



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACIÓN DE *Candida* spp. OBTENIDA DE PACIENTES Y SU
AMBIENTE EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DE
ADULTOS (UCIA) DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL (CMN)
20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARÍA ANTONIETA FLORES SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M.M.T. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES
2009**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

FLORES	SÁNCHEZ	MARÍA ANTONIETA
Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre
Teléfono:	57 67 91 90	
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO		
FACULTAD DE CIENCIAS		
Carrera:	BIOLOGÍA	
No. de cuenta:	09810141-0	

2. Datos del tutor

M. en Med. Trop.	Castañón	Olivares	Laura Rosio
Grado	Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre

3. Sinodal 1

Dr.	Sierra	Galván	Sigfrido
Grado	Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre

4. Sinodal 2

Dr.	Cortés	Figueroa	Arturo Ángel
Grado	Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre

5. Sinodal 3

Q.F.B.	Córdova	Martínez	Erika
Grado	Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre

6. Sinodal 4

Biól.	Bazán	Mora	Elva
Grado	Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre

7. Datos del trabajo escrito

Título	RELACIÓN DE <i>Candida</i> spp. OBTENIDA DE PACIENTES Y SU AMBIENTE EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DE ADULTOS (UCIA) DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL (CMN) 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE
Número de páginas	77
Año	2009

*A la memoria de
Mario Humberto Sánchez Ramos
Tío, Te quedé a deber ese partido...*

**“Orgullosamente mis virtudes:
pasión y actitud”**

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
Agradecimientos	4
Introducción	12
Antecedentes	21
Justificación del trabajo	23
Objetivos	24
Plan general de trabajo	25
Material y Métodos	26
Resultados	36
Discusión	56
Conclusiones	60
Perspectivas	62
Referencias	63
Anexo	67

AGRADECIMIENTOS

Como buen reflejo y parteaguas de todo profesionista, éste trabajo simboliza muchas cosas para mí: esfuerzo, compromiso, sacrificio, perseverancia, tolerancia, constancia, aprendizaje y amor. Y en cada uno de esos rubros hay diversas personas involucradas que ayudaron a conocer, madurar y reconceptualizar estos términos. Tardaría días en mostrar mi gratitud a todas las personas que directa o indirectamente contribuyen a este más que trabajo, el mayor de mis esfuerzos hasta este momento de mi vida, sin embargo me esforzaré por tratar de hacer una breve semblanza.

Hoy, puedo asegurar que uno pasa por la vida experimentando vivencias y tratando de pasarla bien, estando satisfecho de lo que hace, aprendiendo de lo que se vive en todo momento a pesar de lo fatal que pueda ser la experiencia.

No hubiese podido estar aquí sin que mis padres me hubiesen dado la vida, GRACIAS MAMÁ Y PAPÁ porque por ustedes estoy, soy y tengo una identidad y ahora que soy más consciente, estoy tratando de ser alguien. Todos esos momentos de sacrificio y perseverancia que ustedes me dedicaron, hoy se ven de cierta manera remunerados, sé lo que esto significa para ustedes, corrijo, para nosotros, y asumo el compromiso del porvenir. Esto y todo lo que soy, lo debo a ustedes, siempre estaré en deuda y no me alcanzará la vida para poder pagar todo lo que me han enseñado. ¡¡¡LOS AMO!!!

Merecen ser nombrados en mi trabajo mi hermana, mi tío Ville, mi tío Mario y por supuesto mi Sk. Ustedes me ha ayudado a reafirmar mis valores y manera de ver las cosas, gracias por todo el apoyo y por estar siempre; son cómplices de mis triunfos y fracasos, ¡¡¡LOS QUIERO MUCHO!!!. Escander, estés donde estés, espero que cuando crezcas tengas presente que fuiste un gran aliciente para mí en estos momentos de trabajo, estoy segura que a pesar de que las circunstancias sean desfavorables serás un gran hombre y profesionista, pero mejor persona aún.

Gracias a mis amigos de la primaria, a quienes he tenido la oportunidad de reencontrar éste último año. A mis amigos de la Anexa, de quienes sé que son profesionistas exitosos. Mis amistades de la prepa, con quienes experimenté una relación de compañía y complicidad más consciente.

A mis compañeras del voleibol, desde aquellas compañeras del minivoleibol hasta aquellas con las que comparto la cancha hoy, por compartir la pasión de mi vida, tener esa actitud y ganas de superación en cada partido, por darse la oportunidad de trabajar en equipo, de tomar decisiones rápidas y asumir las consecuencias de las mismas, pero sobre todo por apoyarme y aceptarme tal cual soy. A mis entrenadores, Pedro Espitia por enseñarme toda la técnica del voleibol, Víctor Montes y Claudio Torres por confiar en mí y darme la oportunidad de representar a la UNAM, tengan la certeza que jugué con la mayor convicción y pasión ya que representaba a mi alma mater.

A mis compañeras del equipo de Ciencias, por darme la oportunidad de transmitirles mi convicción y compromiso hacia éste deporte, por arriesgarnos a hacer cosas nuevas que afortunadamente se reflejaron en triunfos y no necesariamente recompensados con una medalla o primer lugar, sino con un desarrollo personal y aprendizaje para nuestra forma de vida.

Agradezco a una persona, a la que el gracias le queda corto, Dr. Benjamín Ayala Ruíz, fuiste pionero en muchos aprendizajes hace algunos años en mi vida y sigues siendo un apoyo imprescindible ahora, siempre estás conmigo, espero sigamos creciendo juntos como hasta ahora.

Yazmín De León Labastida y Omar Córdova Ramírez mis casi hermanos, gracias por enseñarme a volver a confiar, a conocer la verdadera amistad, aunque no estemos tan juntos como antes, tengan siempre presente que estoy dónde, cuándo y cómo lo necesiten, esos años que pasé con ustedes son irrepetibles>>¡¡gracias por todo!!!<<<

Mis amigos de la Facultad de Ciencias: PAO, MARISOL, ROSA, DOBY, NADIA y Omar, a pesar de ser personas tan diferentes, fuimos cómplices de algo, esto que es difícil de expresar con palabras, esto que todas sentimos y compartimos. Es y fue un honor compartir con ustedes una simple taza de café, una simple comida, una simple plática, unas simples lágrimas, una práctica de campo, un viaje, una fiesta. Es tan gratificante que así fuesen 5 minutos, horas o días, siempre fueron y son gratos, llenos de sonrisas, de consejos, de complicidad, de amistad, de reflexión, de retroalimentación y que hoy son tan imprescindibles en mi vida. Créanme cuando aseguro que en todo momento he sido y fui sincera, leal, y siempre tratando de ser yo, así sea o fuera mucho o poco el tiempo que tuvimos y tengamos para estar juntos.

Sé que ahora que cada quien trata de crecer en lo suyo, cuestión que me llena de orgullo, es más difícil estar juntas, sin embargo, sé que cuando algo vale la pena se mantiene a pesar de las circunstancias. Agradezco el respeto hacia mi manera tan directa, responsable y apasionada de ser y por permitirme conocer muchas facetas de mí estando con ustedes ¡¡¡LAS ADORO!!!.

Juan Pablo, Ale, Cony, Ara y Roberto, gracias por haber sido un gran apoyo durante mi estancia en la Facultad, sin ustedes seguro hubiese sido más difícil mi paso por muchas materias. Se les estima y espero lo mejor para ustedes hoy y siempre.

Sayab, Ale, Pam y Pau, gracias por apoyarme y siempre contar con ustedes para el voleibol de la Facultad. Créanme que los admiro por el simple hecho de no dejar de lado esa parte tan importante como lo es la pasión y convicción por practicar deporte a pesar de todas las presiones a las que uno se enfrenta en ésta facultad, hicimos una linda amistad que seguro perdurará.

Sin dejar de ser importantes, tengo que agradecer a algunos compañeros que seguro se me escapa nombrar, gracias a todos, y tengan por seguro, que ustedes también contribuyeron de una forma consciente e inconsciente a mi desarrollo personal y del trabajo.

A mis profesores del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina, UNAM por permitirme la estancia en ese lugar, donde aprendí que todo resultado debe ser reflejo de dedicación, compromiso y mucho trabajo. Gracias por haber sido tan exigentes en nuestra formación, porque gracias a ello aprendí que puedo dar más de mí, que no basta sólo con intenciones, sino con hechos. Un especial agradecimiento especial a la Bio. Elva Bazan Mora, por dedicar más que cantidad, calidad de tiempo a éste trabajo, gracias por tu convicción como docente y por transmitirme tus conocimientos en el laboratorio, fuiste pieza fundamental para que éste trabajo se llevara a cabo de forma correcta.

A mis amigas que conocí en ese lugar: ROSA, ELDA y VERO, con las cuales compartí mi estancia, sacrificio, nerviosismo, incertidumbre, e inseguridades que hoy estoy segura que nos hicieron madurar y a la larga contribuirán a ser más que unas buenas profesionistas, unas profesionales en éste mundo de los hongos. Gracias por compartir esas horas en el laboratorio, más por aquellas extras, que dieron pie a ésta amistad que hoy tenemos. Por arriesgarnos a estudiar algo a lo que no se le da la trascendencia e importancia que debería, por contribuir con una pequeña semilla para que ese interés se conscientice en algún momento.

Por supuesto, tengo que rendir tributo a mis tutores:

M. en Med. Trop. Laura Rosio Castañón, que has sido trascendental en mi desarrollo en este campo, no sólo en este proyecto. Gracias por confiar en mí, por el apoyo, por demostrarme con tu ejemplo lo profesional que puedo llegar a ser. Por ser más que una alumna, una persona, una amiga para tí. No tengo como pagar todo el apoyo que me has dado, espero no haber defraudado tus expectativas y seguir trabajando contigo, para mí es un placer. Gracias por lo paciente que has sido tratando de entender mis circunstancias y confía en que cada tarea ha sido realizada con la mejor de la disposición y entereza.

Gracias Dr. Arturo Ángel Cortés Figueroa por haber sido el contacto en el CMN 20 de noviembre, ISSSTE. Y no sólo eso, por ver en mí a una persona productiva y responsable; por apoyarme siempre en lo que he necesitado y por ser siempre tan accesible conmigo. Debo agradecer la oportunidad de trabajar contigo, en tu institución y por haberme transmitido esa convicción para hacer las cosas bien y poder ayudar, a pesar de las circunstancias. Debes estar seguro de que no te defraudaré y tendré siempre en mente tus consejos.

No quiero dejar de lado un agradecimiento a la Dra. Beatriz Rico Verdín, jefe de la División de Epidemiología del CMN 20 de noviembre, ISSSTE, quien dio autorización para la realización del presente trabajo en dicha institución. Además proporcionó los fundamentos para mi formación epidemiológica y me dio una oportunidad valiosa de capacitarme y demostrarle que soy una persona capaz. Gracias por confiar en mí y ver en mí a alguien capaz.

Personas que participaron en el proyecto y no me gustaría dejar de lado, haciendo notar que seguramente se me escapan muchas a quien debo agradecer y que colaboraron con la tesis de manera directa e indirecta: Q. Sara Juárez, jefe del Laboratorio de Pruebas Especiales del CMN 20 de noviembre, ISSSTE, por brindarnos la autorización y el apoyo necesario para el desarrollo del proyecto.

Q.B.P. Óscar Carrera Martínez del Laboratorio de Pruebas Especiales (Bacteriología), quien permitió que comprendiera el uso del auxanograma VITEK. Gracias por su tiempo y su actitud de colaboración para conmigo.

Q.F.B. Juana Salazar Salinas quien me adiestró en las técnicas de muestreo según la vigilancia epidemiológica y siempre me ofreció su apoyo en alguna duda relacionada con ello.

Dra. Lourdes Villa Tanaca y el Dr. César Hugo Hernández del laboratorio de Microbiología General y Genética Microbiana de la Escuela de Ciencias Biológicas

del IPN por aceptar el convenio y siempre estar abiertos a aconsejarme en los detalles moleculares de éste trabajo.

M. Berenice Parra Ortega por tu gran empeño y atención para conmigo, por dedicarme tiempo para el entrenamiento en la extracción y amplificación de mis aislados. Admiro tu convicción y constancia en cada una de las cosas que realizas, gracias por además hacerme grata la estancia en tu laboratorio.

Griselda Sosa, muchas gracias por apoyarme en tratar de alcanzar mi objetivo. Fue muy difícil la decisión de comenzar ésta lucha, pero tú no me dejaste desertar, siempre tuviste una palabra de aliento, un consejo, una alternativa y sobre todo mucha motivación. Espero que tu trabajo reditue todo lo el esmero que pones en cada persona y créeme que no olvido el objetivo, sólo está pospuesto por el momento.

T.C.L. Alejandro Salgado Valencia, te quiero mucho, a pesar del corto tiempo que tenemos de conocernos. Me reflejas muchas cosas que poco a poco descubro. Agradezco el habernos dado la oportunidad de conocernos, eres una persona de la que puedo aprender mucho y que con acciones me has demostrado lo mucho que me aprecia. ¡¡¡Gracias de verdad!!!

T.C.L. Ma. Carmen Hernández Hernández y Bio. Experimental Juan Manuel García Atayde muchas gracias por su apoyo en el trabajo, es bueno saber que puedo confiar y trabajar con ustedes. Ha sido muy grata mi estancia con ustedes en la Unidad; no cabe duda que son personas valiosas y que espero seguir conociendo.

Y por último a la UNAM, por hacerme una profesional profesionalista, por brindarme el espacio para desarrollarme, por ser número uno en vanguardia, por crearnos esta consciencia que la he visto poco en este país. GRACIAS por ayudarme a ver las cosas de manera diferente, tener mucha actitud ante la vida no tengo la menor duda que es sólo reflejo de la garra puma que llevo dentro.

RELACIÓN DE *Candida* spp. OBTENIDA DE PACIENTES Y SU AMBIENTE EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DE ADULTOS (UCIA) DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL (CMN) 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE.

I. INTRODUCCIÓN

1. Hongos

Los hongos, en la naturaleza, de acuerdo a la clase de sustancias orgánicas que aprovechan, pueden ser saprotrofos o simbioses (parásitos, mutualistas, comensalistas, etc.) y son ubicuos. “Los saprobios utilizan sustancias orgánicas inertes, generalmente en descomposición, que pueden ser reservas para otros organismos. Los simbioses, se asocian con otros seres vivos, prestándose mutua ayuda en sus funciones. Los parásitos se desarrollan en otros organismos vivos que constituyen sus hospederos y se nutren de las sustancias que hay en sus células vivas u órganos vitales”. (Herrera y Ulloa, 2004).

La Micología Médica es una rama de la Medicina que se encarga de estudiar enfermedades causadas por hongos, entre las que se encuentran las micosis.

Se llaman micosis a todas las infecciones causadas por hongos parásitos microscópicos. Para que un hongo produzca daño al hombre, y tenga éxito en su invasión y supervivencia, posee diversas estructuras y/o producción de metabolitos que le permiten evadir el sistema inmune del hospedero (factores de virulencia), por los cuales el hongo puede ser beneficiado en el microambiente de la interacción hombre – parásito (Hernández *et al.*, 2003).

2. Micosis

Las micosis, se han clasificado clínicamente según la región topográfica afectada en el humano. I) Las micosis superficiales (dentro de los cuales encontramos a los hongos queratinofílicos que afectan a la epidermis, mucosas y anexos como pelos y uñas), II) Subcutáneas (cuyos agentes etiológicos son hongos saprobios que por inoculación traumática invaden diferentes capas de la dermis y tejido celular subcutáneo), III) Profundas o sistémicas (se adquieren por inhalación afectando al sistema respiratorio y/o diseminan, estableciéndose en diversos órganos y tejidos profundos a partir del foco de infección primario) y IV) Oportunistas (López *et al.*, 2004).

3. Micosis oportunistas

Este grupo de micosis no sigue el criterio topográfico, ya que en él pueden estar incluidas las superficiales, subcutáneas y sistémicas. El conjunto está formado por infecciones causadas por hongos de baja virulencia que incluso pueden ser comensales y que requieren de diversos factores de inmunocompromiso en el hospedero para originar infección.

Dentro de éste grupo de enfermedades encontramos a la criptococosis, mucormucosis, aspergilosis, geotricosis, peniciliosis, rodoturiosis, pseudosporiosis, fusariosis, escopulariopsis, y neumocistosis (López *et al.*, 2004). Uno de los ejemplos más importantes de este grupo de micosis es la Candidosis.

4. Candidosis

La candidosis es una micosis oportunista, causada por levaduras del género *Candida* spp. Es un padecimiento frecuente que se presenta como infección aguda o crónica de mucosas, piel y uñas, además de producir daño a nivel sistémico diseminando a órganos profundos y sangre (López *et al.*, 2004). "Las candidosis invasoras están relacionadas principalmente con enfermos quirúrgicos, pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o cualquier enfermo con una inmunosupresión importante, con catéteres o recibiendo alimentación parenteral" (Quindós, 2002).

4.1 Factores predisponentes o de oportunismo.

La enfermedad se presenta, cuando el sistema inmune de la persona está alterado por algún factor. El advenimiento de procesos terapéuticos modernos, el implemento dentro de los hospitales de Unidades especializadas de Cuidados Intensivos, el uso de procesos invasivos, nutrición parenteral, uso de antimicrobianos de amplio espectro, uso de ventilación asistida, etc. han alargado la vida de pacientes cuya enfermedad generalmente tenían un desenlace fatal; sin embargo esto también ha contribuido al inmunocompromiso y por lo tanto, permiten desarrollar personas susceptibles a enfermedades oportunistas, como aquellas personas que se someten a procesos con corticoesteroides, antibióticoterapia, a quimioterapias, donde el sistema inmune se atenúa y así se crean las condiciones idóneas para que *Candida* prolifere y produzca enfermedad.

Aunado a ello, tenemos la epidemia de SIDA, la cual se ha desarrollado en los últimos años. Los pacientes con dicha enfermedad son altamente susceptibles a infecciones nosocomiales por hongos oportunistas. En éste grupo de pacientes, generalmente las infecciones micóticas son severas y rápidamente progresivas, de difícil diagnóstico y tratamiento (Fridkin y Jarvis, 1996), ya que son susceptibles a cualquier agente etiológico y por lo tanto son un grupo blanco para la candidosis.

Debido a todo lo anterior, y siendo un hospital, un centro de congregación de pacientes inmunodeficientes, estos sitios son altamente susceptibles a infecciones nosocomiales por *Candida*.

5. Mecanismos de infección

La fuente de infección puede ser exógena, a través de venoclisis, cirugías, alimentación parenteral y otros procesos invasivos (López *et al.*, 2004); sin embargo, en la mayoría de los casos, la fuente de infección es endógena y se desarrolla a partir de los sitios donde *Candida* spp. habita como comensal (Herrera y Ulloa, 2004).

Teniendo en cuenta que la candidosis puede ser una enfermedad endógena, se ha observado su transmisión horizontal (de personal médico a pacientes) (Hedderwick, 2000) o bien, de manera vertical (de madre a neonato) (Fridkin y Jarvis, 1996; Ramos y Ruíz, 2006).

Las infecciones sistémicas por el género *Candida* spp. son comunes en pacientes terminales o con procesos delicados, los cuales en los hospitales se integran a las secciones de Unidades de Cuidados Intensivos.

6. Formas Clínicas.

Hay muchas clasificaciones clínicas de la enfermedad. A continuación, se presenta aquella que usa como referencia, la localización de la infección (López *et al.*, 2004; Ramos y Ruíz, 2001), dividiendo a la candidosis en:

6.1 Cutánea.- Afecta las diferentes capas de la piel y mucosas. Se caracteriza por la presencia de una erupción maculo-papular, vesículas y pústulas en tronco y extremidades, que progresan dejando una descamación extensa. "Existe prurito moderado, presencia de grietas y dolor. Aparece principalmente en pliegues de flexión e intertrigos" (López *et al.*, 2004). Es común en niños, y se presenta cuando la madre tiene infección vaginal antes del parto.

6.2 Onicomycosis.- afecta a las uñas. Se presenta eritema alrededor de las uñas y edema doloroso. Si es crónico, la uña, toma un color que va desde amarillo hasta negro y puede haber desprendimiento. Las uñas de las manos son las más afectadas.

6.3 Diseminada o sistémica.- Los signos y síntomas son inespecíficos Y pueden confundir al médico con otro agente etiológico. Dependiendo del órgano o tejido afectado, será la sintomatología exhibida; sin embargo, de manera ordinaria, signos como fiebre, astenia, adinamia y mal estado general, son presentados; además de la sintomatología del órgano afectado. La candidemia no tratada, particularmente durante el período de neutropenia, puede evolucionar a un cuadro agudo de candidiasis diseminada con shock séptico, o a un cuadro crónico de afectación multiorgánica conocido como candidiasis crónica diseminada.

La gravedad de la enfermedad está relacionada con el grado de inmunodepresión del paciente. Para que la enfermedad se desarrolle es necesaria la adhesión, colonización e invasión de la levadura. Generalmente las candidosis superficiales tienen un buen pronóstico, si el diagnóstico es oportuno; no así las sistémicas en donde la evolución es fatal sobre todo si la enfermedad de base no es controlada.

7. Terapia

Cuando la infección es superficial, se maneja con antifúngicos como nistatina, clotrimazol, bifonazol o ketoconazol. Cuando es invasiva, se emplea anfotericina B o triazoles como itraconazol o fluconazol por tiempo variable y ayuda a corregir los factores predisponentes de inmunocompromiso (López *et al.*, 2004). Generalmente las especies de *Candida* son susceptibles a la anfotericina B, por lo que a la fecha, en nuestro país, sigue siendo considerado como el antifúngico por excelencia para el tratamiento de las candidemias; sin embargo, no hay que perder de vista los reportes de resistencia por parte de *C. krusei* y *C. glabrata* (Arif *et al.*, 1996; Fridkin y Jarvis, 1996; Fidel *et al.*, 1999; Calderone, 2002; Arenas, 2008). Asimismo, especies como *C. glabrata*, han mostrado una resistencia innata a compuestos azólicos, específicamente al fluconazol (Arif *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 1998; Castaño *et al.*, 2006).

8. *Candida* spp.

Candida spp. en el hombre y algunos otros vertebrados es una levadura comensal, encontrándose en mucosas del tubo digestivo, tracto genitourinario, aparato respiratorio alto así como en piel. En la naturaleza podemos encontrarla en hojas, flores, agua, detritos del suelo (Quindós, 2002).

"*Candida* vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano, coexistiendo como comensal, pero cuando este balance se pierde, se torna patógeno" (Villanueva y Arenas, 2007).

Existen aproximadamente 200 especies del género *Candida*. Un poco más de 100 de ellas, han sido aisladas de humanos (Fridkin y Jarvis, 1996).

8.1 Diagnósis del género

El género *Candida* está compuesto por un grupo heterogéneo de organismos que crecen como levaduras, ellas pueden ser ovales o redondas; pueden o no producir micelio verdadero, pseudomicelio (excepto *C. glabrata*) y presentan gemación múltiple. Las levaduras de éste género tienen la capacidad de asimilar y fermentar carbohidratos. No producen pigmento carotenoide, ni asimilan inositol y todas carecen de cápsula (López *et al.*, 2004).

Es difícil estandarizar una morfología específica para todas las especies de *Candida*, ya que es un grupo polifilético. "*C. albicans* y otras especies de *Candida* son organismos dimórficos, capaces de alternar entre una fase normal levaduriforme y una fase filamentosa, dependiendo de las condiciones ambientales" (Herrera y Ulloa, 2004).

Otros miembros, como *C. tropicalis*, producen pseudohifas y/o pseudomicelio. *C. albicans* y *C. dubliniensis* también producen pseudohifas e hifas verdaderas. En el tejido parasitado forman micelio verdadero y pseudomicelio. *C. glabrata* en cambio presenta blastoconidios y puede llegar a presentar pseudohifas en respuesta a limitación de nitrógeno (Castaño *et al.*, 2006).

"Todas las especies de *Candida* pueden causar el mismo tipo de enfermedad, desde una candidosis superficial, hasta una enfermedad invasora; sin embargo, la gravedad y las opciones terapéuticas difieren entre las mismas especies, por ello es tan importante identificar la especie en todos los aislamientos de *Candida*."(Cantón, 2001).

La especie con mayor frecuencia aislada de infecciones es *C. albicans* (López *et al.*, 2004). En los últimos años otras especies de *Candida* han incrementado su frecuencia (denominadas CNCA: *Candida* NO-*C. albicans*), principalmente asociadas a brotes, fungemias e infección nosocomial (Fridkin y Jarvis, 1996; Calderone, 2002 y Sánchez, 2004).

8.2 Factores de virulencia

La capacidad de *Candida* de colonizar al hospedero y provocar enfermedad está relacionada con las características que dichas levaduras poseen. Para que *Candida* se establezca y produzca infección, es necesario que se adhiera a las células del hospedero y evada el sistema inmune.

- Transición morfológica.- se refiere a la característica dimórfica de éste grupo de levaduras. Su cambio de forma levaduriforme a forma filamentosa, que incluso es evaluada en pruebas de identificación.
- "Switching" fenotípico.- se refiere al cambio morfológico de las mismas colonias de levaduras al paso del tiempo. Puede haber un cambio de tonalidad, hasta de algunas características de la forma y textura de la colonia.
- Adherencia a sustratos biológicos e inertes.- se refiere a la producción de biofilms, y es la forma en la que la levadura "asegura".
- Producción y secreción de enzimas hidrolíticas.

9. Taxonomía de *Candida* spp.

Candida se puede reproducir de manera sexual y asexual. Especies como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son asexuales (también denominados anamorfos).

En cambio, *C. krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae* y *Candida norvegensis* además de la reproducción asexual, tienen una fase teleomórfica o sexual (Coleman 1997). En el 2000, Chen *et al.*, mediante la comparación de secuencias de ADN, demuestra que las especies sexuales y asexuales de *Candida* están más relacionadas filogenéticamente a los Ascomycetes que a los Basidiomycetes.

"Las técnicas moleculares, como la recombinación genética, por ejemplo, han permitido demostrar como *C. glabrata* durante su evolución se asocia genéticamente con *Saccharomyces cerevisiae* debido a su cercanía filogenética" (Villanueva y Arenas, 2007).

La filogenia, de James, *et al.* 2006, basada en el estudio reciente de la secuenciación de seis genes (18S rRNA, 28S rRNA, 5.8S rRNA, elongación del factor 1-a (*EF1a*), y las subunidades *RPB1* y *RPB2* de la RNA polimerasa), hecha con 200 taxones muestra cinco phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota y Glomeromycota. En el subphylum Saccharomycotina están las "verdaderas levaduras" donde se incluye a *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. (James *et al.*, 2006). A pesar de la taxonomía confusa que se ha venido haciendo del género, actualmente podemos asegurar que el género *Candida* pertenece al Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase: Ascomycetes, Orden: Saccharomycetales y Familia: Saccharomycetaceae (Calderone, 2002; Villanueva y Arenas 2007).

10. *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) (Kurtzman, 1998).

Es una levadura que principalmente se aísla de mucosas como la oral, respiratoria, digestiva y vaginal donde habita como comensal (Manzano, 2000 y Sánchez, 2004). Es la especie más aislada de mucosa de cavidad oral (70-80%). Su aislamiento, generalmente se asocia a pacientes con VIH, con septicemias, trasplantados de médula ósea, prematuros, con infección pos-quirúrgica y aquellos que se someten a quimioterapia de cáncer.

En infecciones sistémicas, las levaduras del género *Candida* ocupan el cuarto lugar de organismos que son aislados de sangre en pacientes hospitalizados; y *Candida albicans* como la especie más representativa en dichos cultivos. Sin embargo su mortalidad no es tan alta, como en el caso de otras especies como *C. glabrata*. (Vázquez, 1998)

11. *C. glabrata* (H.W. Anderson) S. A. Meyer & Yarrow (1978) (Kurtzman, 1998).

Anteriormente denominada *Torulopsis glabrata*, es considerada un patógeno emergente ya que posee resistencia contra drogas antifúngicas como los azoles, característica que le permite un sobre crecimiento y mayor oportunidad de diseminarse a diferentes tejidos, causando infección sistémica (Castaño, 2006). Por lo que presenta la más alta mortalidad de todas las especies de *Candida* (Vázquez, 1998).

Se ha observado que la colonización por este tipo de levaduras se incrementa con la prolongación en la hospitalización y el deterioro clínico del enfermo. Afecta especialmente mucosa vaginal, el tracto urinario, sangre y pulmones.

Se asocia a pacientes con diabetes *mellitus*, tumores hematológicos, con VIH, tumores sólidos, leucemia, embarazo y neonatos malnutridos (Hazen, 1995). Se han descrito algunos brotes epidémicos en las unidades de cuidados intensivos (UCI) debidos a ésta especie, que son de especial atención para los nosocomios, por su naturaleza innata a antifúngicos. (Arif, 1996; Torres, 2000 y Koç *et al.*, 2001)“.

12. *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout (1923).

Después de *C. albicans*, es considerada como una de las especies más encontradas en los productos patológicos de pacientes (Cantón *et al.*, 2001). Se sabe, que “la capacidad invasora de esta especie es mayor que la de *C. albicans*“. Se aísla con más frecuencia a pacientes con enfermedad hematológica o receptores de médula ósea y suele adquirirse mediante algún mecanismo endógeno en los primeros días de hospitalización en ausencia de profilaxis antifúngica (Cantón *et al.*, 2001). Afecta generalmente mucosa oral, sangre, huesos/articulaciones. Asociada a pacientes con Infección por VIH, tumores sólidos, trasplante de médula ósea y leucemia (Wright y Wenzel, 1997) La mayoría de los aislados de *C. tropicalis* son susceptibles a fluconazol, anfotericina B, e itraconazol (Moran *et al.*, 2002).

13. Identificación

“La identificación de las especies que corresponden a estas levaduras no sólo se basa en la morfología macro y microscópica, sino también en pruebas fisiológicas y bioquímicas que se hacen con los cultivos aislados. Todas las especies de *Candida* mencionadas pueden ser aisladas en Sabouraud dextrosa agar o en Mycosel agar” (Herrera y Ulloa, 2004). Se hacen pruebas tradicionales que evalúan las características intrínsecas del hongo, de poseer enzimas y componentes que pueden degradar sustratos.

Dentro de las cuales tenemos a la reducción del sufijo de bismuto (utilizando el agar BIGGY), hidrólisis de la urea (con el agar urea de Christensen), el uso de agares cromogénicos que permiten la identificación a nivel de especie de las levaduras, existiendo muchas marcas comerciales de ellos (Odds, 1994; Godoy, 2001 y Quindós, 2001); la filamentación en suero humano, que sirve para evaluar a las 2 horas la formación del tubo germinativo, característico de *C. albicans* y *C. dubliniensis* y ello permite diferenciarla de otras especies pertenecientes al género. La producción de clamidoconidios (en agar harina de maíz adicionado con tween 80) y su disposición (en agar níger). Se evalúa la termotolerancia (a 37°C) y la resistencia o sensibilidad a actidiona (siembra en medios conteniendo el antibiótico) (Rippon, 1990).

La distinción de especies también se puede obtener por pruebas de asimilación y fermentación de diversas fuentes de carbono (usando auxanogramas, manuales o automatizados).

El estudio del genoma entre otras cosas, contribuye confiablemente al esclarecimiento de la identidad de los organismos, por lo que el análisis molecular de levaduras posee valor práctico, para la identificación rápida y precisa en muestras heterogéneas procedentes de origen clínico y ambiental. Estudios de biología molecular, analizan el ADN utilizando técnicas como el polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPDs) para estudiar la diversidad genética entre cepas de mismas especies del género *Candida* (Boldo *et al.*, 2003) o bien para diferenciar especies que bioquímicamente tiene un perfil muy similar, como lo son *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Alonso, 2000 y Bautista, 2003). A través de trabajos de ensayo-error, se han optimizado las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa PCR para que se lleve la identificación de especies de *Candida* (Sansinforiano, 2001).

Se han diseñado primers a partir de intrones y regiones intergénicas para identificar a especies del género *Candida* (Baquero *et al.*, 2002 y Sandoval, 2008).

Con estas herramientas la determinación de especie es más rápida y certera. Sin embargo estas técnicas son costosas, por lo que el acceso se ve limitado a aquellas personas que pueden sustentarse y quienes cuenten con los recursos humanos que sepan utilizarlas.

II. ANTECEDENTES.

Acerca de la frecuencia de *Candida* y candidiasis en México, López (1995) reportó la frecuencia de micosis pulmonares en pacientes hospitalizados por diferentes neumopatías. En dicho estudio, la candidiasis se encontró como la más frecuente y asociada a enfermedades de base como tuberculosis pulmonar, diabetes y carcinoma pulmonar (López, 1995). Más tarde, Manzano en el año 2000, estudió las levaduras, como agentes causales de micosis, y mostró la frecuencia de aislamiento de levaduras en pacientes atendidos en un Hospital de la Ciudad de México. Ambos estudios se realizaron a partir de productos biológicos de pacientes. En ellos, se enfatiza a *Candida* spp. y específicamente a *C. albicans*, como un grupo de levaduras causante de micosis y frecuentemente aislado de pacientes hospitalizados.

Hernández, *et al*, analizaron la frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos, donde a partir de productos biológicos, se estableció su relación con alguna micosis. Aquí, se incluye a *Candida* como grupo frecuentemente asociado a patologías y los factores de inmunocompromiso (Hernández *et al.*, 2003).

Los servicios más preocupados por vigilar epidemiológicamente la Infección Nosocomial (IN), son los pediátricos y las unidades de cuidados intensivos (UCI) (Díaz, 1999; Hernández, 2006 y Morayta, 2006); en los cuales se han hecho diversas encuestas que dan a conocer los agentes etiológicos más frecuentes causantes de IN, con el fin de tomar acciones preventivas y control sanitario (Hernández, 2006), enfatizando la necesidad de tener un programa de control epidemiológico rutinario (Díaz, 1999).

Estos reportes generalmente enfatizan a las bacterias, como los principales agentes etiológicos y cuando se da importancia a los hongos (Díaz, 1999 y Valenzuela, 2004), indiscutiblemente las levaduras del género *Candida* hacen su aparición.

Valenzuela (2004) realizó un trabajo en el Hospital de Cardiología del CMN SXXI IMMS, donde enfatiza la importancia de la vigilancia epidemiológica en IN e investiga las tasas de infección por sitio y servicio, así como la frecuencia de agentes causales comunes y encontró a *Candida albicans* como el principal microorganismo aislado de urocultivos y el factor de riesgo relacionado, fue la instalación de catéter urinario.

Sánchez (2004) en el hospital de pediatría, del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, investigó en los pacientes la frecuencia de infecciones sistémicas por *Candida* durante el periodo 1991-2003 y encontró como principales agentes causales productores de candidemias a *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, destacando: 1) El aumento de *Candida* no *albicans*, 2)

A las UCI pediátricas, como un sitio cuyos integrantes son altamente vulnerables de contraer candidemias (más del 50% de las infecciones sistémicas por *Candida* se encontraron en este sitio). Actualmente se conoce que algunos brotes intrahospitalarios son el resultado de contaminación a partir del ambiente, y estas formas nosocomiales adquieren mayor importancia que las adquiridas de manera endógena. Una alta proporción de pacientes son colonizados por *Candida* durante su estadía hospitalaria (Villanueva y Arenas, 2007).

1. *Candida* y el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE (CMN).

En el informe anual de infecciones intrahospitalarias del CMN en 2005, se registró que las áreas del hospital que presentan mayor número de casos son: Servicio de Hematología, Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica, Unidad de Cuidados Intensivos Post-Quirúrgica, Unidad de Hemato-Pediatría y la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (Servicio Epidemiología CMN 20 de noviembre, ISSSTE).

Morayta, *et al.* (2006) reportaron que en el CMN, los pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) en primer lugar y aquellos de la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) en segundo lugar, eran los más afectados por infecciones nosocomiales. El proceso encontrado con mayor frecuencia fue el de sepsis relacionada con catéter y el grupo y factor de riesgo más involucrados fueron los recién nacidos y la desnutrición.

En ambos registros, las infecciones nosocomiales investigadas son exclusivamente de etiología bacteriana, por lo que la frecuencia y desarrollo de las infecciones nosocomiales de origen fúngico eran datos desconocidos.

El presente estudio inició cuando en el mes de enero del 2007, se reportaron los casos de posibles candidemias en tres pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA). Se enviaron al laboratorio del hospital, los productos patológicos de los pacientes y como resultado de los análisis, se reportó el aislamiento de *Candida glabrata* y *C. tropicalis*. Correlacionando los hallazgos de laboratorio con los pacientes, se concluyó que cada uno de los dos aislados de *C. glabrata* correspondieron a dos pacientes que para ese momento ya habían muerto, mientras que el paciente de quien se aisló *C. tropicalis*, mejoró su estado y fue trasladado de la UCIA a otra sala del hospital.

iii. JUSTIFICACIÓN.

En la literatura nacional especializada en Micología Médica, existen diversos trabajos que muestran la frecuencia en el aislamiento de *Candida* spp. a partir de productos biológicos de enfermos hospitalizados, pero no de aislamientos obtenidos del ambiente que circunscribe a los pacientes.

En el CMN 20 de noviembre no existen reportes epidemiológicos acerca de la frecuencia de infecciones, que incluyan a los hongos como agentes causales. Aunado a ello, es importante el identificar la micobiota que podría estar en contacto con los pacientes inmunosuprimidos que se encuentran en la Unidad de Cuidados Intensivos, ya que por su estado inmunológico son blanco perfecto para que se pueda desarrollar en ellos una candidosis.

No hay que perder de vista que el presente estudio tiene implicaciones a nivel epidemiológico muy importantes, en cuanto a adoptar y mantener las medidas higiénicas que debe tener el personal, ya que éste podría fungir como un vector para una transmisión del patógeno. Por otro lado, podría ayudarnos a vislumbrar qué factores de riesgo son los que pueden estar mayormente implicados en una infección por *Candida* dentro de la Unidad, reflejo de la frecuencia y de las levaduras.

Por lo anterior el presente estudio, pretende relacionar a las levaduras obtenidas en los productos patológicos de tres pacientes confinados en la UCIA, con aquellas aisladas dentro del ambiente de la Unidad.

IV. OBJETIVOS.

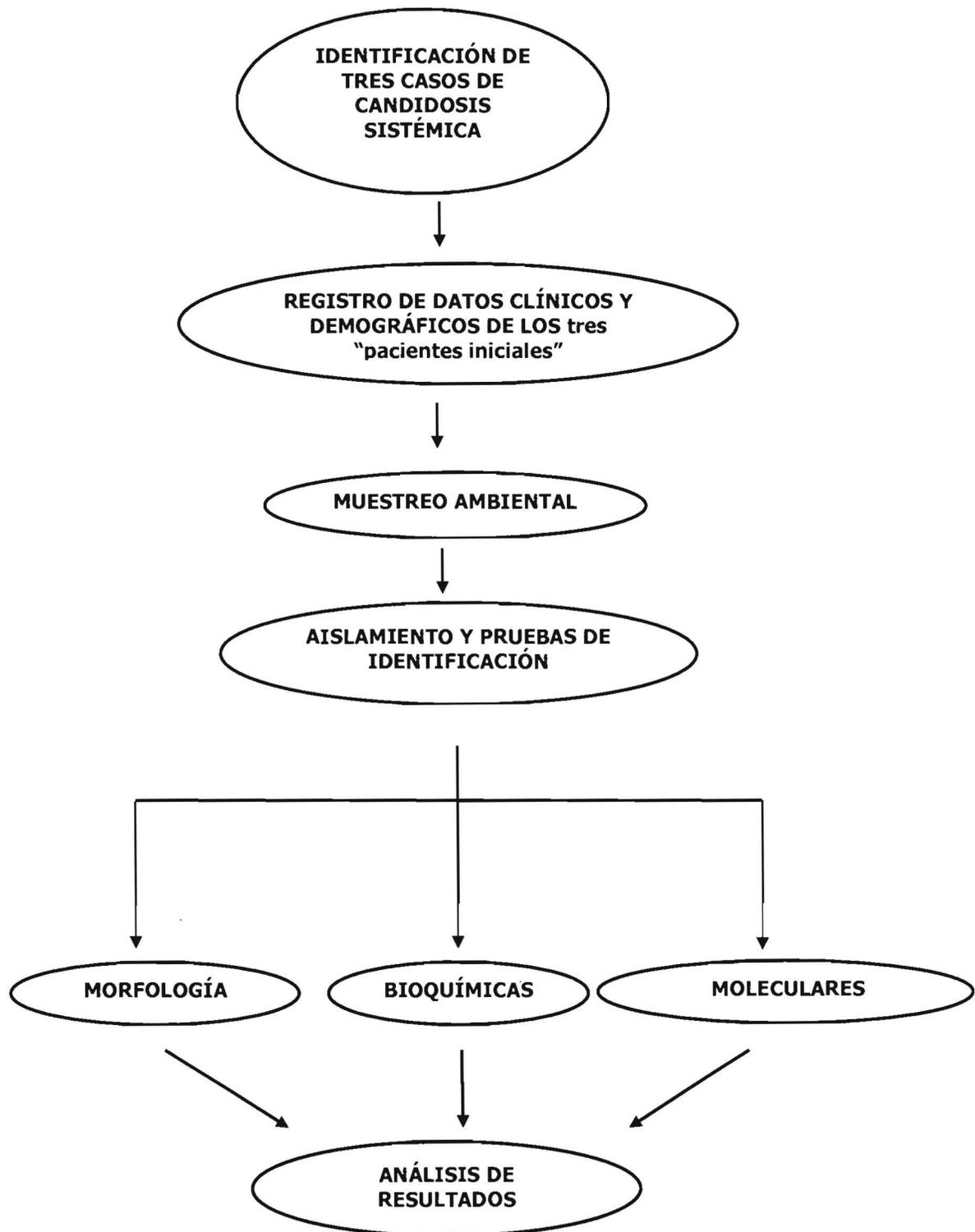
14. Generales:

- Aislar levaduras del género *Candida* spp. a partir del ambiente (productos biológicos y superficies inertes de contacto) correspondiente a la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA), del CMN 20 de noviembre.
- Identificar a las especies de *Candida*, aisladas de los casos clínicos y de las muestras ambientales, así como correlacionarlas.

15. Particulares:

- Utilizar diferentes técnicas para la identificación de *Candida* spp.
- Proponer las potenciales fuentes de contagio de *Candida* spp., en el ambiente intrahospitalario.

V. PLAN GENERAL DE TRABAJO.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

16. Descripción del lugar de estudio.

El Centro Médico Nacional (CMN) 20 de noviembre del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), está ubicado en la zona sur del Distrito Federal. Es un centro de alta especialidad (ofreciendo atención de segundo y tercer nivel), integra las siguientes especialidades: Medicina interna, dermatología, geriatría, reumatología, endocrinología, nefrología, hematología, cardiología, urología, cirugía maxilofacial reconstructiva, cirugía plástica, cirugía general, ortopedia, oncología quirúrgica, y médica, neurocirugía, otorrinolaringología, gastroenterología, neurología, perinatología, neonatología, neurocirugía, cirugía cardiovascular y torácica, oftalmología, neumología, infectología y 6 unidades (de Adultos, Pediátrica, de Neonatos, de Quemados, Coronaria y de Trasplantes).

Es un complejo de 5 edificios aledaños: el A pertenece a la zona de hospitalización (donde se realizó el estudio); el B a consulta externa; el C a la parte de administración, personal y dirección; el D destinado a investigación y el E es el edificio de enseñanza. (Foto 1).

Foto 1. Complejo del Centro Médico Nacional 20 de noviembre, ISSSTE.



La UCIA está en el 7º piso del edificio A, conformado por 12 cuartos de hospitalización, cuartos de trabajos médicos, centrales de enfermeras, guarda equipo, cuartos de diagnóstico y laboratorios diagnósticos. A ella pueden ingresar los familiares de las personas hospitalizadas con previo lavado de manos. Se tiene acceso a ella por una puerta de cristal, al lado de ella hay un lavabo para visitas, junto a la puerta de entrada se encuentra la cocina y en seguida un pasillo largo que comunica a los cuartos del 701 al 710. Justo enfrente de ellos, y en orden de aparición, desde la puerta de acceso, está el laboratorio diagnóstico, cuarto 712, cuarto de trabajos médicos, central de enfermeras, guardaropa, cuarto diagnóstico, central de enfermeras, trabajos médicos y cuarto 711.

Todos los cuartos donde se encuentran los pacientes tienen el mismo diseño y acomodo del mobiliario; poseen una cama, un sofá, lavabo, cortinas, mesa de soluciones para curaciones, consolas y aparatos para medir parámetros vitales, mesa móvil para alimentos, tripie para suero y soluciones.

17. Reporte de casos de candidosis sistémica.

En enero del 2007, se reportó por la unidad de Epidemiología del CMN, tres casos de posible candidemia en pacientes pertenecientes a la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA), pues de manera recurrente pudieron ser aisladas levaduras del género *Candida* a partir de diversos productos patológicos de los pacientes. El Laboratorio de Microbiología del CMN identificó dos especies: *Candida glabrata* y *C. tropicalis*. Los aislados de *C. glabrata* correspondieron a dos pacientes que para ese momento ya habían muerto. El paciente de quien se aisló *C. tropicalis*, mejoró su estado y fue trasladado de la UCIA a otra sala del hospital. Los tres aislados de *Candida*, fueron resembrados en agar Sabouraud, para su inclusión en las muestras a identificar para su posterior proceso. Para diferenciar éstos aislados clínicos de aquellos debidos al muestreo, se decidió denominarlos como muestras de "pacientes iniciales".

18. Datos Clínicos y Demográficos de los "pacientes iniciales".

Se revisaron los expedientes de esos tres pacientes, para obtener algunos datos clínicos y demográficos como: Nombre, sexo, edad, producto biológico a partir del cual se aisló la levadura, antecedentes clínicos generales, diagnóstico de ingreso, enfermedad de base, evolución de la infección, fecha del aislamiento de la levadura y tratamientos antimicóticos empleados.

19. Muestreo ambiental.

Para obtener las muestras, previamente se siguieron las normas higiénicas de: Lavado de manos, uso de bata, tapabocas y guantes estériles.

Absolutamente todo el material utilizado para la toma de las muestras (hisopos, soluciones, cuadrados de alfombra o moquetas, papel filtro, etc.) fue esterilizado e higiénicamente transportado para su uso. Todo el procedimiento de muestreo fue asesorado por el personal del Laboratorio de Epidemiología del CMN.

19.1 Colección. Por su naturaleza, las muestras fueron divididas en dos grupos:

- i. Muestras de áreas inertes: Aire ambiente, superficies y mobiliario de las habitaciones (camas, mesas, cuneros, humidificadores y material de curación) usados por los pacientes internados en el momento del muestreo) y áreas circundantes (central de enfermeras, cocina, cuarto de trabajos médicos, cuarto de diagnóstico y laboratorio).
- ii. Muestras biológicas. Exudado faríngeo y raspado de piel de manos; del personal paramédico a cargo de los pacientes y de las personas que en el momento del muestreo se encontraban en la unidad investigada. El muestreo del personal fue realizado en turno matutino, vespertino y nocturno. Para el registro de datos, se aplicó un cuestionario a cada participante en el estudio.

Se consideraron como muestra del paciente, algunos exudados faríngeos, muestras de orina, piel de manos, piel aledaña a catéter, piel aledaña a sonda nasogástrica y a tubos endotraqueales de aquellas personas que se encontraban hospitalizadas al momento del muestreo. Para ello, se invitó al paciente a que voluntariamente aceptara la toma de la muestra, firmando la carta de consentimiento informado (conforme al Acta de Helsinki), en donde se enteraba de cuál era el procedimiento al que estaría sujeto y los fines de la investigación (ver anexo).

19.2 Técnicas de muestreo. Dependiendo del material a muestrear, se utilizaron uno o más de los siguientes procedimientos.

19.2.1 Técnica del cuadrado de alfombra o moqueta. Se utilizó para muestrear superficies grandes y planas. Con un cuadrado estéril de alfombra de 5 x 5 cm (moqueta) se frotó vigorosamente la superficie a muestrear. Se envolvió la moqueta en el papel estrasa donde se encontraba estéril y fue transportada al laboratorio.

19.2.2 Arrastre con hisopo. Se ocupó para muestrear áreas reducidas y consistió en humedecer un hisopo en solución salina estéril (SSE, ver anexo) y se frotó vigorosamente la superficie elegida, enseguida el hisopo se sumergió en el tubo con la solución para ser transportado.

19.2.3 Toma directa de alícuotas. Se utilizó para tomar muestras líquidas. Se tomó una jeringa estéril y se introdujo al medio líquido a muestrear, tomándose aproximadamente 2 ml los que fueron introducidos a un tubo estéril para ser transportados.

19.2.4 Aire-ambiente. Se colocaron cajas de Petri con agar dextrosa Sabouraud (ADS, ver anexo) separadas en forma equidistante en cada una de las habitaciones y en otras áreas de la unidad. Cada caja se destapó y se expusieron al aire durante 15 min, para la captura de esporas. Transcurrido el tiempo, las cajas se taparon y se transportaron al laboratorio.

19.2.5 Exudados faríngeos y raspados de manos de personas ubicadas en las áreas de estudio (personal paramédico, intendencia o visitantes). El exudado se tomó de la manera convencional ya conocida y el hisopo utilizado fue sumergido en SSE adicionada con antibióticos (ver anexo). Para la muestra de manos, se frotaron vigorosamente las palmas, dorso y uñas de la persona, con un hisopo previamente humedecido en aproximadamente 2 ml de amortiguador de fosfatos (ver anexo).

Posteriormente a cada una de la tomas, los hisopos fueron sumergidos en el amortiguador y transportados al laboratorio para su proceso inmediato.

Las personas muestreadas pertenecieron a los tres turnos laborales (matutino, vespertino y nocturno) y a cada una de ellas se les aplicó un cuestionario (ver anexo). Con esta misma técnica, de aquellos pacientes internados en las áreas estudiadas con previo consentimiento, se obtuvieron muestras de la piel cercana a donde estaban instaladas sondas o catéteres, raspado de manos y exudado faríngeo.

En todos los casos, las muestras fueron marcadas con clave, fecha y procedencia para su identificación.

19.3 Siembra.

En el laboratorio, las muestras obtenidas mediante el cuadrado de alfombra, fueron sembradas sacudiendo el material en cajas Petri con ADS.

Las muestras de superficies inertes tomadas con hisopo fueron sembradas con el método de estría masiva en cajas Petri con ADS.

Las muestras líquidas fueron inoculadas en placas con ADS y sembradas por estría masiva con ayuda de un asa bacteriológica.

Las muestras, designadas como biológicas y tomadas con hisopo fueron sembradas en medio de ADS.

Todas las siembras (incluyendo las muestras de los "pacientes iniciales") se marcaron debidamente para su posterior identificación y fueron incubadas a temperatura ambiente (20-26°C) durante dos semanas, con observaciones diarias para identificar cualquier tipo de crecimiento. Una vez concluido el tiempo, se registró el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) correspondientes a bacterias, hongos filamentosos y levaduras; aquellos cultivos sin crecimiento fueron desechados.

Sólo las levaduras fueron resembradas en tubos con ADS y rotuladas para su identificación morfológica.

20 Identificación.

Todas aquellas colonias con aspecto levaduriforme, crecidas de los aislamientos primarios, fueron analizadas mediante el estudio morfológico macro y microscópico.

20.1 Pruebas Morfológicas.

Fueron observadas las siguientes características macroscópicas de las colonias: tamaño, forma, elevación, bordes, textura y color. Si la morfología era similar a la levaduriforme, se hizo el conteo de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y procedió la observación microscópica mediante un examen directo en fresco de la colonia (en una gota de agua en un portaobjetos, se suspendió un poco de la colonia y se tapó con el cubreobjetos) para observar forma y tamaño de las levaduras, presencia o ausencia de micelio verdadero o seudomicelio. Simultáneamente con las mismas muestras, se prepararon exámenes directos con tinta china para identificar cápsula.

20.2 Purificación.

Una vez confirmada microscópicamente la presencia de levaduras, las colonias fueron resembradas por estría de agotamiento en ADS con antibióticos (ver anexo) para su purificación. Se incubaron durante 48 horas a 25°C y entonces fueron sometidas a los métodos de identificación.

20.3 Conservación.

Todas las muestras a identificar fueron conservadas en solución salina. Para ello, se tomó una asada de la colonia, sembrándola por estría masiva en una caja de petri con ADS. Se incubó 48 horas a temperatura ambiente. Habiendo crecido, se tomó toda la masa fúngica de la caja, y se llevó a un vial que contenía solución salina fisiológica. Se introdujo un cubo de medio de cultivo (ADS o EMA o PDA), se selló el vial marcándolo con clave y fecha de la muestra. Una semana después, se hizo la prueba de viabilidad, la cual consistió en tomar 0.1mL del vial y fueron sembrados por estría masiva en una caja de petri con ADS.

20.4 Pruebas Bioquímicas y Fisiológicas.

Todas las pruebas se hicieron a partir de un cultivo de 48 horas en ADS.

20.4.1 A nivel de género.

Los aislados fueron sembrados en agar BIGGY (Bismuth-Glucose-Glycine-Yeast, para evaluar reducción del sulfito de bismuto) (ver anexo) y agar urea de Christensen para demostrar presencia o ausencia de ureasas) (ver anexo). Estas pruebas discriminan al género *Candida* de otras levaduras.

20.4.2 A nivel de especie.

Los aislados positivos a nivel de género, fueron sembrados en el sistema cromógeno *Candida* ID2[®], que puede diferenciar a las levaduras del género en tres grupos: 1) Azul cobalto = *Candida albicans*, 2) Rosadas = *Candida tropicalis* o *C. kefyr* o *C. lusitanae* y 3) Blancas= Otras especies de *Candida* que no sean aquellas caracterizadas por los 2 colores anteriores, e inclusive pertenecientes a otros géneros (ver anexo).

Otras pruebas efectuadas, en orden de aparición, fueron: Suero humano (para evaluar filamentación), Agar harina de maíz adicionado con tween 80 (para evaluar la producción de pseudohifas, hifas y clamidoconidios), agar Níger (para ver la disposición de clamidoconidios), crecimiento en ADS a 37°C (para evaluar termotolerancia), crecimiento en Mycosel[®] (para evaluar resistencia a la cicloheximida).

Todas las levaduras fueron sometidas al auxanograma (asimilación de carbohidratos y algunos compuestos nitrogenados) mediante el sistema Vitek[®] (ver anexo). Los resultados de esas pruebas fueron registrados.

21 Métodos de identificación.

Para concluir la identificación final, según cada una de las pruebas desarrolladas, los resultados de todas ellas, se agruparon en cuatro rubros principales: 1) Cromógeno producido, 2) Pruebas bioquímicas y fisiológicas tradicionales (reducción del sulfito de bismuto, ausencia de ureasas, producción de seudiohifas, hifas y clamidoconidios, filamentación, termotolerancia y resistencia a la cicloheximida), 3) Auxanograma automatizado VITEK. Cada uno de estos grupos de pruebas orientó a la identificación de una especie o conjunto de especies.

Para el grupo con mayor número de pruebas, el de las técnicas tradicionales, los resultados obtenidos se compararon con la información mostrada en Mycology online (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>).

21.2 Análisis molecular.

21.2.1 Extracción de ADN.

Cada una de las levaduras a identificar, se creció en 25 ml. de medio líquido YEPD (ver anexo) estéril por 24 a 48 horas a 37°C y en agitación a 150 rpm. Se cosecharon las células centrifugando a 12000 rpm por 5 min. Las levaduras se dividieron en dos partes: 1) Se conservó un paquete celular con glicerol al 50% 2) A partir de las levaduras restantes, se extrajo el ADN mediante el método de fenol/cloroformo.

Las células fueron lavadas y en seguida rotas químicamente, mediante una solución de lisis (ver anexo) y solución de fenol-cloroformo-isoamílico 24:41:1. Se incubó a 65 °C por una hora, para posteriormente agregar 200 µl de Tris-EDTA (TE) (ver anexo). Se centrifugó y se obtuvo la fase acuosa en otro tubo limpio. Se precipitó el ADN con etanol absoluto, mezclando suavemente por inversión y se dejó reposar 20 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugó 5 min a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN obtenida, se dejó secar. Se agregaron 400 µl de TE y 1µl de RNAsa (10µg/ml), dejándose incubar por 30 minutos a 37 °C. Se añadieron 10 µl de acetato de amonio 4M (ver anexo) y 1ml de etanol absoluto, mezclando por inversión. Se dejó reposar 20 min a -20°C. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm, se dejó secar el pellet y el ADN se resuspendió en 30 µl de agua inyectable y almacenado a -4°C.

21.2.2 PCR.

Se amplificó parte de la subunidad grande (26S) del ARN ribosomal, el dominio D1: FEP (CATATCAATAAGCGGAGCAAAAAG) y dominio D2: REP (GCTCTTGAAACACGGAGC) (Fell, 2000 y Sandoval, 2008), utilizando la siguiente mezcla estandarizada:

Reactivo	Volumen
H ₂ O	15.4 µl
Regulador 10X PCR	2 µl
MgCl ₂ (50mM)	1.5 µl
dNTPs	2 µl
FEP (1:10)	1 µl
REP (1:10)	1 µl
Taq	0.1 µl
ADN	2 µl

Para la amplificación, se utilizaron las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
94	5
94	1
59	1
72	2
72	10
4	A

21.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para poder visualizar la calidad del ADN y el resultado de la amplificación se hizo un gel de agarosa al 1% (w/v) en regulador (TAE) 1X (ver anexo). El gel se cubrió con el regulador y se cargaron 3 µl de cada muestra del amplificado previamente mezclada con 1 µL del buffer de carga. Como marcador, fue utilizado el

correspondiente a 100 000 pb. Se utilizó una corriente de 90 volts por aproximadamente 40 min. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (1 µg/ml) por 20 minutos. El gel fue observado bajo luz ultravioleta y se digitalizó en un documentador de imágenes Eagle Eye (Stratagene).

21.2.4 Secuenciación.

El ADN amplificado de cada una de las muestras se purificó, utilizando el kit comercial "DNA Clean and Concentrator-5™" (Zymo Research Corp.) siguiendo las instrucciones de fabricante. Posteriormente los productos purificados fueron enviados al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM para su secuenciación.

21.2.5 Análisis de las secuencias.

Se verificó cada uno de los electroferogramas de las secuencias obtenidas, y para la alineación y comparación de las mismas, fue utilizado el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con el fin de encontrar las secuencias que en la base de datos (GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tenían mayor parecido a las secuencias problema.

Por medio del programa CLUSTAL X versión 1.83 las secuencias problema se alinearon con las obtenidas en el BLASTn, y la edición de las mismas se realizó mediante el programa Seaview.

22 Correlación.

La información referente a las personas encuestadas, lugares muestreados, tipo de muestras y pruebas de identificación, se registraron en hojas de cálculo SPSS® versión 15.0 y EXCELL®.

VII. RESULTADOS

23 Datos clínicos y demográficos.

El Cuadro 1 muestra los datos obtenidos de los expedientes clínicos de los tres "pacientes iniciales". Se observa un predominio del sexo femenino y son pacientes cuyo promedio de edad es de 73 años. Todos tenían algún factor de inmunocompromiso y recibieron un tratamiento antimicótico con azoles, dos de ellos con resultado fatal (asociados a *C. glabrata*) y una con buena respuesta a la terapia y sobreviviente (asociada a *C. tropicalis*).

24 Muestreo.

En total fueron tomadas 138 muestras (cuadro 2), 45 (33%) obtenidas de superficies inertes y 93 (67%) a partir de productos biológicos (Fig. 1).

Sólo en 26 muestras se observó crecimiento levaduriforme, 24 de las cuales pertenecieron al grupo de muestras biológicas y sólo dos a las inertes, resultados estadísticamente significativo ($\chi^2=10.547$ $p= 0.001$) (Fig. 2 y foto 2).

Debido al proceso de purificación, de las 26 colonias obtenidas en el aislamiento primario, el número total de aislados, se incrementó a 37 (cuadro 3 y fotos 3 y 4).

Los 37 aislados purificados más los tres aislados obtenidos de los tres pacientes iniciales, pacientes problema, nos dieron un total de 40 aislados. Ellos fueron identificados como levaduras pertenecientes al género *Candida* por pruebas morfológicas (foto 5) y tradicionales (fotos 6, 7, 10, 11 y 12).

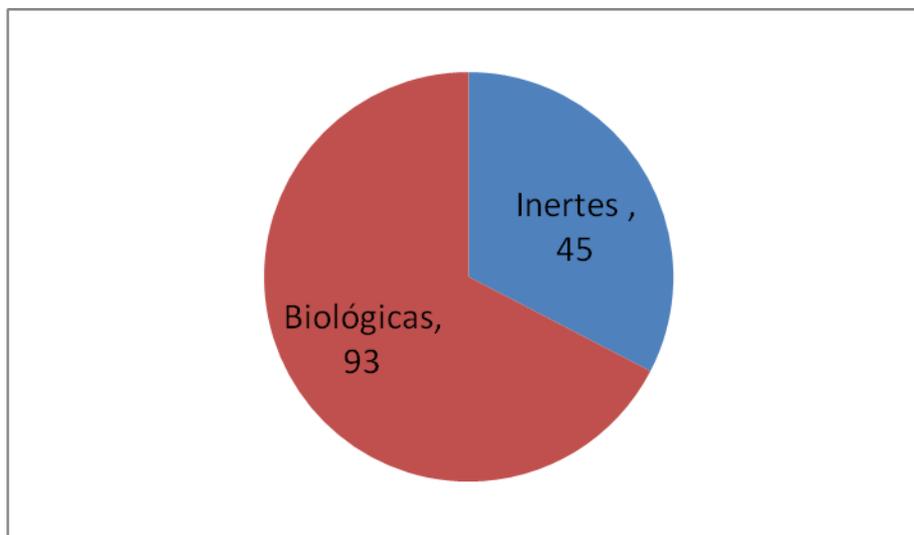
Es relevante el hecho de que más de la mitad de los aislados pertenecieron a ocho especies de *Candida* diferentes a *albicans* y además, se identificó un aislado, debido al muestreo, como *Saccharomyces cerevisiae*. La figura 3, muestra la frecuencia de aparición de cada una de las especies identificadas del muestreo y "pacientes iniciales".

Cuadro 1. Datos clínicos y demográficos de los pacientes problema.

Paciente	1	2	3
Edad (años)	82	52	85
Género	Masculino	Femenino	Femenino
Enfermedad de base	<i>Diabetes mellitus</i>	<i>Diabetes mellitus</i>	Cáncer
Motivo de hospitalización	Insuficiencia renal	Cambio de catéter cardiaco	Lesión en una articulación
Producto biológico	Líquido de lavado bronquial	Líquido de lavado bronquial	Líquido de lavado bronquial
Tratamientos antimicóticos	Fluconazol	Fluconazol y Voriconazol	Fluconazol
Identificación Inicial	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
Días de hospitalización	8	40	Desconocido*
Evolución de la infección	Falleció	Falleció	Viva

*Se desconoce el dato, ya que el paciente presentó mejoría y fue trasladado a otra área de hospitalización.

Figura 1. Proporción de muestras de origen biológico vs. origen inerte, en un total de 138 muestras colectadas.



Cuadro 2. Número de muestras con crecimiento levaduriforme y su procedencia.

Tipo de muestras	División de muestras		Número de muestras	Muestras con <i>Candida</i> spp.
Biológicas	Pacientes*	exudado	1	1
		piel ***	10	2
		Orina	2	0
	Personal	manos	39	5
		exudado	41	16
Inertes	Superficies**		11	1
	Aire Ambiente		34	1
Total			138	26

$\chi^2=10.547$ (p 0.001)

*Se refiere a aquellos pacientes hospitalizados, presentes en el momento del muestreo y que voluntariamente se integraron a la encuesta.

**Correspondientes a: Barandal de cama, quicio de ventana, mesa empotrada a la cama, mesa Pasteur auxiliar de enfermería con soluciones, caja para colocar material de curación, superficie exterior de frasco de solución parenteral en uso, punta de aspiración de secreciones en uso, tubo de cabecera donde se colocan las puntas de aspiración, dos trampas de filtro y humidificador.

***Se refiere al raspado de la piel tomado de manos y la aledaña a catéter o sondas.

Figura 2. Distribución de los 26 aislamientos levaduriformes en las muestras de origen biológico e inerte.

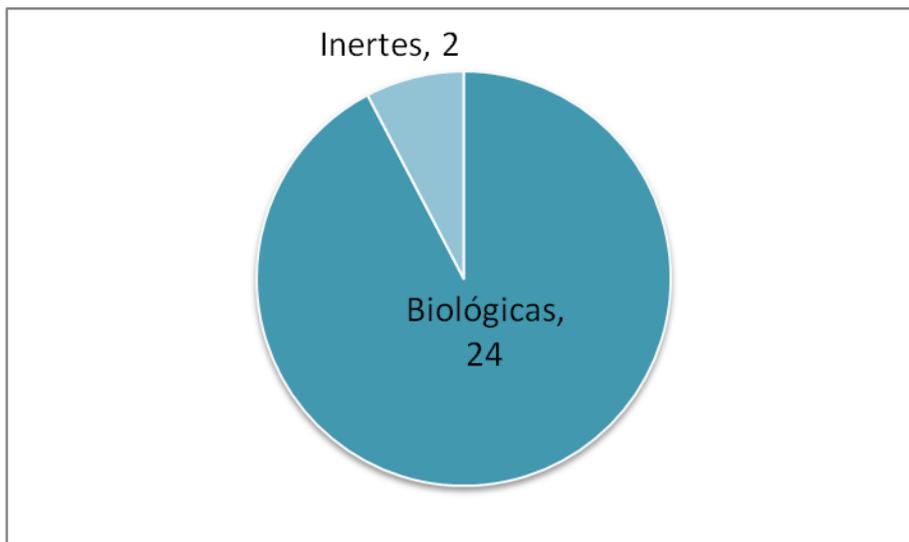


Foto 2. Primo-aislamientos a partir de aire-ambiente. Se observa abundante crecimiento de hongos filamentosos y algunas colonias bacterianas, por el contrario, pocas levaduras.



Cuadro 3. Distribución de 37 UFC* en los ambientes muestreados.

	Tipo de muestra	No. de muestras con crecimiento	Total de UFC levaduriformes Purificadas
BIOLÓGICAS	PACIENTES	3	5
	PERSONAL	21	30
INERTES	AIRE - AMBIENTE	1	1
	SUPERFICIES	1	1
Total		26	37

*UFC = Unidad formadora de colônia

Foto 3. Morfología macroscópica de dos colonias purificadas a partir del primoaislamiento.

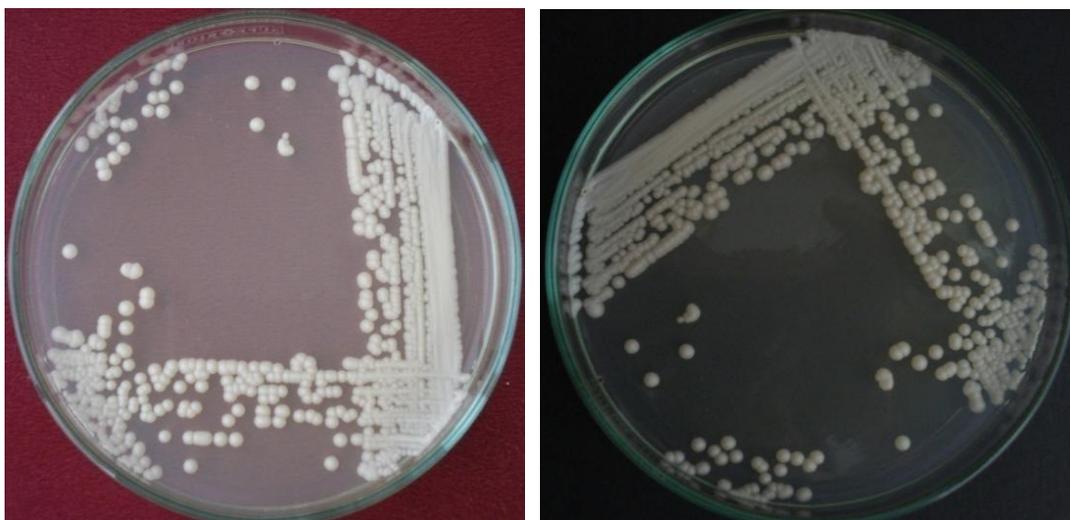


Foto 4. Colonias redondas, blanco-amarillentas de consistencia cremosa, con bordes completos de poca elevación, características de levaduras del género *Candida* spp.

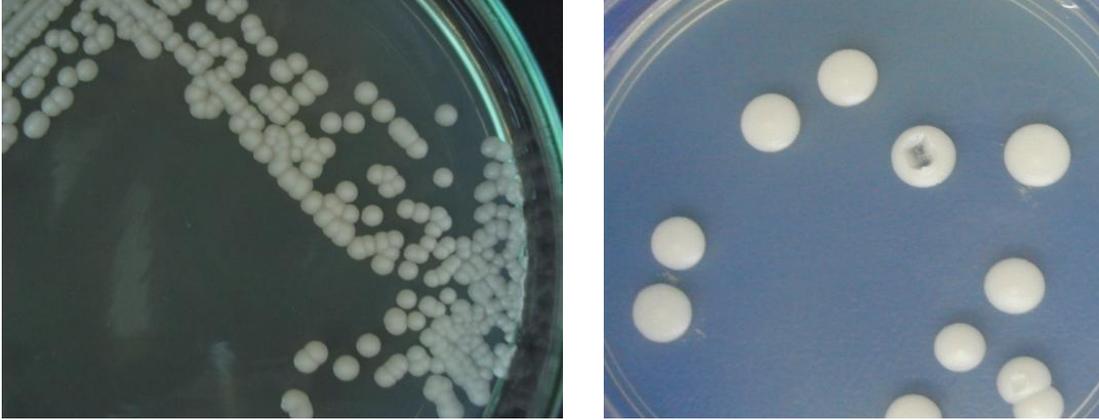
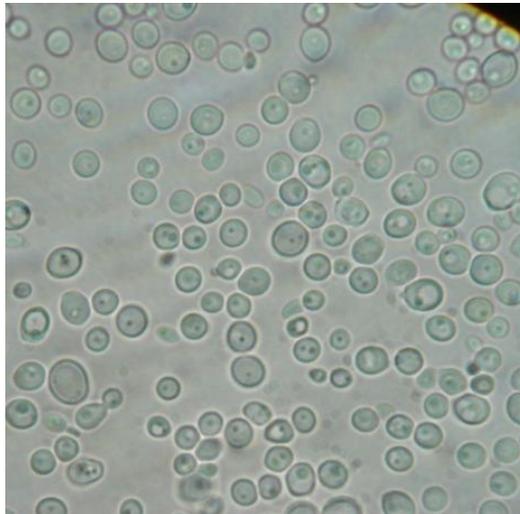


Foto 5. Estudio de la morfología colonial microscópica (40x). Se observan múltiples levaduras ovoides.



25 Identificación.

La reducción del sulfito de bismuto en el medio BIGGY (foto 6) y la ausencia de ureasas en el medio de Christensen (foto 7), fueron pruebas que confirmaron la identificación de género, es decir, los 37 aislados obtenidos se corroboraron como *Candida* spp.

Siguiendo las instrucciones del fabricante de *Candida* ID2[®], desafortunadamente, sólo pudo diferenciarse de manera certera a *C. albicans* con la presencia de azul cobalto (foto 9). Para el resto de las especies de *Candida*, la identificación no fue determinante (foto 8).

Consecuentemente, se tuvieron que efectuar otras pruebas.

La primera de ellas fue la siembra en suero humano para observar la presencia del tubo germinativo, característica distintiva de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (foto 10). El cultivo en agar harina de maíz se empleó para distinguir a las especies productoras de clamidoconidios *C. albicans* y *C. dubliniensis*, de las que únicamente producen blastoconidios, como *Candida glabrata*, y del resto de las especies que producenseudomicelio (foto 11).

Con el fin de discernir entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (muy similares fenotípicamente), se empleó el medio Níger para que a través de la observación de la disposición de los clamidoconidios producidos (foto 12), pudiera discriminarse a cada una de las especies. Ninguno de los aislados se identificó como *Candida dubliniensis*.

El sistema de auxanograma automatizado VITEK[®], garantiza rapidez en la identificación así como resultados más confiables que los de las técnicas manuales (foto 13), así que partiendo de ese principio y a partir de múltiples purificaciones, pudieron obtenerse las identificaciones mostradas en el cuadro 4.

Foto 6. Cultivo en agar BIGGY. A) Colonias de color gris oscuro, correspondientes al control negativo. B) Colonia color marrón característica del género *Candida*.

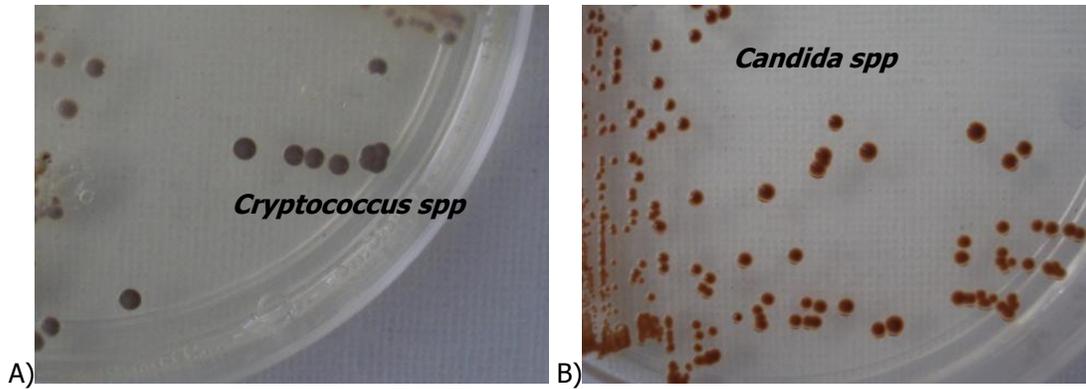


Foto 7. Cultivo en urea de Christensen. A) Prueba negativa (ausencia de ureasas) y control positivo con *Cryptococcus neoformans*. B) Pruebas: positiva, negativa e hidrólisis intermedia.



Foto 8. Medio de cultivo cromógeno: Candida ID2®. A) Colores característicos dependiendo de la especie de *Candida* que se trate. B) Inhibición del crecimiento por componentes de dicho medio.

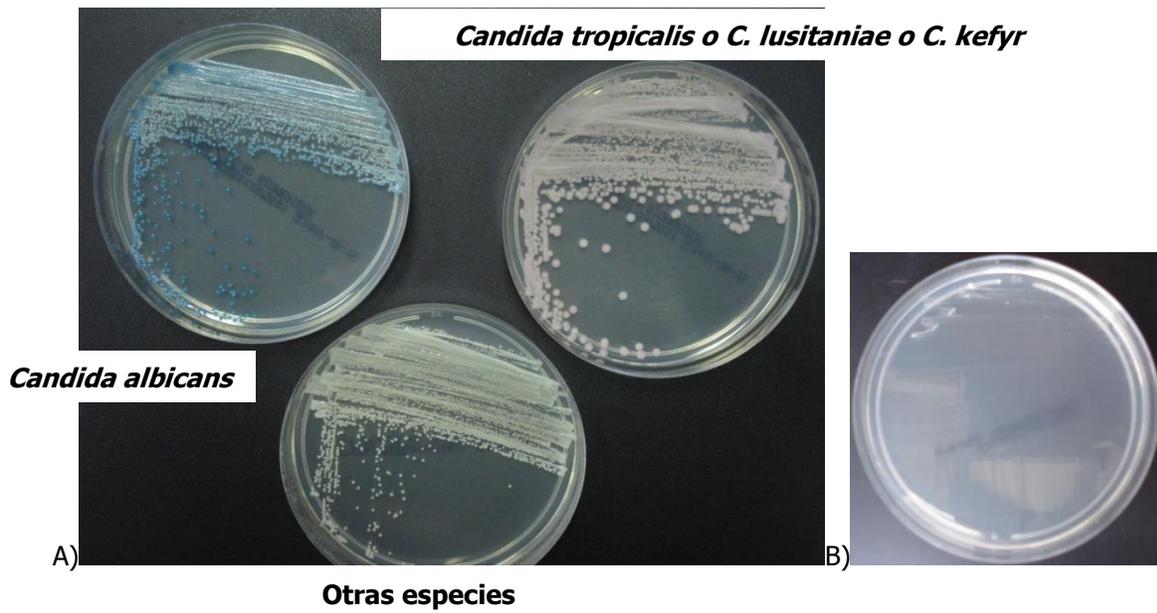


Foto 9. Medio de cultivo cromógeno: Candida ID2®. Colonias con pigmento y morfología uniforme.

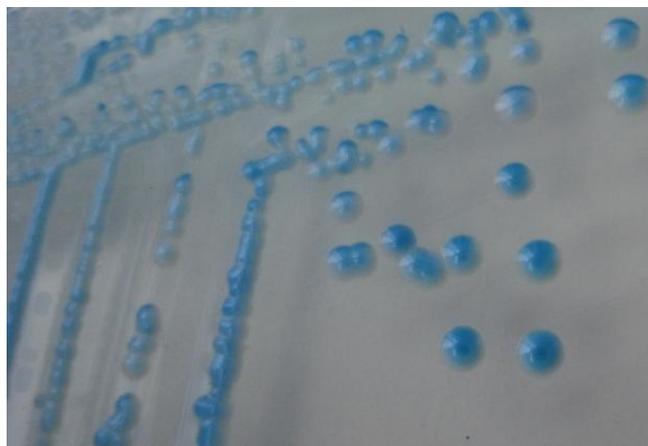


Foto 10. Incubación por 2h a 37°C en suero humano. Vista microscópica (40x) de la filamentación de *Candida* en suero humano. **A)** Presencia de tubo germinativo (característico de *C. albicans* y *C. dubliniensis*). **B)** El resultado negativo de la prueba, identifica a otras especies de *Candida*.

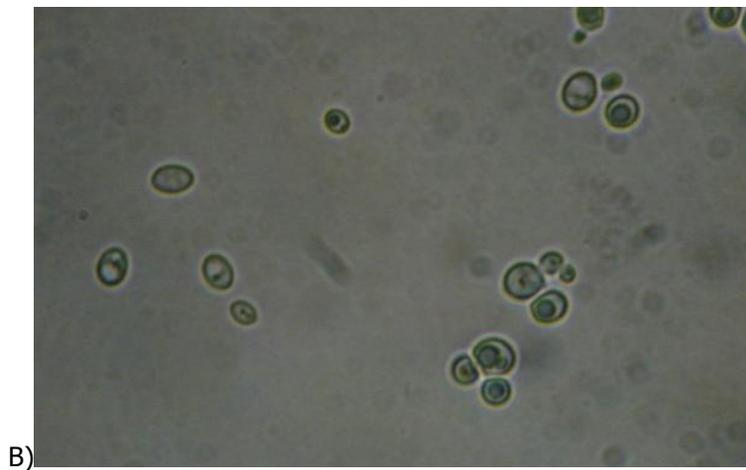
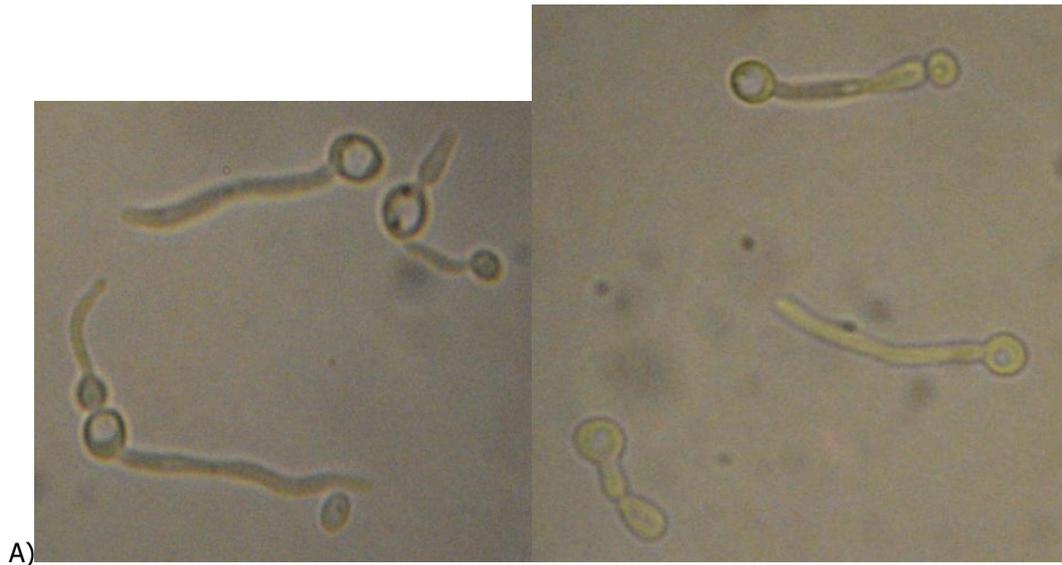


Foto 11. Cultivo en agar harina de maíz con tween 80. A) Vista microscópica a 40x mostrando hifas verdaderas y clamidoconidios, estructuras que identifican a *C. albicans* y *C. dubliniensis*. B) Ausencia de seudomicelio, desarrollo exclusivo de levaduras y blastoconios, característica de *C. glabrata* y C) Presencia de seudomicelio, blastoconidios y levaduras, morfología perteneciente a otras especies de *Candida*.

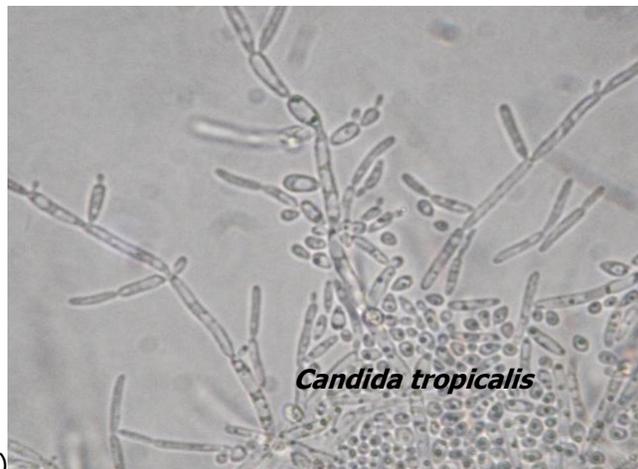
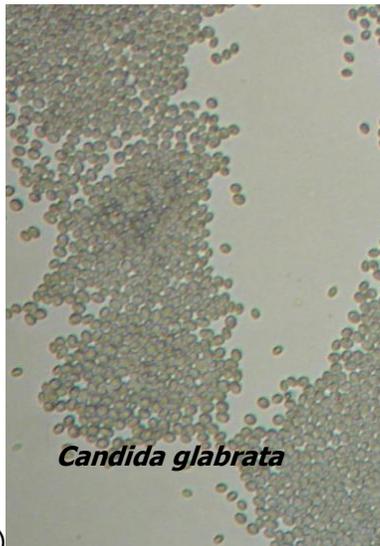
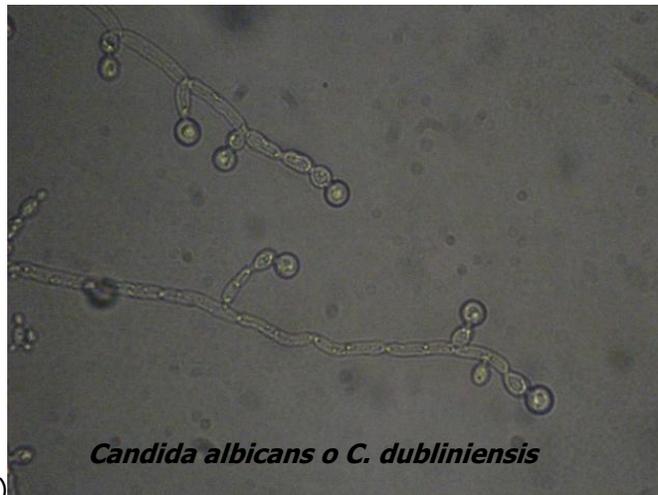


Foto 12. Disposición de clamidoconidios en Agar Níger. A) Clamidoconidios dispuestos de manera terminal y únicos, característicos de *C. albicans*. B) Clamidoconidios dobles o en racimo de *C. dubliniensis*.

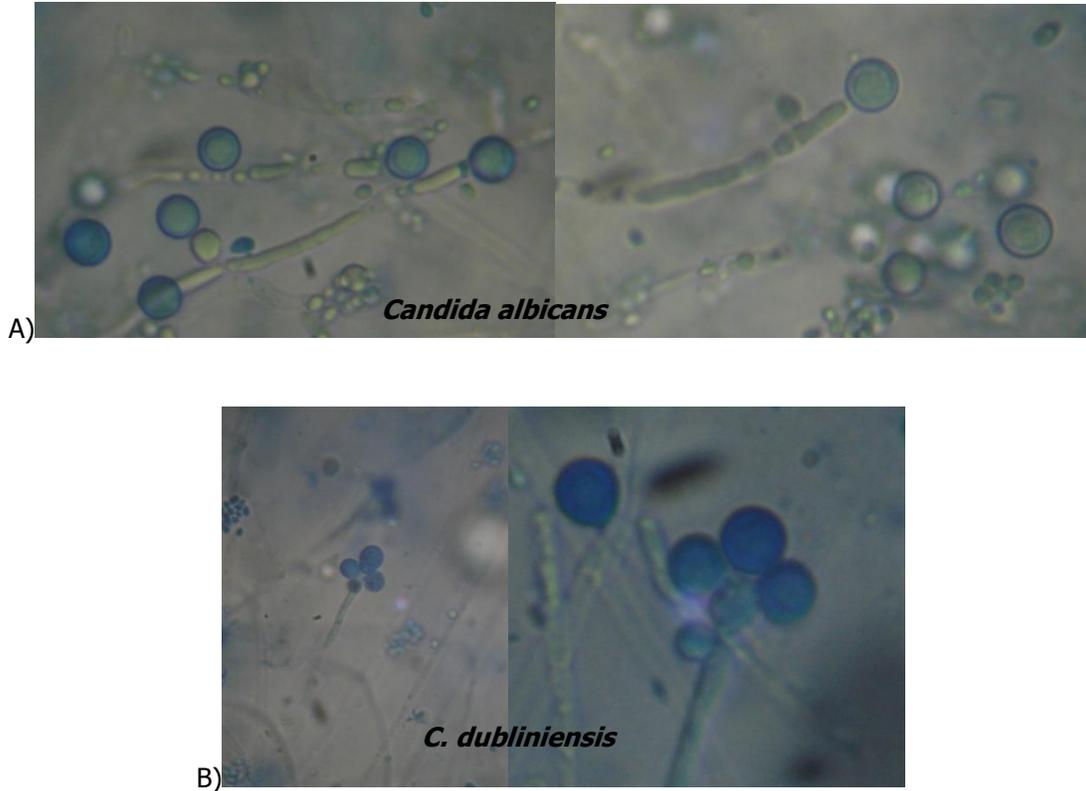
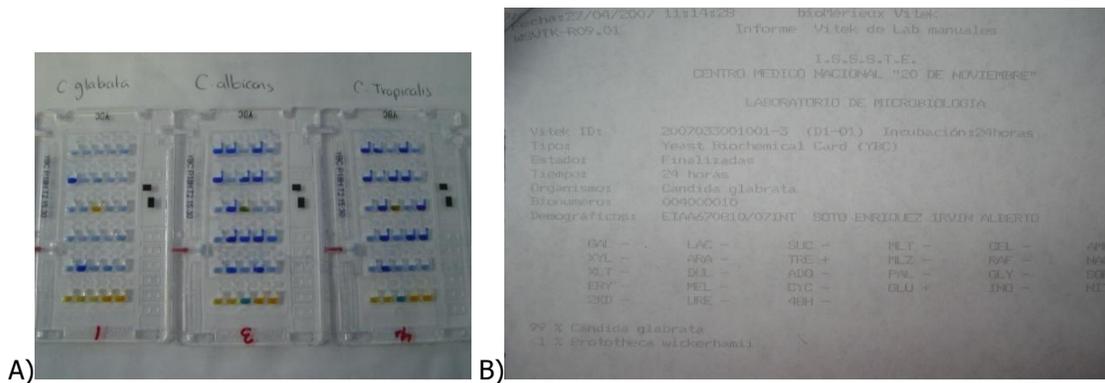


Foto 13. A) La imagen muestra las tarjetas con los sustratos para asimilar. B) Ejemplo del perfil bioquímico, veredicto y porcentaje de probabilidad de especie que es dada por el equipo.



Con respecto al análisis molecular, se obtuvo el ADN de las 37 aislados derivados del muestreo y el de los tres "pacientes iniciales". En la foto 14, se observa la imagen del gel en el que se aprecian los purificados de la amplificación obtenida mediante los oligos FEP y REP, de algunas de las cepas estudiadas.

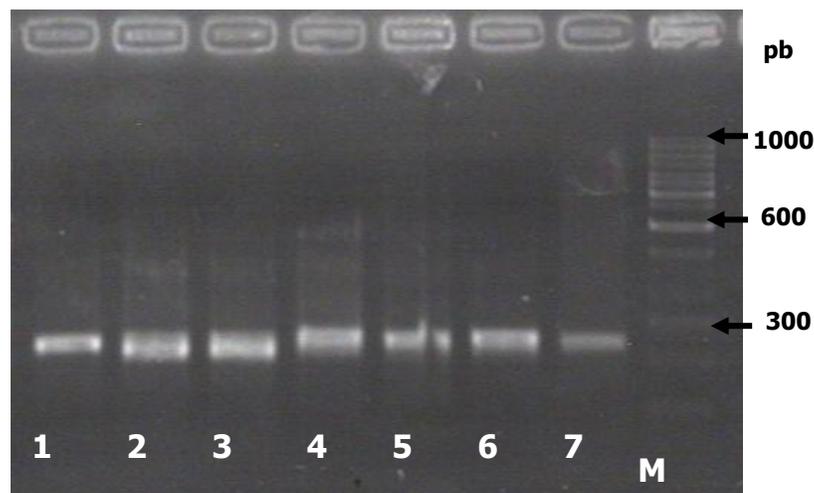
Desafortunadamente, de los 37 amplificados, sólo se obtuvieron las secuencias de 33 aislados (cuadro 4).

Es relevante el hecho de que más de la mitad de los aislados pertenecieron a ocho especies de *Candida* diferentes a *albicans* y además, se identificó un aislado, debido al muestreo, como *Saccharomyces cerevisiae*. La figura 3, muestra la frecuencia de aparición de cada una de las especies identificadas del muestreo y "pacientes iniciales".

25.1 Identificación molecular de los "pacientes iniciales"

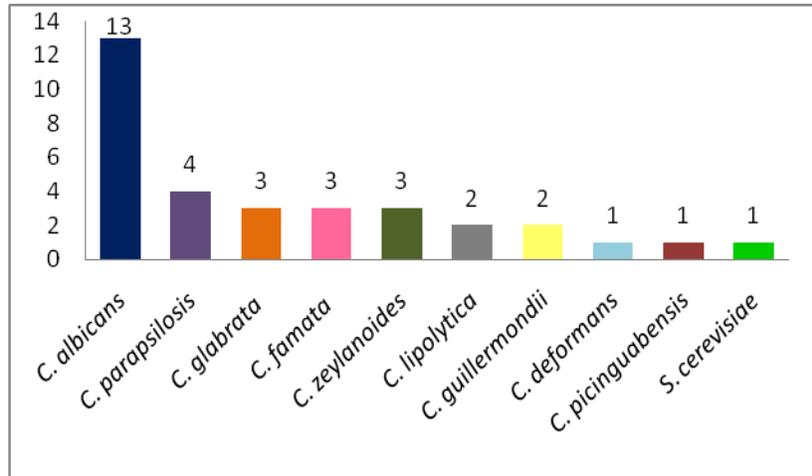
Inicialmente, el laboratorio del Hospital identificó a *C. glabrata* en líquido de lavado bronquial de los pacientes 1, 2. Sin embargo, al hacer la identificación molecular, se determinó que la especie del paciente 1 no correspondía a *C. glabrata*, sino a *S. cerevisiae*. (Cuadro 4, núm. 38*, 39* y 40*). Por otro lado, en el caso de los pacientes 2 y 3 se corroboró la identificación como *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

Foto 14. Amplificados de REP y FEP de 7 aislados.



1-7 aislados del muestreo; pb: pares de bases; M: marcador de 1000pb.

Fig. 3. Especies del género *Candida* encontradas en el muestreo de la UCIA.



Cuadro 4. Resumen de especies del género *Candida* determinadas por las pruebas de identificación.

NÚM.	CROMÓGENO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS TRADICIONALES	AUXANOGRAMA (% probabilidad)	TÉCNICAS MOLECULARES (% identidad)	Aislada de:
1	No creció	<i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. parapsilosis</i> (99)	<i>C. parapsilosis</i> (100)	Aire Ambiente
2	No creció	<i>C. famata</i>	No identificó	<i>C. famata</i> (99)	Manos
3	No creció	<i>C. krusei</i>	No identificó	<i>C. deformans</i> (99)	Manos
4	<i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. lipolytica</i> (99)	<i>C. lipolytica</i> (98)	Manos
5	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. kefyr</i> <i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. famata</i> (80)	<i>C. guilliermondii</i> (99)	Manos

6	<i>C. tropicalis</i> , <i>C. kefyi</i> <i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. guillermundii</i> (88)	<i>C. guillermundii</i> (99)	Manos
7	<i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. parapsilosis</i> (97)	<i>C. parapsilosis</i> (99)	Manos
8	No creció	<i>C. zeylanoides</i> , <i>C. kefyi</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. zeylanoides</i> (99)	<i>C. zeylanoides</i> (99)	Manos
9	No creció	<i>C. kefyi</i>	<i>C. zeylanoides</i> (99)	<i>C. zeylanoides</i> (100)	Manos
10	No creció	<i>C. glabrata</i> <i>C. famata</i>	<i>C. krusei</i> (61)	<i>C. famata</i> (100)	Exudado faríngeo
11	No creció	<i>C. glabrata</i> <i>C. famata</i>	<i>S. cerevisiae</i> (90)	<i>C. famata</i> (82)	Exudado faríngeo
12	<i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. guillermundii</i> <i>C. kefyi</i>	<i>C. lipolytica</i> (99)	<i>C. lipolytica</i> (95)	Exudado faríngeo
13	<i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lipolytica</i> ,	<i>C. lusitaniae</i> , <i>C. parapsilosis</i> ,	<i>C. tropicalis</i> (99)	<i>C. parapsilosis</i> (100)	

	<i>C. krusei</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>			Exudado faríngeo
14	<i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. zeylanoides</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. tropicalis</i> (55)	<i>C. pincinguabensis</i> (100)	Exudado faríngeo
15	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
16	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (100)	Exudado faríngeo
17	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
18	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (92)	No determinada	Exudado faríngeo
19	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (93)	Exudado faríngeo
20	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	No determinada	Exudado faríngeo
21	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
22	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (100)	Exudado faríngeo

23	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
24	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (100)	Exudado faríngeo
25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
26	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
27	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	No determinada	Exudado faríngeo
28	<i>C. glabrata, C. dubliniensis, C. parapsilosis, C. lipolytica, C. krusei, C. famata, C. zeylanoides</i>	<i>C. zeylanoides, S. cerevisiae</i>	<i>C. lambica</i> (99)	<i>C. glabrata</i> (77)	Exudado faríngeo
29	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (100)	Exudado faríngeo
30	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo
31	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. zeylanoides</i> (100)	Exudado faríngeo
32	<i>C. glabrata, C. dubliniensis, C. parapsilosis, C. lipolytica, C. krusei,</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (87)	No determinada	Humidificador

	<i>C. famata,</i> <i>C. zeylanoides</i>				
33	<i>C. glabrata, C. dubliniensis,</i> <i>C. parapsilosis,</i> <i>C. lipolytica,</i> <i>C. krusei,</i> <i>C. famata,</i> <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i> ⋄⋄⋄	<i>S. cerevisiae</i> (85)	Sonda nasogástrica
34	<i>C. glabrata, C. dubliniensis,</i> <i>C. parapsilosis, C. lipolytica,</i> <i>C. krusei,</i> <i>C. famata,</i> <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> (99)	<i>C. parapsilosis</i> (100)	Catéter
35	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> (99)	<i>C. albicans</i> (99)	Exudado faríngeo de paciente
36	<i>C. glabrata, C. dubliniensis,</i> <i>C. parapsilosis, C. lipolytica,</i> <i>C. krusei,</i> <i>C. famata,</i> <i>C. zeylanoides</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (99)	<i>C. glabrata</i> (100)	Exudado faríngeo de paciente
37	<i>C. glabrata, C. dubliniensis,</i> <i>C. parapsilosis, C. lipolytica,</i> <i>C. krusei,</i> <i>C. famata,</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (99)	<i>C. glabrata</i> (100)	Exudado faríngeo de paciente

	<i>C. zeylanoides</i>				
38*	<i>C. glabrata, C. dubliniensis, C. parapsilosis, C. lipolytica, C. krusei, C. famata, C. zeylanoides</i>	<i>C. glabrata C. famata S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> (99)	<i>S. cerevisiae</i> (100)	Líquido de lavado bronquial
39*	<i>C. glabrata, C. dubliniensis, C. parapsilosis, C. lipolytica, C. krusei, C. famata, C. zeylanoides</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i> (99)	<i>C. glabrata</i> (100)	Líquido de lavado bronquial
40*	<i>C. tropicalis, C. kefir C. lusitaniae</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i> (99)	<i>C. tropicalis</i> (98)	Líquido de lavado bronquial

* Datos correspondientes a los "pacientes iniciales"

VIII. DISCUSIÓN.

Los tres pacientes con diagnóstico de candidosis y con quienes se inició este estudio, cumplían con factores que favorecieron la infección. Lo interesante de estos casos, es 1) Presentan el aislamiento de especies diferentes a *C. albicans*, lo que apoya la tendencia ascendente de las especies *Candida* no *albicans* que se ha venido registrando en algunos estudios desde finales de los 90s (Fridkin y Jarvis, 1996; Vázquez, 1998; Calderone, 2002); 2) La identificación de *C. glabrata* y la muerte de los pacientes en quienes se aisló, son factores íntimamente asociados al desconocimiento de la resistencia de la levadura a los antifúngicos de origen azólico (Castaño, 2004); 3) La identificación de *C. tropicalis*, a partir de una mujer adulta de 85 años, es interesante ya que el aislamiento de esa especie de *Candida* generalmente se asocia a pacientes pediátricos (Sánchez, 2004).

Del muestreo efectuado, el crecimiento de *Candida* spp., se observó predominantemente mayor, en las muestras biológicas (piel y mucosas); lo cual seguramente está relacionado con: 1) El papel biológico natural de las levaduras como comensales en el humano y 2) Los adecuados métodos de limpieza y desinfección llevados a cabo en el hospital para sanitizar las superficies de contacto del mobiliario y en consecuencia, el aire ambiente.

De los 37 aislados de *Candida*, 30 de ellos fueron obtenidos a partir de los exudados faríngeos y raspados de manos del personal a cargo de los pacientes en la UCI. Si tomamos en cuenta que en muchos casos, la persona a muestrear acudía a lavarse las manos justo en el momento en que se le avisaba que se le iba a tomar una muestra, se puede deducir que la cantidad de aislamientos hubiera sido mayor, si no se hubiera avisado del procedimiento. Lo anterior reafirma el conocimiento de que las manos son el vehículo más común para transmitir infecciones; por lo que es imprescindible que todo el personal de salud entienda la importancia de lavarse las manos, antes y después de cada actividad y no necesariamente cuando se conozca que será un sujeto de muestreo.

El cultivo en el sistema cromógeno *Candida* ID2[®], según el fabricante (Biomerieux), es recomendado para la identificación específica de las levaduras problema; sin embargo, la experiencia en este estudio permite comentar que este tipo de alternativa cromógena: 1) Exclusivamente identifica de manera certera a *Candida albicans*, para el resto de las especies el método es sólo orientador y 2) Desafortunadamente, los componentes que integran al medio de cultivo, resultaron inhibidores del crecimiento de algunos aislados, lo que impidió identificarlos.

El carácter menos útil para la identificación de las levaduras de *Candida* spp., es la morfología colonial macroscópica observada en los medios de Sabouraud y en agar BIGGY, pues en ambos la aparición de morfologías diferentes no implican, necesariamente, diferentes especies, además de que morfologías iguales pueden estar asociadas a diferentes especies.; sin embargo, las morfologías microscópicas del cultivo de las levaduras en suero humano y en agar harina de maíz, ratifican la utilidad de estas técnicas en la diferenciación de algunas especies, aunado a la facilidad de ejecución y bajo costo de los insumos. Consecuentemente, se recomienda el uso de agar BIGGY que, al igual que el agar de Christensen, funciona más como prueba bioquímica identificadora del género *Candida*, que como una herramienta morfológicamente útil.

En nuestro estudio, enfatizamos la importancia de combinar los resultados del agar BIGGY y el agar de Christensen como técnicas orientadoras a nivel de género, pues en el caso de confusión por hidrólisis "parcial" de la urea en Christensen, entonces la reducción del sulfito de bismuto en BIGGY nos daría la identificación del género; o en su caso, la presencia de pigmentos ocre no bien definidos en BIGGY, pero la presencia de hidrólisis de urea positiva, disminuye la proporción del error, aumentando la confiabilidad en la identificación.

Para identificar especies diferentes a *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. glabrata*, resultó una tarea difícil, ya que existen gran cantidad de listas y bases de datos físicas y electrónicas que, dependiendo del autor, se incluyen diversos parámetros y en aquellos en que se valoran las mismas características, los resultados no concuerdan, además de que para muchas especies los parámetros evaluados son ambivalentes; todo ello confunde y evita tomar una decisión en la identificación. Es en éstos casos en donde la tecnología VITEK® da un apoyo fundamental.

El auxanograma automatizado VITEK® permitió la identificación de las levaduras en 36 de 40 aislados, sólo a partir de una escrupulosa purificación de los microorganismos; dos aislados nunca pudieron crecer durante la incubación (se hicieron tres intentos) y en los otros dos, el equipo no pudo discernir la identificación entre dos o tres especies, a pesar del cultivo monospórico. Esta situación nos muestra la eficiencia del método, pues la gran mayoría de las levaduras se identificaron; sin embargo, desde el punto de vista cualitativo queda la desconfianza acerca de si la etiología de las levaduras no identificadas correspondería a alguna de las especies resistentes a antifúngicos.

Con la técnica molecular, la identificación obtenida con los métodos tradicionales fue corroborada. Por otra parte, en aquellos casos en que la identificación con pruebas bioquímicas tradicionales se dificultó, se justificó ampliamente el uso de la herramienta molecular.

Consideramos importante enfatizar la importancia y utilidad de la técnica molecular como una excelente herramienta en la determinación de la especie. Si no se cuenta con la manufactura, de insumos y personal capacitado, es bueno apoyarse en dichas técnicas "caseras", y de acuerdo a nuestra experiencia es importante contemplar más de uno de los 3 métodos utilizados (cromógeno, pruebas bioquímicas y/o auxanograma VITEK®) para tener más elementos que ayuden a que la identificación sea lo más verás posible.

Independientemente del método de análisis, este estudio confirma de nuevo la indiscutible y predominante presencia de *C. albicans*, lo que a su vez está en íntima relación con el papel biológico de la levadura como comensal ya que la mayor parte de los cultivos fueron obtenidos de exudados faríngeos de personal aparentemente sano.

C. glabrata se aisló de tres exudados faríngeos, uno de personal y dos de pacientes hospitalizado al momento del muestreo. Este hallazgo cobra importancia epidemiológica debido a la resistencia innata de esta especie hacia los azoles, grupo de antifúngicos profilácticos por elección en el hospital. El aislamiento de ese agente en una UCI, alerta al personal médico y para-médico, para fortalecer las medidas preventivas de higiene ya que en dicha área se encuentran pacientes idóneos, con alta probabilidad de contraer una candidiasis sistémica y cuya situación se complicaría en extremo, si el agente causal fuera *C. glabrata*.

En este estudio *C. parapsilosis*, ocupó el segundo lugar en frecuencia después de *C. albicans*, fue la única especie recuperada de aire-ambiente, lo que evidencia su presencia en los cuartos de hospitalización, hecho que cobra relevancia epidemiológica. Está documentado que *C. parapsilosis* afecta principalmente a pacientes hospitalizados y en especial a los que se encuentran en UCI's (Kuhn *et al.*, 2004). Con estos antecedentes, es muy recomendable sistematizar métodos de muestreo que evalúen periódicamente, la calidad del aire en las UCI's.

La identificación de *C. glabrata* a partir de los productos biológicos de un "paciente inical", fue reemplazada por la genotipificación como *Saccharomyces cerevisiae*. En la literatura especializada cada vez se encuentran con mayor frecuencia casos de infección por *S. cerevisiae* (Tawfik *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 2002 y Cassone *et al.*, 2003), además de que el estudio de esta levadura ha revelado la presencia de características biológicas que están íntimamente relacionadas como factores de virulencia. En nuestro estudio este descubrimiento además es interesante pues aparentemente esa levadura presentaba resistencia a los antifúngicos de origen azólico.

Filogenéticamente *S. cerevisiae* está muy emparentada con *C. glabrata* (Villanueva y Arenas, 2007), por lo que si se utilizan métodos convencionales para la identificación, incluyendo al VITEK[®], pueden fácilmente ser confundidas.

Una prueba tradicional que podría discriminar a las dos especies, sería la siembra de las levaduras en medios que propicien la producción de ascosporas.

Sin embargo hay que enfatizar la importancia de determinar la especie de manera certera, para tener un éxito en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente. Y así, directamente contribuir al objetivo de los nosocomios (mejoría y convalecencia del paciente), así como indirectamente repercutiría a nivel epidemiológico y financiero del mismo nosocomio.

Se aislaron dos especies de *Candida* no relacionadas como comensales o causantes de infección en animales: *C. pinguabensis* y *C. deformans*. La primera especie está relacionada con plantas de la familia Heliconiaceae (pertenecientes a bosques mesófilos) (Morais *et al.*, 2006) y la segunda, inicialmente sinónimo de *Yarrowia lipolytica* (Bigey *et al.*, 2003), es usada en biotecnología pues produce una lipasa extracelular que cataliza la producción de ésteres por esterificación de ácidos grasos libres en presencia de altas concentraciones de agua (Bigey *et al.*, 2003). Se corroborarán las identificaciones de estas especies, secuenciando nuevamente los fragmentos amplificados y otros productos obtenidos del análisis de regiones genómicas más conservadas, como por ejemplo: regiones inter-transcripcionales (ITS) o intergénicas (IGS).

XI CONCLUSIONES.

El presente trabajo enfatiza la importancia de las levaduras como productoras de enfermedad en pacientes hospitalizados, pues reporta el aislamiento de *Candida* spp., y *S. cerevisiae* a partir de infección sistémica presentada en tres pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos del CMN 20 de noviembre, ISSSTE.

Se destaca la identificación de *C. glabrata* en el ambiente hospitalario, ya que por su resistencia innata a los azoles, la implica como un agente viable de candidemias, sobretodo en pacientes inmunodeficientes en quienes la infección tiene mal pronóstico.

El aislamiento de *Candida glabrata* a partir de exudados faríngeos del personal y de pacientes hospitalizados, podría orientarnos hacia las potenciales fuentes extrínsecas de infección; sin embargo, debido a la naturaleza comensal-endógena de *Candida* spp., y a la situación inmunológica de los "pacientes iniciales" diagnosticados con candidemia, permanece incierto el definir a los agentes como causantes directos de infección nosocomial.

Los casos clínicos en donde fueron aisladas *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Saccharomyces cerevisiae*, cada una de esas situaciones prevalentes, son consideradas como brotes.

Debido a la baja proporción de aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de las superficies inertes y del aire ambiente que están en contacto con los pacientes, se estima una baja probabilidad de esos materiales como fuentes de infección; por el contrario, el aislamiento de especies iguales de *Candida* entre los pacientes y el personal que atiende la UCI, nos orienta a pensar en la posibilidad de la adquisición de la infección por un contagio extrínseco.

La utilidad del agar cromógeno *Candida* ID2[®], es cuestionable en relación a la identificación de especies diferentes a *Candida albicans*.

Las pruebas "caseras" de producción de tubo germinativo, seudomicelio y clamidoconidios, siguen manteniendo un nivel de identificación muy aceptable para algunas especies del género *Candida*.

El sistema VITEK® funciona, siempre y cuando las levaduras se encuentren certeramente purificadas, lo cual no elimina la manipulación humana y la consecuente contaminación.

A falta de la infraestructura para una identificación a nivel molecular de especies del género *Candida*, se recomiendan los siguientes métodos de identificación: Hidrólisis de la urea, producción de tubo germinativo, presencia o ausencia de clamidoconidios, seudomicelio y blastoconidios, sensibilidad a compuestos azólicos y finalmente, auxanograma VITEK®.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, toman en cuenta y dan importancia a la identificación de las levaduras del género *Candida* como potenciales causas de infección nosocomial y de brotes, en áreas hospitalarias de trascendental vigilancia como son las UCI.

Los métodos usados en el presente estudio epidemiológico, fueron cruciales para identificar algunos factores involucrados en la relación causa-efecto entre exposición y enfermedad y todo esto, con la finalidad de ser una fuente de información para la formulación de políticas sanitarias, encaminadas a la prevención de enfermedades micóticas intrahospitalarias.

X. PERSPECTIVAS.

- Secuenciar los 4 aislados faltantes del muestreo
- Determinar la relación de los aislados por medio de un árbol filogenético, que muestre el parentesco y relación entre ellos.
- Aumentar el número de aislados para efectuar el análisis molecular y confirmar o descartar el parentesco presente entre aislados de pacientes con aquellos aislados del ambiente.
- Diseñar formalmente un estudio de Epidemiología Descriptiva, con el cual se describa la presencia de candidosis sistémicas en tiempo, lugar y persona, cuantificando la frecuencia y distribución del fenómeno mediante medidas de [incidencia](#), [prevalencia](#) y [mortalidad](#), en el CMN 20 de noviembre, ISSSTE.

XI. REFERENCIAS.

1. Alonso, R *et al.* Utilidad de la amplificación aleatoria de ADN en la diferenciación de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 10-13.
2. Arenas Guzmán R. 2008. Micología Médica Ilustrada 3a. ed. Mc Graw Hill. México. Pp.425.
3. Arif, S.; Barkham, T.; Power, E. y Howell, S. Techniques for investigation of an apparent outbreak of infections with *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 1996; 34:2205–2209.
4. Bassetti, M. *et al.* Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. 2006;6:21.
5. Baquero, C. *et al.* Identification of *Candida albicans* by polymerase chain reaction amplification of a CaYST1 gene intron fragment. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 80-83.
6. Bautista, C.; Boldo, X.; Villa, L. y Hernández, C. Identification of *Candida* spp. by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Direct PCR Methods. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41 (1) p. 414–420.
7. Bigey *et al.* Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. Yeast. 2003; 20: 233–248.
8. Boldo, X. *et al.* Genetic Diversity among Clinical Isolates of *Candida glabrata* Analyzed by Randomly Amplified Polymorphic DNA and Multilocus Enzyme Electrophoresis Analyses. Journal of Clinical Microbiology. 2003, 41:10: 4799–4804.
9. Buitrón R.; Romero, R.; Cruz, F.; Bonifaz, A. y Zarama, F. Study on *Candida* no-*albicans* species and its relation to recurrent vulvovaginal candidiasis. Ginecol Obstet Mex. 2002;70: 431-436.
10. Calderone R. 2002. *Candida* and Candidiasis. ASM Press. Pp. 451.
11. Cantón E. *et al.* Infección sistémica nosocomial por levaduras. Rev. Iberoam Micol. 2001; 18: 51-55.
12. Cassone, M. *et al.* Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* Subtype *boulardii* fungemia in patients in neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. 2003. 41:11: 5340-5343.
13. Castaño, I.; Cormack, B. y De las Peñas, A. Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2006;48:2:66-69.
14. Cliff, P.; Sandoe, J.; Heritage, J. y Barton, R. Retrospective survey of candidaemia in hospitalized patients and molecular investigation of a suspected outbreak. J Med Microbiol. 2005; 54:391–394.
15. Coleman *et al.* Candidiasis: the emergence of a novel species: *Candida dubliniensis*. AIDS 1997, 11:557–567.

16. Díaz R. *et al.* Infecciones nosocomiales. Experiencia de un Hospital Pediátrico de tercer nivel. Salud Pública de México. 1999; 41, suplemento 1.
17. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. 2004. Manuales departamentales del Programa académico de la asignatura de Microbiología y Parasitología.
18. Doctor fungus. Disponible en: <http://www.doctorfungus.org/index.htm>.
19. Fell, J. et al. 2000. Biodiversity and systematic of basidiomycetus yeast as determined by large-subunit rRNA D1/D2 domain sequence analysis. Int. J. of Syst. And Evol. Microbiol. 50:1351-1371.
20. Fidel, P. *et al.* *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans* 1999. CLINICAL Microbiology Reviews,. 1999; 12 (1), p. 80–96.
21. Fridkin, S. y Jarvis, W. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 9, No. 4. Oct. 1996, p. 499–511.
22. Galván, B. y Mariscal, F. Epidemiología de la candidemia en UCI. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 12-15.
23. García, J. Fundamentos para el estudio de un brote epidémico. Revista Mexicana de Pediatría. Vol. 69, Núm. 5 • Sep.-Oct. 2002 pp. 208-211.
24. Godoy, P.; Almeida, L. y López, A. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogénico Albicans ID. Rev. Iberoam Micol 2001; 18: 197-199.
25. Hazen, K. New and Emerging Yeast Pathogens. 1995. Clinical Microbiology Reviews, 8:4:462–478.
26. Hedderwick, A; Lyons, J.; Liu, M.; Vazquez, A. y Kauffman, A. Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19:663-670.
27. Hernández, H. *et al.* Infecciones nosocomiales en el Instituto Nacional de Pediatría (INP). 2004 – 2005. Acta Pediatr Mex 2006; 27(6): 325-328.
28. Hernández, F. *et al.* Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un Hospital regional de la Ciudad de México. Salud Pública de México. Vol. 45, no.6. noviembre-diciembre 2003.
29. Herrera, T. y Ulloa, M. 2004. El Reino de los Hongos. UNAM y FCE. México. Pp. 552.
30. James, T. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. 2006. Vol. 443, octubre.
31. Koç, A. *et al.* Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. Mycoses 45, 470–475 (2002).
32. Kunh, D. *et al.* *Candida parapsilosis* characterization in an Outbreak Setting. Emerging Infectious Diseases. 2004; 10: 6; 1074-1081.

33. Kurtzman, P. y Fell, J. 1998. The Yeast. A Taxonomic Study. 4ª edición. Elsevier. Amsterdam Holanda. 1055 pp.
34. López, C. *et al.* Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. Revista Argentina de Microbiología (2005) 37: 16-21.
35. López, R.; Bazán, E.; León, S. y Manzano, P. Frecuencia de micosis en pacientes hospitalizados del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias SS. Revista Mexicana de Micología. 1995; 11, 39 – 45.
36. López, R.; Méndez, L.J.; Hernández, F. y Castañón, R. (2004). Micología Médica. Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio. (2ª ed.). México: Trillas. 192 pp.
37. Manzano, P *et al.* 2000. Identification and typing of yeast isolates from hospital patients in Mexico City. Rev Argent Microbiol.; 32: 1-6.
38. Morais, P. *et al.* 2006. Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South American Ecosystems. Springer Berlin Heidelberg.
39. Moran, P.; Sullivan, D. y Coleman, D. 2002. Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogen: *Candida* and candidiasis. Calderone RA. Ed ASM Press. EUA. pp. 37.
40. Morayta, A., Granados, E., Pérez, G. y Domínguez, W. Incidencia de infecciones nosocomiales en la Coordinación de Pediatría del CMN "20 de noviembre". Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 2006; 19(75):71-78.
41. Navarrete Navarro S, Mejía Arangure JM, Rivera García B, Rangel Frausto MS. ¿Cómo estudiar brotes de infección nosocomial? Enf Infec y Micro. 2003; 23:17-22.
42. NOM-EM-002-SSA2-2003. Norma Oficial Mexicana de Emergencia.
43. NOM-EM-002-SSA2-2003. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.
44. Nedret, A.; Kocago, S.; Erdem, F. y Gündüz, Z. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. Mycoses. 2002; 45, 470–475.
45. Odds, F. y Bernaerts, R. CHROMagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important Candida Species. Journal of Clinical Microbiology, Aug. 1994, Vol. 32, No. 8 p. 1923-1929.
46. Orbera, T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 15-19.
47. Pfaller *et al.* Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. Clinical Microbiology Reviews. 2007; 20:1 p.133-163.
48. Quindós, G. *et al.* Evaluación micológica de un nuevo medio de cultivo cromógeno (*Candida* ID®) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 23-28.

49. Quindós, G. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 1-4. Disponible en <http://reviberoammicol.com/2002-19/001004.pdf>.
50. Ramos, A. y Ruiz, J. Candidiasis. Infectología. 2001; p. 45-51.
51. Rippon, J. 1990. Tratado de Micología Médica. 3era. Ed. Interamericana. México.
52. Runco R. y Salim R. Fungemias por *Pichia anómala* en pacientes pediátricos inmunocomprometidos hospitalizados. Boletín Micológico Vol. 20: 103 - 108 2005.
53. Sánchez, G. *et al.* Epidemiología de las infecciones Sistémicas por *Candida* en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Bol Med Hosp Infant Mex. 2004; 61, julio-agosto.
54. Sandoval, A. 2008. Tesis: Propuesta de nuevas especies del género *Pichia* aisladas de tracto digestivo de escarabajos descortezadores del género *Dendroctonus*. IPN, ENCB.
55. Sansinforiano, M. E. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 65-69.
56. Servicio de Epidemiología. CMN "20 de noviembre", ISSSTE. Informe de Infecciones Intrahospitalarias del 1º de enero al 31 de diciembre de 2005.
57. Smith, D. *et al.* Fatal *Saccharomyces cerevisiae* Aortic Graft Infection. Journal of Clinical Microbiology. 2002. 40:7; 2691-2692.
58. Tawfik, O. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Pneumonia in a Patient with Acquired Immune Deficiency Syndrome. Journal of Clinical Microbiology. 1989. 27:7; 1689-1691.
59. Torres, J.; Morera, Y. y López, O. *Candida glabrata*: Un patógeno emergente. Control de calidad SEIMC. 2000, Barcelona.
60. Vázquez *et al.*, 1998. Nosocomial *Candida glabrata* Colonization: an Epidemiologic Study. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36 (2): 421 – 426.
61. Valenzuela, A.; Rangel, M.; Gutiérrez, J.; Valenzuela, A. y Tabal, N. Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia de un hospital de cardiología en México. Cir Ciruj. 2004; 72:41-46.
62. Villanueva, J. y Arenas R. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. Revista mexicana de Micología. 2007. 25:91-104.
63. Wingard, R., Dick, J.; Merz, W.; Sandford, G., Saral, R. y Burns, W. (1980). Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. Infect. Immun. 29:808-813.
64. Wright, W. y Wenzel, R. NOSOCOMIAL CANDIDA: Epidemiology, Transmission, and Prevention. 1997. Infectious Disease Clinics of North America. 11:2: 411-425.

XII. ANEXO

SOLUCIONES

Solución salina estéril (SSE)

Composición:

9 g de NaCl

1000ml de agua destilada.

Preparación: se disuelve la sal en el agua destilada, se agita hasta que no quede ninguna partícula sólida. Se esteriliza por 15 minutos a 121°C. Se refrigera para su uso posterior.

Solución salina estéril adicionada con antibióticos

Se prepara SSE y se le agrega Estreptomicina disuelto en agua, Penicilina disuelto en agua y Cloramfenicol disuelto en alcohol. Se esteriliza por 15 minutos a 121°C. Se refrigera para su uso posterior.

Amortiguador de fosfatos

Composición:

34 g de KOH

500mL de agua destilada

Preparación: se pesó el fosfato y fue agregado al volumen de agua, ajustando el pH 7.2 con NaOH 1M (solución madre o stock). Ésta solución se aforó a un volumen final de 1L, siendo esterilizado por 20 min a 121°C. En condiciones de esterilidad, se tomaron 1.25mL y se llevaron a un volumen final de 1L (solución de trabajo). Se hicieron alícuotas de trabajo de 3mL cada una, en tubos separados y estériles

Solución de lisis

Contiene:

Tritón x-100 (2%)

SDS (dodesil sulfato de sodio) al 1%

NaCl 10mM

Tris 10mM pH 8.0

EDTA 1mM

MEDIOS DE CULTIVO PARA CRECIMIENTO DE LEVADURAS

Agar dextrosa Sabouraud (ADS).

Preparación: disolver 65 g del polvo en 1L de agua; hervir y esterilizar durante 15 minutos a 121°C, Verter en cajas Petri de 15 mm de diámetro. Etiquetar y almacenar a 4°C

ADS con antibióticos (ampicilina, estreptomicina y cloranfenicol).

Preparación: disolver 65 g del polvo en 1L de agua; hervir y esterilizar durante 15 minutos a 121°C, cuando se encuentre a 40°C aprox., agregar Estreptomicina disuelto en agua, Penicilina disuelto en agua y Cloramfenicol disuelto en alcohol, esterilizados por filtración. Verter en cajas Petri de 15 mm de diámetro. Etiquetar y almacenar a 4°C.

YEPD (Extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 2%)

Preparación: disolver 4.5 g de extracto de levadura, 9g de peptona y 9 g de dextrosa en 450 mL de agua destilada. Homogenizar perfectamente. Vaciar 20mL del contenido en cada matraz pequeño, donde se crecerá la levadura. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar y almacenar a 4°C

MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS

Agar BIGGY

Preparación: Suspender 45 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa. Diluir y hervir durante un minuto. NO SOBRECALENTAR. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Fundamento.- la prueba realizada con este medio de cultivo, sirve para identificar levaduras del género *Candida*. Es un medio comercial que posee antibacterianos y vira a colores marrones indicando que la especie pertenece al género *Candida*. Es una modificación de la fórmula desarrollada por Nickerson quién realizó estudios sobre la reducción de sulfito por especies de *Candida*. La diferenciación está basada en la morfología colonial y la pigmentación típica que se presenta en este medio. La reducción del sulfito de bismuto se manifiesta en una pigmentación de la colonia que en ocasiones difunde en el medio.

Técnica.- se siembra en el medio una asada de la levadura a muestrear por el método de estría cruzada. Se incuba por 24 a 48 horas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad.

Lectura.- se realizó observando la morfología macroscópica

Nomenclatura:

+ (Prueba positiva) en este caso nos referimos a que contenía colores que iban del café claro a café oscuro o marrón.

- (prueba negativa), se incluye en este parámetro aquellos levaduras que dieron una coloración diferente a la café o marrón.

0 (no creció) la levadura en el medio

Si se observaba una combinación de colores, incluyendo aquellos tonos que no fueran marrones y se sometió a estría de agotamiento en ADS para su purificación.

Los grupos controles utilizados fueron obtenidos como control positivo a *Candida glabrata* FM 227 y como control negativo a *Cryptococcus neoformans* FM136.

Agar urea de Christensen

Preparación: disolver la base de agar urea (29 g) en 100ml de agua destilada y esterilizar por filtración en ambiente estéril. Suspender 15g de agar-agar en 900 ml de agua destilada, calentar a ebullición mezclando gentilmente. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar a 50°C y añadir la base de urea. Vaciar en tubos o viales previamente estériles e inclinarlos.

Fundamento.- es un medio que es utilizado para medir la capacidad de la levadura para hidrolizar la urea y convertirla a amonio que se observa por el cambio en la coloración del medio debido al rojo fenol.

Técnica.- se sembró una pequeña asada de la levadura en el medio, se incubó de 48 a 72 hrs con revisiones diarias a una temperatura de 30°C.

Lectura.- se revisó la coloración del medio, si conservaba color amarillo, la prueba se registraba como negativa, y si viraba a un color rosa intenso, sí hay hidrólisis de urea, y la prueba era registrada como positiva. Existen casos en lo que podemos encontrar un término intermedio, ello puede indicarnos 2 cosas: tiene que ver con propiedades intrínsecas del hongo y éste se comporta así o se trataba de una colonia contaminada.

Nomenclatura:

- + (Prueba positiva) medio color rosa intenso
- (prueba negativa) medio color amarillo.
- 0 (no creció)

Los grupos controles utilizados fueron: como control positivo a *Candida tropicalis* FM829 y como control negativo a *Cryptococcus neoformans* FM136.

Agar cromogénico Candida ID2®

Fundamento.- Es un medio comercial que permite la identificación a nivel de especie de las levaduras, por la coloración que adopta la levadura en ellos.

Técnica.- de una solución levaduriforme inicial, se hicieron diluciones para hacer un conteo celular en una cámara Neubauer, una vez determinada la concentración de 10000 células por ml, se tomó 15µl y se sembraron por estría cruzada para poder identificar si hay alguna contaminación a combinación de especies y esta pueda ser percibida. Se incubó 2 días a 37°C en condiciones de oscuridad con revisiones diarias.

Lectura.- si las levaduras son azules con *C. albicans*, si son rosas pertenecen a *C. tropicalis* o *C. lusitaniae* o *C. kefyr*; y blancas pertenecen a otras levaduras que no sean aquellas caracterizadas por los 2 colores anteriores.

Los grupos controles utilizados fueron: como controles positivos a *Candida albicans*, *Candida tropicalis* FM829, *Candida kefyr* FM076 y *Candida glabrata* FM227; y como controles negativos a *Cryptococcus neoformans* FM136, *Saccharomyces cerevisiae* FM147 y *Rhodotorula* spp. FM231.

Filamentación en suero humano

Fundamento.- prueba que sirve para observar la formación del tubo germinativo, característico de *C. albicans* y ello permite diferenciarla de otras especies pertenecientes al género *Candida*.

Técnica.- se pone una asada de la levadura en suero fisiológico humanos, dejando incubar por 2 horas a 37°C.

Lectura.- se hace una preparación de esta solución y se observa al microscopio determinando el porcentaje por campo en el que se observa la formación del tubo germinativo, para que al final se pueda deducir la proporción en la formación de éste. Es importante hacer notar que se debe realizar la lectura dentro de las 2 a 4 horas, ya que pasado ese tiempo la prueba pierde viabilidad debido a que después de ese tiempo las diferentes especies pueden formar el tubo germinativo.

Nomenclatura:

- + (Prueba positiva) formación de tubo germinativo en más del 50 % del inóculo
- (prueba negativa) ausencia de tubo germinativo

Los grupos controles utilizados fueron: como control positivo a *Candida albicans* y como control negativo a *Candida glabrata* FM227.

Agar harina de maíz +tween 80

Preparación: disolver 17 g de agar harina de maíz en polvo en 1L de agua destilada. Añadir 10ml de tween 80 (para obtener una concentración 1%). Disolver, hervir y esterilizar a 120°C durante 20 min. dejar enfriar y verter en cajas chicas estériles.

Fundamento.- es un medio que simula estrés, contiene pocos nutrientes y un factor estresante (tween 80), ello provoca que se pueda diferenciar entre especies del género *Candida* por la formación de estructuras de resistencia como lo son los clamidoconidios (formados por *C. albicans* y *C. dubliniensis*); así como la formación de pseudomicelio y blastoconidios.

Técnica.- se emplea la técnica de Damau en la cual se pone una asada de la levadura a identificar formando 3 líneas paralelas y al final cruzar una línea perpendicular, en seguida colocar un cubreobjetos. Dejar incubar 2 días a temperatura ambiente.

Lectura.- observar la caja directamente al microscopio, tratando de observar las estructuras que se forman en la periferia.

Nomenclatura:

+ prueba positiva (formación clamidoconidios)

- prueba negativa (formación de pseudomicelio, blastoconidios y sin clamidoconidios o ausencia en la formación de los 3 anteriores)

0 no creció

Los grupos controles utilizados fueron: como control positivo a *Candida albicans* y como control negativo a *Candida glabrata* FM227.

Agar Níger (Staib-Seeliger).

Preparación: Disolver 34g y disolver en 1000 ml de agua destilada, pulverizar la semilla Níger, ponerla en ebullición en agua destilada durante 30 minutos. Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior. Añadir y disolver la glucosa, el fosfato, la creatinina y el agar. Esterilizar a 121°C durante 20 min. enfriar a 50°C. Disolver en baño maría el difenil en alcohol. Añadir al medio el difenil en ambiente estéril y antibióticos. Homogeneizar y envasar

Fundamento.- medio que permite la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* por el acomodo de clamidoconidios que en el primer caso son únicos y en el segundo están acomodados en racimos; y por la morfología macroscópica de las colonias. Además sirve para diferencias levaduras del género *Cryptococcus*, ya que ella puede pigmentar este medio con una coloración vino.

Técnica.- con un palillo estéril tocar la levadura a identificar y llevar al medio. Tocar el agar en varios puntos de la placa. Dejar incubar 2 a 3 días a temperatura ambiente.

Lectura.- observar en microscopio estereoscópico la morfología macroscópica y hacer un examen directo de las colonias poniendo énfasis en el acomodo de los clamidoconidios.

Nomenclatura:

C. albicans clamidoconidios únicos terminales.

C. dubliniensis clamidoconidios en racimo.

Cryptococcus spp. Si el medio vira a una coloración vino.

Los grupos controles utilizados fueron: como controles positivos a *Candida albicans* y *C. dubliniensis* 195-B; y como control negativo a *Candida glabrata* FM227.

ADS A 37°C

Preparación: se hicieron cajas de petri con ADS.

Técnica.- se inoculó con la levadura a identificar por medio de estría de aislamiento en toda la caja. Se incubaron a 37°C por 48 a 72 hrs, revisándolas diariamente.

Lectura.- se observaron directamente las cajas, diferenciando el crecimiento positivo del nulo, lo que se registró y después dichas cajas fueron eliminadas.

Nomenclatura:

- + Presencia de crecimiento levaduriforme
- Ausencia de crecimiento

Los grupos controles utilizados fueron: como control positivo a *Candida albicans* y como control negativo a *Candida glabrata* FM227 y *Candida tropicalis* FM829.

MICOSEL®.

Preparación: se pesaron 65g del polvo, se diluyeron en 1000 ml de agua, se esterilizó durante 15 minutos a 121°C, ya frío, se vertió en cajas Petri de 15 mm de diámetro. Se etiquetaron y almacenaron a 4°C.

Técnica.- se inoculó con la levadura a identificar por medio de estría de aislamiento en toda la caja. Se incubaron por 48 a 72 hrs, con revisiones diarias.

Lectura.- se observaron directamente las cajas, diferenciando el crecimiento positivo del nulo, lo que se registró y después dichas cajas fueron eliminadas.

Nomenclatura:

- + Presencia de crecimiento levaduriforme
- Ausencia de crecimiento

Los grupos controles utilizados fueron: como control positivo a *Candida albicans* y como control negativo a *Candida glabrata* FM227.

Auxanograma Vitek®

Fundamento.- es una prueba sistematizada del auxanograma que anteriormente se hacía manualmente. Se trata de unas tarjetas que contienen productos bioquímicos que en contacto con la levadura podrán ser metabolizados o no, ello provocará un viraje de color en cada uno de los pozos que integran las tarjetas, creando un perfil bioquímico característico. La lectura de estas tarjetas se realiza por medio de una computadora y un software que contiene una base de datos a partir de muestras clínicas, en ella se busca un perfil parecido al problema en estudio, e identifica la especie a la que pertenece, dando todo el perfil bioquímico del organismo así como un porcentaje de certeza.

Técnica.- se hace una solución (con solución salina estéril más la levadura), se mide la concentración determinada por un espectrofotómetro (la cual debe mantenerse en un rango determinado para las levaduras), se introducen las tarjetas a un compartimiento del aparato para que sean llenadas. Se incuban 24 horas en una estufa a 37°C y al día siguiente son introducidas al lector para ser comparada con la base de datos, dando un nombre de especie, así como de la probabilidad (mostrada en porcentaje) de veracidad.

Los grupos controles utilizados fueron: como controles positivos a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* FM310, *Candida glabrata* FM227; y como controles negativos a *Cryptococcus neoformans* FM136, *Saccharomyces cerevisiae* FM147 y *Rhodotorula* spp. FM231.

CARTA DE CONSENTIMIENTO

SE LE SOLICITARA AL PACIENTE, QUE LEA EL SIGUIENTE MATERIAL PARA ASEGURAR QUE ESTÁ INFORMADO ACERCA DE LA NATURALEZA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y DE LA FORMA EN LA QUE PARTICIPARÁ, SI DECIDE DAR SU CONSENTIMIENTO PARA HACERLO.

LA FIRMA DEL FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INDICARÁ QUE EL PACIENTE HA SIDO INFORMADO Y QUE ACEPTA PARTICIPAR, EN EL ESTUDIO CLÍNICO.

Protocolo No. _____

**AI SLAM I ENTO DE *Candida glabrata* A PARTIR DE PACIENTES
EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS DEL CENTRO MÉDICO
NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE.**

Información para el Paciente y Formularios para el Consentimiento Informado Escrito

Fecha de emisión: ____/____/____

PROPOSITO

Antes de otorgar su consentimiento para participar en este ensayo, es importante que usted lea y comprenda la siguiente explicación sobre el estudio. Este documento describe el motivo, los procedimientos y los beneficios de la investigación a efectuar, así como también las molestias que podrían presentarse durante el desarrollo del estudio. Su participación en este estudio es estrictamente voluntaria y aún cuando usted decida participar, tiene el derecho de retirarse del programa en cualquier momento.

CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO

Introducción

Infección nosocomial o intrahospitalaria es aquella que aparece en el hospital y en un enfermo que fue ingresado por un proceso distinto al de la infección. Las infecciones nosocomiales son un problema de salud pública, y es una preocupación incipiente en instituciones médicas a nivel mundial. En nuestro país, a partir de estudios realizados a partir en 1996 en hospitales se asume que el promedio de infección nosocomial es del 10 al 15 %; sin embargo, el impacto mayor de este problema es su elevada mortalidad, la cual es aproximadamente del 5 %. Se ha observado que pacientes de alto riesgo, es decir con baja en la inmunidad, son las más susceptibles a este tipo de infecciones, dentro de ellos encontramos a niños recién nacidos, de cuidados intensivos, así como a personas diabéticas, con SIDA o aquellas con cáncer y los trasplantados. El trabajo más reciente, fue un estudio transversal efectuado en el año 2004 en pacientes pediátricos reiterando la información que se tenía acerca de las áreas en las que se presenta mayor frecuencia de infección nosocomial y el tipo de gérmenes encontrados. Este estudio sin embargo se enfocó a bacterias, por lo que con respecto a las infecciones nosocomiales causadas por hongos, son pocos los estudios que se han efectuado en nuestro país y el mundo, a pesar de ello, sabemos que los hongos, aunque en menor escala con respecto a sus homólogos las bacterias, también son causantes de graves infecciones intrahospitalarias, que desafortunadamente atentan, en gran proporción, contra la vida de los pacientes. Los estudios apuntan a que la fuente de contagio para que un paciente adquiera una infección nosocomial, está en el propio hospital, por lo que es requerido que el control de calidad del ambiente hospitalario, deba ser óptimo, cumpliendo con las normas de limpieza, asepsia y antisepsia, instauradas en cada institución y por las normas oficiales de salud que rigen a nuestro país. Para poder abatir la frecuencia de infecciones micóticas hospitalarias, es primordial conocer cuáles son las fuentes de contagio. ¿Existen hongos en el ambiente hospitalario? y ¿qué tipo de hongos son?

¿Qué pruebas se realizarán?

Se tomará una muestra de las zonas donde haya posible contacto directo con el agente causal de alguna micosis, es decir, en venoclisis (sondas, catéteres, tubos endotraqueales, etc.), ropa, cubrebocas y zapatos. Asimismo se tomarán muestras de exudado faríngeo, piel y uñas.

MOTIVO

Aislar e identificar *C. glabrata* en diversas áreas de la UCI del Hospital Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE y evaluar las potenciales fuentes de contagio que favorezcan infecciones micóticas y pongan en riesgo a los pacientes internados en el hospital.

PROCEDIMIENTOS

¿Quiénes participarán?

Pacientes internos en la UCI del Centro Médico Nacional 20 de noviembre, ISSSTE

¿Qué tendrá que hacer durante la investigación y cuál es la duración de la misma?

Todos los pacientes que acepten ingresar a la presente investigación, serán muestreados en zonas con venoclisis. En total el estudio contempla una duración de pocos minutos.

BENEFICIOS

Esta investigación brindará una oportunidad de conocer si hay y evaluar la proporción de hongos oportunistas en el hospital que tengan contacto directo con los pacientes. Así evaluar el control de calidad que, en materia de higiene, el hospital debe tener programado.

¿Existe alguna compensación en caso de lesiones?

Al firmar el consentimiento, no renuncia a ninguno de los derechos legales que le reconoce la normativa vigente del país, que pudiesen corresponderle en caso de que se produzca algún daño y que se acredite que el mismo se haya producido como consecuencia directa de la investigación.

Su médico investigador será quien indique / autorice dichos procedimientos.

¿Tendré que pagar o recibiré algún pago por participar en la investigación?

Si usted está interesado, podrá extendersele el resultado de manera escrita en forma totalmente gratuita. No recibirá pago alguno por su participación en la investigación.

Si usted decide no participar en este estudio, esto no influirá sobre la calidad del cuidado médico que se le administrará.

RIESGOS, INCONVENIENTES MOLESTIAS

Ninguno.

PARTICIPACIÓN

¿Podrá retirarse de la investigación en cualquier momento?

La decisión de tomar parte en la investigación es voluntaria y libre y podrá retirarse en cualquier momento, sin que esto afecte la relación con su médico. En ese caso, es muy importante que le comente a su médico las razones de su decisión.

¿Cómo conseguir más información?

Es importante que cualquier pregunta que tenga en relación con la investigación, la consulte con su médico.

Fecha de emisión: ____ / ____ / ____

Recibí copia de esta Información Clínica (para el paciente)		
Firma del paciente	Por favor, escriba su nombre y apellido completos	Fecha

