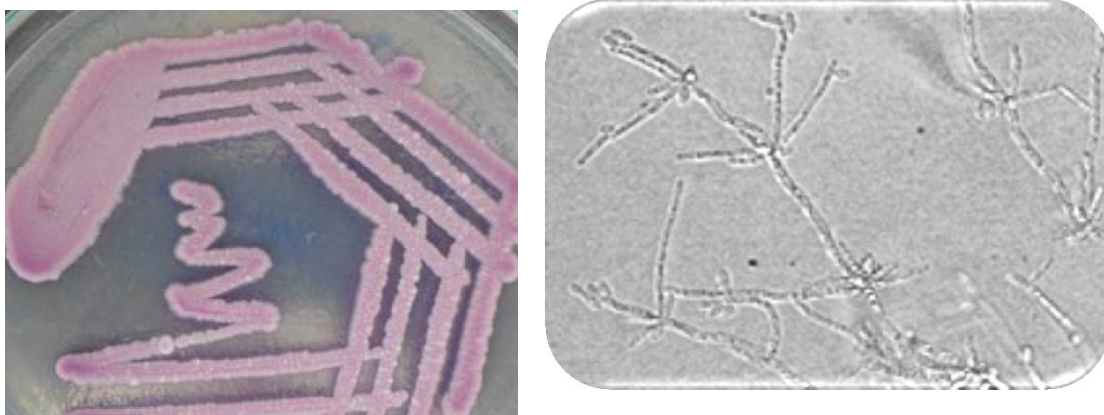


Figura 8.: Observación **A)** macromorfológica en CHROMagar Candida y **B)** micromorfología en agar leche Tween 80 al 1%, correspondiente a *C. krusei*.

5.3.1 Identificación molecular de las colonias verdes recuperadas del medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*).

De los 29 aislamientos de *Candida* spp. que presentaron un color verde en el medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) se identificaron molecularmente a 28 como *C. albicans* por la presencia de la banda de alrededor de 1000 pb, por la amplificación del gen *HWPI* (figura 9 y 10). Cabe destacar que algunos aislamientos presentaron una única banda para este gen (17/28) y el resto dos bandas (figura 6 y 7). Un aislamiento presentó una banda de 570 pb que correspondió a *C. dubliniensis* (1/29) (figura 11). Se destaca además la ausencia en los aislamientos verdes estudiados molecularmente la banda de 700 pb que corresponde a *C. africana*.

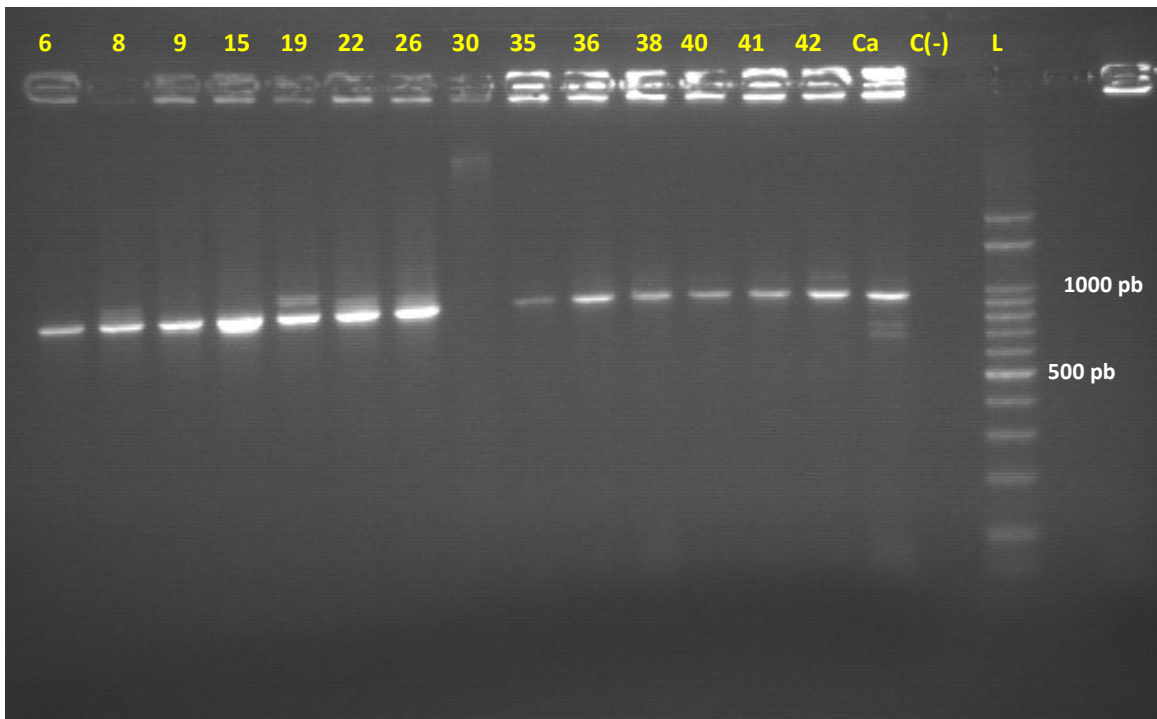


Figura 9: corresponde a los productos de amplificación del gen de *HWPI* de colonias verdes en CHROMagar *Candida* de los aislamientos 6, 8, 9, 15, 19, 22, 26, 35, 36, 38, 40, 41, 42 observación de. Ca: control *C. albicans* ATCC 90028, C (-): control negativo. 30 aislamiento verde en el ChromAgar *Candida* de *C. albicans* que no amplificó. L. marcador de peso molecular de 100 pb

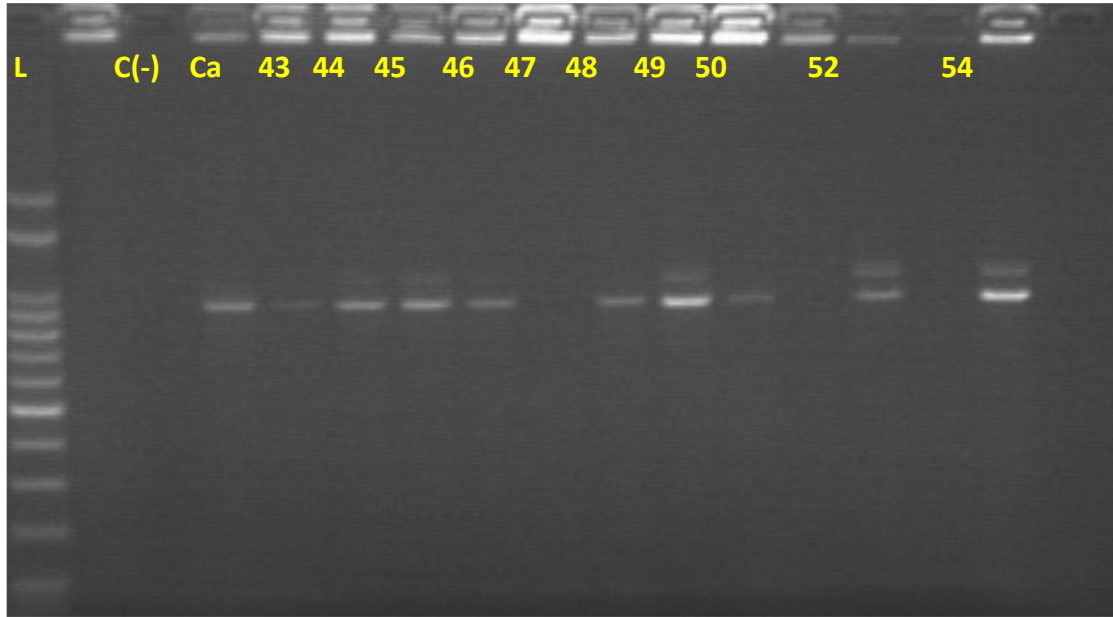


Figura 10: corresponde a los productos de amplificación del gen de *HWPI* de colonias verdes en CHROMAgar Candida de los aislamientos 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 52 y 54. Ca: control positivo *C. albicans* ATCC 90028, C (-): control negativo. Nótese que los aislamientos 44, 45, 49, 52 y 54 presentaron doble banda para este gen. L. marcador de peso molecular de 100 pb.

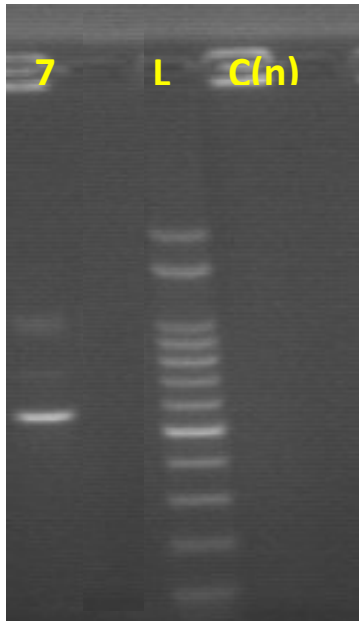


Figura 11: corresponde a los productos de amplificación del gen de *HWPI* de colonias verdes en CHROMAgar Candida. 7: aislamiento de *C. dubliniensis* L: marcador de peso molecular de 100 pb y C(n): control negativo de amplificación

5.3.1.1 Análisis de un amplicón doble obtenido como producto de amplificación de *C. albicans* con los cebadores que amplifican el gen *HWPI*.

Se observan 2 grupos de secuencias que corresponden a los siguientes genes *HWPI* y *RBT1* (tabla 13).

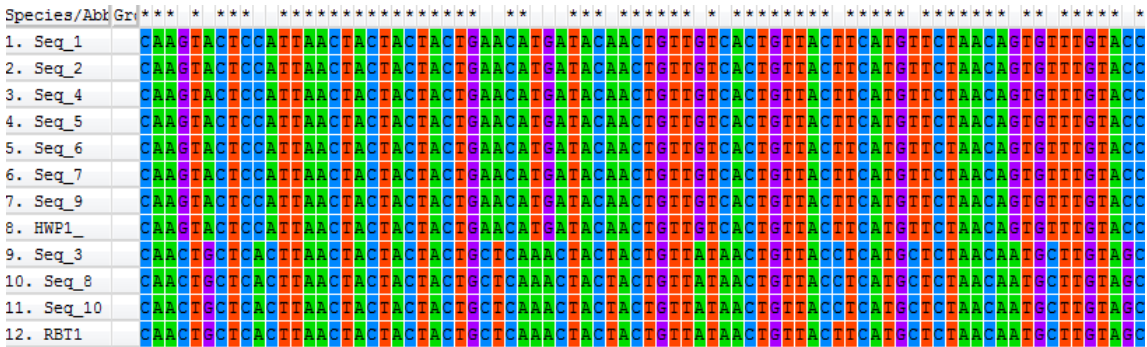
Tabla N° 13: grupo de secuencias obtenidas luego del clonado, edición y comparación mediante Blastn

Grupo	Secuencias	% de identidad con <i>HWPI</i>	% de identidad con <i>RBT1</i>
1	1 / 2 / 4 / 5 / 6 / 7 y 9	99%*	
2	3 / 8 y 10		97% 99% 93%**

C. albicans* números de accesos al Genbank AF 0019078 – XM 704859- U 64206 cubriendo el 100 %. *C. albicans* número de accesos al Genbank AF 254142 cubriendo 82, 89 y 98 %. Las secuencias del grupo 1 numeradas con: 1, 2, 5, y 7 tienen 940 nucleótidos y las 4, 6 y 9 presentan 939 nucleótidos. Las secuencias del grupo 2 numeradas con: 3 y 10 presentan 1148 nucleótidos y la 8 se observan 1145 nucleótidos.

En *C. albicans* con doble banda en el gel de agarosa se están amplificando dos genes el *HWPI* y el *RBT1*.

En el alineamiento múltiple con los genes *HWPI* y *RBT1* realizado con el programa BioEdit y visualizado por el programa Mega (10) observamos los dos tipos de clones, el grupo 1 (constituido por las secuencias 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 9 y el grupo 2 por las secuencias 3, 8 y 10. (Figura 12)



Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

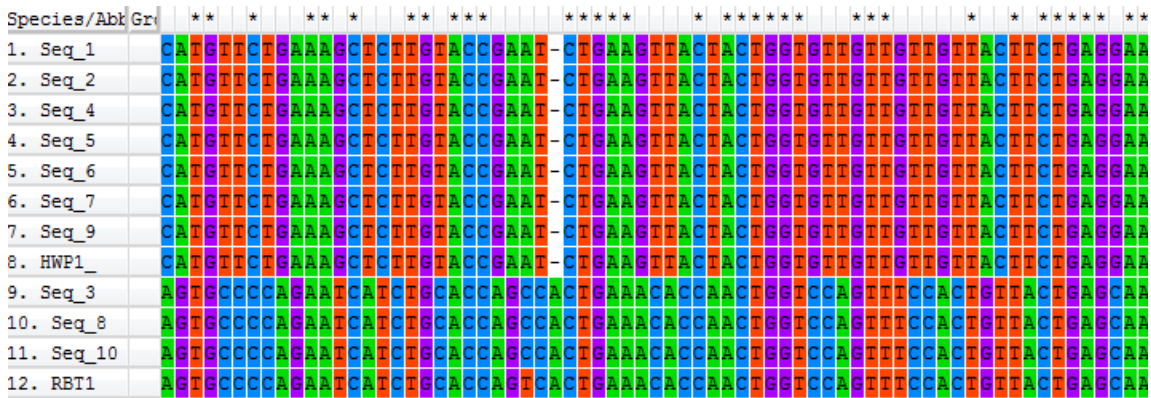


Figura 12: porción del alineamiento múltiple de los genes *RBT1* y *HWPI* con las secuencias de los diferentes clones obtenidos con el programa BioEdit y visualizado en el programa Mega (cita). *HWPI* y *RBT1* corresponden a las secuencias de parcial de estos genes de *C. albicans* número de acceso al Genbank XM 704869 y AF254142, respectivamente.

Pegado de los cebadores CF-f y CF-r en la secuencia del gen *HWPI* de *C. albicans* número de acceso al Genbank XM 704869.

ATGAGATTATCAACTGCTCAACTTATTGCTATCGCTTATTACATGTTATCAATTGGGGCCACTGTCCCACA
GGTAGACGGTCAAGGTGAAACAGAGGAAGCTCTTATTCAAAAGAGATCTTATGATTACTATCAAGAACC
ATGTGATGATTACCCACAACAACAACAACAAGAGCCTTGTGATTACCCACAACAACAACAGCAGGAA
GAACCTTGTGATTACCCACAACAACAACCACAAGAGCCATGTGACTATCCACAACAGCCACAAGAACCTT
GTGACTACCCACAACAACCACAAGAACCTTGTGACTACCCACAACAACCACAAGAACCTTGGCACAATCC
ACCTCAACCTGATGTTCTTGTGACAATCCTCCTCAACCTGATGTTCTTGTGACAATCCTCCTCAACCTGA
TATTCCTTGTGACAATCCTCCTCAACCTGATATTCCTTGTGACAATCCTCCTCAACCTGATCAGCCTGATGA
CAATCCTCCTATTCCAAACATTCCAACCGATTGGATTCCAAATATTCCAACCTGATTGGATCCCAGATATTC
AGAAAAGCCAACAACCTCCAGCTACTACTCCAAACATTCTGCTACAACCTACTACTTCTGAATCATCATCTTC
TTCTTCTTCTCATCATCATCTACTACTCCAAAACCTTCTGCTTCAACTACACCTGAATCTTCTGTTCCAGCT
ACCACTCCAAACACTTCTGTTCCAACAACCTTCTCAGAATCAACTACTCCAGCTACTAGCCAGAAAGTTCT
GTTCCAGTACTTCTGGATCATCTATTTA **GCTACCACTTCAGAATCATCATC** **TGCTCCAGCTACTACTCCA**
AATACATCTGTTCCAACCTACTACTGAAGCCAAATCATCAAGTACTCCATTA **ACTACTACTACTGAACAT**
GATACAACTGTTGCTACTGTTACTTCATGTTCTAACAGTGGTGTACCGAAAGTGAAGTTACTACTGGTGT
TATTGTCATCACATCTAAAGATACTATTTACACCACTTACTGTCCATTGACTGAAACTACTCCAGTTTCTAC
TGCTCCAGCCACTGAAACACCAACTGGTACAGTATCCAATTCTACTGAACAATCAACTACTGTTATTACTG
TTACTTCATGTTCTGAAAGCTCTGTACCGAATCTGAAGTTACTACTGGTGTGTTGTTGTTACTTCTGAGG
AAACTGTCTACTACTATTCTGTCCATTGACTGAAAACACTCCAGGACTGATTCAACTCCAGAAGCTTCC
ATTCCACCTATGGAAACAATTCTGCTGGTTCAGAATCATCCATGCCTGCCGGTGAAACCTCTCCAGCTGT
TCCAAAATCAGATGTTCCAGCTACTGAATCAGTCCAGTTCCTGAAATGACTCCAGCTGGTTCACAACCAT
CTATTCCTGCCGGTGAACCTCTCCAGCTGTTCCAAAATCAGATGTTCCAGCTACTGAATCTGCTCCTGCTC
CTGAAATGACTCCAGCTGGTACTGAAACTAAACCAGCTGCTCCAAAATCATCAGCTCCTGCCACTGAACCT
TCCCAGTTGCTCCAGGACTGAATCCGCACCAGCTGGTCCAGGTGCTTCTTCTCCAAAATCTTCTGTT
TTGGCTAGTGAACCTCACCAATTGCTCCAGGTGCTGAAACCGCTCCAGCTGGCTCAAGTGGTGCTATTA
CTATTCGGAATCTAGTGCTGT **CGTCTCTACGACTGAAGGTGC** **TATTCCAACCTACATTAGAATCAGTCCA**
CTCATGCAACCATCTGCCAATTACTCAAGTGTGCTCCTATTTCTACATTTGAAGGTGCTGGTAACAACAT
GAGATTGACTTTCGGTGCTGCTATTATTGGTATTGCTGCATTCTTGATCTAA

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

Obsérvese que los nucleótidos en rojo representan la secuencia amplificada del gen *HWPI* y lo resaltado en celeste los cebadores que originan un amplicón de 941 pb en las condiciones explicitadas en materiales y métodos.

Pegado de los cebadores CF-f y CF-r en la secuencia del gen *RBT1* de *C. albicans* número de acceso al Genbank AF254142.

```
TATCTTTGTCATTATAAGGCGTGTTTTGGTTTTGGTTTTGGGGTTTTGTTTTTCGTTTTTAATGCAAGAATC
TTAGCTTTGTTTTGCATGATTTTCGGGTTAATGCATAGTGCATATTTGATAACCCTGGCACAGCATCTTT
GTTTCCACTAATGTTTCATTGCAATTTTTAAAATTTTTCAGTACCCTACGCCAATTAACCAAATACCCTCCAAT
GCTTTGTCTCGCAATAATTAACATTTTCAAGAATGTTCTCTTTTTAGATTTTTCAATTCTTTGTTTTTAAT
CACAAATATGAAAACATTTTCGACAGATTCGTTTTAGTATTTTTATAATTCTACACAAAGTTAAATTTTTCA
CACTGTTTTAAGTTGACTTTGGAATGTTAATGCTTCTATTTTTCAATTCGGATCTTGAAAGACAATTACC
CGTTGATTTCAACAATTAATCAATGGTTATAATATGATCAAATTACTTTCCAAAACTATAAATAAAGGT
AAGATTTACCGGATTTGAACTTGTAAATTTCTATTTTTCTATCCCATCAACAAGATCAAACAAAATACAA
ATCTCGTATTATTCATTGCTTTAATTTTTATCAACTATGAGATTTGCAACTGCCAACTCGCTGCCCTCGCT
TACTACATTTTATCCACTGAGGCTACTTTCCATTATTGGGTGACATCTTTAATTGTATTCCACACAACACT
CCTCCTGTCTGTACTGACTTGGGTCTTTACCACGATAGCTCCATTTCCCTTAGTGTTCCAAGAACAAGAG
AGAAGCTGAAATTGTCAATGAAGATGGTACAATTGAAAAGAGAAGTTTGGAAAGCGCTGGTGTAATGC
CGGTTTCAATGCCGATTTGTCGTGTCTAATGCCAAAAAATTATCTGACGGTCTTATGGTATTGATTGTA
ACTTCAAGAGTGATTCTTGTCCAATTGAACCTGGCCTTTGGTAAAAAAGTTAAACAATTGAGTATCACC
GGTACTGGTTATTCTGATATTTTATTATTAGGAAATGTTGCTAATCCATTTGAATGGTCAGCTTCTTGAAA
GTCAAAGCAGAAATTGTTAAAGGAAAATGTTGTCTTCCATCAGGTTTCCAGAATCGTTACAGATTTGAAA
GCAACTGTCCTGAATTTGATGCCATCAAACAATTTTTGGCAGTTCTCAAATAATTTACAAAGTCAATGCC
GTTTCTAACGCAATTGGTACTTTTGTGCTTCTGCATTATTCAATGCTCAAGTCAAAGCCTTCCCTGCCAAG
AGAGAATTAGATGAATTTGAAGAATTAAGTAACGATGGTGTTACTCACAGCAAGAGAAGTTTGGGTTTGC
TTTTGGGTTTGCTAAGAAAGTTACTGGTGGATGTGATACTTTACAACAATTCTGTTGGGACTGTCAATGT
GACACCCCATCTCCATCAACTACCACCGTAAGTACTCATCTGCTCCATCTACTTCCCAGAATCATCTGCT
CCATCTACTACTACAGTTACCACTTCATCTTCTCCAGTTACTTCTCCAGAATCTAGTGTTCCAGAACTACT
ACCGTTACTACTTCATCTGTCCCAGAACTACTCCAGAATCATCAGCTCCAGAAACCACCACAGTTACTAC
TTCATCTGTTCTTCTACTACCCAGAGTCTTCTGCTCCAGAAACCACTCCAGAATCATCAGCTCCAGAAATC
TAGTGTTCCAGAATCATCAGCTCCAGAAACCACTCCAGAATCATCAGCTCCAGAATCTAGTGTTCCAGAAT
CATCAGCTCCAGAACTGAAACTGAAACCACTCCAAGTCTCACTTAACTACTACTGCTCAAACACTACT
ACTGTTATAACTGTTACTTCATGCTCTAACAAATGCTTGTAGCAAACTGAAGTAACCACAGGTGTTGTTGT
TGTCATCTTGAAGATACTATTTACTACTACCTTCTGTCCATTAAGTAACTGAAACCACCCAGTTCTTCAAGTGT
TGATTCTACTTCAGTCACTTCTGCTCCAGAAACCACCCAGAATCTACTGCCCAGAATCATCTGCTCCAG
AATCTAGTGCCCAGAATCATCTGCACCAGTCACTGAAACACCAACTGGTCCAGTTTCCACTGTTACTGAG
CAATCAAAGACCATCGTCACCATCACCTCATGCTCCAACAATGCATGCAGTGAATCTAAGGTCACCACTG
GTGTTGTTGTTGTTACATCTGAAGATACTGTTTACTACTACATTCTGTCCATTAAGTAACTGAAACTACTCCAGCTA
CTGAATCAGCCCAGAATCATCTGCACCAGCCACTGAATCAGTTCCAGCTACTGAAAGTGCTCCAGTTGCT
CCAGAATCATCTGCACCAGGTTACTGAAACCGCACCAGCTACCGAATCAGCTCCTGCCACTGAAAGTTCTC
CAGTTGCTCCAGGTTACTGAATCTTCCCAGTTGCCCCAGAATCATCAGCACCAGCTACTGAATCAGACCA
GCCACCGAATCTTCCCAGTTGCTCCAGGTTACTGAAACCACTCCAGCTACTCCAGGTGCTGAATCAACTCC
AGTTGCTCCAGTTGCCCCAGAATCATCAGCTCCAGCTGTTGAATCTTCTCCAGTTGCTCCAGGTGTCGAAA
```

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

CTACTCCAGTTGCACCGATTGCTCCTTCTACCACTGCAAAAACTAGTGCTCTCGTCTCTACGACTGAGGGT
ACTATTCCAACACTACATTAGAATCTGTTCCCTGCCATTCAACCATCTGCTAACTCCTCATACTATTGCTTCA
GTCTCTTCATTGCGAAGGTGCTGGTAACAACATGAGATTAACCTTATGGTGCTGCTATTATTGGTCTTGCTGC
ATTCTTGATCTAATTCTAGTTACTGATACTATATCTTTTTCTTTTTCTGTTTGGATTTCTACTAATTACATTTT
TCAATTTTCGGTTTTCAATATTATGACAAAGTTATTGTATTGAATATTTACTTTGGTACATAAAAAAAGT
TGGTGCTTTTTCTTTTAGAATTGTTTTGTTTAGATTTCTGATTTTCTTTCTTATTCTGCTTTTCATTTTCGGT
GTATAGATTACAACCTACAATAAATACCATTTTTTTCTATTAATTTTTTCATCACATTGATTAGTTTTCAAC
TTGAAAAGAATTCGAATTG

Obsérvese que los nucleótidos en rojo representan la secuencia amplificada del gen *RBT1* y lo resaltado en celeste los cebadores que originan un amplicón de mayor tamaño que el gen *HWPI* en las condiciones explicitadas en materiales y métodos.

En el producto de PCR se amplificaron dos genes diferentes, el *HWPI* y el *RBT1*, ambos de *C. albicans*. Del gen *HWPI*, se amplificaron aproximadamente 940 nucleótidos, mientras que en el *RBT1* más de 1140 nucleótidos. La amplificación por PCR de dos bandas para el gen *HWPI* en este caso se deba probablemente a un pegado inespecífico de los primers.

5.3.2 Identificación molecular del complejo *C. parapsilosis*.

Se identificaron molecularmente 7 aislamientos de *Candida* spp. que presentaron un color rosado en el medio cromogénico (CHROMagar, *Candida*) y se identificaron como *C. parapsilosis sensu stricto* por la presencia de la banda de alrededor de 380 pb producto de la amplificación con los pares de cebadores específicos para *C. parapsilosis* CPAF-CPAR (figura 13). No se encontraron aislamientos correspondientes a *C. orthosilopsis* ni *C. metapsilosis* (figura 14 y 15), las restantes especies del complejo *C. parapsilosis*, por la ausencia de la amplificación de los aislamientos con los cebadores CMEF, CMER y COPF, COPR. Cabe destacar, que los métodos microbiológicos convencionales no permiten discriminar a las diferentes especies de *C. parapsilosis sensu stricto*.

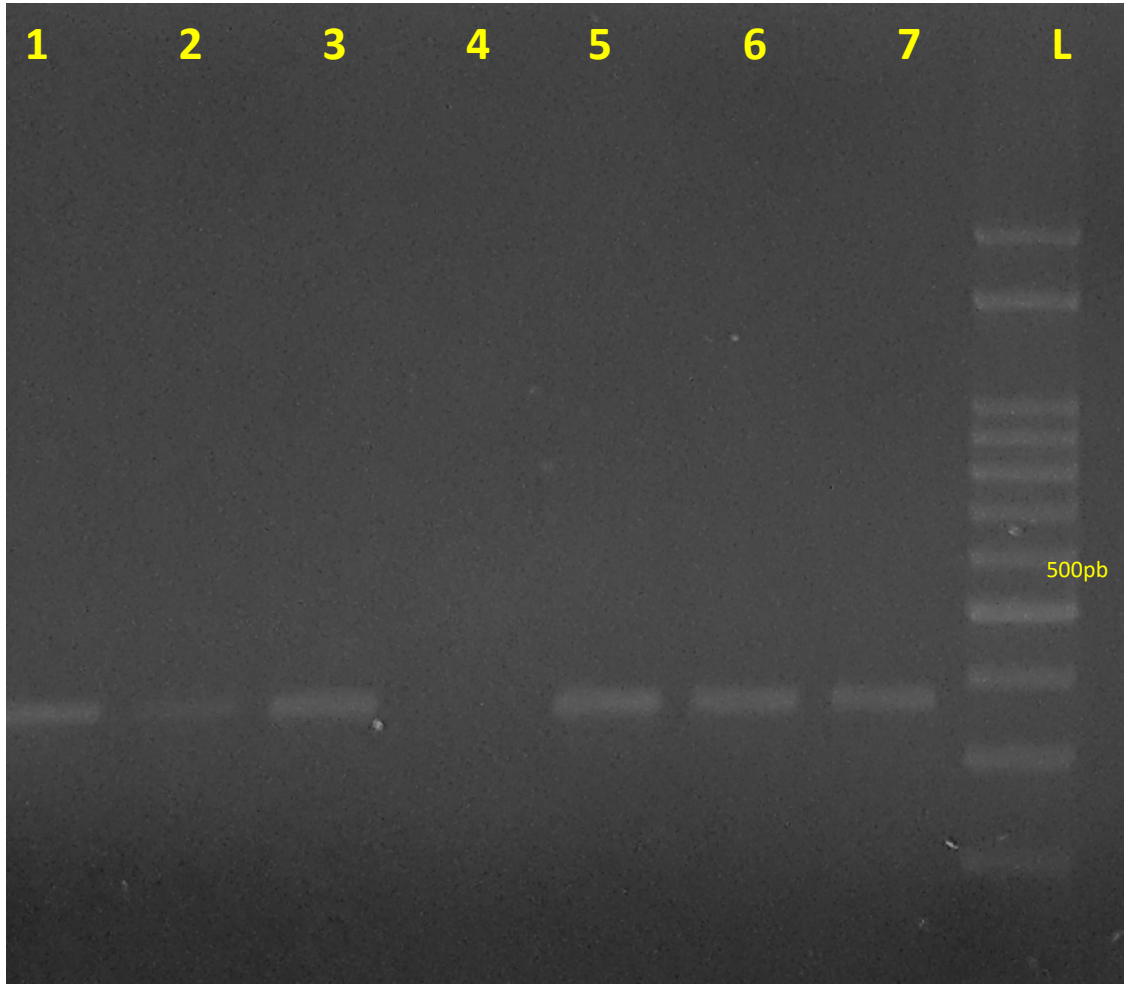


Figura 13: identificación molecular de *C. parapsilosis sensu stricto*. La banda de 380 pb corresponde a la amplificación con los cebadores específicos CPAF-CPAR de los aislamientos. La calle 4 corresponde a al control negativo. L: marcador de peso molecular de 100 pb. Las calles 1, 2, 3, 5, 6 y 7 corresponden a la identificación de *C. parapsilosis sensu stricto*.

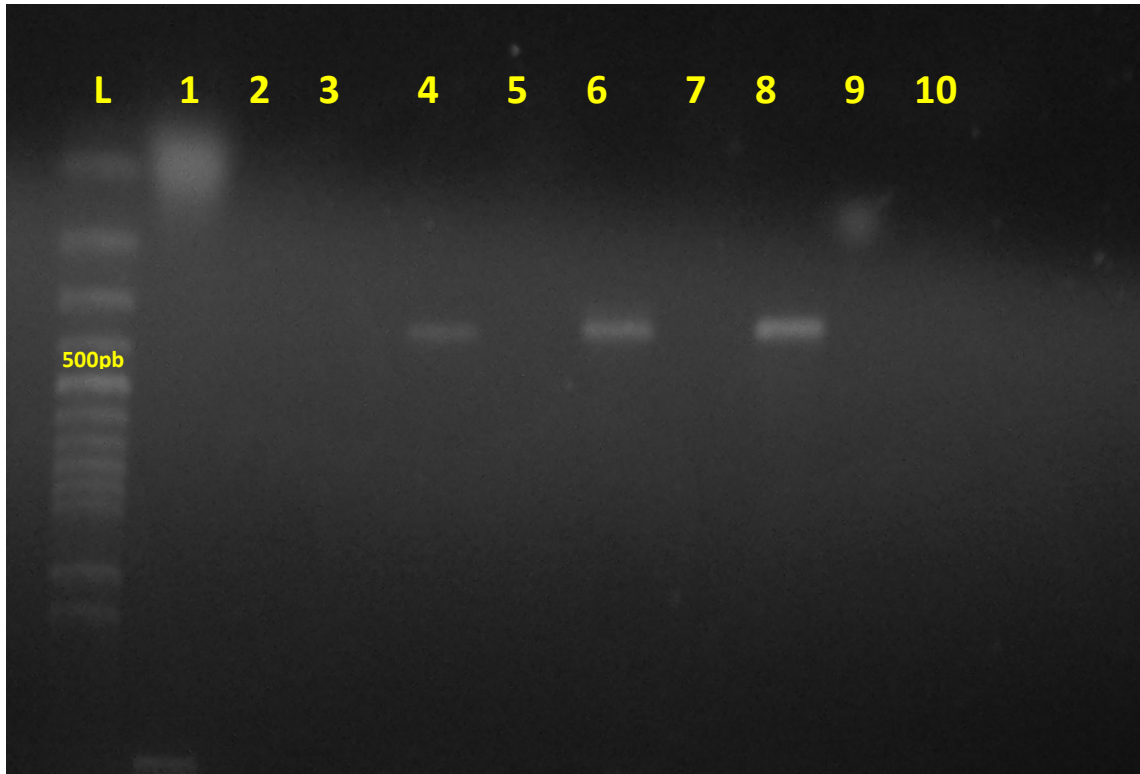


Figura 14: Amplificación con los cebadores CORF y CORR. La banda de 367 pb corresponde a la amplificación con los cebadores específicos. Las calles 4, 6 y 8 producto de amplificación de cepas control *C. orthopsilosis* Dmic 113916 (Instituto Malbrán), *C. orthopsilosis* NRRL Y-27733 y *C. orthopsilosis* NRRL Y-48468, respectivamente. L: marcador de peso molecular de 100 pb; calles 2, 3, 5, 7, 9, y 10 aislamientos de *C. parasilopsis* del presente estudio. Calle 1: control negativo. L: marcador de peso molecular de 100 pb.

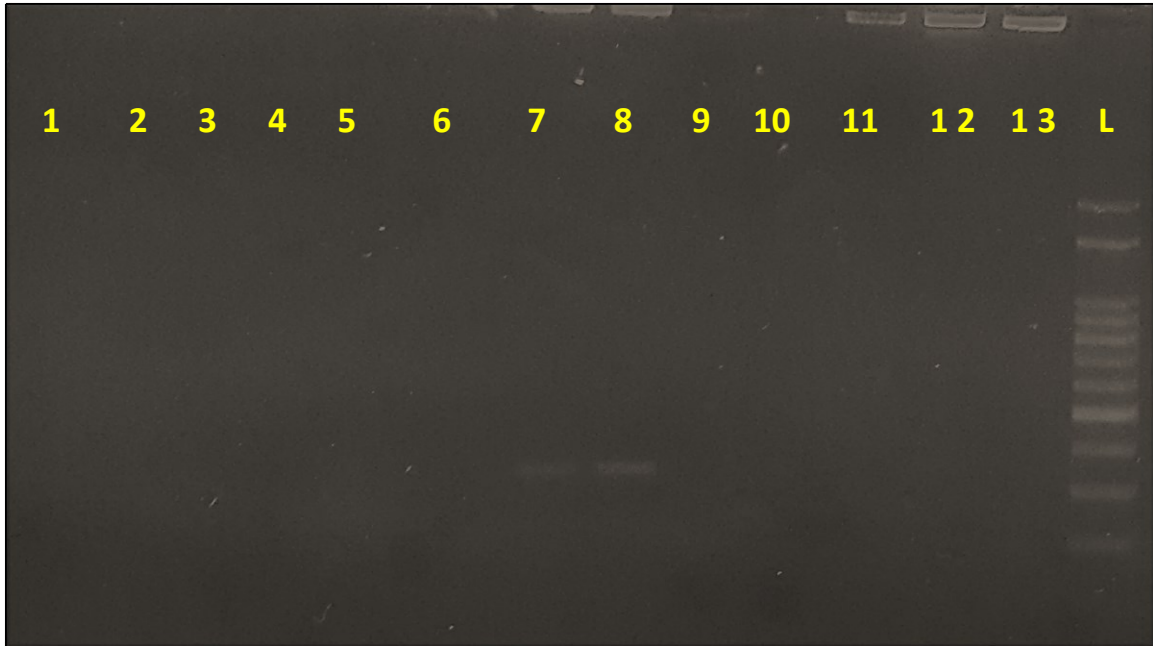


Figura 15: Amplificación con los cebadores CMEF y CMER. La banda de 374 pb corresponde a la amplificación con los cebadores específicos. Las bandas: 7 y 8 corresponden a *C. metapsilosis* Dmic 134285 (Instituto Malbrán) y a *C. metapsilosis* NRRL Y- 48469, respectivamente. Las 1-6 y 9-12 aislamientos de *C. parasilopsis* del presente estudio. Calle 13: control negativo. L: marcador de peso molecular de 100 pb

5.3.3. Identificación molecular del complejo de colonias purpuras-blancas (30) recuperadas en medio cromogénico (CHROMagar, Candida) *C. glabrata*, *C. braccarensis* y *C. nivariensis*.

Se identificó molecularmente 1 aislamientos de *Candida* spp. que presentaron color púrpuras-blanco en el medio cromogénico (CHROMagar, Candida) y resultó ser *C. glabrata* debido a la presencia de la banda de alrededor de 1000 pb con la amplificación con los pares de cebadores RPL31cgF-RPL31cgR (figura 16).

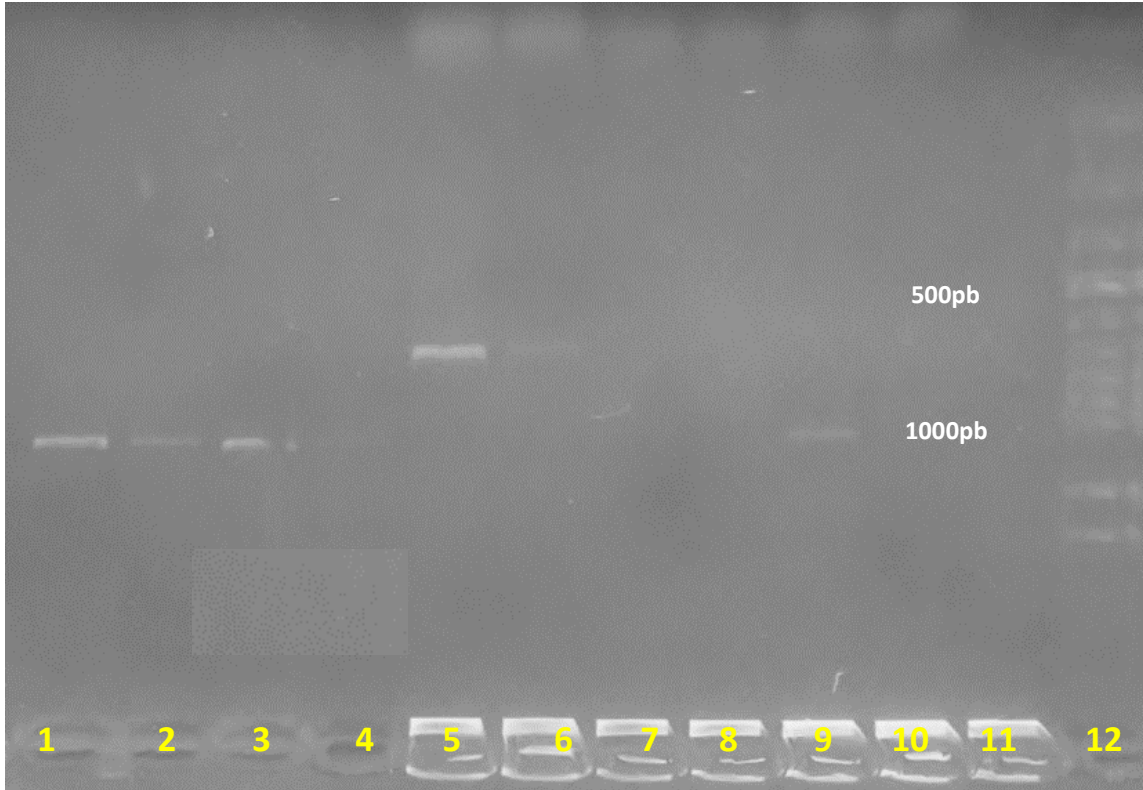


Figura 16: Amplificación con los cebadores RPL31cgF-RPL31cgR. Calles 1, 2, y 3 con una banda mayor de 1000 pb corresponde a la amplificación con los cebadores específicos del aislamiento realizado de *C. glabrata* (por triplicado). Calle 4 control negativo. Calle 5 y 6 (670 pb) corresponden *Candida nivariensis* DMIC 134286 (Instituto Malbrán) y un aislamiento de urocultivo del Centro de Micología de la Facultad de Medicina, respectivamente. Calle 9 *C. glabrata* identificada molecularmente y por microbiología convencional. Calle 12 marcador de peso molecular de 100 pb

5.4 Muestras clínicas en pacientes quemados

En un total de 36 pacientes quemados se obtuvieron 52 muestras que correspondieron a orina (urocultivo) 42,3 % (n= 22), hemocultivo 26,9 % (n= 14), biopsia cutánea 9,6 % (n=5), punta de catéter 15,4 % (n= 8) y aspirado traqueal (AT) 5,8% (n=3). El desarrollo de cultivo en medios cromogénicos de *Candida* spp. se obtuvo en promedio a los 21,4 días de ingreso a la unidad de cuidados intensivos.

Podemos observar que el hemocultivo y los urocultivos fueron las muestras más estudiadas (Gráfico 11). Al considerar, los aislamientos prevalentes encontramos a *C. albicans* con el 53,8 % (n=28) y *C. tropicalis* con el 23,1 % (n= 12) que continua en

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

orden de frecuencia (grafico 12). En el grafico 13 observamos que, en los hemocultivos, *C. albicans* fue la especie más frecuente. En el urocultivo las especies *Candida* no *albicans* predominaron a *C. albicans*.

Al considerar las tres especies de mayor prevalencia *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* en los distintos materiales clínicos (gráfico 12 y 14) podemos decir que *C. albicans* fue la levadura de más frecuente aislamiento en todos los materiales estudiados.

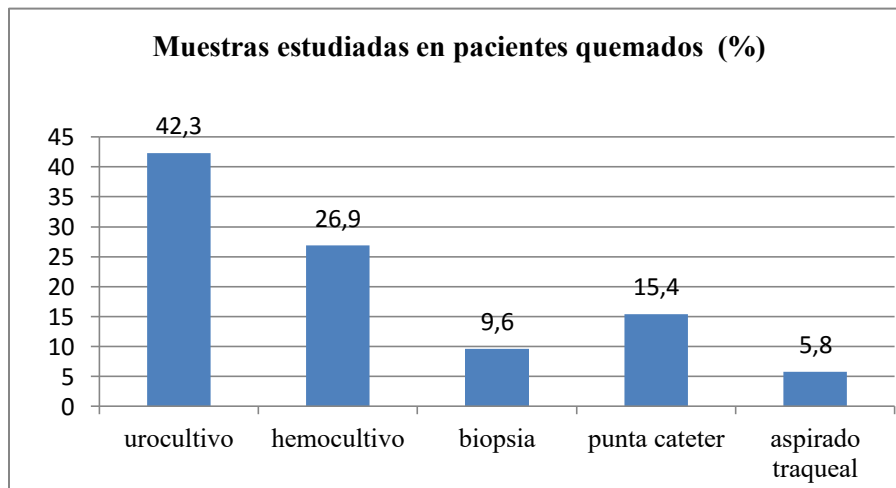


Gráfico 11: muestras clínicas para estudios micológicos en los 36 pacientes quemados.

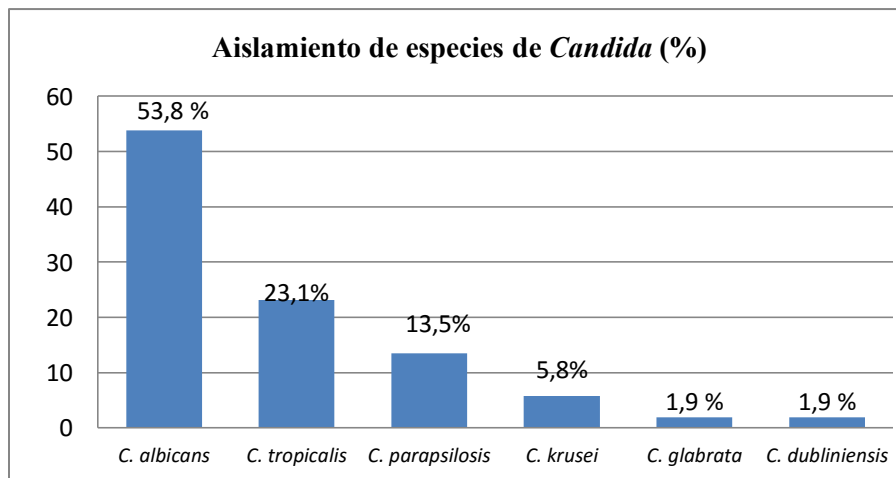


Gráfico 12: aislamiento de especies de *Candida* spp en las muestras clínicas (n= 52) de pacientes quemados

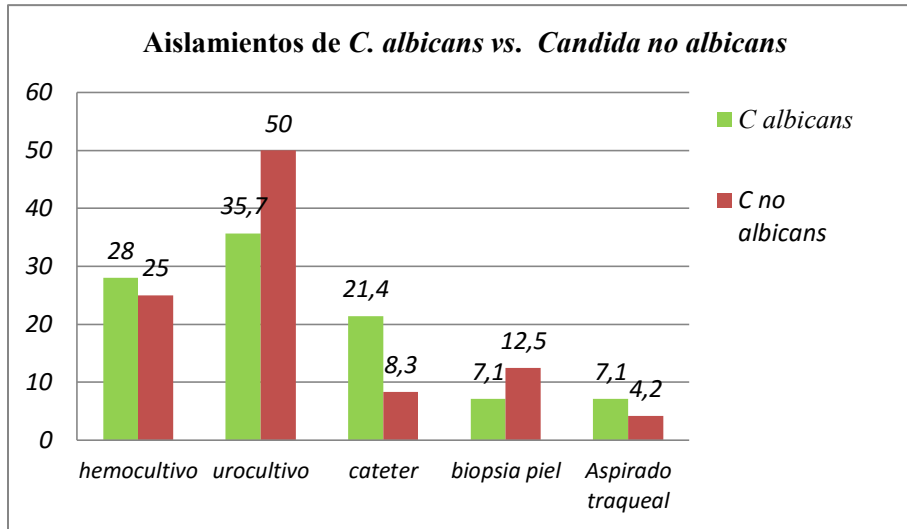


Gráfico 13: distribución de las especies de *C. albicans* vs *Candida no albicans* en los materiales clínicos estudiados (hemocultivo, urocultivo, punta de catéter, AT* (aspirado traqueal) y piel (corresponde a biopsia del material de la lesión))

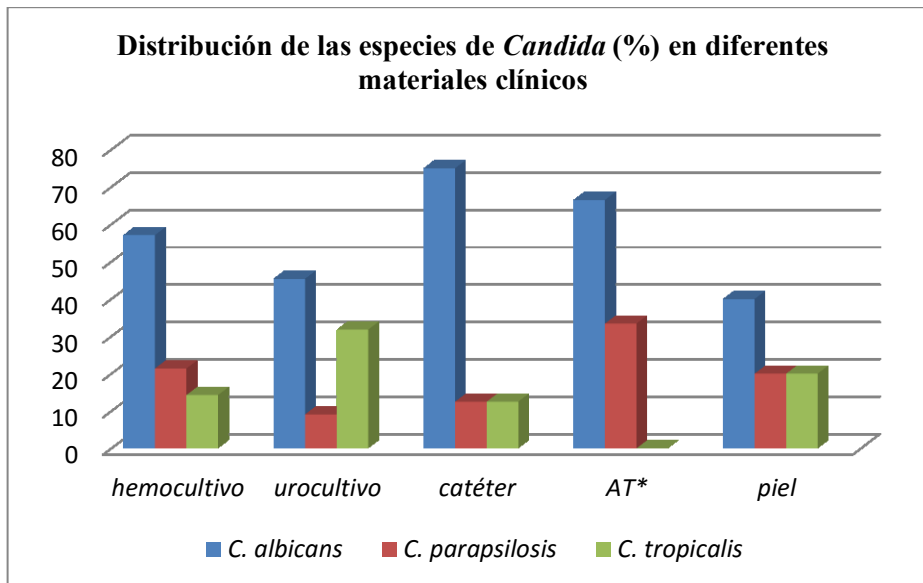


Gráfico 14. Distribución de las especies de *Candida* en los materiales clínicos estudiados (hemocultivo (n=14), urocultivo (n=22), punta de catéter (8), AT* (aspirado traqueal, n=3) y piel n=5).

Al comparar los pacientes con hemocultivos positivos (candidemias), estos representaron el 33,3 % (n=12) de los cuales falleció el 58,3 % (7/12) y esta mortalidad fue mayor a la del grupo con hemocultivos negativos (29,2 %) sin diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,091$) (Tabla 14).

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

		candidemia		Total
		no	si	
no falleció	Recuento	17	5	22
	% dentro de candidemia	70,8%	41,7%	61,1%
si falleció	Recuento	7	7	14
	% dentro de candidemia	29,2%	58,3%	38,9%
Total	Recuento	24	12	36
	% dentro de candidemia	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 14. Contingencia fallecimiento en pacientes con candidemia.

6-DISCUSIÓN.

Las infecciones fúngicas son una causa importante de morbimortalidad en pacientes quemados, ya que constituyen un huésped ideal para las infecciones oportunistas. Sus barreras anatómicas y su inmunidad se encuentran deterioradas (2,18).

La candidiasis es una enfermedad infecciosa emergente, especialmente en los pacientes críticos y grandes quemados, en los que el aumento de la sobrevida logrado en las últimas décadas ha llevado a una mayor incidencia de la enfermedad infecciosa, y concretamente de la infección fúngica (3, 5, 20).

La incidencia de infección fúngica es variable entre el 6,3 % y el 44 % dependiendo de los centros, en el presente estudio fue de un 39,3 por cada 1000 quemados por admisiones Sheridan *et al.* encontraron que la candidemia la desarrollaron el 33,4 % de los pacientes quemados, con una mortalidad del 58,3 %.(73). Es conocido que los niños pequeños y los ancianos tienen incrementos del riesgo de quemaduras y el curso clínico comparado con los otros grupos etarios (74). Coincidente con estos estudios la mayor mortalidad se encontró en los quemados mayores de 65 años, pues los niños fueron excluidos (49, 75).

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

Los pacientes quemados presentan múltiples factores de riesgo para infecciones fúngicas por especies de *Candida*, como el uso de antibióticos de amplio espectro (que alteran la biota intestinal y la de piel, promoviendo el crecimiento de levaduras), la ruptura de las barreras normales de piel y / o mucosas (como consecuencia de procedimientos quirúrgicos, traumas) el uso de catéteres venosos centrales, la sonda vesical que está asociada a riesgo de infección urinaria, el catabolismo secundario a la lesión, el empleo de aminos vasoactivas, la profilaxis de las úlceras de estrés, el gran porcentaje de superficie corporal quemada, las LIH, el uso de Propofol que puede estar asociado a riesgo de infección fúngica por su vehículo lipídico, la albúmina humana, que en nuestra unidad se administra a los pacientes de manera sistemática, el tratamiento con esteroides, que se usa de manera rutinaria en este estudio (300 mg por día de hidrocortisona), la nutrición parenteral total, la asistencia respiratoria mecánica por más de 48 hs, la permanencia en UCI, los pacientes con una puntuación de APACHE II mayor a 10, un *Candida Score* de 3 y finalmente la inmunosupresión inducida en el paciente quemado. Estos factores de riesgo permiten la proliferación y diseminación de la *Candida* a los tejidos más profundos (6)

Esto sustenta conocer la epidemiología molecular en los pacientes quemados pues enfatiza la necesidad de una correcta identificación en las especies de mayor prevalencia como los complejos: *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* para conocer la real importancia de las especies de los respectivos complejos, por las posibilidades de presentar diferencias en la sensibilidad a los antifúngicos actualmente disponibles como AMB, azoles (fluconazol y voriconazol), equinocandinas (caspofungina y anidulafungina), en este hospedero particular que lo constituye el paciente quemado (6).

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

En este estudio se observó que los pacientes quemados tenían una edad media de 46,1 años (rango 18 a 87), a predominio del sexo femenino 63,9 % y 36,9 % para el sexo masculino. Nótese que esta diferencia con ventaja femenina, se relaciona con el elemento causante alcohol y fuego directo como causa de la quemadura, según figura en las historias clínicas, por lesiones de un tercero con vínculo afectivo. Estas son parte de las causas actuales de femicidios, informadas en nuestro país, que ocurrieron y se presentaron en menores de 40 años. El sexo masculino fue exclusivo, cuando el agente causante de la quemadura resultó la nafta y la electricidad, en concordancia, con la ocupación laboral y el manejo de ese combustible. En pacientes de más de 60 años la quemadura se originó a partir de una estufa, relacionado esto, al mayor uso de este elemento en dicho grupo etario y la tendencia “a calentarse el cuerpo tocando la estufa con las ropas”.

Los pacientes estudiados presentaron en un 50 % LIH, es conocido que este tipo de lesiones causan toxicidad y daño químico en el epitelio traqueobronquial, alteran la ventilación- perfusión y producen el síndrome de distress respiratorio (49, 76). Esto llevó a una mortalidad de un 55,6 % en el grupo de pacientes con LIH. La localización topográfica de la lesión en cara se produjo simultáneamente con otros sitios en el 88,9 % de los pacientes con LIH. El combustible y el fuego estuvieron implicados como causa de accidentes en el 83,3 % de los pacientes que evidenciaron LIH. Las LIH se deben sospechar si el paciente sufrió la quemadura en un espacio cerrado, presenta quemadura facial y/o desarrolla ronquera progresiva y estridor o tos productiva de esputo carbonáceo. El efecto térmico de la LIH aparece luego de unas horas, mientras que el daño químico progresa más lentamente en uno o dos días (49).

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

La extensión de la superficie quemada predominante osciló entre 31 y 50 %, y la profundidad de la quemadura estuvo en el grado 4 en un porcentaje algo inferior al 71 % de los pacientes. El riesgo de contraer candidiasis, y por lo tanto de mortalidad, se ve incrementado en los pacientes quemados con superficie corporal total afectada superior al 30%, con quemaduras de tercer y cuarto grado de profundidad por las complicaciones inmunológicas asociadas y el mayor número de procedimientos quirúrgicos e invasivos. Esto lleva a una mayor duración de la hospitalización (2, 74, 76, 77, 78, 79, 80).

Con respecto a la localización de la quemadura podemos remarcar que fue predominante en tronco y miembros superiores; miembros inferiores fue la última en frecuencia. Se señala a la ubicación en el área perineal como otro factor que predispone a las infecciones debido a la colonización micótica que ocurre con dicha ubicación (74, 81).

El 44,4 % de los quemados refirió antecedentes patológicos, como EPOC, enfermedades cardiovasculares, DBT, obesidad, hipotiroidismo, enfermedad neurológica y oncológica, los que presentaron mayor mortalidad. En concordancia con los hallazgos, Church y col. señalan que los adultos obesos y aquellos con otras condiciones médicas tales como DBT han mostrado una mayor morbi-mortalidad (49).

Los soportes médicos realizados para mantener las funciones hemodinámicas y respiratoria en la UCI, para proveer una nutrición temprana y adecuada, en conjunción con técnicas quirúrgicas que minimicen la pérdida de sangre y el calor, constituyen medidas importantes para el cuidado de las grandes superficies quemadas en los modernos centros de quemados.

La agresión térmica da lugar a una respuesta hipermetabólica cuya magnitud se encuentra entre las más elevadas que pueden presentar los pacientes críticos. El

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

tratamiento nutricional del paciente quemado debe iniciarse de forma precoz y por la vía enteral sola o combinada siempre que sea posible. El aporte calórico total es mayor que el recomendado para otros pacientes críticos, pero no debe superar el 200% del gasto energético basal (82). La nutrición parenteral debe reservarse para los pacientes que no puedan recibir nutrición enteral, o para aquellos en los que no se alcancen los requerimientos nutricionales en forma enteral, que fue observado en el 27,8% de los pacientes. En este estudio el 22,2% de los pacientes, recibían doble administración (enteral-parenteral) por no alcanzar los requerimientos calóricos necesarios o por los ayunos que imponían las cirugías rutinarias (83).

La colonización del catéter venoso central se produce generalmente desde la piel o la conexión del mismo y se relaciona con factores como el material del catéter, la ubicación (mayor frecuencia de complicaciones infecciosas en catéteres femorales frente a subclavia y yugulares), el número de luces, el tipo de inserción, la duración del mismo y las características del paciente (84). La utilización de accesos venosos centrales estuvo presente en el 88,9 % de nuestra serie, con el agregado que la vía femoral se usó en el 90,6 %. Un reciente estudio en pacientes quemados demostró una alta correlación entre microorganismos cultivados a partir del catéter dentro de las 48 hs. de inserción, y la incidencia de infección asociada al catéter. Esta fue inversamente proporcional a la distancia de la línea de inserción al sitio de la quemadura. La infección del catéter en pacientes quemados comúnmente se produce por adherencia y migración de microorganismos de la biota a la punta del dispositivo (49,74, 78).

Las infecciones del sitio quemado son una de las más importantes y serias complicaciones que ocurren en el periodo agudo que siguen al accidente. La cirugía

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

temprana se realiza a los fines de prevenir la respuesta inflamatoria sistémica y las infecciones (49). El tratamiento quirúrgico, se practicó en un alto porcentaje (91,7 %) pues tiene como objetivo una mayor sobrevida (49). En general se prescribe la cirugía tan pronto como es posible, luego que el paciente ha sido hemodinamicamente estabilizado. Se planifica de acuerdo a la edad del paciente, su condición clínica y del grado de extensión. Puede además, requerir en pacientes con severas lesiones por inhalación el soporte de la asistencia respiratoria mecánica.

Luego de la escisión del tejido necrótico, una injerto autólogo se colocó en los pacientes como parte del tratamiento (49). Debemos considerar que la extirpación de la herida quemada y la subsecuente acción de recubrir la lesión con un injerto autólogo disminuye la colonización y desarrollo de microorganismos en el área sometida al daño térmico (85). Se debe señalar que en aquellos pacientes en los que el injerto no fue exitoso (falta de adherencia) la mortalidad fue del 100%.

Las bacterias rápidamente colonizan el tejido quemado. Estas pueden ser endógenas de la piel, tracto gastrointestinal y respiratorio, pero además pueden ser transferidos al paciente (a la superficie de la piel quemada) por agua, fómites, aire y las manos del personal de la salud. Inmediatamente del daño, las bacterias Gram positivas colonizan la herida y luego de unos pocos días aparecen las Gram negativas (49). En el presente estudio las infecciones bacterianas (Gram positivas y negativas) ocurrieron en la totalidad de los pacientes en un tiempo promedio de 4 días desde el ingreso a la unidad de cuidados críticos. Es de destacar el uso combinado de dos o más antibióticos, así como los aislamientos polimicrobianos. La presencia de infecciones bacteriana previas o concomitantes y la utilización de antibióticos de amplio espectro como carbapenemes,

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

vancomicina y piperacilina tazobactam (PTZ) y/o el uso prolongado de antibióticos han sido señalados como factores relevantes para el desarrollo de la infección micótica (74, 76). La colonización por levaduras ocurre más tardíamente como consecuencia del amplio uso de la antibioterapia (49), en el presente trabajo se detectaron las levaduras en las muestras clínicas estudiadas en promedio a los 21,4 días de ingreso a la UCI (49).

En la actualidad el pronóstico APACHE II es ampliamente utilizado en los pacientes ingresados en las UCI para determinar cuantitativamente la gravedad de los individuos y pronosticar las probabilidades de sobrevida, independientemente al diagnóstico de ingreso, y evaluar retrospectivamente la calidad de desempeño de una UCI. El 47,2 % de los pacientes presentó un valor de APACHE II mayor de 30 y si el índice lo consideramos por encima de 21 este representó al 72,2 % de los quemados, lo que significa una alta gravedad y la posibilidad de un curso fatal. Las cifras de mortalidad varían entre 14-70 % en pacientes quemados (3). Estos valores son dependientes del hospital, tipo de terapia intensiva considerada, que en nuestro caso es específica, del lugar de estabilización de los pacientes previo al ingreso a UCI, entre otros factores (52, 86). En pacientes con un APACHE II entre 30 y 45, se recuperaron más del 50% de especies de *Candida*. Por otro lado apreciamos que con APACHE II entre 6 y 10 no se constataron óbitos (78).

La frecuencia de colonización fúngica aumenta en forma sostenida durante la estancia hospitalaria alcanzando un máximo entre la segunda y cuarta semanas (87). Las candidiasis se produjeron dentro de 1-3 semanas de la admisión, lo que está en consonancia con los casos reportados en la literatura médica (49, 88). Murray y col. informaron que el crecimiento en las biopsias de piel, sangre, aspirado traqueal y las

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

puntas de catéter por especies de *Candida* se inició luego de 2 semanas de la lesión térmica (89). Una posible explicación para esto podría ser que se necesita un período de 2 semanas para la colonización exógena de las lesiones o por la propia biota del tracto respiratorio o gastrointestinal (90).

C. albicans es el 4º organismo aislado en orden de frecuencia en pacientes de la unidad de cuidados críticos y representa el 8 al 10% de todas las infecciones nosocomiales en los Estados Unidos. En una revisión de 10 años (julio 1998 a diciembre 2007) en el servicio de *Victorian Burns*, Melbourne, Australia, de 1929 pacientes ingresados con lesión por quemadura aguda, en 143 se aislaron levaduras del género *Candida*, más comúnmente *C. albicans* (80). En el presente estudio se observó a *C. albicans* como la especie más prevalente en pacientes quemados recuperada del sitio de la quemadura, de hemocultivos, de urocultivo, aspirado traqueal y catéteres, coincidente con la bibliografía (91).

Sin embargo, otra especie de *Candida* como *C. tropicalis* (23,1 %) emergió como una especie importante en este grupo de pacientes de manera similar a lo reportado por otros autores (10, 91, 92). En un estudio epidemiológico llevado a cabo en 12 centros médicos brasileños, *C. tropicalis* fue la segunda especie aislada con mayor frecuencia y representó el 33-48% de todos los casos de candidiasis (93).

Con menores registros, en nuestro estudio, se hallaron a *C. parapsilosis sensu stricto* (13,5%), *C. krusei* (5,8%), *C. glabrata* (1,9%) y *C. dubliniensis* (1,9%). Los datos epidemiológicos recientes revelan un cambio en los aislamientos micológico, y mientras que *C. albicans* sigue siendo el agente causal más frecuente, su prevalencia relativa en la

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

infección disminuye con el aumento de la frecuencia de otras especies en conjunto como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (94).

El aumento de la participación de especies de *Candida* no-*C. albicans* en candidiasis puede relacionarse con el uso de métodos apropiados de identificación (convencionales y moleculares) y en ciertas ocasiones constituye un reflejo del nivel intrínsecamente o naturalmente de resistencia a ciertos antifúngicos (usados en tratamiento o en profilaxis) en comparación con *C. albicans*.

C. parapsilosis es la más común después de *C. albicans* en hospitales españoles y canadienses (2). Y también es hallada en segundo término en hospitales de nuestro país. Durante la última década, la incidencia de las infecciones por *C. parapsilosis* ha aumentado drásticamente. De hecho, los informes indican que *C. parapsilosis* constituye la segunda especie aislada de *Candida* (95). Es una de las especies fúngicas más frecuentemente aislada de las manos del hombre y en especial del personal de salud. Esta especie representa el 15,5 % de los aislamientos de *Candida* spp. en América del Norte, y el 23,4 % en América Latina, en tanto que *C. albicans* se encontró en el 51,5 %, y 36,5%, de las mencionadas regiones respectivamente. *C. glabrata* se halla en un 21,3 % en América del Norte (96). El aumento de la incidencia de las infecciones por *C. parapsilosis* en el torrente circulatorio se ha atribuido a una variedad de factores de riesgo, incluyendo las capacidades de crecimiento selectivo del organismo en soluciones de hiperalimentación y su capacidad de colonizar los dispositivos intravasculares y materiales protésicos. En un estudio español sobre 72 pacientes con infecciones invasivas por *C. parapsilosis*, los factores de riesgo que se han identificados son: uso de catéteres venosos centrales (97 %), tratamiento antibiótico previo (91 %), nutrición parenteral

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

(54%) y cirugía previa (46 %) (95). En un informe de 64 episodios en hospitales brasileños (entre 2002 y 2003) de candidemia por *C. parapsilosis*, los factores de mayor riesgo fueron, la neutropenia y el uso de catéteres venosos centrales (97). En un estudio de cohorte retrospectivo, de la unidad de quemados de cuidados intensivos del Hospital General de Viena, *Candida albicans* fue la especie más común (61,1 %), seguido de *Candida parapsilosis* (27,8 %) (98). En trabajos realizados donde han participado Terapias Intensivas de Argentina se evidencia que las especies de *Candida* no-*C. albicans* superan a las *C. albicans*, con la preponderancia de la *C. parapsilosis* (99,).

En cuanto a mortalidad y especies, se señala que la mayor mortalidad se produce en las infecciones por *C. krusei* (52,9 %) y la menor para *C. parapsilosis* (23,7 %), mientras que las tasas intermedias se informaron para *C. albicans* (35,6 %), y *C. tropicalis* (41,1 %) (24). Sin embargo, este dato no pudo ser relevado pues la candidemia se registró en un número pequeño de pacientes quemados.

Los estudios microbiológicos realizados en la identificación de las especies de *Candida* recuperadas de las muestras clínicas coincidieron con los estudios moleculares en las especies de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*; y en *C. glabrata*. En tanto, que *C. parapsilosis* lo fue por estudios microbiológicos y *C. parapsilosis sensu stricto* por métodos moleculares.

La *C. dubliniensis* es una levadura originalmente descrita en 1995 (101) y posee características fenotípicas similares a *C. albicans*. Por ello, puede conducir a una incorrecta identificación de la misma y así sobreestimar los reportes de *C. albicans* en las candidiasis, lo cual presumiblemente ocurrió en el pasado y aconteció en este estudio retrospectivo de levaduras obtenidas de pacientes quemados pues fue incluida como *C.*

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

albicans al momento del diagnóstico microbiológico, (102) dado que requiere de una metodología apropiada para su investigación (10, 11, 69). La reacción de PCR utilizada en este estudio, pudo diferenciar exitosamente los aislamientos clínicos de *C. albicans* de los de *C. dubliniensis* (13). Además, en nuestro caso corroboró a los estudios microbiológicos convencionales realizados. La especie *C. albicans* es la más comúnmente recuperada de las infecciones humanas y está relacionada fenotípicamente no solo a *C. dubliniensis* sino a otra levadura recientemente descrita como *C. africana* y aislada especialmente en secreciones vaginales (12, 102, 103, 104). La amplificación por PCR del gen que codifica para *HWP1* permitió identificar molecularmente a los restantes aislamientos como *C. albicans* (13). La proteína HWP1 es una de las adhesinas mejor conocidas de *C. albicans*. Se encuentra expuesta en la superficie celular y es expresada durante la formación del tubo germinativo y en la hifa verdadera. Esta proteína actúa como sustrato para las transglutaminasas del huésped y permiten la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales (105). El gen *HWP1* se expresa durante la formación del tubo germinativo, y parece ser característico de aislamientos de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* (13). En nuestro estudio, *C. albicans* produjo dos fragmentos de ADN. El fragmento de menor (941 pb.) tamaño es producto de la amplificación del gen *HWP1* (13). La presencia de doble bandas como producto de amplificación de este gen ha sido indicado por Padovan y col quienes señalaron la presencia de un nuevo alelo del gen *HWP1* (HWP1-2; GenBank: EU044787.1). La observación en este caso correspondió a dos fragmentos (839 pb y 941pb) de ADN que demostraron a *C. albicans* como heterocigoto al locus *HWP1* (106). Esto fue corroborado en la tesina de Maestría en Biología Molecular Médica de María Josefina Mucci (107). Sin embargo, en este caso la

doble banda observada en algunos aislamientos se debió a la amplificación parcial del gen *RBT1* debido a un pegado inespecífico de los cebadores. En forma similar a lo detectado en el presente trabajo, Kwok y col señalaron el efecto de la unión del cebador-templado realizado en la PCR y encontraron que la uniones en el extremo '3 C-C y adicionales uniones en las últimas cuatro bases dramáticamente disminuyen la eficiencia del producto de PCR (108). Las proteínas HWP1, HWP2/PGA8 y RBT1 son miembros de la familia proteicas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol) e identificadas en el genoma de *C. albicans* (102). De esta forma la presencia de simple banda o la doble banda como producto de la amplificación con los cebadores CRf- CRr en los aislamientos verde puede deberse a un gen *HWPI* heterocigota o en otros casos donde se observe una banda mayor de 1000 pb se deba a la amplificación inespecífica del gen *RBT1*, por lo que un mejor control de las condiciones de amplificaciones debería llevarse a cabo en esta última circunstancia.

En este estudio, se destaca la ausencia de *C. africana* en las muestras de los pacientes quemados. Los aislamientos clínicos de *C. africana* representan en general un muy pequeño porcentaje de *C. albicans* y actualmente muy pocos estudios registran su prevalencia (103, 106). Es conocido que *C. africana* se halla en secreciones vaginales de pacientes provenientes de África y Europa; y recientemente fue aislada de una paciente de argentina (12, 109, 110). Se ha recuperado de hemocultivo en un paciente chileno ampliando la distribución geográfica y anatómica del aislamiento en esta especie (14).

Las especies muy relacionadas como *C. glabrata*, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* no pueden diferenciarse por los métodos microbiológicos convencionales (27, 111) y requieren de la identificación molecular. Esta se realiza por PCR para el gen *RLP31* que

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

codifica para una proteína ribosomal de 60S (28). Esta reacción nos permitió identificar a al único aislamiento de este complejo, como *C. glabrata*. No detectamos la presencia de *C. bracarensis* ni de *C. nivariensis*. Se describen que aislamientos clínicos provenientes de colecciones de cultivos identificados fenotípicamente como *C. glabrata* y analizados molecularmente, representaron a las especies de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* en menos del 2,2 % y del 0,1 % respectivamente (112, 113). Las especies del complejo de *C. parapsilosis* no pueden diferenciarse por los métodos microbiológicos convencionales (114). La amplificación por PCR con primers específicos para cada una de las especies del complejo permitió la identificación *C. parasilopsis sensu stricto*.

En pacientes quemados, el principal sitio de infección fúngica es la quemadura propiamente dicha, pero pueden desarrollarse infecciones en el torrente circulatorio, tracto respiratorio (neumonía), urinario (infecciones en el tracto urinario, ITU) y en el gastrointestinal (115). El diagnóstico histológico de la lesión en los quemados es el método adecuado para confirmar la infección al observar a los microorganismos invadir el tejido viable debajo de la escara (85). El estándar de oro para el diagnóstico de la candidemia es el hemocultivo.

En el presente estudio, el 26,9 % de los pacientes quemados desarrollaron candidemia y se observó que con mayor extensión de superficie corporal total quemada (mayor al 50%), la prevalencia de la candidemia alcanzó el 44,4 % (4/9) (6).

El cultivo del aspirado traqueal tiene un elevado valor predictivo negativo, pero es muy poco específico; el cultivo cuantitativo (punto de corte 10^5 - 10^6 UFC/ml) mejora sensiblemente su especificidad y en nuestro caso solo se tomaron tres muestras de aspirados traqueales siendo *C. albicans* fue la especie prevalente.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

Aun con medidas preventivas, la administración de antibióticos y la más cuidadosa asepsia de la uretra y del catéter, las ITU en pacientes están asociadas con el uso de catéteres por largos periodos de tiempo. La infección nosocomial en UTI se produce habitualmente por la introducción directa de microorganismos en el momento de la cateterización. Las infecciones por *Candida* en UTI se producen luego de la introducción de los catéteres urinarios, típicamente luego de la bacteriuria y de la terapia antibiótica. En algunas circunstancias la bacteriuria y candiduria puede presentarse simultáneamente (8, 115). Las especies de *Candida* no-*C. albicans* se recuperaron en mayor proporción que las de *C. albicans* en orina. Sin embargo, al considerar a las especies individualmente *C. albicans* resultó la especie más prevalente. A diferencia de lo observado por Kim J y col. quienes hallaron un mayor porcentaje de *C. tropicalis* a partir de la segunda a quinta semana en la orina de los pacientes quemados (115).

Sobre la base de la eficacia, el perfil de seguridad y los costos, el fluconazol se considera la opción empírica de primera línea frente a candidiasis invasiva en pacientes no-neutropénicos y hemodinámicamente estables. En presencia de inestabilidad hemodinámica, o en pacientes que son sospechosos de estar infectados con *C. glabrata* o *C. krusei*, los agentes con amplio espectro, como polienos, equinocandinas, y, posiblemente, el voriconazol o posaconazol, son opciones posibles para el tratamiento empírico de la candidemia. Las guías de IDSA 2009 (116) señalan que todos los pacientes con candidemia demostrada deben recibir antifúngicos específicos y que los catéteres venosos centrales deben ser sustituidos si es posible. La duración exacta del tratamiento no está bien establecida. Sin embargo, se recomienda que el tratamiento debe

continuarse durante 14 días después del último cultivo positivo, y si los signos y síntomas atribuibles a la candidemia se han resuelto (117).

7-CONCLUSIÓN

En los pacientes quemados coexistieron numerosos factores de riesgo conocidos para la colonización e infección por *Candida*: la pérdida de la barrera cutánea, uso previo de antimicrobianos, implantación de catéteres intravasculares, sonda vesical, admisión en UCI, el catabolismo secundario a la lesión, nutrición parenteral total, ventilación mecánica invasiva, aminas vasoactivas, profilaxis de las úlceras de estrés, gran porcentaje de superficie corporal quemada, LIH, uso de Propofol, la albúmina humana, el tratamiento con esteroides y las alteraciones inmunológicas. Estos factores de riesgo permiten la proliferación y diseminación de la *Candida* a los tejidos más profundos. Además, podemos remarcar que:

1- Al tratarse de un centro específico, se reciben pacientes de gravedad (quemaduras de grado 4 en el 69,4 % de los pacientes). Permanecieron internados en promedio 46,7 días, con un rango entre 9 y 218 días. Pertenecieron al sexo femenino el 63,9 % (n=23) y al masculino 36,1 % (n=13).

2- La extensión de la superficie quemada predominante osciló entre 31 y 50%, en un 33,3% de pacientes ($p=0,03$) y se observó en el grupo etario de mayor edad (> 59 años) relacionado con la fuente estufa y el fuego, en tanto con superficie corporal quemada entre el 71% a 100%, la edad promedio fue de 19 años.

3- Los agentes causantes de la quemadura fueron: combustible (alcohol, nafta, explosión) 41,7% y otras causas (fuego 25,0 %, estufa 13,9 %, agua 16,7 % y por último electricidad 2,8 %). Al considerar la etiología combustible, el alcohol fue el de mayor prevalencia en

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

el 73,3 % y en especial en el sexo femenino. Esta relación del elemento alcohol y el fuego en el sexo femenino como causa de la quemadura, se correlaciona con lesiones de un tercero con vínculo afectivo. Son parte de las causas actuales de femicidios, que se informan en nuestro país y que se presentan en menores de 40 años. La quemadura por electricidad y nafta fueron exclusivas del sexo masculino por ser de índole laboral.

4- Con respecto a la superficie quemada y la causa: combustible vs. otros agentes, observamos que, la menor extensión de superficie quemada fue significativa con causas no combustibles y en tanto encontramos el grado 2 (mayor extensión) cuando el agente es combustible (alcohol, nafta, explosión).

5- Al considerar la localización topográfica de la zona quemada, se registró que el 75 % de los pacientes presentaron una combinación de sitios quemados (tronco, cara, miembros inferiores y miembros superiores) y solo el 25 % presentaron únicamente lesiones en miembros inferiores, superiores o en tronco (n=1).

6- El 50% de los pacientes quemados presentaron LIH y estuvo implicado el combustible y el fuego como agente de la quemadura. Los pacientes con LIH presentaron un mayor óbito ($p= 0,04$).

7- Las infecciones bacterianas estuvieron presentes en el 100 % de los pacientes quemados y los microorganismos fueron: bacterias Gram negativas como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC). Entre los Gram positivos, *S. aureus* meticilinoresistente (SMR) fue el más prevalente. El momento de aparición de las infecciones bacterianas en promedio fue 4 días post ingreso a la unidad de cuidados intensivos.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

8- La gravedad de los pacientes estuvo dado por: -el valor de APACHE II, observamos que mayor número de pacientes presentó un valor entre 31- 40 en un 38,9 % y con valor entre 41-46 en un 8,3 %.- el *Candida score* fue de 3 en el 77,7 %. - la nutrición de los pacientes quemados que estuvo representada por la vía enteral sola o combinada (oral, parenteral y oral-parenteral- enteral) en el 81,6 %. – la utilización de vías central en 88,9% a predominio de la vía femoral obligada por la localización de la quemadura y con un promedio de 5,8 vías por paciente – el uso de intubación orotraqueal y la traqueotomía. – la utilización de inotrópicos y el tratamiento antifúngico fluconazol y/o AMB liposomal- las intervenciones quirúrgicas escarectomías, escarotomías, fasciotomías y amputación de miembros en el 91,7 % de los quemados.

9- La mortalidad fue mayor en pacientes que recibieron la fasciotomía como tratamiento quirúrgico ($p=0.04$).

10- A posterior del tratamiento quirúrgico y luego de obtener un lecho de tejido viable, se procedió a cubrir la herida con injertos de piel (autoinjerto). El mismo exhibió buena adherencia al tejido subyacente en un 75%. En el 25% que no fue exitoso, el porcentaje de mortalidad fue de 100 % ($p < 0,01$), cuya causa principal es el shock séptico (requirieron el uso de inotrópicos).

11- El óbito ocurrió en el 38,8 % pacientes y la misma se observó que fue mayor entre los mayores de 65 años ($p= 0,018$), con el uso de inotrópico (noradrenalina) ($p < 0,001$) y en el grupo con antecedentes o factores de riesgos ($p = 0,002$).

12- Las infecciones fúngicas son una causa importante de morbimortalidad en pacientes quemados, ya que constituyen un huésped ideal para las infecciones oportunistas. La incidencia de infección fúngica representó en 39,3 por cada 1000 admisiones. Las

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

candidiasis se produjeron en promedio a los 21,4 días de ingreso a la unidad de cuidados intensivos (rango 1-3 semanas).

13. El hemocultivo y los urocultivos fueron las muestras más estudiadas para los análisis micológicos.

14- La levadura de más frecuente aislamiento fue *C. albicans* en todos los materiales clínicos analizados. Así, *C. albicans* estuvo representada con el 53,8 %, *C. tropicalis* con el 23,1 %, *C. parapsilosis sensu stricto* 13,5 %, *C. krusei* 5,8 %, *C. glabrata* y *C. dubliniensis* 1,9 % cada una. En los hemocultivos, *C. albicans* fue la especie prevalente, seguida por *C. parapsilosis*. En el urocultivo las especies *Candida* no *C. albicans* sobrepasaron a *C. albicans*.

15- Los pacientes con hemocultivos positivos (candidemias), presentaron mayor mortalidad que aquellos con candidemias negativas, aunque sin diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,091$).

16- La identificación molecular coincidió con la microbiológica en *C. albicans* y *C. dubliniensis*. En tanto que se requirió de identificación molecular para identificar a los aislamientos de *C. parapsilosis* y de *C. glabrata* como *C. parapsilosis sensu stricto* y *C. glabrata* dentro del complejo de esta última especie.

17- La amplificación por PCR del gen *HWPI* para las especies de *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana* confirmó a los aislamientos como *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Esto concuerda con la identificación microbiológicas de las colonias verde en el CHROMAgar *Candida*®, que produjeron clamidoconidios en agar leche-Tween 80 y que en solo un aislamiento formó clamidoconidios en medio de Staib y correspondió a *C. dubliniensis*. No se registró la presencia de *C. africana*.

18- En nuestro estudio, existieron aislamientos de *C. albicans* que la amplificación del gen *HWPI* produjo dos fragmentos de ADN. Un fragmento menor de 941 pb y otro de mayor tamaño que se debió a la amplificación parcial del gen *RBTI* por un pegado inespecífico de los cebadores. La secuenciación de ambos genes confirmaron a *C. albicans*.

19- La identificación molecular de las especies del complejo de *C. glabrata* a través de la reacción de PCR para el gen *RLP31* que codifica para una proteína ribosomal de 60S determinó la ausencia de *C. bracarensis* y *C. nivariensis*, confirmando la presencia de *C. glabrata*.

20- La identificación molecular de las especies del complejo de *C. parapsilosis* con cebadores específicos para cada una de las especies de este complejo derivados de secuencias dentro de la región de ITS1 y ITS2 del *rDNA* permitió la identificación *C. parapsilosis sensu stricto*. No se detectó la presencia de *C. orthosilopsis* y *C. metapsilosis*.

8-RESUMEN.

Se analizaron las historias clínicas de 36 pacientes quemados con infección fúngica documentada, internados durante el período comprendido entre enero 2011 y diciembre del 2014 en el área de internación de Terapia Intensiva del Hospital Municipal de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Se identificaron por microbiología convencional y molecular a 52 especies de *Candida* provenientes de la colección de cultivo que el Laboratorio del Hospital de Quemados conserva a -20 °C, correspondiente a los pacientes estudiados. La internación de los pacientes fue promedio 46,7 días, con un rango entre 9 y 218 días. Pertenecieron al sexo femenino el 63,9 %

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

(n=23) y al masculino 36,1 % (n=13). Se observó un predominio de una extensión de la superficie corporal quemada entre 31 y 50 % en el 33,3 % de los pacientes ($p=0,03$). Esta se presentó en el grupo etario de mayor edad (59 años), en tanto entre el 71 y 100%, la edad promedio fue de 19 años. Al considerar la profundidad de la quemadura específicamente la de grado 4, se observó en el 69,4 % de pacientes, esto marca la severa gravedad de las lesiones en los pacientes estudiados. El 75 % de los pacientes presentaron una combinación de sitios quemados (tronco, cara, miembros inferiores y miembros superiores) y solo el 25 % exhibieron lesiones en miembros inferiores, superiores o en tronco. Los agentes causantes de la quemadura fueron: combustible (alcohol, nafta, explosión) 41,7 %, fuego directo 25,0 %, estufa 13,9 %, agua 16,7 % y por último electricidad 2,8 %. Debemos destacar que cuando el agente causal de la quemadura resultó el combustible, el alcohol fue el agente de mayor prevalencia. Al relacionar a los agentes causales y la edad observamos que cuando la fuente fue la estufa y el fuego las quemaduras se presentaron a una mayor edad promedio, en tanto que cuando lo fue el alcohol, combustible y electricidad se presentaron a menor edad. Al analizar los agentes causales y el género, podemos apreciar que el elemento alcohol, fue prevalente en el sexo femenino. Esta superioridad femenina, se relaciona con el agente causante alcohol y fuego directo como causa de la quemadura, según figura historia clínica por lesiones de un tercero con vínculo afectivo. Son, en parte las causas actuales de femicidios, que se informan en nuestro país y que se presentan en menores de 40 años. La quemadura por electricidad y nafta fueron exclusivas del sexo masculino. Al relacionar la superficie quemada y la causa (combustible vs. otros agentes), se encontró que causas no combustibles ocasionan una menor superficie quemada ($p= 0,01$), en tanto el grado 2

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

se presenta cuando el agente fue combustible (alcohol, nafta, explosión) ($p=0,03$), como resultado de una mayor profundidad de la quemadura. El 50 % de los pacientes quemados presentaron LIH, implicados el combustible y el fuego como agente de la quemadura. Se requirió de vías centrales en el 88,9 % de los quemados. La vía femoral se usó en el 90,6 % y el 9,4 % las vías superiores (subclavia y/o yugular). El promedio de vías utilizadas en cada paciente fue de 5,8. La intubación orotraqueal y la traqueotomía se practicaron en el 72,2 % y 41,7 %, respectivamente. Se practicó tratamiento quirúrgico en el 91,7 % de los pacientes (escarectomías 100%, escarotomías 42,4%, fasciotomías 54,5% y amputación de miembros 6,1%) y sin tratamiento quirúrgico (sólo curación con lavados) se encontraron 8,3 % de los quemados. Luego del tratamiento quirúrgico y de obtener un lecho de tejido viable, se procedió a cubrir la herida con injertos de piel. Se les aplicó autoinjerto a 97,2%. El mismo exhibió buena adherencia al tejido subyacente en un 75%. En el 25% que no fue exitoso, el porcentaje de mortalidad fue de 100 % ($p < 0,01$), cuya causa principal es el shock séptico. El requerimiento de inotrópicos fue del 72,2 % y de antifúngico del 91,7%. Se inició la terapia con fluconazol en el 58,8% y el resto anfotericina B liposomal. La mortalidad ocurrió en el 38,8 % pacientes y se observó que fue mayor entre los mayores de 65 años ($p = 0,018$), con el uso de inotrópico (noradrenalina) ($p < 0,001$), con LIH ($p = 0,04$), en pacientes que se les practicó una fasciotomía ($p=0.04$) y en el grupo con antecedentes o factores de riesgos ($p = 0,002$). Las infecciones bacterianas estuvieron presentes en el 100 % de los pacientes quemados y los microorganismos fueron: bacterias Gram negativas multirresistentes como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC). Entre los Gram positivos, *S. aureus* meticilinoresistente (SMR) fue el más prevalente. El momento de aparición de las infecciones bacterianas en promedio fue 4 días post ingreso a la unidad de cuidados intensivos. El 38,9 % de los pacientes presentaron un APACHE II entre 31-40 y el 8,3 % entre 41-46. El *Candida score* fue de 3 en el 77,7 %. Las infecciones fúngicas son una causa importante de morbimortalidad en

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

pacientes quemados, ya que constituyen un huésped ideal para las infecciones oportunistas. La incidencia de infección fúngica representó en 39,3 por cada 1000 quemados y las candidiasis se produjeron en promedio a los 21,4 días de ingreso a la unidad de cuidados intensivos (rango 1-3 semanas). La levadura de más frecuente aislamiento fue *C. albicans* en todos los materiales clínicos analizados (biopsia de la lesión, urocultivo, hemocultivo, aspirado traqueal, punta de catéter). Así, *C. albicans* estuvo representada con el 53,8 %, *C. tropicalis* con el 23,1 %, *C. parapsilosis sensu stricto* 13,5 %, *C. krusei* 5,8 %, *C. glabrata* y *C. krusei* 1,9 % cada una. En los hemocultivos, *C. albicans* fue la especie prevalente, seguida por *C. parapsilosis*. En el urocultivo las especies *Candida* no-*C. albicans* sobrepasaron a *C. albicans*. Los pacientes con hemocultivos positivos (candidemias), presentaron mayor mortalidad que aquellos con candidemias negativas aunque sin diferencia estadísticamente significativa ($p= 0,091$). La identificación molecular (la amplificación por PCR del gen *HWPI* coincidió con la microbiológica en *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Existieron aislamientos de *C. albicans* que la amplificación produjo dos fragmentos de ADN. El fragmento de menor (941 pb) tamaño es producto del gen *HWPI* y el fragmento de mayor tamaño se debió a la amplificación parcial del gen *RBT1* por un pegado inespecífico de los cebadores, pero se confirmó por secuenciación de ambos clones a *C. albicans*. Para la identificación de *C. parapsilosis* y de *C. glabrata* como *C. parapsilosis sensu stricto* y *C. glabrata* dentro del complejo de esta última especie, se requirió de la identificación molecular a los aislamientos. En el complejo de *C. glabrata* a través de la reacción de PCR para el gen *RLP31* que codifica para una proteína ribosomal de 60S determinó la ausencia de *C. bracarensis* y *C. nivariensis*; y confirmó la presencia de *C. glabrata*. La identificación molecular de las especies del complejo de *C. parapsilosis* con cebadores específicos para cada una de las especies de este complejo derivados de secuencias dentro de la región de ITS1 y ITS2 del *rDNA* permitió la identificación *C. parapsilosis sensu stricto*. No se detectó la presencia de *C. orthosilopsis* y *C. metapsilosis*.

8-ABSTRACT.

Medical histories of 36 burned patients with documented fungal infection, admitted to the Intensive Care Unit of the *Hospital Municipal de Quemados del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires* between January 2011 and December 2014, were analyzed. A total of 52 species of *Candida* were identified by conventional and molecular methods from the culture collection stored at -20 °C at the Laboratory of *Hospital de Quemados* in the patients studied. The mean hospitalization period was 46.7 days, ranging from 9 to 218 days. They belonged to females 63.9% (n = 23) and 36.1% male (n = 13). The burned body surface area was estimated at 31-50% in 33.3% of the patients ($p=0.03$). This percentage was observed among the higher age group (59 years of age). Instead, patients in the group with a mean age of 19 years suffered burns affecting 71% - 100% of their body surface area. With regard to burn depth, fourth-degree burns affected 69.4% of the patients, which indicates the seriousness of the injuries in the patients studied. A total of 75% of the patients showed burns in different locations (torso, face, lower and upper limbs) and only 25% showed injuries only on the lower limbs, upper limbs or torso. The causative agents of burns were: combustible substances (alcohol, gasoline, explosion): 41.7%, direct fire: 25%, heaters: 13.9%, water: 16.7% and lastly, electricity: 2.8%. It is remarkable that in those cases in which the burn causative agent was a combustible substance, alcohol was the prevalent agent. When studying causative agents in relation to age, burn injuries by fire or heaters were found mainly older patients. Conversely, burns caused by alcohol, combustible substances and electricity were reported on younger patients. When studying causative agents in relation to sex, alcohol was found to be the prevalent element in females. This higher rate for women is associated with the fact that

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

the causative agents of the burn injury are alcohol and direct fire, according to medical history including injuries by a close third party. They are the current causes of the femicides reported in our country in women under 40 years of age. Electrical burns and gasoline burn injuries were affected males exclusively. When analyzing the correlation between the burned surface area and the cause (combustible substances vs. other agents), it was found that causes other than combustible substances generate smaller burn injuries ($p= 0.01$). However, second-degree burns were observed when the agent was a combustible substance (alcohol, gasoline or explosion) ($p=0.03$), as a result of a deeper burn. Fifty per cent of the burned patients showed inhalation injuries (SII), with both combustible substances and fire as causative agents of the burn injury. A central line was required in 88.9% of the burned patients. Femoral lines were used in 90.6% and upper lines (subclavian and/or jugular lines), in 9.4%. The mean number of lines used per patient was 5.8. Orotracheal intubation and tracheostomy were performed in 72.2% and 41.7% of the patients, respectively. A total of 91.7 % of the patients underwent surgical treatment (escharectomy: 100%, escharotomy: 42.4%, fasciotomy: 54.5% and limb amputation: 6.1%) while 8.3% of the patients did not undergo any surgical treatment (only wound lavage). Following surgical treatment and, after reaching viable tissue, the wound was covered with skin grafts. Autograft was performed in 97.2% of the patients, showing firm adherence to the underlying tissue in 75% of the cases. In twenty-five per cent of the unsuccessful cases, the mortality rate was 100% ($p < 0.01$), the main cause being the septic shock. Inotropes were required in 72.2% of the cases and anti-fungal drugs in 91.7%. A total of 58.8% were initially treated with Fluconazole. The rest of the cases were treated with Amphotericin B Liposomal. Death occurred in 38.8% of the

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

patients, its rate being higher among patients over 65 years of age ($p= 0.018$), on inotropes (noradrenaline) ($p < 0.001$), those patients suffering inhalation injury ($p= 0.04$), those who had undergone fasciotomy ($p=0.04$) and those with a history or in a high-risk group ($p = 0.002$). Infection by bacteria occurred in 100% of the burned patients, the microorganisms being: Gram-negative bacteria such as multiresistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenemase-producing (KPC) *Klebsiella pneumoniae*. Among Gram-positive bacteria, the most prevalent was methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA). The mean time of the onset of bacterial infections was 4 days following admission to the Intensive Care Unit. A total of 38.9% of the patients had an APACHE II score of 31-40 while 8.3% had a score of 41-46. A total of 77.7% showed a *Candida score* of 3. Fungal infections are a major cause of morbi-mortality in burned patients since they are ideal hosts for opportunistic infections. The incidence of fungal infection was 39.3 for every 1,000 burned patients. On average, the cases of Candidiasis occurred after 21.4 days of the admission to the intensive care unit (1-3 weeks). The most frequently isolated yeast was *C. albicans* in all samples analyzed (wound biopsy samples, urocultures, blood cultures, tracheal aspirate cultures, catheter tip cultures). Thus, *C. albicans* amounted to 53.8%, *C. tropicalis* to 23.1%, *C. parapsilosis sensu stricto* to 13.5%, *C. krusei* to 5.8%, *C. glabrata* and *C. krusei* to 1.9 % each. *C. albicans* was the prevalent species in blood cultures, followed by *C. parapsilosis*. In the urocultures, non-*albicans* *Candida* species surpassed *C. albicans*. Patients with positive blood cultures for candidaemias showed higher mortality than those with negative blood cultures for candidaemias, with no statistically significant difference ($p= 0.091$). Molecular identification (*HWPI* gene amplification by PCR) and microbiological identification

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

agreed with *C. albicans* and *C. dubliniensis*. For some *C. albicans* isolates, the amplification produced two fragments of DNA. The smaller fragment (941 bp) was produced by the *HWPI* gene and the larger fragment resulted from the *RBT1* gene partial amplification by a non-specific primer binding but the identification of *C. albicans* was confirmed by clone sequencing. Molecular identification of isolates was required for the identification of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* as *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. glabrata* species complex. For *C. glabrata* species complex, PCR reaction for *RLP31* gene, which codes for a 60S ribosomal protein, determined the absence of *C. bracarensis* and *C. nivariensis*, and the presence of *C. glabrata*. Molecular identification of *C. parapsilosis species complex* by specific primers for each of these complex species by sequencing of ITS1 and ITS2 regions of *rDNA* enabled the identification of *C. parapsilosis sensu stricto*. *C. orthosilopsis* and *C. metapsilosis* were not detected.

9-ANEXO

ANEXO I

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DEL PACIENTE

Fecha:

Apellido y nombre:

Edad:

Sexo:

Antecedentes clínicos patológicos:

Porcentaje de extensión, profundidad y localización de quemaduras:

Tiempo de internación en UCI:

Patologías Concomitantes:

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

Antibióticos:	si	no	Cual?
Antifúngicos:	si	no	Cual?
Muestras Clínicas:			
Corticoides:	si	no	Cual?
Catéteres vesicales:	si	no	
Catéteres venosos centrales: Localización/Tiempo ¹	si	no	
Tipo de nutrición: Tiempo ¹	si	no	
Tubos endotraqueales: Traqueostomía:	si	no	
Infecciones bacterianas:	si	no	Cuales?
Uso ARM (Asistencia Respiratoria Mecánica) Tiempo ¹ Lesión vía aérea:	si	no	
Uso de inotrópicos: Tiempo ¹	si	no	
Tratamiento quirúrgico: Uso de injertos	si	no	Cuales?
APACHE II/ <i>Candida Score</i> :			
Óbito:	si	no	
1(tiempo de permanencia en días)			

ANEXO II

Variable	Definición teórica	Definición operativa	Escala de medición	Valoración posible
Sexo.		Se tomará como válido aquel que figure en el DNI.	Nominal dicotómica.	Femenino (F). Masculino (M).
Edad.	Tiempo en años transcurrido desde el nacimiento.	Aquella calculada a partir de la fecha de nacimiento que aparece en el DNI.	Numérica continua.	De 19 hasta 87 años cumplidos.
Antecedentes Médicos/ Patológicos.	Enfermedades que preceden el tiempo, antes de ocurrida la internación del paciente.	Puede incluir información sobre alergias, enfermedades metabólicas, infecciosas, inflamatorias, neoplasias, hipertensión arterial, embarazo, o la ausencia de ellos.	Nominal.	1-Sin antecedentes. 2-Enfermedad Obstructiva Crónica.(EPOC) 3-Enfermedades cardiovasculares(Hipertensión Arterial-HTA,arritmias) 4-Diabetes (DBT). 5-Hipotiroidismo. 6-Embarazo. 7-Enfermedad neurológica (accidente cerebro vascular-ACV) 8-Enfermedad oncológica. 9- Obesidad.
Porcentaje de quemadura.	Número o cantidad que representa la proporcionalidad de una parte con respecto a la superficie total corporal que se considera dividido	Porcentaje con respecto a la superficie corporal total. Se divide de manera aleatoria en 5 grupos representados con números abstractos del 0 al 4.	Numérica.	0%-10% : 0 11%-30%:1 31%-50%: 2 51%-70%: 3 71%-100%: 4

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

	en cien unidades.			
Profundidad de la quemadura.	Distancia desde la superficie corporal que abarca el área quemada.	Se categorizar por grados del I al IV.	Numérica.	<p>I: Leves</p> <p>II: Afecta a epidermis y dermis</p> <p>III: Todo el espesor de la piel.</p> <p>IV: Afecta músculos, tendones.</p>
Localización Anatómica de la quemadura.	Ubicación anatómica donde se localiza la patología en estudio. Área específica del cuerpo humano esto es grupo de sistemas orgánicos que conforman un ente vivo El cuerpo humano está compuesto por la cabeza, el tronco, los miembros superiores e inferiores.	<p>Visualización al examen clínico de la afectación.</p> <p>Localización probable:</p> <p>Cara, tronco, miembros superiores (mmss) y miembros inferiores (mmii), múltiples.</p>	Nominal.	<p>1-Múltiples sitios.</p> <p>2-Tronco.</p> <p>3-MMSS.</p> <p>4-MMII</p> <p>5-Cara</p>
Agente causal de la quemadura.	Un agente es aquel o aquello que tiene la capacidad de actuar o de producir algo.	Agentes posibles, ej alcohol.	Nominal.	<p>Grupos :</p> <p>1-Combustibles: (alcohol, nafta, explosión).</p> <p>2-Agua.</p> <p>3-Fuego directo.</p> <p>5-Estufa.</p> <p>6-Electricidad.</p>

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

Muestras Clínicas.	Material biológico.	Material biológico tomado del paciente quemado al presentar cuadro clínico o parámetros compatibles con SIRS.	Nominal.	1-urocultivo. 2-hemocultivos (HMC) 3-punta de catéter. 4-biopsia de piel. 5-aspirado traqueal (AT).
Identificación del aislamiento por cultivo microbiológico o convencional.	Resultado del aislamiento de <i>Candida</i> spp en medios de cultivo y temperatura adecuados que favorezcan el crecimiento fúngico.	Observación macro y microscópica de las colonias fúngicas desarrolladas en el medio de cultivo.	Nominal.	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. dubliniensis</i>
Vía Central.	Vía intravenosa preparada para tener un acceso continuo a una vena central que permite la administración de líquidos, medicinas y medición de presión.	Vena Central: subclavia, yugular, femoral.	Nominal.	-Superior: Subclavia-yugular. -Inferior: femoral.
Lesiones de vía aérea por Inhalación	Lesión que se produce debido a que se introducen sustancias o gases en el sistema respiratorio y que son perjudiciales o producen el fallo de su función.	Lesiones directas (fuego) o indirectas.(sustancias) Vía aérea superior Vía aérea inferior.	Nominal dicotómica	Sí - No
Intubación	Procedimiento	Indicaciones:	Nominal	Sí - No

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

orotraqueal	médico que consiste en la introducción de un tubo en la vía aérea por la boca el que se coloca por visualización directa de las cuerdas vocales a través del uso de un laringoscopio.	Apnea Deterioro del estado de conciencia Dificultad para mantener la vía aérea permeable Sospecha de probable obstrucción Protección de posible aspiración Lesión de la vía aérea por inhalación Insuficiencia respiratoria	dicotómica	
Traqueotomía	Procedimiento quirúrgico con el fin de crear una abertura dentro de la tráquea, a través de una incisión ejecutada en el cuello, y la inserción de un tubo o cánula para facilitar el paso del aire a los pulmones.	Indicaciones: -Obstrucción respiratoria a nivel de la orofaringe, laringe o tráquea secundaria a edema local. -Intubación prolongada -Shock Séptico	Nominal dicotómica	Sí - No
Nutrición	La nutrición es el proceso biológico en el que los organismos asimilan los alimentos y los líquidos necesarios para el funcionamiento, el crecimiento y el mantenimiento de	ORAL: acto o proceso fisiológico de tomar o dar alimento por la boca ENTERAL: consiste en administrar los diferentes elementos nutritivos a través de una sonda, colocada de tal forma que un extremo queda en el exterior y el otro en distintos tramos del tubo	Nominal	1-Oral 2-Enteral 3-Enteral y oral. 4-Parenteral-enteral. 5-Parenteral-enteral-oral

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

	<p>sus funciones vitales.</p>	<p>digestivo como el estómago, duodeno o yeyuno, suprimiendo las etapas bucal y esofágica de la digestión.</p> <p>PARENTERAL: la nutrición parenteral aporta al paciente por vía intravenosa los nutrientes básicos que necesita.</p>		
Fármacos Inotrópicos	<p>Fármacos usados en diferentes tipos de Shock y Fallas Multiorgánicas.</p> <p>Características</p> <ul style="list-style-type: none"> •Son inotrópicos positivos (aumentan la fuerza de contracción miocárdica) •Cronotrópicos positivos (aumentan la frecuencia cardíaca). •Vasoconstrictoras •Aumentan el gasto cardíaco •Aumentan la presión arterial 	<p>Fármaco usado:</p> <p>Noradrenalina</p>	Nominal dicotómica	Si-No
Antibióticos	<p>Fármacos usados para el tratamiento de infecciones bacterianas</p>	<p>Antibióticos sistémicos,son aquellos que se administra por vía oral o intravenosa, en nuestro caso se emplea la vía endovenosa exclusivamente</p>	Nominal	<p>Antibióticos usados:</p> <p>1-Piperlacilina-tazobactam (T).</p> <p>2-Colistina (C).</p> <p>3-Imipenem (I).</p> <p>4-Vancomicina (V).</p>

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

Bacterias coexistentes.	Microorganismos procariotas que cohabitan con los diferentes tipos de sistemas.	Microorganismos procariotas que cohabitan con los diferentes tipos de <i>Cándidas</i> .	Nominal	1-Gram negativas(<i>Acinetobacter baumannii</i> (AC)- <i>Pseudomona Pneumoniae</i> (PAE)y <i>-Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemasa (KPC) 2-Gram positivas- <i>Staphylococcus</i> Metilino Resistente (SMR)		
Antimicóticos o Antifúngicos	Toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento o de provocar la muerte de la mayoría de los hongos. .	Fluconazol. Anfotericina.	Nominal	Grupos: 1-fluconazol 2-anfotericina B liposomal. (AMB)		
Tratamiento quirúrgico Cirugías	Cirugía mayor es todo procedimiento realizado en quirófano que comprende la incisión, escisión, manipulación o sutura de un tejido, y generalmente requiere anestesia regional o general, para controlar el dolor.	Cirugías realizadas en quirófano, con anestesia general	Nominal	1-Escarectomía 2-Escarotomía 3-Fasciculotomía. 4-Amputación 7- Sin cirugía (lavados) 8- Combinados 9-Injertos		
SCORE APACHE II Acute	Indice de puntuación, resultado un factor predictivo de	Indice medido a las 24 hs de ingreso del paciente quemados a la terapia intensiva del Hospital del	Numérico	0-71 <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Puntuación</td> <td>Mortalidad (%)</td> </tr> </table>	Puntuación	Mortalidad (%)
Puntuación	Mortalidad (%)					

Identificación molecular de especies de *Candida* en pacientes quemados.

Physiology and Chronic Health Evaluation	mortalidad, que se fundamenta en la determinación de las alteraciones de variables fisiológicas y de parámetros de laboratorio. Aplicado dentro de las primeras 24 hs de ingreso a la UTI.	Quemados.		0-4	4
				5-9	8
				10-14	15
				15-19	25
				20-24	40
				25-29	55
				30-34	75
				>34	85
<i>Score Candida.</i>	Sistema de puntuación estudiado para estratificar el riesgo de candidiasis invasiva.	Sistema evaluado a la semana del ingreso del paciente y cada semana.	Numérico.	1 al 5	
Tiempo de internación hospitalaria.	Periodo desde que el paciente ingresa hasta que egresa del hospital.	Periodo desde que el paciente ingresa a la guardia del hospital de quemados hasta que se retira con alta hospitalaria, no médica.	Numérica continua.	Intervalo de 9 a 218 días.	
Óbito	Proceso terminal que consiste en la extinción de la homeostasis de un ser vivo y, por ende, concluye con el fin de la vida	Muerte del paciente constatada clínicamente.	Nominal	Si-No	

10-BIBLIOGRAFÍA

- 1- Schwartz R, Chirino C, Saenz SV, Rodríguez T. Algunos aspectos del manejo del paciente quemado en un servicio de cirugía infantil. A propósito de 47 pacientes pediátricos. Rev Argent Dermatol.2008; 89: 98-103.
- 2- Ballard J, Edelman L, Saffle J, Sheridan R, Kagan R, Bracco D, et-al. Positive fungal cultures in burn patients: a multicenter review. J Burn Care Res.2008; 29: 213-221.
- 3- Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, a etiology, morbidity and mortality. Crit Care.2010; 14: R188.
- 4- Eggiman P, Garbino J, Pittet D.Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non- immunosuppressed patients.Lancet Infect Dis.2003; 3: 685-702.
- 5- Ha J, Italiano C, Heath C, Shih S, Rea S, Wood FM. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon.Burns.2011; 37:181-95.
- 6- Murray C, Loo F, Hospenthal D, Cancio L, Jones J, Kim S.Incidence of systemic fungal infection and related mortality following severe burns.Burns.2008; 34:1108-1112. 107.
- 7- Pedrosa A, Rodrigues A. Candidemia in burn patients: figures and facts. J Trauma.2011; 70:498-505.
- 8- Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial candiduria: a review.Clin Infect Dis.2001; 32:1602-1607.
- 9- Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi, L.Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidiasis.J. Infect. Dis.1987; 156: 777-783.

- 10- Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, Iovannitti CA, Rosa AC. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol.*2008; 505-509.
- 11- Fernandez A, Jewtuchowicz VM, Malzone MC, Lopez-Daneri G, Iovannitti CA, Mujica MT. Phenotypic and genotypic characterization of *Candida dubliniensis* isolate in a patient with disseminated candidiasis. *Mycos.*2011; 54-55.
- 12- Tietz H, Hopp M, Schmalreck A, Sterry W, Czaica V. *Candida africana* sp nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*?. *Mycos.*2001; 44: 437-445.
- 13- Romeo O, Criseo G. First molecular method between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using hwp1 gene. *Diag Microbiol Infect. Dis.*2008; 62: 230-233.
- 14- Odds F, Bougnoux M, Shaw D. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Euk Cell.*2007; 6:1041–1052.
- 15- Dean DA, Burchard KW. Fungal infection in surgical patients. *Am J Surg.*1996; 171: 374–382.
- 16- Ye P, Rodriguez S, Kanaly K, Stocking J, Schurr P, Schwarzenberger P, Oliver, Huang W, Zhang P, Zhang J. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.*2001; 194: 519–527.
- 17- Csontos C, Foldi L, Pa'linkas L, Bogar E, Roth G, Lantos J. Time course of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in patients with burns: prognostic value of interleukin-10. *Burns.*2010; 36: 483–494.

- 18- Couper K, Blount N, Riley E. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*2008; 180: 5771–5777.
- 19- Garcia-Effron, G, Katiyar S, Park K, Edlind S, Perlin, D. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Ag Chem.*2008; 52: 2305–2312.
- 20- Fridkin S. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis.*2005; 41:1455–1460.
- 21- Branchini M, Pfaller A, Rhine-Chalberg J, Frempong T. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.*1994; 32:452–456.
- 22- Clark T, Slavinski T, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs B, Brandt M, Flowers, S, Hajjeh R. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin. Microbiol.*2004; 42:4468–4472.
- 23- Levin A, Costa N, Mussi M, Basso S, Sinto C, Machado C, Geiger M, Villares A, Schreiber A, Branchini M. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*1998; 30:243–249.
- 24- Horn D, Neofytos D, Anaissie E, Fishman J, Steinbach W, Olyaei A. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.*2009; 48:1695–1703.

25- Mirhendi H, Bruun B, Schönheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol.*2010; 59: 414–420.

26- Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med. Microbiol.*2009; 58: 745–752.

27- Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. Production of white colonies on CHROMagar *Candida* medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *J Clin Microbiol.*2008; 46: 3498-500.26.

28- Enache-Angoulvant A, Guitard J, Grenouillet F, Martin T, Durrens P, Fairhead C, Hennequin C. Rapid discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* using a simpleplex PCR. *J Clin Microbiol.*2011; 49: 3375–3379.

29- Walsh T, Merz W. Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*. *J Clin Path.*1986, 85(4) 498-502.

30- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis.*1997; 24:1122-1128.

31- Colombo Al, Guimara ~es T, Silva Lrbf, Monfardini Lpda, Cunha Akb, Rady P, Alves T & Rosas Rc. Prospective observational study of candidiasis in Sa ~o Paulo, Brazil. Incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Cont Hosp Ep.*2007; 28: 570–576.

- 32- Pfaller M, Diekema D. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.*2007; 20 (1):133–163.
- 33- Blank H. What are the functions of skin lost in burn injury that affect short and long-term recovery? *J Trauma.*1984; 24: 512-518.
- 34- Moritz A, Henriques F. Studies of thermal injury. II the relative importance of time and surface temperature in the causation of cutaneous burns. *Am J Path.*1947; 23:695-720.
- 35- Wilhelm D, Mason B. Vascular permeability changes in inflammation: role of endogenous permeability factors in mild thermal injury. *Br Exp.Pathol.*1960; 41:487-506.
- 36- Huang Y. Roles of thromboxane and its inhibitor anisodamine in burn shock. *Burns.*1990; 16:249-253.
- 37- Hatherill, Till. Thermal injury, intravascular hemolysis, and toxic oxygen products. *J Clin Invest.*1986; 78:629-636.
- 38- Horton, White. The role of oxygen-derived free radicals in burn-induced myocardial contractile depression. *J Burn Care Rehabil.*1988; 9:589-598.
- 39- Huribal, Cunningham. Endothelin 1 and Prostaglandin E2 levels increase in patients with burns. *J Am Coll Surg.*1995; 180:318-322.
- 40- Tranbaugh, Levis. Lung water changes after thermal injury. The effects of crystalloid resuscitation and sepsis. *Ann Surg.*1980; 192:479-490.
- 41- Kiviluoto. Acute gastric mucosal lesions, haemodynamic changes in the thermally injured rat. *Burns.*1989; 15:365-370.
- 42- Epstein MD, Thervenckov. Increased gut permeability following burn trauma. *Arch. Surg.*1991; 126:198-200.

- 43- LeVoyer, Cioffi. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. *Arch Surg.*1992; 129:325-328.
- 44- Richards C, Emori T, Edwards J. Characteristics of hospitals and infection control professionals participating in the National Nosocomial Infections Surveillance System 1999. *Am J Infect Control.*2001; 29: 400–403.
- 45- Weber J, McManus A. Nursing Committee of the International Society for Burn injuries. Infection control in burn patients. *Burns.*2004; 30(8):16-24.
- 46- Shirani K. The influence of inhalation injury and pneumonia on burn mortality. *Ann Surg.*1987; 205:82-87.
- 47- Diekema D, Pfaller A. Nosocomial candidemia: announcement of prevention is better than a pound of cure. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*2004; 25: 624–626.
- 48- Ostrosky-Zeichner, L. Prophylaxis and treatment of invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin. Microbiol. Infect Dis.*2004; 23:739–744.
- 49- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev.*2006; 19 (2):403-34.
- 50- Finnerty C, Jeschke D, Herndon, Gamelli N, Gibran M, Klein G, Silver B., Tompkins R. Investigators of the Inflammation and the Host Response Glue Grant. Temporal cytokine profiles in severely burned patients: a comparison of adults and children. *Mol. Med.*2008; 14: 553–560.
- 51- Knaus WA, Drapper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.*1985; 13: 818-829.

- 52- Costa JI, Gomes do Amaral JL, Munechika M, et al. Severity and prognosis in intensive care: prospective application of the Apache II Index. Rev Paul Med.1999; 117(5): 205-214.
- 53- León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Álvarez-Lerma F, et al. A bedside scoring system (“*Candida score*”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. Crit Care Med.2006; 34: 730-7.
- 54- Rex J, Walsh T, Sobel J, Filler S, Pappas P, Dismukes WE. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect Dis.2000; 30: 662-678.
- 55- Di Lonardo A, Ferrante M, Maggio G, et al. Histological assessment of the level of burn wound infection: Diagnostic and Therapeutic Strategies. Ann Medit Burns.1993; 6(2): 90–93.
- 56- Mc Manus A, Kim S, McManus W, Mason A, Pruitt B. Comparison of quantitative microbiology and histopathology in divided burn wound biopsy specimens. Arch Surg.1987; 122(1): 74–76.
- 57- Schofield C, Murray C, Horvath E. Correlation of culture with histopathology in fungal burn wound colonization and infection. Burns.2007; 33(3):341–346.
- 58- Lorente JA, Esteban A. Cuidados intensivos del paciente quemado. Barcelona. Springer-Verlay Ibérica.1998; 120-133.
- 59- Pan Wei-hua, XIA Zhao-fan, SHAN Hong-wei, CHEN Min, Liao Wan-qing. Fungal infection after a tragedy: a report of three cases of candidiosis in a fire accident. Chin. Med J.2012; 125 (14): 2628-2631.

- 60- Morrell M, Fraser V, Kollef M. Delaying the empiric treatment of *Candida* blood stream infection until positive. *Infect Control Hosp Epidemiol.*2005; 26: 540-7. 27.
- 61- Al-Mousawi AM, Jeschke MG, Herndon DN. History of metabolic treatments in burn care. *Wounds.*2008; 20: 185–191.
- 62- Weems JJ Jr. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis.*1992; 14: 756-766.
- 63- Normas del Hospital de Quemados G.C.B.A.2010; Bubenick H, Portas M.2010; 9-30.
- 64- Lorente JA, Esteban A. Cuidados intensivos del paciente quemado. Barcelona. Springer-Verlay Ibérica.1998; 4.
- 65- Krawczyk W. The pattern of epidermal cell migration during wound healing. *J Cell Biol.*1971; 49: 247-63.
- 66- Demling R, Lalonde Ch. Management of the burn wound. Blaisdell Trunkey Burn Trauma. New York. Thieme Medical Publishers.1989; 42-65.
- 67- Heimbach D. Early burn excision and grafting. *Surg. Clin. North Am.*1987; 67(1): 93-107.
- 68- Jitaurong S, Klamsiri S, Pattararagron N. Milk medium for germ tube and chlamidoconidia production by *Candida*. *Mycopathol.*1993; 123: 95-98.
- 69- Staib P, Morschauser J. Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycos.*1999; 42: 521-524.
- 70- Lopez J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich A, Pacot A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco diagnostic tablets. *J Clin Microbiol.*2001; 39: 1172-1174.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

- 71- Elías N, Cuestas M.L, Sandoval M, Poblete G, Lopez-Daneri G, Jewtuchowicz V, Iovannitti C, Mujica MT. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. *Mycopathologia*.2012; 174: 451-456.
- 72- Siachoque N, Jewtuchowicz V., Iovannitti C, Mujica, MT. Amplificación del gen CAP 59 en *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* directamente a partir de una suspensión de levaduras. *Rev Arg Microbiol*.2010; 42: 91-94.
- 73- Sheridan R, Weber J, Budkevich L, Thompkins R. Candidemia in the patient with burns. *J Burn Care Rehabil*.1995; 16(4):440-3.
- 74- Rosanova M, Basilico H, Villasboas M, Finquelievich J, Mónaco A, Péreza G, Berberian G, Álvarez V, Andi6n E, Santos P. Infecciones f6ngicas en una unidad de quemados pedi6trica. *Arch Argent Pediatr*.2011; 109: 437-444.
- 75- Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*.2009; 136:1237–1248.
- 76- Capoor MR, Sarabahi S, Kumar Tiwari V, Prakash Narayanan R. Fungal infections in burns: Diagnosis and management. *Indian J Plast Surg*.2010; 43: S37–S42.
- 77- Ekenna O, Sherertz J, Bingham H. Natural history of bloodstream infections in a burn patient population: the importance of candidemia. *Am J Infect Contro*.1993; 21:189–95.
- 78- Branski L, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke M, Sanford A, Herndon D. Emerging Infections in Burns. *Surg Infect*.2009; 10: 389-97. DOI: 10.1089.

- 79- Herndon N, Parkes D. Comparison of serial debridement and auto grafting and early massive excision with cadaver skin overlay in the treatment of large burns in children. *J Trauma*.1986; 26:149-52.
- 80- Moore E, Padiglione A, Wasiak J, Paul E, Cleland H. Candida in burns: risk factors and outcomes. *J Burn Care Res*.2010; 31:257-63.
- 81-Rodgers G, Mortensen J, Fisher M, Lo A, et al. Predictors of infectious complications after burn injuries . *Infect Dis J*.2000; 19: 990-5.
- 82- American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Parenteral Nutrition. *Gastroenterology*.2001; 12:966-969.
- 83-Aspen Board of Directors: Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN*.2002; 26 (1):88-90.
- 84- Santarpia I, Pasanisi F, Alfonsi L, Violante G, Tiseo D, De Simone G .Prevention and treatment of implanted central venous catheter (CVC) - related sepsis: a report after six years of home parenteral nutrition (HPN). *Clin Nutr*.2002; 21: 207-11.
- 85- Mayhall C.The epidemiology of burn wound infections: then and now. *Infect*.según un estudio del National Nosocomial Infections Study System. *Clin Dis*.2003; 37: 543-550.
- 86- Savastano L, Benito O, Cremaschi F. Análisis de la mortalidad en la unidad de cuidados intensivos del hospital central de Mendoza, Argentina. *Rev. Medica Universitaria. Facultad de Cs médicas Universidad de Cuyo*.2009; 5: 1-27.
- 87- Macedo L, Santos J. Bacterial and Fungal colonisation of Burn wounds. *Mem Inst Osw. Cruz R de J*.2005; 100: 535–539.

- 88- Fraser V, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan W. Candidiasis in a tertiary care hospital: Epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis.*1992; 15: 414-421.
- 89- Murray CK, Horvath EE, Cancio LC, Kim SH, Wolf SE, et al. Correlation of culture with histopathology in fungal burn wound colonization and infection. *Burns.* 2007; 33:341-6.
- 90- Luo G, Peng Y, Yuan Z, Cheng W, Wu J, Fitzgerald M. Yeast from burn patients at a major burn centre of China. *Burns.*2011; 37: 299-303.
- 91- Gupta N, Haque A, Lattif A, Narayan R, Mukhopadhyay G, Prasad R. Epidemiology and molecular typing of *Candida* isolates from burn patients. *Mycopathologia.*2004; 158: 397-405.
- 92- Haque A, Latif A, Narayan RP, Mukhopadhyay G, Prasad R. Epidemiología y caracterización molecular de *Candida* aisladas de pacientes con quemaduras. Gupta N1. *Mycopathologia.*2004; 158 (4): 397-405.
- 93- Miranda L, Van Der Heijden I, Costa S, Sousa A, Sienna R, Gobara S, Santos C, Lobo R, Pessoa V, Levin A. *Candida* colonisation as a source for candidiasis. *J Hosp Infect.*2009; 72: 9–16.
- 94- Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari M, Rosso R, Viscoli. Epidemiological trends in nosocomial candidiasis in intensive care. *Bmc Infect Dis.*2011; 6: 21.
- 95- Almirante B, Rodriguez D, Cuenca. Epidemiology, risk factors, and Prognosis of *Candida Parapsilosis* bloodstream infections: Case-control population fems. *Microbiol Rev.*2012; 36 288–305.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

- 96- Messer S, Jones R, Fritsche T. International Surveillance of *Candida Spp.* And *Aspergillus Spp.*: Report From The Sentry antimicrobial surveillance program J Clin Microbiol.2003; 44: 1782–1787.
- 97- Brito L, Guimaraes T, Nucci M, Rosas R, Almeida P, Matta D, Colombo A. Clinical and microbiological aspects of Candidemia due to *Candida Parapsilosis* in Brazilian Tertiary care hospitals. Med Myco.2006; 44: 261–266.
- 98- Fochtman A, Forstner C, Haggmann, M Keck M, Muschitz G, Presterl E, Rath T. Predisposing factors for candidemia inpatients with major burns. Journal of the International Society Burn Injury.2015; 41 (2). 326-332
- 99- Balasini, Carina. Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes. Sociedad Argentina de Terapia Intensiva.SATI. Infec. Crít.2009; 5-9..
- 100- Eggiman P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. Annals of Intensive Care.2011; 1-37.
- 101- Sullivan D, Westerneng T, Haynes K, Bennett A, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. Microbiol.1995; 141:1507–1521.
- 102- Forche A, Schonian G., Graser Y, Vilgalys R, Mitchell TG. Genetic structure of typical and atypical populations of *Candida albicans* from Africa. Fungal Genet Biol.1999; 28: 107-125.
- 103- Romeo O, Criseo G. *Candida africana* and its closest relatives. Mycos.2011; 54: 475-86.

- 104- Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, et al. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Med Mycol.*2008; 46: 167-70.
- 105- Staab J, Bradway S, Fidel P, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Scien.*1999; 283: 1535–1538.
- 106- Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvo vaginal candidiasis. *Med Mycol.*2014, 52, 636–640.
- 107-. Mucci M, Cuestas M, Landaburu M, Mujica M. Epidemiología molecular de la candidiasis vulvovaginal (CVV) en gestantes en Argentina relación con las manifestaciones clínicas (portación vs. (CVV). Prevalence of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida africana* in pregnant women with vulvovaginal candidiasis in Argentina” enviado a la RIAM referencia D-15-00080R1.
- 108- Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Godal L, Levenson C, Sninsky J. Effects of primer - template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.*1990; 18: 99-1005.
- 109- Tietz H, Kussner A, Thanos M, Pinto De Andrade M, Presber W, Schonian G. Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. *J Clin Microbiol.*1995; 33: 2462-5.
- 110- Theill L, Dudiuk C, Morano S, Gamarra S, Nardin M, Méndez E, Garcia-Effron G. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species

Candida dubliniensis and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. Rev Argent Microbiol.2016; 48: 43-49

111- Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, Guarro J, Perez-Roth E, Arevalo M. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. a possible new opportunistic fungus. J Clin Microbiol.2005; 43: 4107-11.

112- Bishop J, Chase N, Magill S, Kurtzman C, Fiandaca M, Merz W. *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. J Clin. Microbiol.2008; 46: 443-446.

113- Borman A, Petch R, Linton C, Palmer M, Bridge P, Johnson E. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. J Clin. Microbiol.2008; 46: 933-938

114- Mirhendi H, Bruun B, Schönheyder H, Christensen J, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen H, Nielsen L, Knudsen J, Arendrup M. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. J. Med Microbiol.2010; 59: 414-420.

115- Kim J, Sung Kim D, Seong Lee Y, Gyeu Choi N. Fungal Urinary Tract infection in burn patients with long-term Foley catheterization. Korean J Urol.2011; 52: 626-631.

116- Pappas P, Kauffman A., Thierry F, Calandra F, Edwards, J. Scott G. Kullberg, Ostrosky-Zeichner, Reboli C. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis. Update by the Infectious Diseases Society of America. Treatment Guidelines for Candidiasis.2009; 48: 503-535.

Identificación molecular de especies de Candida en pacientes quemados.

117- Bastos. Candidiasis in Burn Patients: Figures and Facts. J. Trauma Injury. Inf Crit. Care.2011; 70: 498.