



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**FRECUENCIA de *Candida dubliniensis* Y SU SENSIBILIDAD
ANTIFÚNGICA, OBTENIDAS DE PACIENTES DEL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA
P R E S E N T A:
CARINA GARCÍA MUÑOZ**

**ASESOR TESIS:
Dr. Luis J. Méndez Tovar
Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología
Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI**

**CO-ASESORA:
Dra. Patricia Manzano Gayosso
Laboratorio de Micología Médica
Facultad de Medicina, UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA C.M.N SIGLO XXI
DELEGACIÓN SUR DEL D.F

AUTORIZACIÓN DE TESIS

DR JESUS VALENCIA SÁNCHEZ

Director de investigación y educación en salud
UMAE Hospital de Cardiología C.M.N Siglo XXI.

DRA NOEMÍ PATRICIA CASTILLO TORRES

Profesora Titular del Curso de Posgrado
De la Especialidad de Patología Clínica.
UMAE Hospital de Cardiología C.M.N Siglo XXI.

Dr. Luis J. Méndez Tovar

Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología
Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI

Dra. Patricia Manzano Gayosso
Laboratorio de Micología Médica
Facultad de Medicina, UNAM

CONTENIDO

HOJA DE FIRMAS

HOJA DE REGISTRO

CONTENIDO GENERAL.

INDICE DE FIGURAS, CUADROS Y GRAFICAS

ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

A Dios.

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

A mis Padres.

Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a sus consejos, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad. Por la paciencia y el apoyo que me brindaron para culminar mi carrera profesional.

¡Gracias por darme la vida!

A mis Hermanos

Porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad.

¡Gracias!

A mi amigo y compañero incondicional.

No tengo palabras para expresar lo mucho que has contribuido en este trabajo, por tu inmensa comprensión y apoyo en toda circunstancia, siempre estuviste conmigo.

¡Te amo!

Al gran amor de mi vida.

Por ser la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor y estar a tu lado LEONAI. Te AMO.

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros.

Gracias por su tiempo, por su apoyo y paciencia pero principalmente por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, en especial: al Dr. Luis Javier Méndez Tovar por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, a la Dra. Patricia Manzano Gayosso por su dedicación y apoyo en la realización de esta investigación. Al Dr. Rubén López Martínez por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. ¡MIL GRACIAS!

Al personal de laboratorio

En especial al M.C Jesús Manuel Ramos Hernández por su aportación y participación, y a todo el personal que contribuyó para que este trabajo fuera posible.

ÍNDICE GENERAL

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	2
2.1.	Antecedentes históricos.....	2
2.2.	Género <i>Candida</i>	3
2.2.1.	Características generales.....	3
2.2.2.	Taxonomía del género.....	6
2.2.3.	Reproducción asexual.....	6
2.2.4.	Reproducción sexual.....	6
2.2.5.	Especies patógenas para el humano	7
2.2.6.	Hábitat	7
2.3.	Candidosis.....	9
2.3.1.	Variedades clínicas.....	10
2.3.2.	Epidemiología: frecuencia y factores predisponentes.....	11
2.3.3.	Diagnóstico de laboratorio.....	13
2.4.	Sensibilidad antifúngica.....	18
3.	Desarrollo de la investigación.....	20
3.1.	Planteamiento del problema.....	20
3.2.	Objetivos.....	21
3.3.	Recursos, financiamiento y factibilidad.....	21
3.4.	Aspectos éticos.....	22
3.5.	Material y métodos.....	23
4.	Resultado.....	31
5.	Discusión.....	38
6.	Conclusiones.....	40
7.	Bibliografía.	41
8.	Apéndice.....	45

ABREVIATURAS

Agar C.L.E.D.- agar Cistina Lactosa Electrólito Deficiente

AHM.- Agar harina de maíz.

APD.- Agar papa dextrosa.

ADS.- Agar Sabouraud Simple

CMN SXX.-Centro Médico Nacional Siglo XXI.

CMI.- Concentración mínima inhibitoria.

CLSI.- Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico

FDA. - Food and Drug Administration

TG. - Tubo germinativo

OP.- Opacidad

UMA.E.- Unidad Médica de Alta Especialidad.

RESUMEN

La candidosis es la micosis oportunista más frecuente, el principal agente etiológico es *Candida albicans*. En 1995, se determinó que dentro de los aislados clasificados dentro de esta especie, había dos levaduras diferentes una *C. albicans* y otra fisiológicamente muy semejante que es *C. dubliniensis*.

Actualmente en los hospitales no se hace diferenciación entre estas dos especies, sin embargo, la tipificación precisa es necesaria, ya que *C. dubliniensis* presenta una gran capacidad para desarrollar resistencias a diversos antifúngicos principalmente a los compuestos azólicos.

Estudios de sensibilidad antifúngica realizados en el HE CMN SXXI muestran que las levaduras de *Candida* aisladas de pacientes presentan resistencia a antifúngicos cercana al 27%, pero se desconoce el porcentaje de *C. dubliniensis* en estos casos.

Aún no se ha investigado si la resistencia observada en los aislados levaduriformes está relacionada con la frecuencia de *C. dubliniensis*.

Se realizará un estudio con dos objetivos principales 1) Conocer la frecuencia de *C. dubliniensis* y 2) Estudiar la sensibilidad diversos antifúngicos (fluconazol, voriconazol, 5-fluocitocina).

La identificación se realizará por medio de estudios morfológicos (producción de clamidioconidios en agar harina de maíz, tubo germinativo y pruebas diferenciales que incluyen crecimiento en CHROMagar[®], producción de clamidioconidios en agar Staib, tabaco y caseína, finalmente la prueba de termotolerancia. El estudio de sensibilidad se realizará por el método de equipo semiautomatizado Vitek2[®].

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La descripción más antigua del término Candidosis se encuentra en el libro “*Epidemics*”, obra escrita por Hipócrates, cuatro siglos antes de Cristo. En 1665 fue mencionado por Samuel Pepys³⁹. En 1771 Rosen Von Rosenstein y en 1784 Underwood describieron una candidosis bucal y gastrointestinal en un recién nacido. En 1985 Veron descubrió el agente causal de la candidosis¹. En 1835 Verón describió un caso de candidosis esofágica y uno de pustulosis candidósica en un recién nacido. En 1839 Langerbeck, descubrió el agente etiológico causante de candidosis, aisló el hongo de un caso de afta bucal en un paciente que padecía de fiebre tifoidea y lo asocia a esta enfermedad. En 1841 Berg y en 1844 Bennet confirman el hallazgo de Langerbeck. En 1842 Gruby, describió la morfología del hongo causal y lo ubicó en el género *Sporotrichum*. Dos años después Gruby reportó características microscópicas de la levadura de un paciente con tuberculosis pulmonar. En 1849, Wilkinson, demostró las manifestaciones clínicas de una vulvovaginitis por *Candida*. Robin en 1853, mostró que el agente etiológico podía diseminarse y causar enfermedad generalizada y lo llamó *Oidium albicans*. En 1868, Quinquad propuso un nuevo nombre *Syringospora rodinii*. En 1877 Ress, cambia el nombre al microorganismo por *Saccharomyces albicans*, en el mismo año Grawitz, demostró la naturaleza dimórfica del hongo y describió las formas de la levadura, micelio, clamidoconidios, sin darles connotación. En 1887 Audery reportó que las diversas morfologías que presenta la levadura eran dependiendo de las condiciones ambientales. En 1890 Zopt, lo denominó *Monilia albicans*, nombre que se hizo popular en la literatura médica, denominándose durante muchos años como moniliasis a la enfermedad causada por

estas levaduras, aunque el género *Monilia* está relacionado como patógeno de plantas. Fue Berkhout en 1923 quién propuso el término genérico de *Candida*¹. Finalmente el nombre de *Candida* fue aceptado en VIII Congreso Internacional de Botánica en París en 1954. En 1981 se decide por "La Asociación Internacional de Micología" eliminar el término de moniliasis de su *Índex Medicus*, aceptándose solamente la denominación de candidosis o candidiasis (en idioma inglés).³⁹

En la década de los 90, investigadores de Europa, notaron que muchos pacientes con VIH y candidosis oral por *C. albicans* presentaban un comportamiento clínico diferente a pesar de que las características de los pacientes eran similares. Esto los llevó a realizar diversos pruebas en los aislados fúngicos, desde la morfología microscópica hasta llegar a la biología molecular, en base a los resultados, demostraron la existencia de una nueva especie similar a *Candida albicans* que denominaron *Candida dubliniensis*. Entre las diferencias principales se tiene la virulencia mayor en pacientes con VIH y la capacidad de desarrollar resistencia a fluconazol *in vitro*. Por lo tanto, *C. dubliniensis* se ha vinculado a candidosis bucal en pacientes con SIDA y recientemente se ha asociado a la enfermedad invasiva⁴.

GÉNERO *Candida*

Características generales

El género *Candida* está formado por alrededor de 200 especies³. Las levaduras son Gram positivas, aerobias, presentan diámetros variables de acuerdo a la especie que van de 4 a 6 µm de diámetro, la forma puede variar de globosa, ovoide cilíndrica a elongada raramente apiculada¹⁵. Los organismos se reproducen asexualmente por procesos blásticos

y dan origen a levaduras, filamentos y estructuras especiales como los clamidoconidios. También se reproducen sexualmente formando ascas desnudas que contienen ascosporas.¹⁹

No tienen pigmentos carotenoides, pueden formar carbohidratos extracelulares dando un color púrpura al reaccionar con el yodo, la asimilación del inositol es variable y la fermentación de carbohidratos puede estar ausente o presente, las diferentes especies dentro de este género son identificadas, según sus propiedades morfológicas y fisiológicas por patrones de fermentación y asimilación de carbohidratos.

La mayoría de las especies de este género, crecen en cultivos aerobios ricos o pobres en nutrientes con un rango de pH amplio de 2.5 a 7.5 y temperaturas de 20°C a 38°C. Todas ellas asimilan y fermentan la glucosa como fuente de carbono y algunas asimilan el nitrato como fuente de nitrógeno, solamente *C. krusei* puede crecer en medio libre de vitaminas, la biotina es un factor importante de crecimiento. Todas las especies reportadas como patógenas crecen a temperaturas de 37°C y tienen la capacidad de formar pseudomicelio excepto *C. glabrata*.¹⁵

Las levaduras del Género *Candida* son aerobias, pero también pueden crecer con elevadas concentraciones de CO₂, la atmósfera pura de CO₂ inhibe el crecimiento de *Candida. albicans*. La influencia de diferentes componentes en los medios de cultivos estimula la formación de micelio en *Candida. albicans* fundamentalmente concentraciones críticas de glucosa y medios suplementados con suero o aminoácidos, 40 % de proteínas 30 y 50% de polisacáridos^{27, 33}. La composición de lípidos es variable dependiendo del tipo de cepa, edad del cultivo, condiciones y la fuente de carbono utilizada aunque la mayoría de los estudios realizados concluyen que los fosfolípidos y los esteroides son los lípidos predominantes en *C. albicans* Esta especie tiene un pH intracelular de 6.7 a 6.8, y contiene

aminas y trazas de metales. La concentración intracelular de potasio es 200 veces mayor que la concentración de sodio ^{1,4,3}.

Pared celular: La pared celular es la envoltura que rodea al protoplasma de la célula que le da la forma característica y lo protege de cualquier cambio de presión osmótica, permite el contacto entre el hongo y el medio ambiente llegando a representar entre el 10 y el 50 % del peso seco del microorganismo. Dicha proporción varía durante el ciclo de crecimiento y tiene gran influencia en este aspecto la edad del microorganismo y la composición química del medio de cultivo ^{1,24,35}.

El grosor de la pared en este género va desde 120 hasta 300 nm; mediante microscopía electrónica se han observado 6 capas. Uno de los principales componentes de la pared son los mananos estando en áreas de alta densidad electrónica y es uno de los principales determinantes antigénicos, la quitina y el β -1-6 glucano son capas inertes que le confieren la rigidez a la pared donde también se presentan capas de lípidos y fibrina que se sintetizan cuando se cultiva en medios con agar y se piensa que esta capa es la responsable de la adhesión de *C. albicans* al epitelio ^{1,38,24}.

Morfogénesis: *C. albicans* es la especie del género que mayor variedad de formas morfológicas presenta. Posee micelio, pseudomicelio, blastoconidios, clamidoconidio y la presencia de tubo germinativo y pueden estar todas presentes en un mismo cultivo de este microorganismo.^{1,24}. La morfología de esta levadura está determinada por la síntesis de la pared celular ^{1,6,24}.

La transición de la forma levaduriforme a la forma micelial es un proceso regulado por el medio ambiente. Los principales factores que favorecen el desarrollo de la forma micelial son baja tensión de oxígeno, bajo contenido de glucosa, medios carenciales, inóculos altos, medios líquidos con anaerobiosis parcial, pH > 6.5 temperatura de 37⁰C,

presencia de aminoácidos en los medios de cultivos o de sueros y contenido mínimo de algunos carbohidratos ^{1,6}.

Taxonomía.

A lo largo de la historia, este género de hongos como otros muchos, ha presentado modificaciones en su ubicación taxonómica. La clasificación actual del género *Candida* es la siguiente ^{6,15,24,33,34}.

Phyllum- : Deuteromycotina.

Clase: Blastomycetes.

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*.

Reproducción asexual

Se lleva a cabo por un mecanismo blástico. En esta forma de reproducción se pueden formar diferentes estructuras como levaduras con gemación multipolar, filamentos, pseudofilamentos, clamidoconidios. Estas estructuras ayudan a establecer diagnóstico así como una taxonomía presuncional.

La mayoría de las veces, es en esta forma de reproducción en la que invade al hospedero y en los especímenes de las lesiones se observan las estructuras mencionadas previamente¹⁸.

Reproducción sexual

En varias especies de *Candida* se ha descubierto que se reproducen sexualmente formando ascas con ascosporas libres (sin cuerpo fructífero) lo que los ubica dentro de la subdivisión Hemiascomycetes, éstas ascas son fácilmente visibles tiñendo los frotis de

cultivos con tinción de verde de malaquita (Figura 1). Hasta el momento no se ha demostrado que las ascas por sí mismas (reproducción sexual) cause la infección.

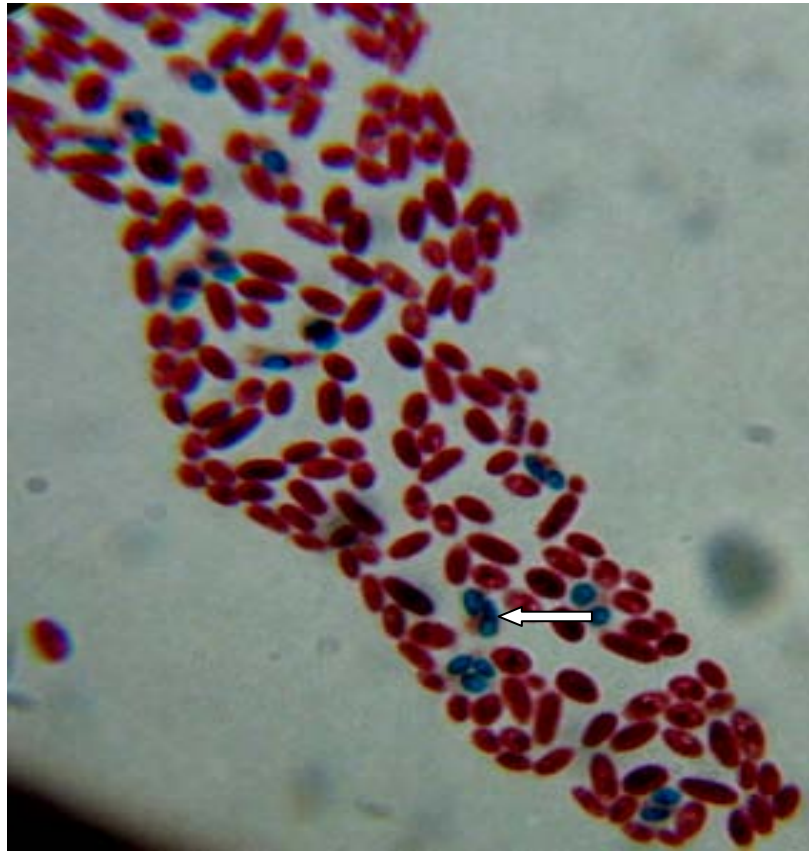


Figura 1. Frotis de *Candida* sp. teñido con verde de malaquita.
Las estructuras de color verde son ascas (forma sexual del hongo)

Especies patógenas

Dentro del género *Candida* nueve especies son consideradas patógenas muy frecuentes en el humano: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. kefyr*, pero existen reportes ocasionales de otras 16 especies que se aíslan con menor frecuencia^{3,6,15}. Cuadro 1

Hábitat

Las levaduras del género *Candida* se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza, pueden habitar en el agua, en las plantas (*C. albugo*) e insectos, en los animales

de sangre caliente, también pueden encontrarse en los alimentos, frutas, fómites, suelo, agua, heces y en la atmósfera ³. Muchas levaduras de este género son biota normal del humano y se localizan normalmente en el tracto digestivo, las mucosas, faringe, ano rectal, vaginal, oído externo y piel ^{19,40,38}.

A partir de las primeras descripciones de levaduras de este género, se han desarrollado gran número de métodos y pruebas fisiológicas y bioquímicas para su correcta clasificación taxonómica. Estos avances han permitido a lo largo del siglo pasado separar muchas especies que originalmente fueron clasificadas como un mismo agente. Un ejemplo de este hecho es el descubrimiento en 1995 por Sullivan DJ y cols. de *C. dubliniensis* que fue aislada de mucosa bucal de pacientes con SIDA y que en principio se creía se trataba de *C. albicans* porque el comportamiento clínico era igual al de esta especie, sin embargo, la respuesta al tratamiento mostraba resistencia a fluconazol y ulteriores pruebas fisiológicas mostraron que se trataba de una nueva especie, como fue descubierta en Dublin, Irlanda, recibió el nombre de *C. dubliniensis*.^{34,35,36}.

Candida dubliniensis inicialmente esta especie fue descrita como atípica de *C. albicans*, basados en las siguientes características:

Similares: a) crecimiento en ADS con antibiótico y ciclohexamida, b) formación de tubo germinativo, pseudohifas y clamidoconidios c) crecimiento a temperatura de 30 a 37°C.

No similares a) Formación de abundantes clamidoconidios en agar harina de maíz o agar harina de arroz, los cuales se disponen en pares, tripletes o racimos en el extremo distal de la hifa b) crecimiento limitado o ausente a 45°C ^{2,8,10,11,32,33,34,35}.

CANDIDOSIS.

Con este término denominamos a la invasión de tejidos superficiales o profundos causada por levaduras del género *Candida*. Como se mencionó previamente, ésta es la infección oportunista más frecuente, tanto en pacientes con inmunidad normal, como aquellos que presentan inmunosupresión. Las infecciones causadas por levaduras de este género pueden afectar cualquier parte del cuerpo, por ese motivo las clasificaciones son muy numerosas, por ejemplo, se pueden dividir de acuerdo al factor predisponente; al tiempo de evolución; a la profundidad; etc., en esta tesis se utilizará una clasificación topográfica^{1,6,34}.

CUADRO 1.- ESPECIES DE *Candida* PATÓGENAS PARA EL HUMANO.

ESPECIES COMUNMENTE INPLICADAS EN INFECCIONES HUMANAS.

<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C. guilliermondii</i>
<i>C. papsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.krusei</i>
<i>C. famata</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. kefyr</i>

ESPECIES POCO COMUNES INPLICADAS EN INFECCIONES HUMANAS.

<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. catenulate</i>	<i>C. chiroptorum</i>	<i>C. ciferrii</i>
<i>C.haemulonii</i>	<i>C.humicola</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>C. lambica</i>
<i>C. incospicua</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. norvegensis</i>	<i>C. pintolopesii</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. rugosa</i>	<i>C lipolytica</i>	<i>C. utilis</i>

Variedades clínicas

Es importante, reconocer que la gravedad de las infecciones es variable, este hecho ha sido demostrado a lo largo de la historia desde la primera descripción clínica de candidosis que se atribuye a Hipócrates. Hoy nadie duda que la candidosis sea una infección oportunista cuya evolución depende principalmente de los factores predisponentes que presente el hospedero y la interacción con los agentes y el ambiente. Cuadro 2. Estos no siempre están asociados a inmunosupresión grave. Por ejemplo, la candidosis bucal presente en un recién nacido sano, es una patología en la que el factor predisponente es la presencia de restos de leche en la boca, muchas horas de sueño durante las cuales la salivación disminuye y en consecuencia hay desarrollo excesivo de las levaduras habitualmente presentes en la boca, estos lactantes “sanos” responden fácilmente al tratamiento y en muy pocas ocasiones hay recidivas. La misma candidosis de localización bucal en un paciente con leucemia, es una patología grave, que puede ser crónica y ser marcador de agravamiento de la enfermedad, estos pacientes habitualmente, no responden al tratamiento y fácilmente, la infección puede diseminarse a otros órganos e incluso causar la muerte del enfermo. Esta obra no tiene la intención de hacer una revisión clínica profunda de la candidosis, pero la aseveración anterior es válida para cualquier tipo y localización de la candidosis ^{4,6,19,24,36}.

Las especies de *Candida* es uno de los cuatro agentes causales más comunes de infecciones nosocomiales y han sido asociadas comúnmente con mortalidad significativa. En la unidad de cuidados intensivos este género, es considerado como el segundo agente causal de infección fúngica en todos los pacientes adultos y neonatos y el primer agente causal de invasión fúngica en pacientes inmunocomprometidos con tumores hematopoyéticos y trasplantados ^{6,12,13,2,24}.

CUADRO 2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA CANDIDOSIS

Mucocutánea

Bucal

Genital

Urinaria

Ocular

Granulomatosa crónica

Profunda (mono-orgánica)

Sistémica

La prevalencia de *Candida* en los humanos como comensal varía considerablemente de acuerdo a la población estudiada, así, la prevalencia de *Candida* colonizando la cavidad oral es alrededor del 6% en personas sanas y aproximadamente 47% en pacientes hospitalizados. Este porcentaje aumenta en pacientes con disminución de linfocitos CD4, VIH positivos, diabéticos, en personas que reciben quimioterapia antineoplásica, y este es mayor en quienes presentan factores locales predisponentes como son tabaquismo o prótesis dental ^{7,13,29,36}.

Epidemiología: frecuencia y factores predisponentes.

La incidencia real de candidosis sistémica se desconoce porque no es una enfermedad de notificación obligatoria. Aunque en algunos países existen estadísticas anuales de las muertes causadas por esta entidad, por ejemplo en Francia y en Estados

Unidos de América (EUA) en el período desde 1990 hasta 2005, las muertes por esta causa aumentaron al doble y el triple respectivamente ^{13,27}. En México, la casuística publicada, generalmente solo incluyen uno o varios hospitales, aún así dan una idea de la frecuencia de esta patología ¹².

Entre las infecciones consideradas como indicadores de enfermedad por VIH se destaca la candidosis del esófago, tráquea y bronquios, que se presentan entre el 80 y 95% de estos pacientes; sin embargo, antes de la aparición del SIDA *Candida* spp. producía infecciones orofaríngeas solamente en el 1% de pacientes inmunocomprometidos ^{6,7,13}.

Cuando *Candida* ingresa al organismo a través de un catéter intravenoso se va a manifestar como candidemia. La incidencia de sepsis asociada al catéter varía de 15 a un 30 % los cocos Gram positivos y las levaduras son los principales agentes etiológicos, en particular *Candida* spp. poseen una gran capacidad de adherencia al plástico (calderón, 1993; benaryeh et al., 1995). En la incidencia de micosis los trasplantes hepáticos está entre 30 y 40 % durante los 30 días posteriores al trasplante ^{6,13} y *C. albicans* es la causante del 70 % de estas infecciones profundas con implicación peritoneal, de las cuales se informa una mortalidad igual o superior al 60 %. Las levaduras del género *Candida* son la causa del 85 % de las peritonitis fúngicas en los pacientes con diálisis peritoneal. ¹³

Los factores que predisponen al hospedero para padecer de una candidosis puede ser exógenos o endógenos, locales o generalizados y temporales o permanente, por lo que es muy difícil mencionarlos todos, a continuación se presenta una lista breve de los factores de riesgo más frecuentes. Cuadro 3

CUADRO 3. FACTORES PREDISPONENTES PARA CANDIDOSIS

ENDÓGENOS	EXÓGENOS
Prematurez, desnutrición	Malos hábitos higiénicos de los encargados del cuidado de los lactantes, se relaciona con dermatitis del área del pañal o candidosis cutáneas extensas
Embarazo, cambios de pH, alteraciones hormonales	Mala higiene bucal
Enfermedades metabólicas como: diabetes	Toxicomanías como el tabaquismo
Enfermedades autoinmunes por ejemplo lupus eritematoso, artritis reumatoide	Cirugías de diversos órganos que condicionan solución de continuidad y debilidad general
Padecimientos oncológicos: leucemias y tumores malignos de órganos sólidos	Tratamientos con antibacterianos de amplio espectro por tiempo prolongado, o uso de anti-inflamatorios esteroides de alta potencia
Deficiencias enzimáticas (déficit de mieloperoxidasa, etc)	Infecciones debilitantes como el SIDA
Fallas inmunológicas inespecíficas (candidosis granulomatosa crónica)	Procedimientos invasivos como: catéteres y sondas vesicales, venoclisis, etc.

Diagnóstico de laboratorio

Si bien, en los inicios de la Micología Médica, la identificación precisa de las especies de *Candida* aisladas de los pacientes era un dato que le interesaba principalmente al personal de laboratorio, en la actualidad es importante para todo el personal médico, epidemiología e incluso los administradores, ya que en base a los diferentes agentes, se deben tomar decisiones importantes para la salud o la compra de insumos para detección o tratamiento. Entre los factores que muestran la importancia de la identificación precisa tenemos:

1. Existen especies intrínsecamente resistentes a los antifúngicos
2. Algunas especies como *C. albicans* con capacidad de formar filamentos son más resistentes a los mecanismos de defensa del cuerpo humano.

3. Permite determinar infecciones nosocomiales y el foco de infección en los brotes epidémicos.
4. Ayuda a establecer mapas epidemiológicos locales, regionales e incluso mundiales

La identificación de las levaduras se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes:

- 1.- Morfológicos.**
- 2.- Bioquímicos.**
- 3.- Inmunológicos.**
- 4.- Genéticos.**

Criterios morfológicos.- Los criterios morfológicos a su vez se dividen en:

- a) Macroscópicos
- b) Microscópicos.

Morfología macroscópica: En este rubro, se valora el aspecto colonial de las levaduras al crecer en los diferentes medios de cultivo. La mayoría de especies crecen fácilmente en todos los medios micológicos, los medios de ADS y ADS adicionado con antibióticos son empleados para el aislamiento primario: sin embargo, estas levaduras se desarrollan bien en gran número de medios como: agar sangre, agar chocolate, agar C.L.E.D, etc.

En el medio ADS las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente, convexas o planas, de consistencia suave, aunque al paso de los días pueden ser pastosas, de superficie lisa o rugosa. Por lo general, no desarrollan micelio aéreo, aunque en ocasiones pueden aparecer prolongaciones aracneiformes en la periferia de las colonias.

Morfología microscópica: Ciertas características microscópicas son muy útiles para la identificación de algunas especies de levaduras. Las más utilizadas en la práctica son las siguientes:

1) Prueba del tubo germinativo.

El tubo germinativo es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. Sólo *C. albicans* y *C. dubliniensis* son capaces de producir verdaderos tubos germinativos; sin embargo, otras especies como *C. tropicalis* pueden producir pseudohifas precoces de aspecto similar a los tubos germinativos pero con una zona de constricción característica.^{2,3,4}

2) Formación de hifas, blastoconidios, clamidoconidios y artroconidios

La formación de hifas, blastoconidios, clamidoconidios o artroconidios por parte de las levaduras constituye una característica morfológica de gran importancia para la identificación de algunas especies de levaduras.

Ante la presencia de estructuras con aspecto de hifas, lo primero que hay que determinar es si se trata de pseudohifas (resultantes del proceso de formación de blastoconidios y, por tanto, con puntos regulares de estrechamiento) o, por el contrario, son verdaderas hifas que se fragmentan en artroconidios.

Las clamidoconidios son formas de resistencia, redondas u ovales, de 6-12 μm de diámetro y pared gruesa, laterales, terminales o en racimo. Su producción es característica y diagnóstica de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.³ También puede hacerse una identificación presuntiva de estas especies si se observa la formación de grupos compactos de blastoconidios, a intervalos regulares, a lo largo de la pseudohifa.^{31,32,33.}

3) Tinciones.

El estudio microscópico de los organismos levaduriformes o microorganismos relacionados (género *Prototheca*) se puede llevar a cabo mediante tinciones, ya sea una tinción simple o una tinción compuesta como la de Gram en la que, estas levaduras se tiñen como Gram positivas. Mediante estas tinciones también se puede observar la formación de blastoconidios, artroconidios, hifas, pseudohifas.

Tinción con azul algodón de lactofenol

Se realizan las preparaciones a partir de cultivos. El fenol destruye la flora acompañante y organismos; el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas y el azul algodón tiñe la quitina de las paredes fúngicas.

Criterios bioquímicos y fisiológicos

Enzimáticos o bioquímicos:

- Medios cromogénicos.- Estos medios están diseñados para el aislamiento e identificación presuntiva de algunas especies del género *Candida* después de su incubación a 30-37 °C, durante 24 a 48 h.^{10,11} El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos.

Estos medios pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o con fines de identificación, después del aislamiento de los organismos levaduriformes en los medios convencionales.

- Auxanograma (Identificación basada en la asimilación de nutrientes).-Se fundamenta en la aplicación por separado de sustratos con un solo azúcar, o compuestos protéicos, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía del nutriente aplicado.
- Activación de coagulación.- El (1-3) β -D-glucano es un componente de la pared celular de la mayoría de los hongos, exceptuando *C. neoformans* y hongos zigomicetos. El compuesto mencionado, es capaz de activar la vía de la coagulación de los amebocitos de *Limulus* activando el factor G, y generando componentes coloreados usando reactivos diazo. En la mayoría de laboratorios, la capacidad de coagulación, no es empleada como criterio taxonómico, sin embargo, existen dos equipos comerciales: FungitecC® (FungitecG, Japón) y GlucateLL® (Associates of Cape Cod Ind. USA), que hacen uso de esta propiedad. Estos sistemas tienen una sensibilidad del 90% y especificidad del 100%. Los falsos positivos se presentan en las siguientes situaciones: hemodiálisis con membranas de celulosa o albúmina; tratamiento con inmunoglobulinas, antitumorales o sulfamidas.
- Asimilación de xilosa y metil-a-D-glucósido son los dos carbohidratos para diferenciar entre *C.albicans* y *C. dubliniensis*.^{8,40} Sin embargo, de acuerdo con diversos autores usando solo estos métodos no es suficiente para confirmarla identificación de *C. dubliniensis* y es importante realizar las pruebas fenotípicas. Otros métodos recientemente descritos por Valenza y cols. Evalúan la utilidad de Vitek2® 2 Yeats identificación card para la identificación de *C. dubliniensis*.^{8,20,23,40}

Fisiológicos:

- Termotolerancia.- *Candida albicans* es la única especie del género *Candida*, que tiene la capacidad de desarrollarse a 45 °C, el resto de especies de este género no se desarrollan a esa temperatura.^{3,9}
- Desarrollo en medios hiperosmolares.- *Candida albicans*, es la especie que tolera las concentraciones más elevadas de NaCl y H₂O₂.

3. Criterios inmunológicos. Los diferentes antígenos que producen las levaduras del género *Candida*, pueden ser detectados por medio de anticuerpos tanto *in vivo* como *in vitro*. Por estas técnicas sabemos por ejemplo que en *C. albicans* existen el serotipo A y el serotipo B.

4. Criterios moleculares (DNA, RNA). Aunque las técnicas moleculares, han demostrado su utilidad en diversos estudios de investigación, aún no se emplean de manera habitual en los laboratorios de micología. Entre las técnicas disponibles se cuenta con: PCR en sus diferentes modalidades.^{4,15}

Sensibilidad antifúngica

La historia del tratamiento de las micosis, se remonta al siglo XIX cuando se utilizó por primera vez el yoduro de potasio, medicamento que más que un antimicótico, es un inmunomodulador. En la década de los 50 del siglo pasado, se sintetizó la anfotericina B antimicótico fungicida del grupo de los polienos, que se une a los esteroides de la membrana fúngica y altera su permeabilidad. Dos décadas más tarde, se comercializan los primeros compuestos azólicos, éstos que inhiben la síntesis de ergosterol. Como es habitual, en los primeros años de comercialización de un nuevo medicamento, la respuesta terapéutica era

muy efectiva, sin embargo, a partir de 1980 se publican numerosos casos de falla terapéutica, esto motivó que se desarrollaran nuevas líneas de investigación para conocer la causa de estos fracasos.^{5,37,39}

Entre las principales causas de falla terapéutica los investigadores encuentran que en muchos casos hay resistencia a los antifúngicos por cambios adaptativos que presentan los hongos.^{7,30} Esta resistencia puede dividirse en dos categorías: clínica y microbiológica a su vez, estas se subdividen en primaria o secundaria. La resistencia clínica se presenta por el fracaso del tratamiento antifúngico y no necesariamente se asocia con una disminución en la sensibilidad *in vitro*. La resistencia *in vitro* primaria (intrínseca o innata), es la que presenta el microorganismo de forma natural (sin exposición previa), es decir la prueba de sensibilidad de un determinado hongo a los antifúngicos *v.g.* *C. glabrata* es resistente intrínsecamente a fluconazol (Quindos). La resistencia *in vitro* secundaria (adquirida), aparece cuando un microorganismo que inicialmente es sensible, al exponerlo a diferentes drogas antifúngicas adquiere resistencia, por ejemplo la resistencia que desarrolla *C. dubliniensis* a fluconazol.^{20,21,25}

La detección frecuente de casos de resistencia antifúngica ha obligado a desarrollar y normalizar pruebas de sensibilidad antifúngica. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)”, publicó el documento M27-A donde se establecen las pautas para realizar los estudios de sensibilidad antifúngica por medio de macro y microdilución de hongos levaduriformes, dichas normas hasta el momento están vigentes, y se han ido modificando el documento utilizado hoy día es el M27-A3.²¹

En la actualidad disponemos de diferentes métodos para valorar la sensibilidad de los antifúngicos. Las casas comerciales hacen uso de los resultados y lineamientos dictados por el CLSI y desarrollan métodos comerciales fáciles de realizar para aplicación en gran

número de pacientes en menor tiempo, entre los más utilizados tenemos: Neosensitab®, Sensititre®, Fungitest®, E- test®, Vitek2®.^{8,20,23,37,41}

En relación al Vitek2®, los antimicóticos que evalúa son: fluconazol, voriconazol, 5-fluocitocina y anfotericina B. La tarjeta de Vitek2® 2 AST- YS01 aprobada por la FDA con CMI como se menciona a continuación 1 a 64 µg /ml para el fluconazol y 5 fluocitocina, 0,125 a 8 µg/ml para el voriconazol.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en todos los países la frecuencia de micosis oportunistas se ha incrementado. Entre estas micosis, la más frecuente es la *candidosis*, desde las superficiales que curan con tratamiento tópico y medidas generales de higiene; hasta las invasiones sistémicas, muchas veces mortales que se presentan en pacientes inmunosuprimidos.

En el CMN SXXI, la clasificación taxonómica de los cultivos es inexacta ya que, los equipos automatizados que se emplean, son incapaces de clasificar algunas especies, entre ellas, *C. dubliniensis*, agente que en diversos estudio, ha mostrado resistencia hacia los antifúngicos.

En trabajos previos, se ha demostrado que aislados de *Candida* de pacientes del CMN SXXI presentan resistencia antifúngica hasta en 27.5%, se desconoce si el incremento de fallas terapéuticas observadas en pacientes de estos hospitales se debe a que sean causadas por *C dubliniensis*, por lo tanto, es importante conocer la frecuencia y sensibilidad de esta especie en los aislados de nuestros pacientes.

OBJETIVOS:

- 1) Conocer la frecuencia de aislamiento de *C. albicans* y *C. dubliniensis* en los pacientes hospitalizados de las UMAEs de Hospital de Cardiología, Hospital de Oncología y Hospital Especialidades pertenecientes al CMN SXXI
- 2) Determinar el perfil de sensibilidad antifúngica en los aislados de *C. dubliniensis*

DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO: Transversal.

Criterios de inclusión:

Aislamientos fúngicos de pacientes del CMN S XXI, identificados como *C. albicans* por auxanograma y zimograma

Criterios de exclusión:

Todos los aislamientos no identificados como *Candida albicans* por auxanograma y zimograma.

Limitantes del estudio:

No se incluyeron todas las cepas, por problemas técnicos en la recolección.

RECURSOS FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD.

Humanos

- Un micólogo médico
- Una residente 3º año de la especialidad de Patología Clínica

Una investigadora titular del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina UNAM.

Un químico adscrito al Laboratorio Central del Hospital de Especialidades

Instalaciones

Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología, UMAE Hospital de Especialidades

Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

Financiamiento

No se recibió ningún apoyo. Los materiales y equipos empleados, pertenecen a los laboratorios mencionados

Materiales empleados

Medios de cultivo: agar dextrosa Sabouraud simple, agar dextrosa Sabouraud adicionado con antibiótico, agar harina de maíz, agar caseína, agar tabaco, agar Staib, CHROMAgar®, agar papa dextrosa.

Reactivos

Tarjetas para identificar especies de *Candida* (ID, YST VITEK2®), tarjetas sensibilidad antifúngica (AST YST VITEK2®),

Equipos: incubadora, microscopio, equipo Vitek2®.

ASPECTOS ÉTICOS.

En base al artículo 17 de la ley General de Salud, se considera investigación sin riesgo, por lo que no aplica el consentimiento informado establecido en la Comisión de Ética, y en el artículo 23 de la ley General de Salud.

En lo que se refiere a las instalaciones, el Laboratorio de Micología cumple con los requisitos de Bioseguridad de Laboratorio Clínicos y la Ley General de Salud, establecidos en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 75 y 98.

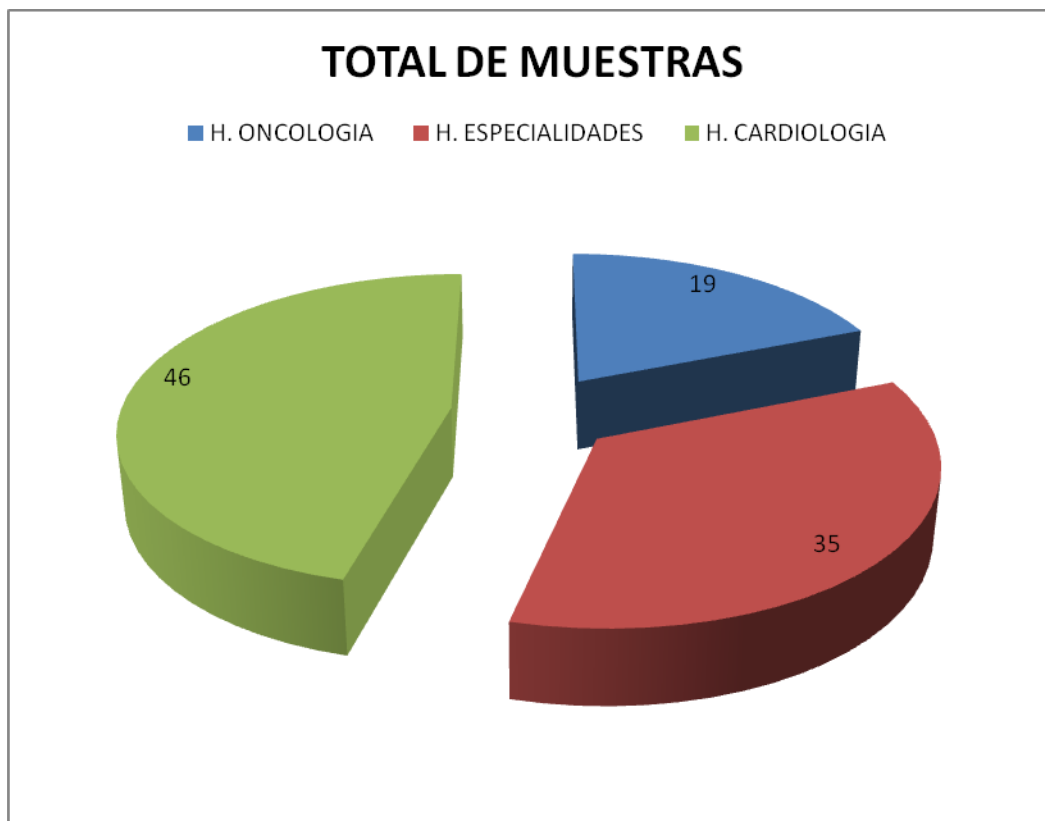
MATERIAL Y METODOS

a) Material

De los centros de estudio, a partir de diversos especímenes, se incluyeron 100 aislados tipificados como *C. albicans*, recolectadas del 4 de octubre de 2009 a 28 de febrero de 2010 el número de muestras de cada centro se muestra en la Gráfica 1. Todos los aislados identificados como *C. albicans* provenían de personas mayores de 18 años.

Grafico1.

Grafica 1. Número de aislados de acuerdo a la UMAE de procedencia



b) Métodos.

Se han desarrollado varios métodos basados en las características fenotípicas para identificar a las especie de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. Entre ellas podemos citar la variación de color en medios con sustratos cromogénicos (CHROMagar *Candida*, *Candida*

ID2), la capacidad de termotolerancia, los patrones de asimilación de carbohidratos, el color, el aspecto de las colonias y la producción de clamidoconidios en diferentes sustratos, la producción de un halo de opacidad en medios con Tween 80.

Por la experiencia que se tiene en trabajos previos sobre la identificación fenotípica de *C. dubliniensis* realizados en el laboratorio de micología médica de la facultad de medicina en este estudio, las pruebas utilizadas fueron las que se muestran en la Figura 2. y se interpretaron de acuerdo a los criterios de Cuadro 4

Figura 2. Flujograma para la reclasificación de los aislados.



Medio de agar harina de maíz. Por la técnica de Dalmau, la cual consiste en inocular el aislado de *Candida* trazando dos líneas verticales sobre el agar a 1 cm de separación y colocar un cubreobjetos estéril e incubar a 28 a 30 ° C durante 72 horas, la lectura se realizó directamente colocando la caja de Petri al microscopio sin retirar el

cubreobjetos con el objetivo de 10X y 40X, se observa la producción de clamidoconidios
Figura 3.



Figura 3. Inoculación en agar harina de maíz técnica de Dalmau.

Medio de agar tabaco. Se realiza la siembra por puntilleo sobre el agar y se incubó a 30°C durante 72 horas. se analizó la morfología macroscópica de las colonias: la presencia de halo (regular o festoneado), el color (blanco o dorado) y el aspecto (liso o rugoso). Figura 4. La morfología microscópica se realizo con azul de algodón para observar la producción de clamidoconidios¹⁴.

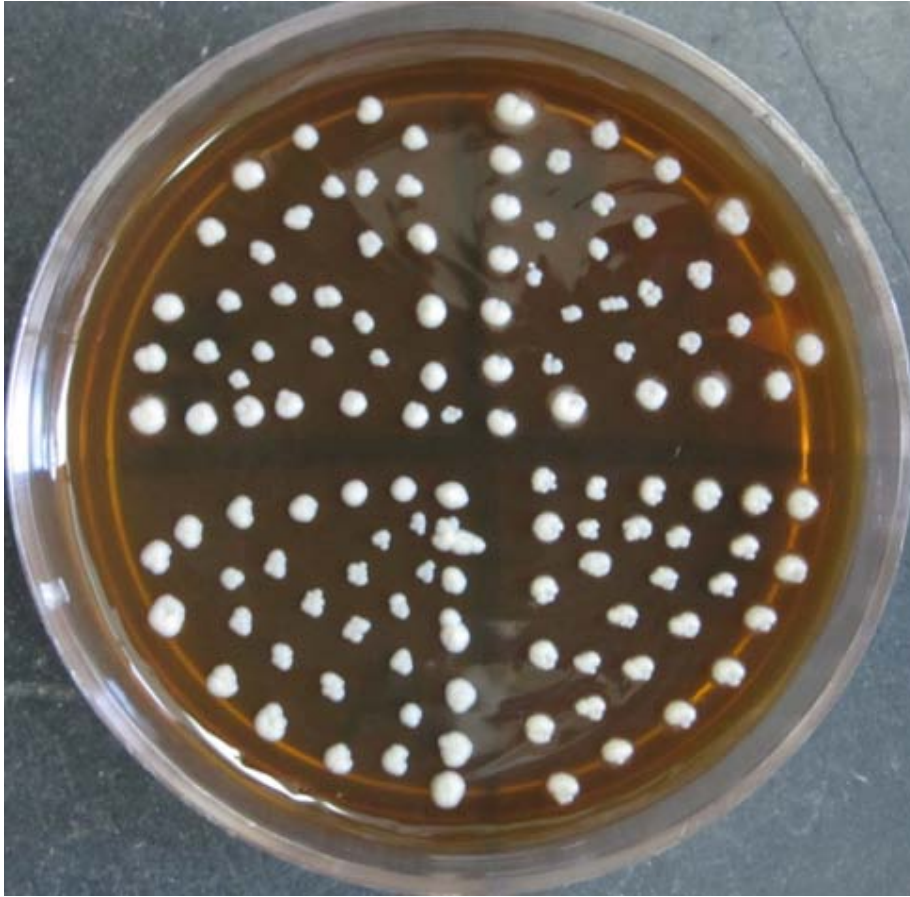


Figura 4. Aspecto típico de un medio de agar tabaco inoculado con la técnica puntilleo

Medio de Staib. Con un palillo estéril se tomo una colonia de 24 horas de crecimiento en ADS a 30°C, se sembró sobre la superficie del agar Staib por la técnica de puntilleo se incubo a 30°C durante 48 horas. Figura 5. Posteriormente se estudio la morfología macroscópica de la colonia, tomando en cuenta los siguientes parámetros aspecto y formación de una zona filamentosa alrededor de la colonia, microscópicamente la formación de clamidoconidios.^{32,33,34}



Figura 5. Aspecto en agar Staib inoculada mediante la técnica de puntillero.

Medio de caseína. Al igual que en los medios antes mencionados se realiza la inoculación en la caja de Petri por puntillero para observar la formación de un halo filamentoso el cual puede ser periférico abundante, periférico escaso, solo lateral Figura 6 Posteriormente se realiza un examen directo de esta zona y observa en el microscopio a 40x, las clamidioconidios.^{31,35}



Figura 6. Agar caseína inoculado con 4 cepas de *Candida* spp.

Termotolerancia. De cada aislado, con una asa bacteriológica se tomo una porción de las colonias a estudiar crecidas en SS a 30°C y se suspendieron en un tubo con solución salina estéril al 0.85%, hasta tener una concentración de 10^5 UFC/ ml de la suspensión se tomo 1 μ l, se colocó en la caja de Petrí en medio de agar papa dextrosa, se extendió sobre la superficie por la técnica de estría cerrada. Los medios de cultivo ya inoculados se incubaron a 45°C durante 48 horas, positivo: *C. albicans* muestra un desarrollo óptimo, mientras que, *C. dubliniensis* tiene un desarrollo escaso o nulo.^{3,6,9,33}

Cuadro 4. Interpretación de pruebas fenotípicas

PRUEBA	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tubo germinativo	Si	Si
AHM (Clamidoconidios)	Si, terminales	Si en racimo o dobles
Agar tabaco (color, aspecto, Halo, clamidoconidios)	Blanca ,lisa, no produce clamidoconidios, halo periférico	Dorada, rugosa, si produce clamidoconidios en racimos.
Agar Staib (clamidoconidios)	Si, únicos o escasos dobles	Si, en racimos
Agar caseína (clamidoconidios)	Si, únicos o escasos dobles	Si abundantes en racimos
Termotolerancia 45 ^o c en APD	Si	No

2). Estudios de sensibilidad antifúngica.

El estudio de sensibilidad se realizó de acuerdo al sistema automatizado Vitek2®, en el cual se introduce un inóculo de 24 hrs de desarrollo , se preparó una suspensión estandarizada para introducirla en el equipo con las tarjetas de identificación y sensibilidad, la tarjeta de sensibilidad contiene 64 pocillos, en los cuales están los antifúngicos a diferentes concentraciones , las tarjetas se incuban en un compartimento cerrado con temperatura controlada, se realizan las lecturas ópticas cada 15 minutos para medir la cantidad de luz transmitida a través de cada pocillo.(Figuras 3,4,5)

El análisis algorítmico de la cinética de desarrollo en cada cubeta se realiza por el programa del sistema para calcular los datos de CMI se convalidan con el programa

Advanced Expert System, se les asigna una categoría de interpretación y se informan los patrones de resistencia a antifúngicos de el microorganismo. ^{8,20,23,37,41}



Figura 7. Registro de código de barras de tarjetas se sensibilidad.

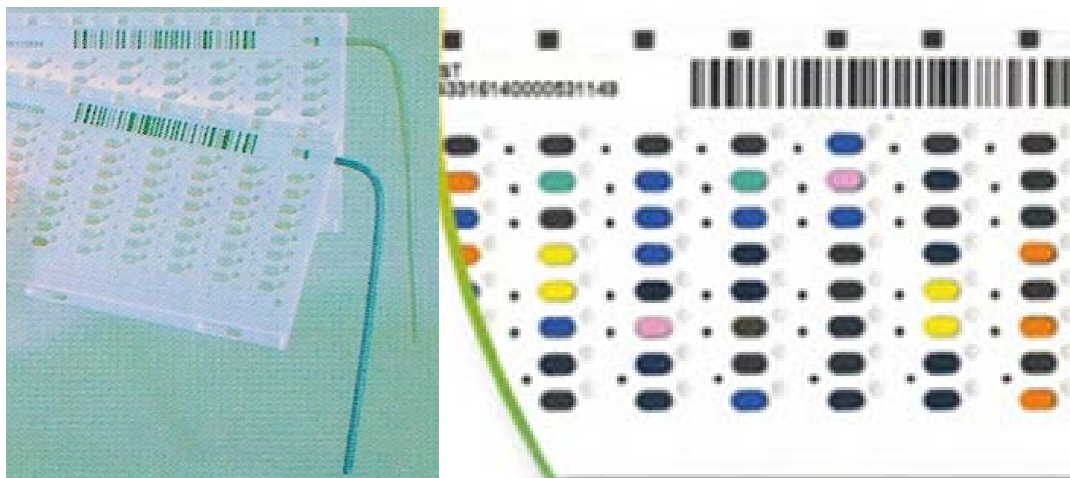


Figura 8. Tarjetas de sensibilidad AST –YS01



Figura 9. Equipo Vitek2®

RESULTADOS.

De los 100 aislados estudiados solo 4 cumplieron con los parámetros morfológicos establecidos para la identificación de *C. dubliniensis*, 3 pacientes fueron del hospital de Especialidades y 1 de el Hospital de Oncología.

Para la interpretación de los resultados se realizaron exámenes directos de las diferentes pruebas antes mencionados para la observación al microscopio con las tinciones ya citadas, según el predominio de clamidoconios y el medio de cultivo , se reportó en una hoja Excel de la siguiente manera utilizando los siguientes parámetros: (-) es ausente, (-/+) escaso , (+) mínimo, (++) regular y (+++ y ++++) abundante.. Para considerar que se trataba de *C. dubliniensis* o *C. albicans* se tomaba en cuenta que presentara positiva a las pruebas de acuerdo a los criterios fenotípicos ver cuadro 5. Todas las pruebas se realizaron por duplicado en las que se observo reproducibilidad de resultado Cuadro 6. A continuación se muestra un ejemplo del reporte de resultados. Así como la imagen tubo germinativo positivo Figura 10.

Cuadro 5- Reporte de resultados hasta la identificación fenotípica de *C. dubliniensis*.

NO.	T. G	HARINA DE MAIZ			CROMagar®	AGAR TABACO					
		CLAMIDOCONIDIAS				ASPECTO	CLAMIDOCONIDIAS			OP FILAMENTO	
		UNICAS	DOBLES	RACIMO			UNICAS	DOBLES	RACIMO		
1	+	-	-	+++	VERDE OSCURO	LISA	-	-	++++	SI	FILAMENTO EN PARCHES
2	+	+	-	-	VERDE CLARO	LISA	++	-	-	SI	PERIFERICO LARGO
3	+	-	+	-	VERDE CLARO	LISA	++	++	-	SI	PERIFERICO LARGO

	AGAR STAIB					AGAR CASEINA					TERMOTOLERANCIA	IDENTIFICACION FENOTÍPICA
	ASPECTO	CLAMIDOCONIDIAS			OP	ASPECTO	CLAMIDOCONIDIAS			OP	CRECIMIENTO	
		UNICAS	DOBLES	RACIMO			UNICAS	DOBLES	RACIMO			
1	LISA	-	-	+++	SI	LISA	-	-	++++	SI	-----	<i>C. dubliniensis</i>
2	LISA	++	-	-	SI	LISA	++	-	-	SI	++++	<i>C. albicans</i>
3	LISA	++	-	-	SI	LISA	++	+	-	SI	++++	<i>C. albicans</i>



Figura 10. Tubo germinativo positivo.

Observación microscopica de AHM en 400x.

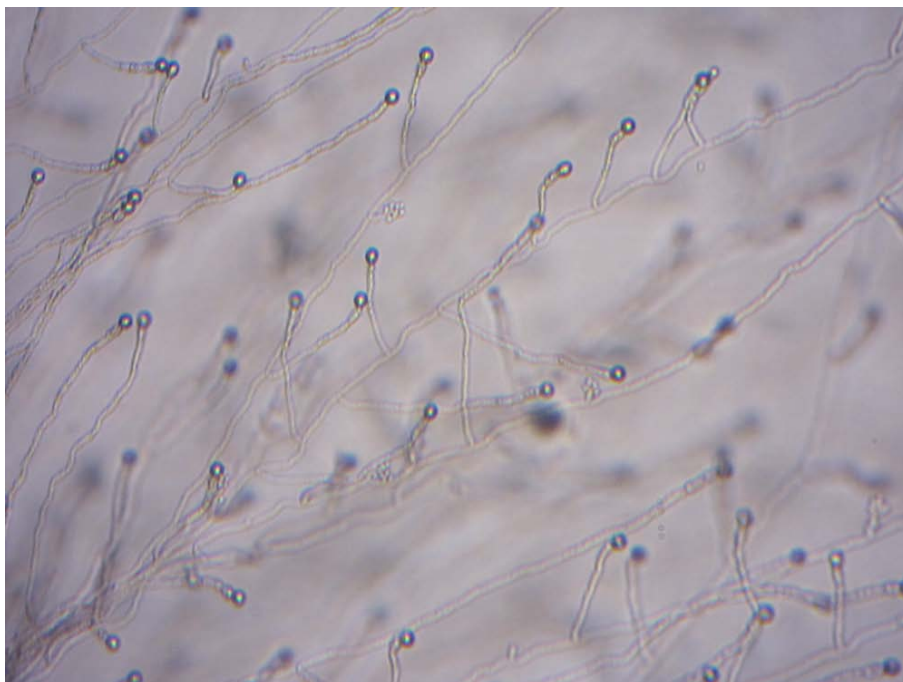


Figura 11. Clamidoconidios únicos terminales, característicos de *C. albicans*.

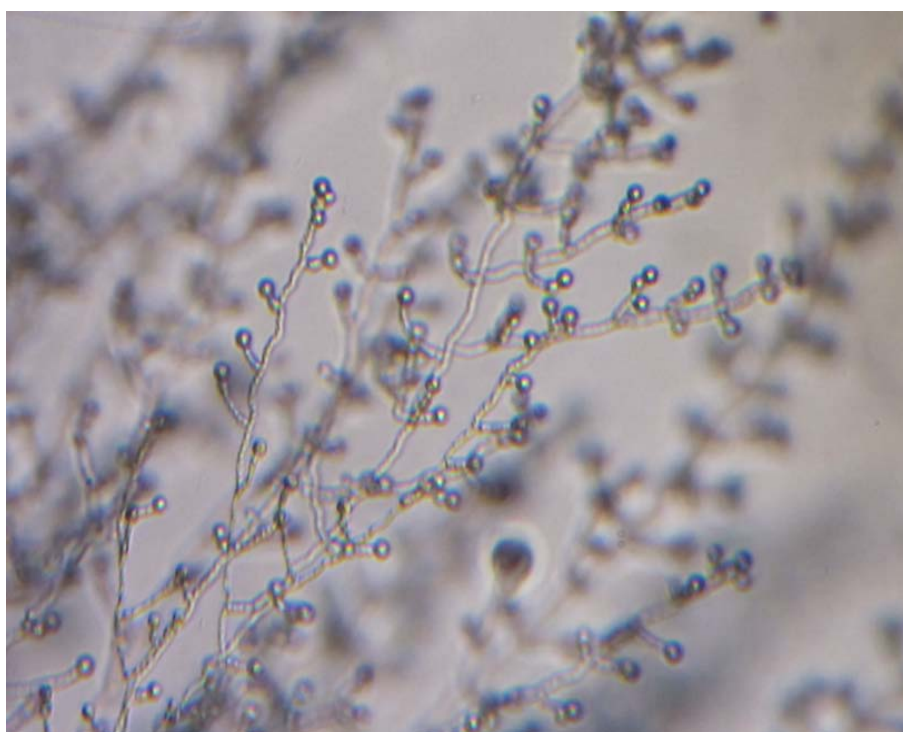


Figura 12. Clamidoconidios dobles y abundantes característicos de *C. dubliniensis* crecida en medio de AHM.

Para la interpretación en agar tabaco, además de la producción de clamidoconidios se considero el aspecto colonial, el halo de opacidad y las características del mismo, siguiendo el reporte gráfico según lo observado al microscopio cómo se mencionó anteriormente. En las Figura 13y 14 se presentan imágenes macroscópicas de agar tabaco.



Figura13. Halo completo y superficie lisa de una colonia de *Candida* sp.



Figura 14. En esta imagen, destaca el aspecto rugoso y el halo visible en toda la colonia de *C. dubliniensis*. Los clamidoconidios se encuentran en la periferia de las colonias.

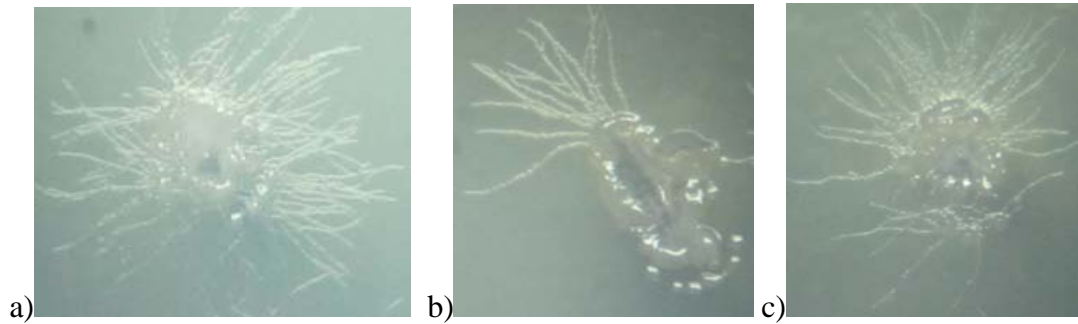


Figura 15a – c. Acercamiento de las colonias en agar caseína, con los diferentes tipos de halo.

En cuanto al examen microscópico de los clamidoconidios, es el mismo para los medios de agar tabaco, agar Staib y agar caseína por lo que a continuación se muestra los diferentes tipos de clamidoconidios, que se pueden encontrar. Figura 16.

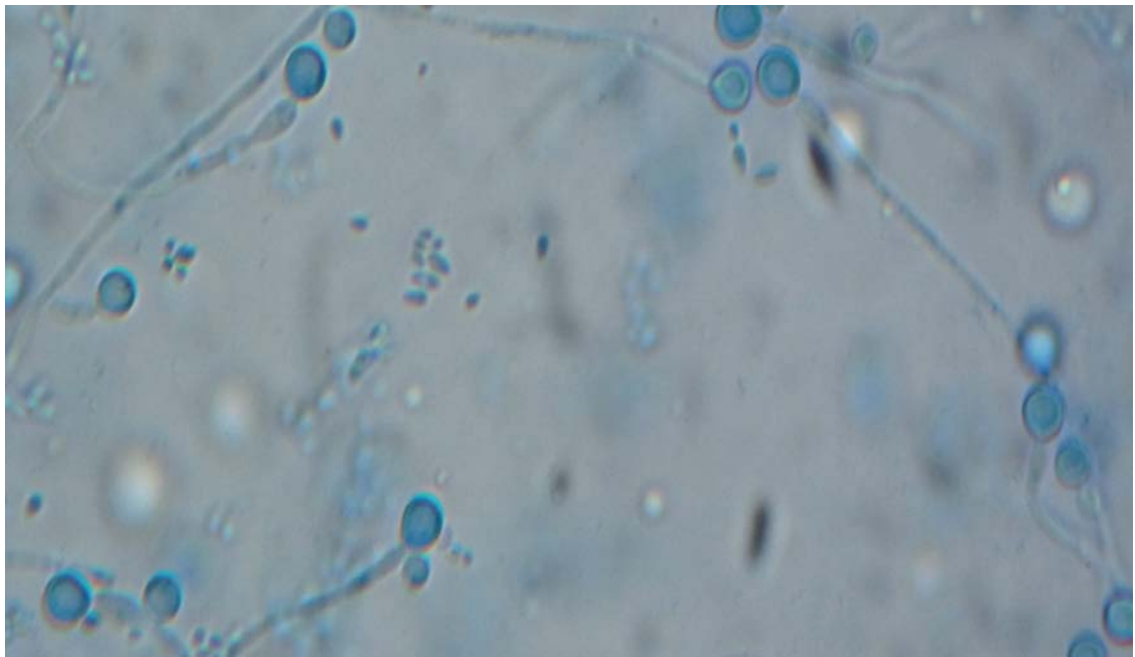


Figura 16. Clamidoconidios únicos característicos de *C. albicans*.

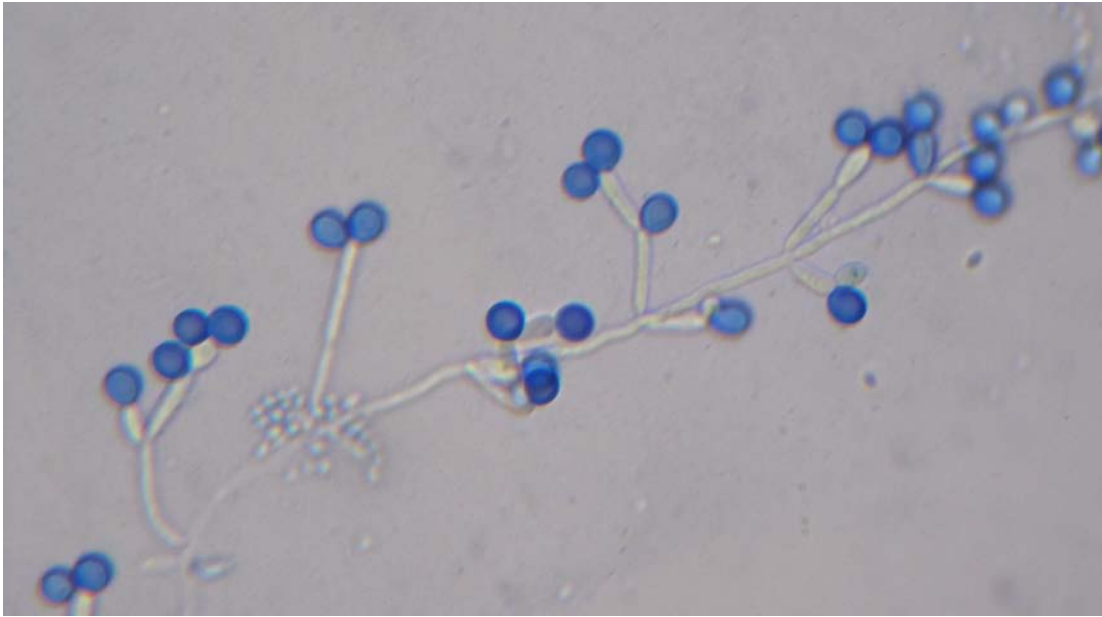


Figura17. Clamidoconidio dobles encontrados en *C. dubliniensis*.

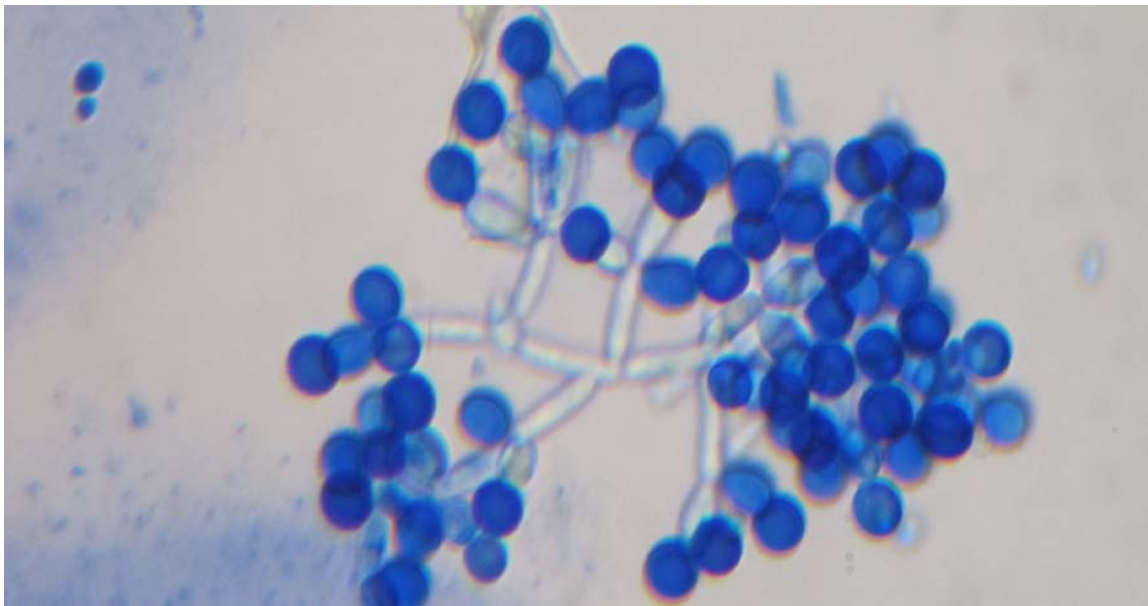


Figura 18. Clamidoconidios en racimo presentes en *C. dubliniensis* crecida en agar tabaco, caseína y Staib.

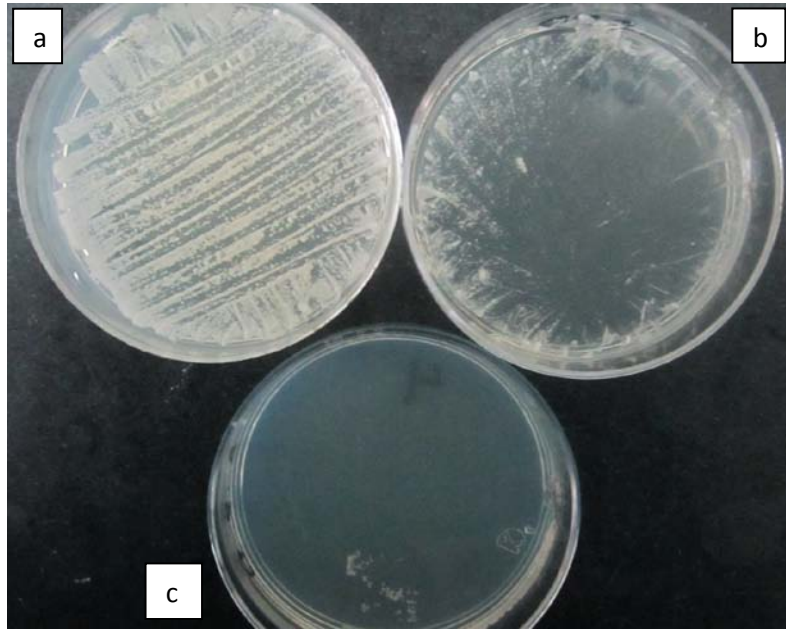


Figura 19. Termotolerancia en APD. En la imagen superior izquierda se observa crecimiento abundante que correspondería a *C. albicans*, mientras que la superior derecha tiene crecimiento escaso y la inferior nulo que corresponden a *C. dubliniensis*

De acuerdo a los criterios utilizados el resultado de las cepas identificadas como *C. dubliniensis* se muestra en la Figura 20.

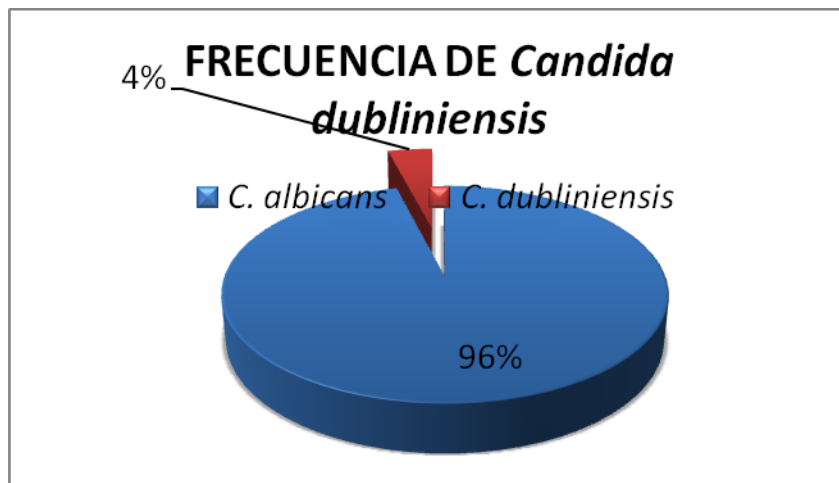


Figura 20. Resultados de frecuencia de *C. dubliniensis*.

En cuanto a la sensibilidad antifungica no se realizó grafico debido a que no es ilustrativo, ya que de acuerdo al equipo empleado, todos los aislados tuvieron una sensibilidad de 100%.

DISCUSIÓN

Desde las primeras descripciones de frecuencia de *C. dubliniensis*, la mayoría de publicaciones menciona una frecuencia inferior a 10%, en este estudio, a frecuencia encontrada fue de 4%, porcentaje similar a lo reportado en otros países, Argentina, Venezuela, E.U España. En otros estudios realizados en pacientes con infección por VIH, se ha reportado el 6% de frecuencia Argentina y E.U ^{13,27,34}. En México, el reporte de Manzano-Gayosso y cols, de aislados levaduriformes de orina de pacientes diabéticos, se encontró una frecuencia de 8.7%.²² Por otro lado en un estudio de onicomycosis causada por *C. dubliniensis* se encontró el 1.2%. En México no existen reporte de estudios realizados en aislados de pacientes con VIH y *C. dubliniensis* ²⁹.

La importancia de identificar a *Candida dubliniensis*, radica no solo en conocer la distribución geográfica de los agentes, sino que también permitirá establecer el perfil de sensibilidad de esta especie en población mexicana ya que en varios estudios publicados en países tan diversos como Uruguay, España, Argentina, EUA, se ha demostrado que ésta especie capaz de desarrollar resistencia *in vitro* al fluconazol de manera rápida ^{5,7,13,16,25,41}; mientras que en trabajos realizados a partir de aislados de pacientes mexicanos han mostrado ser sensibles con el método E- Test. Y microdilución en placa.^{16,17}

Entre las causas de resistencia antifúngica tenemos: 1) el uso de drogas antimicóticas por largo tiempo, bien sea con fines terapéuticos o en forma profiláctica; 2) el tratamiento empírico con antimicóticos de lesiones cutáneas en piel u otros órganos que no tienen una etiología fúngica; 3) la variabilidad genética que presentan algunas levaduras, por ejemplo *C. glabrata*, es intrínsecamente resistente a fluconazol. Además de incrementar la resistencia, el uso inadecuado de antifúngicos, expone al paciente a todos los efectos indeseables de las drogas empleadas e incrementa los costos de atención.¹⁶

Actualmente, la elección de antifúngicos, se realiza en base a la identificación del género y especie de *Candida*, a pesar de que desde hace más de una década existen pruebas de sensibilidad antifúngica, en la mayoría de hospitales de México, incluyendo al CMN estos estudios no se realizan, debido al volumen de pacientes atendidos y la gravedad de muchos casos de candidosis.

El CLSI sigue considerando la microdilución en placa como el método estandarizado de referencia para la sensibilidad antifúngica. Sin embargo, este método es complejo y laborioso para utilizarlo como un método de rutina.²¹

En nuestro estudio son concordantes los resultados de sensibilidad de *C. dubliniensis*, con los estudios previos realizados en población mexicana con diferentes métodos¹⁸. Sin embargo, no existe concordancia de otros estudios de sensibilidad de aislados de *Candida* spp. realizados con el método de microdilución en placa. Aunque la CLSI, ha dado su aval de confiabilidad para sistemas Vitek2®, E-test® y Fungitest®^{8,20,23,37,41}, las razones para esta falta de concordancia podrían ser: 1) que los equipos utilizados no están calibrados adecuadamente; 2) que los reactivos no tengan conservación adecuada; 3) manejo inadecuado del equipo por el personal encargado. Será importante, comparar estos resultados de estos aislados con lo que se obtenga por el método de microdilución en placa.

CONCLUSIONES

- El porcentaje de *C. dubliniensis* es similar a lo reportado en otros países, que comparte características económicas y socioculturales con México.
- Las pruebas fisiológicas siguen siendo la alternativa válida para los laboratorios que no cuentan con metodologías moleculares para diagnóstico micológico
- Las fallas terapéuticas observadas en pacientes con candidosis del CMN S XXI, no se deben a la existencia de un porcentaje elevado de *C. dubliniensis* (4% del total).

APENDICE.

NOTA: ESTE FORMATO NO APLICA PARA EL SIGUIENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, YA QUE NO INTERVIENE EN LA INTEGRIDAD NI VARIANTES FISIOLÓGICAS DE LOS PACIENTES A ESTUDIAR.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Lugar y fecha:- _____

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número: _____

El objeto del estudio es : _____

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

Declaro que se me han informado ampliamente sobre los posibles riesgos: -

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR

TESTIGOS

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. Introductory mycology. Third edition. John Wiley and Sons. New York, London. 1979.
2. Asmaa al Mosaid, Derek Sullivan, Ira F. Salkin, Diarmuid Shanley, and David C. Coleman. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Acid-Ferric Citrate Agar. J Clin Microbiol, 2001;1:323-7.
3. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeast-characteristics and identification. 2a. ed. New York: Cambridge University Press; 1991.
4. Coleman, D. C., D. J. Sullivan, D. E. Bennett, G. P. Moran, H. J. Barry and D. B. Shanley. Candidosis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. AIDS 1997;11:557-67.
5. Cowen LE, Anderson JB y Kohn LM. Evolution of Drug Resistance in *Candida albicans* Ann Rev Microb 2002; 56: 139-65.
6. Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. En: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, editores. Clinical Mycol. Francia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009. p. 197-229.
7. Dilek Satana*, Gonca Erkose Genc and Zayre Erturan. 2010. The antifungal susceptibilities of oral *Candida* spp. isolates from HIV-infected patients. Afr Journal Microbiol Research 4(6): 466-470.
8. Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll Dr. Identification of *Candida dubliniensis* Based on temperature and utilization of Xylose and α -methyl-D-glucoside as determinate with the API 20C AUX and Vitek2® YCB systems. J Clin Microbiol 1999;37:3804-08.
9. Guarro J, Gené J, Atchigel A. Developments in fungal taxonomy. Rev Clin Microbiol 1999;12:454-500.
10. Guisiano GE, Mangiaterra ML. Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio ChroMagar *Candida*. Rev Argent Microbiol 1998;30:100-03.
11. Guisiano GE, Mangiaterra ML. Diferenciación e identificación presuntiva rápida de levaduras con el medio CROM-agar®. Rev Argent Microbiol 1998;30:100-3.
12. Hernández- Hernández F, Córdova- Martínez E, Manzano- Gayoso P, López – Alvarez R, Bazán- Mora E, López-Martínez R, Frecuencia de las micosis en pacientes inmunosuprimidos en un hospital regional de la ciudad de México. Salud Pub Mex 2003; 32:1-6.

13. Kantarcioglu AS, Yucel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol* 2002;19:44-8.
14. Khan ZU, Ahmad S, Mocadas E, Chady R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4796-8.
15. Kreger-Van Rij NFM: The yeast taxonomic study. Elsevier 1984;4:70-390.
16. Maldonado B, Reviákina V, Bukonja A, Dolande M, Febres C (1996). Susceptibilidad in vitro de levaduras a drogas antifúngicas. En: XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Caracas. Venezuela.
17. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar, Hernández-Hernández F, *et. al.* La resistencia a los antifúngicos un problema emergente en México *Gac Med Mex.* 2008; 144:23-6.
18. Méndez Tovar Luis J, López Martínez R, Hernández F, 2010. Actualidades en micología Médica.233-258.
19. Méndez Tovar Luis J, López Martínez R, Hernández -Hernández F, 2010. Actualidades en micología Médica.27-38
20. N. Bourgeois, L. Dehandschoewercker, S. Bertout, *et al.* Antifungal Susceptibility of 205 *Candida* spp. Isolated Primarily during Invasive Candidiasis and Comparison of the Vitek2® 2 System with the CLSI Broth Microdilution and Etest Methods, *J Clin Microbiol* 2010;13:154–161.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 2nd ed., M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
22. Patricia Manzano-Gayosso Francisca-Hernández-Hernández, Nancy-Zavala-Velásquez, Luis Javier Méndez-Tovar, J. Miguel Naquid-Narváez, Josep M. Torres-Rodríguez, Rubén López-Martínez. 2008. Candiduria en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Sensibilidad antifúngica in vitro. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2008; 46 (6): 603-610
23. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, G. W. Procop, and M. G. Rinaldi. . Multicenter comparison of the VITEK2® 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3522–3528.
24. Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2093-5.

25. Quindos G. Susceptibility in vitro de *C. dubliniensis* a los agents antifúngicos actuales. Rev Clin Microbiol. 2000; 46:395-401.
26. Rex, J. H., M. A. Pfaller, T. J. Walsh, V. Chaturvedi, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, L. L. Gosey, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, D. J. Sheehan, and D. W. Warnock. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Rev Clin Microbiol. 2001;14:643-658.
27. Salkin IF, Pruitt WR, Padhye AA, Sullivan D, Coleman D, Pincus DH, Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered from the United States. J Clin Microbiol 1998;36:1467-70
28. Salvador Martínez-Cairo Cueto.1996. Metodología de la investigación clínica, Instituto Mexicano del Seguro Social 2ª. Ed.
29. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G .Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral Candida isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. Rev Iberoam Micol. 2005;22:83-92.
30. Silva V.V; Díaz M,C Frebe N, Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifungicos. Rev Chil Infect 2002;19:149-56.
31. Slikfin M. Tween 80 Opacity test responses of various *Candida* Species. J Clin Microbiol 2000; 38 4626-28.
32. Staib P.Chlamydospore formation on staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. Mycoses 1999; 42:521-24.
33. Sullivan DJ, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. J Clin Microbiol 1998;36:329-34.
34. Sullivan DJ, Moran G, Donnelly M, et al. *Candida dubliniensis*: An update. Rev Iberoam Mycol 1999;46: 72-6.
35. Sullivan DJ, Westerpeng tj, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV- infected individuals. Microbiol 1995;141:1507-21.
36. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapci I, Güven GS, Sahin GO, Uzun O , Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV positive patients. Mycoses 2005;48:197-201.
37. Thomas e. Rogers and John N. Galgiani. Activity of Fluconazole (UK 49,858) and Ketoconazole against *Candida albicans* In Vitro and In Vivo. Antimicrobial agents and chemotherapy, J Bacteriol,1986;4:418-22.

38. Torres Rodríguez, J.M. Candidosis sistémica Cap. 17 En: Micología Médica Masson S.A. Barcelona. 1993.
39. Torres, J.M. Actualización en antimicrobianos. Estado actual de los antifúngicos de uso sistémico. Rev Esp 1992;5: 162-169.
40. Wickerham LJ, Burton KA. Carbohydrate assimilation test for the classification of yeasts. 1998;56:363-71.
41. Zambardi, G., D. Parreno, V. Monnin, A. Fothergill, L. Hurt, A. Bassel, D. McCarthy, I. Canard, and J. Slaughter. 2005. Rapid antifungal susceptibility testing of medically important yeasts with the VITEK2® 2 system, abstr. M-1619. American Society for Microb, Washington, DC.2005;12:213-18