



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

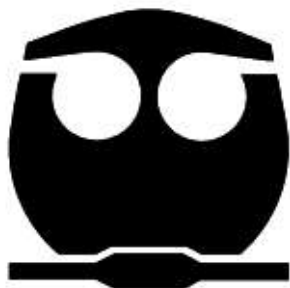
**“Diagnóstico de Candidemia por el
Laboratorio en pacientes pediátricos en un
Hospital de tercer Nivel”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

FRANCISCO GUSTAVO CASTILLO LANGO



MÉXICO, D.F.

2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. Misael González Ibarra
VOCAL: QFB. Abel Gutiérrez Ramos
SECRETARIO: MA. Gerardo García Camacho
1er. SUPLENTE: QFB. Alejandro Camacho Cruz
2° SUPLENTE: QA Norma Angélica Camacho De la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL “INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA. “

ASESOR DEL TEMA:

MA. GERARDO GARCÍA CAMACHO_____

SUSTENTANTE:

Francisco Gustavo Castillo Lango_____

AGRADECIMIENTOS

Al MA. Gerardo García Camacho por dirigir este proyecto, haberme permitido ser parte de esta investigación y asesorarme.

A mis padres, por su apoyo incondicional, sus consejos y por haberme impulsado a lograr todos mis objetivos hasta hoy.

Al la QFB Mónica Mirabal y el QFB Dorian Sánchez, por sus enseñanzas, su apoyo en el trabajo experimental, su asesoría y por su amistad.

Al QFB. Misael González Ibarra por su gran asesoría en la elaboración de este trabajo.

A mis amigas Marisol Rosas Guerrero, Carmen Rosas Flores, Elizabeth Colula Medel, por su apoyo durante todo mi transcurso en la carrera y por su amistad.

A Rubén, Walter y Diego, por ayudarme en los momentos difíciles y por brindarme su amistad.

DEDICATORIA

A Vanessa Mayen Renata:

Por estar conmigo en todo momento, tu apoyo incondicional, tu amor y cariño, por todo lo que hemos vivido juntos y lo que nos falta por vivir.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
3. ANTECEDENTES	7
3.1. Candidosis y candidemia	7
3.2. Septicemia	8
3.3. Epidemiología	9
3.4. Sintomatología.....	10
3.5. Otros agentes causantes de fungemia.....	11
3.5.1. Aspergilosis.....	11
3.5.2. Criptococosis	11
3.5.3. Fusariosis	13
3.5.4. Otras infecciones fúngicas poco comunes	13
3.6. Métodos de diagnóstico.....	14
3.6.1. Examen directo.....	14
3.6.2. Hemocultivos	15
3.6.3. Clasificación de los hemocultivos	15
3.6.3.1. Sistemas manuales.....	15
3.6.3.1.1. Hemocultivo en placa	16
3.6.3.1.2. Hemocultivo bifásico	16
3.6.3.2. Sistemas semiautomatizados.....	16
3.6.3.2.1. Lisis-centrifugación.....	17
3.6.3.3. Sistemas automatizados.....	17
3.6.3.4. Impacto de la automatización de los hemocultivos.....	18
3.7. Identificación hongos levaduriformes	19
3.7.1. Criterios morfológicos.....	19
3.8. Identificación del género <i>Candida</i>	20
3.8.1. Cultivos especiales.....	20
3.8.2. Cultivo en CHROMagar <i>Candida</i> ®	20

3.8.3.	Métodos de identificación del genero Candida.....	22
3.8.3.1.	Fisiológicos	22
3.8.3.2.	Auxonograma.....	22
3.8.3.2.1.	API 20C AUX®	23
3.8.3.3.	Zimograma	23
3.8.3.3.1.	Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®	23
3.8.4.	Métodos inmunológicos	24
3.8.4.1.	Aglutinación en látex	24
3.8.4.2.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)	24
3.8.4.3.	Platelia candida Ag	24
3.8.4.4.	Platelia candida Ac/Ak/Ab	25
3.8.4.5.	Técnicas de biología molecular	25
3.8.4.6.	Identificación de Cryptococcus neoformans	26
3.8.4.7.	Micológico	26
3.8.4.8.	Inmunológico.....	27
3.8.4.9.	Identificación de <i>Fusarium sp.</i>	27
3.8.4.10.	Identificación de <i>H. capsulatum</i>	28
3.8.5.	Tratamiento	30
3.8.5.1.	Ketoconazol	30
3.8.5.2.	Fluconazol	31
3.8.5.3.	Itraconazol	31
3.8.5.4.	Anfotericina B	31
4.	JUSTIFICACIÓN.....	32
5.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	32
6.	HIPÓTESIS.....	32
7.	OBJETIVOS.....	33
7.1.	Objetivos generales.....	33
7.2.	Objetivos particulares.....	33
8.	CRITERIOS DE SELECCIÓN	33
8.1.	Criterios de inclusión.....	33
8.2.	Criterios de no inclusión	34

9. MÉTODODOLOGIA.....	34
9.1. Hemocultivo por el método manual.....	34
9.2. Hemocultivo por el método automatizado.....	35
9.3. Prueba serológica	36
9.4. Tipificación	36
9.5. Tipificación de levaduras mediante el método de MicroScan®.	37
9.6. Identificación de levaduras por el método de tira API 20 C AUX.....	39
9.7. Control de calidad.....	40
10. PROCESAMIENTO DE DATOS.....	40
11. RESULTADOS.....	41
12. ANALISIS DE RESULTADOS.....	52
13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
14. CONCLUSIONES.....	55
15. PERSPECTIVAS.....	58
16. REFERENCIAS.....	59

ABREVIATURAS

ADS	Agar dextrosa de Sabouraud
ATCC	American Type Culture Collection
CVC	Catéter venoso central
EDTA	Etilen-diamin tetra acético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
GXM	Glucoroximanana
INP	Instituto Nacional de Pediatría
Rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción de cadena de la polimerasa
SPS	Polianetol sulfonato de sodio
TCS	Tejido celular subcutáneo
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
UTIP	Unidad de terapia intensiva

UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología y Micología del Instituto Nacional de Pediatría.

Insurgente Sur No. 3700-C, Col Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, C.P. 04530, México, D.F.

1.INTRODUCCIÓN

La candidosis es una enfermedad cosmopolita causada por un hongo levaduriforme del género *Candida*. Las infecciones debido a especies de *Candida*, incluyendo a *Candida albicans* se han vuelto gradualmente más frecuentes y una importante infección nosocomial, causando una morbilidad y mortalidad mayor en pacientes pediátricos hospitalizados. Se estima que entre el 10% y el 20% de las infecciones en torrente sanguíneo son causadas por las especies de *Candida*.^{1:2}

La distribución de candidemia se ha incrementado, principalmente en las unidades de cuidados intensivos más que en otras áreas hospitalarias. Para que este microorganismo comensal se convierta en un patógeno, es necesario la presencia de inmunosupresión.³

En Estados Unidos de América (EUA) la mortalidad en niños mayores de 8 años con candidosis sistémica ha sido reportada del 19%-26% y en Infantes menores de 8 años del 43% al 54%.⁴⁻⁶

La mayoría de estudios de candidemia se ha centrado solo en la población adulta. En México, existen muy pocos estudios sobre las distribuciones de candidosis sistémica en dichos pacientes, siendo de gran importancia un análisis epidemiológico sobre la prevalencia de este microorganismo.

En este trabajo se recopilaron de manera retrospectiva los datos provenientes de los resultados obtenidos en el periodo de julio de 2008 a julio de 2009 para obtener una perspectiva de los casos obtenidos en el hospital.

También se compararon los métodos de hemocultivo manual y automatizado, para el diagnóstico de candidemia y otras fungemias en pacientes pediátricos en un periodo de dos años, el primero tomando en cuenta los datos recopilados de julio de 2008 a julio de 2009 (retrospectivo) y el segundo de julio de 2009 a julio de 2010 (prospectivo), así como también se obtuvo la distribución de especies de *Candida* en este periodo de tiempo.

Además se correlacionó la detección de antígeno de *Candida* por el método de Aglutinación en látex (PASTOREX Candida), con la presencia de hemocultivos positivo para hacer la detección de candidemia de manera rápida y oportuna.

2. MARCO TEÓRICO

En la actualidad se ha observado que existe un aumento de infecciones sistémicas ocasionadas por *Candida* en especial la especie *albicans* y que resulta ser un problema importante de salud en los hospitales. Por otro lado se necesitan mejorar los métodos de diagnóstico, en pacientes pediátricos con probables sepsis por el género de *Candida* que permitan dar un diagnóstico temprano de estas infecciones ya que es una población muy vulnerable, y por consiguiente permitir al médico ofrecer una terapia adecuada.

En EUA la candidosis es la cuarta causa de infección sanguínea intrahospitalaria, ya que se han reportado rangos del 2.5% al 20%^{1;6;7} de infecciones causadas por este microorganismo.^{8;9}

En México se reporta que de los casos de sepsis las bacterias aisladas, 52% corresponden a Gram negativas, 38% a Gram positivas y 10% a hongos, de los cuales *Candida albicans* representa alrededor de el 50% de los casos.¹⁰

Se ha observado en México que la especie más frecuente aislada en fungemias en es *C. albicans* (25%-40% en neonatos)¹¹, seguida de *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.¹² En niños en general se aísla más frecuentemente *C. albicans* (40%-58%) seguida de *C. parapsilosis* (27%-35%).

A diferencia de EUA en donde *C. glabrata* representa la especie no-*albicans* con mayor distribución, en México la segunda especie en importancia es *C. parapsilosis*.^{6;13;14}

Este padecimiento afecta especialmente a pacientes con grados variables de inmunocompromiso por causas como infección por el VIH y enfermedades hematológicas malignas. Además se presentan en forma secundaria a tratamientos agresivos como cirugía mayor, terapia anti retroviral, quimioterapia, trasplante de precursores hematopoyéticos y tratamientos antimicrobianos de amplio espectro. Estos tratamientos tienen como consecuencia que un número

importante de pacientes sobrevive a su enfermedad de base pero, a su vez, son más susceptibles a infecciones por agentes oportunistas como *Candida*.^{1;6;7;13-16}

Dado el impacto clínico y la frecuencia de presentación de candidemias, especialmente en pacientes severamente comprometidos se hace necesario disponer de herramientas diagnósticas, que permitan una rápida y adecuada determinación de la candidemia y que faciliten la tipificación etiológica entre las especies de *Candida*, dada la diferencia registrada entre la mortalidad atribuible y factores de riesgo asociados para diferentes especies de *C. albicans* y *C. no albicans*^{17;18}

La detección rápida de la presencia de la levadura en sangre y otros tejidos es un objetivo que recientemente se intenta abordar aplicando distintos métodos moleculares de diagnóstico, el hemocultivo, aunque se considera el estándar de oro para el diagnóstico de candidemia, requiere de varios días para el establecimiento del diagnóstico específico. Dado que existe retraso, poco aislamiento y baja sensibilidad para el diagnóstico, se requiere de métodos más rápidos, sensibles y específicos que permitan el diagnóstico temprano y confiable de este tipo de infecciones.¹⁹

La positividad del hemocultivo depende de varios factores como: el número de blastoconidios por mililitro en sangre durante la fungemia, la viabilidad de los blastoconidios una vez iniciada terapia antifúngica, el número de muestras cultivadas y la forma clínica.^{17;20;21}

Los métodos convencionales basados en el cultivo, tienen una sensibilidad estimada de un 15 a 50% y necesitan un mínimo de 48 a 72 horas para ofrecer un diagnóstico. Con la introducción de la automatización de hemocultivos se han producido grandes avances haciendo a este más sensible, reduciendo el riesgo de punciones accidentales en el laboratorio, disminuyendo tiempos de incubación y de resultados.^{17;20;22}

Las técnicas de diagnóstico de laboratorio basadas en métodos de amplificación genómica, como la PCR, pueden resultar una alternativa rápida y más sensible que los métodos convencionales de cultivo, para la detección temprana de candidemia en pacientes críticos. Presentan una sensibilidad que va del 73 al 100% y una especificidad del 72 al 100%, capaz de detectar género y especie de *Candida*.^{17;20;23}

Otra prueba consiste en la detección de antígeno polisacárido de *Candida* (manano) por técnica de aglutinación con partículas de látex, recubiertas de anticuerpos IgG monoclonales de rata EBCA-1 dirigido contra los oligomanósidos de *Candida spp.*, detecta cantidades de manano en suero mayores de 2.5 ng/ml.

La sensibilidad de la detección de antígeno varía desde un 25 a 65%, dependiendo de varios factores, entre ellos el tiempo de toma de la muestra, generalmente el antígeno es detectable en sangre en etapas tempranas de la enfermedad, antes de la aparición de anticuerpos séricos. Otro factor es el estado inmunológico del paciente, ya que en los pacientes inmunocomprometidos hay mayor posibilidad de no detectar anticuerpos contra *Candida* debido a la pobre respuesta inmunológica para desarrollar anticuerpos.^{20;24-26}

3. ANTECEDENTES

3.1. CANDIDOSIS y CANDIDEMIA

La candidosis es una enfermedad cosmopolita causada por hongos levaduriformes del género *Candida*, el hábitat de este hongo es el hombre y algunos animales, algunas especies de *Candida* pertenecen a la microbiota habitual del cuerpo, se presentan desde los primeros días del nacimiento y tienen una predilección hacia las mucosas. Éstas se pueden encontrar en diversos sitios como laringe, faringe, intestino grueso e intestino delgado, también las mucosas genitales pueden ser comensalizadas pero es más frecuente encontrarlas en la mujer, generalmente entre un 5 – 30%, pero dependiendo de diversos factores como: el embarazo, cambios de pH o una baja en la respuesta inmune puede aumentar hasta un 70%.³

Debido a que *Candida albicans* y otras especies oportunistas son parte integral de la microbiota normal del cuerpo provocan enfermedades endógenas, la candidosis se presentan en todas las edades, es común en lactantes, ya que existe el primocontacto a través del canal de parto, sobre todo cuando la madre curso con candidosis en el último trimestre de embarazo. La candidosis afecta a los dos sexos por igual, solo los casos genitales tienen predilección por la mujer.

Los procesos patológicos producidos por la enfermedad son diversos y varían desde inflamación leve hasta respuestas de tipo granulomatoso crónico.^{3;27}

Se define a la candidemia como la penetración de especies de *Candida* en el torrente circulatorio y posterior diseminación, que se manifiesta por fungemia, endocarditis, meningitis y/o lesiones focales en hígado, bazo, riñón, hueso, piel, tejido celular subcutáneo (TCS) y otros tejidos.²⁷

La candidemia es una micosis propia de pacientes con severa inmunosupresión, su sintomatología afecta el estado general del paciente y existe la presencia de fiebre y escalofríos, se confunde fácilmente con septicemias bacterianas y su

modo de diagnóstico es mediante hemocultivos y pruebas serológicas.^{15;18}

3.2 SEPTICEMIA

Septicemia, es el nombre médico que se utiliza para designar una infección generalizada por la presencia de microorganismos en la sangre.²⁸

Dependiendo del microorganismo invasor la septicemia se puede clasificar en general como: bacteremia (bacterias), fungemia (hongos), parasitemia (parásitos), y viremia (virus).

La septicemia es una de las principales causas de morbilidad en las unidades de terapia intensiva; según el padecimiento asociado, la mortalidad estimada es de 20 a 50% de los casos. La septicemia puede desaparecer de manera espontánea o tornarse grave y desencadenar disfunción orgánica múltiple o choque séptico.

La distribución de septicemia se ha elevado en los últimos 20 años. Su crecimiento anual es de 8.7%, quizás esto se debe a que su diagnóstico se realiza oportunamente, este 8.7% ya sea por distribución de infecciones nosocomiales, mayor esperanza de vida, procedimientos invasores, trasplantes, quimioterapia, radioterapia y prescripción indiscriminada de antibióticos de amplio espectro que han originado cepas multirresistentes.^{7;28}

La septicemia es causada por microorganismos que pasan a la sangre procedentes de cualquier foco de infección y se multiplican incontroladamente en el torrente sanguíneo invadiendo el organismo, un ejemplo de esto es el meningococo, causante de la meningitis.

Entre las enfermedades que favorecen la septicemia por alterar los mecanismos de defensa del cuerpo y las barreras de la piel o las mucosas que protegen contra infecciones están: los traumatismos o golpes fuertes, la diabetes, el cáncer, la meningitis, la cirrosis, las infecciones renales o las quemaduras entre otras.

Algunos de los síntomas más generales son:

- Pérdida de apetito.
- Fiebre elevada.
- Frío y escalofríos, con tendencia a tener manos y pies fríos.
- Perder interés en el entorno.
- Irritabilidad.
- Somnolencia.
- Dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea.
- Sudoración excesiva.
- Hipotensión, es decir presión baja.
- Estado de coma que puede llevar a la muerte

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

En México se han realizado pocos estudios clínico-epidemiológicos enfocados a determinar la frecuencia de infecciones por *Candida* en pacientes inmunosuprimidos, por lo que se desconoce la magnitud del problema para establecer las medidas terapéuticas y preventivas oportunas.

En EUA la candidosis es la cuarta causa de infección sanguínea intrahospitalaria, ya que se han reportado rangos del 2.5%^{1;6;7} al 20% de infecciones causadas por este microorganismo.^{8;9}

Las infecciones ocasionadas por levaduras del género *Candida*, especialmente *C. albicans*, predominan en la mayoría de los reportes (60%–80%). Existe un incremento de casos ocasionados por especies diferentes a *C. albicans* que en conjunto se denominan no *albicans*; tales como: *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, entre otras.

En hospitales de tercer nivel se ha observado que la especie más frecuente aislada en fungemias en niños es *C. albicans* (25%-40% en neonatos)¹¹, seguida de *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.¹² En niños en general se aísla más frecuentemente *C. albicans* (40%-58%) seguida de *C. parapsilosis* (27%-35%), con una relación estadísticamente significativa a colocación de catéter venoso

central (CVC) en la vena femoral, el uso de catéteres tunelizados, prolongación de hiperalimentación así como candiduria.^{11;12;21}

A continuación se muestra una tabla que compara la distribución de especies encontradas en el CMN Siglo XXI y lo reportado en la literatura para Norte y Latinoamérica (Tabla 1).¹¹

Especie	Estados Unidos	Canadá	Latinoamérica	México
<i>C. albicans</i>	54.4	70	44.6	54.8
<i>C. parapsilosis</i>	15	7	18.5	14.45
<i>C. tropicalis</i>	5.8	5.2	20	9.93
<i>C. glabrata</i>	21.8	12	9.2	0.9
Otras	2	3.6	6.2	15.96
TOTAL	99	97.8	98.5	96.04

Tabla 1. Comparación en la distribución de especies en Norte y Latinoamérica en los últimos 10 años
México: Datos reportados en el Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMMS

Finalmente los principales factores predisponentes que se han encontrado son la nutrición parenteral total (43.3%), cánulas endotraqueales (29.9%), CVC (25.8%), cirugía previa (14.4%) y uso prolongado de antibióticos de amplio espectro (90%).¹²

3.4 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas de Candidemia no son muy específicos. Los síntomas más comunes son fiebre y escalofríos, que no mejoran después de terapia con los antibióticos. Si la infección dispersa a los órganos internos tales como riñones, hígado, huesos, músculos, bazo, u ojos, hay otras muestras y síntomas específicos que pueden convertirse, y varían generalmente dependiendo del sitio de la infección. Si la infección resiste al tratamiento, los órganos del paciente pueden fallar y llevar a la muerte del mismo. También si la candidemia consigue llegar al cerebro, el paciente puede tener pequeños cambios en la función o el comportamiento mental.^{3;13;17}

3.5 OTROS AGENTES CAUSANTES DE FUNGEMIA

Las infecciones por hongos oportunistas se observan en su mayoría en pacientes con desordenes hematológicos, aquellos con extensivos procesos quirúrgicos y los que reciben terapia de corticoesteroides, citotóxica o inmunosupresora. Actualmente también se ha observado un aumento de Candidosis y Criptococosis en pacientes con SIDA.

3.5.1 Aspergilosis

Las especies de *Aspergillus* son de las más frecuentemente aisladas en el laboratorio, están presentes en el medio ambiente y sus conidios son fácilmente dispersables permitiendo que hospederos susceptibles se infecten por inhalación. La infección nosocomial ocurre generalmente durante la renovación o construcción de edificios o cuando los ductos de aire acondicionado están contaminados con *Aspergillus spp.*²⁹

A. fumigatus es de las especies más comunes que se observan en las secreciones del tracto respiratorio y es responsable de la mayoría de los casos de aspergilosis. Otros, incluyendo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus* se observan con mayor frecuencia como causa la infección en el hospedero inmunocomprometido. El *Aspergillus* es frecuentemente recuperado en cultivos de secreciones del tracto respiratorio, raspados de piel, y otros especímenes, lo que hace difícil su diagnóstico. La recuperación repetida de un microorganismo del mismo sitio o de varios sitios diferentes puede servir como evidencia de infección, especialmente en los pacientes neutropénicos.^{29;30}

3.5.2 Criptococosis

La *Criptococosis* es principalmente una infección de los pacientes inmunodeprimidos, es producida por *Cryptococcus neoformans* o *C. gattii*, este microorganismo está ampliamente distribuido en la naturaleza y se encuentran con mayor frecuencia en asociación con el excremento de las palomas. Se cree que la

exposición a *Cryptococcus neoformans* es común y que la principal vía de entrada es por inhalación. Sin embargo, una historia de exposición es difícil de obtener de los pacientes, además el número de casos reconocidos de criptococosis pulmonar son pocos en comparación con los casos de meningitis, tal vez muchos se resuelven por sí solos.

Su presencia en cualquier espécimen debe ser considerada significativa hasta que se demuestre lo contrario.

La criptococosis se presenta frecuentemente en el sistema nervioso central en forma de meningitis, asociándose con disminución de la audición, deterioro cognitivo, dolor de cabeza, rigidez de la nuca, vomito, nistagmo, diplopía, coriorenitis, fatiga, somnolencia, irritabilidad y a menudo se manifiesta torpeza, signos clínicos con disfunción del nervio craneal y meningitis. La gradual aparición de la enfermedad y la falta de signos y síntomas específicos en la enfermedad temprana son probablemente el resultado de una mínima inflamación en los tejidos.²⁹

En pacientes con SIDA, un gran número de microorganismos pueden estar presentes en el tejido, con una escasez notable en la respuesta inflamatoria, notablemente, algunos pacientes con meningitis criptocócica no tienen inmunodeficiencia específica anterior a su enfermedad. Otros pueden estar recibiendo terapia con altas dosis de corticosteroides o tienen trastornos linfoproliferativos, especialmente linfoma o diabetes mellitus, entre otras. Curiosamente, en muchos pacientes que reciben dosis altas de corticoides, los signos y síntomas de meningitis son a menudo suprimidos. Una infección criptocócica del sistema nervioso central se debe sospechar en pacientes que reciben corticosteroides, otros sitios que pueden estar implicados son la piel y el hueso y en raras ocasiones, los riñones, el hígado y el tracto genitourinario.^{29;30}

Los hemocultivos pueden ser positivos para *Cryptococcus neoformans* en pacientes que están inmunosuprimidos y con fiebre sin una fuente identificable de infección. En muchos de estos pacientes el microorganismo se encuentra en las vías respiratorias superiores o en líquido cefalorraquídeo.

3.5.3 Fusariosis

El género *Fusarium* contiene nueve especies, todas ellas son patógenas de plantas y están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Sólo unas pocas especies han sido identificadas como causantes de infección en humanos y animales, siendo la más común la queratomycosis (oculomycosis). Las infecciones se han reportado en pacientes inmunodeprimidos, *Fusarium solani* se ha demostrado que causa infección diseminada con fungemia. *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum* se han asociado con neumonía y la infección diseminada en pacientes con leucemia. La infección por *Fusarium spp.* también se ha observado en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, la mayoría de las infecciones han sido mortales, pero la terapia con anfotericina B ha sido beneficiosa en algunos casos. La presentación clínica más frecuente es la oculomycosis en individuos que presentan traumatismo ocular, o han sido sometidos a tratamiento con gotas que contienen esteroides.

El diagnóstico definitivo de Fusariomycosis se hace al recuperar e identificar el microorganismo de pacientes que tengan historia clínica compatible o histopatológica de esta infección o de ambos. *Fusarium spp.* no se pueden distinguir de *Aspergillus spp.*, *P. boydii*, en el examen de los cortes de tejido. El diagnóstico definitivo depende de la identificación del género y las especies involucradas mediante el microcultivo.²⁹

El género se reconoce fácilmente por la observación de hifas que generan fialides que producen microconidios en forma de lagrimas más macroconidios grandes septados en forma de hoz. Algunos cultivos producen clamidoconidios que ayudan a su identificación, las colonias de *Fusarium spp.* son algodonosas y pueden presentar pigmento que va desde el rosa, lila, amarillo y verde.

3.5.4 Otras infecciones fúngicas poco comunes

A esta lista se pueden agregar patógenos dimórficos como *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* y *Paracoccidioides brasiliensis*, y patógenos

difásicos como *Coccidioides immitis* que están asociados a zonas endémicas y que se presenta cada vez mas en pacientes severamente inmunosuprimidos, con SIDA o con terapias prolongadas de corticoesteroides u otros inmunosupresores.

3.6 METODOS DE DIAGNÓSTICO

3.6.1 Examen directo

La observación microscópica puede dar información preliminar sobre la presencia o ausencia de hongos en la muestra y también orientar sobre el género causante de infección gracias a la observación de elementos micóticos característicos. Algunas formas parasitarias que podremos observar al microscopio son blastoconidios en gemación, hifas macrosifonadas septadas o cenocíticas, pseudohifas, entre otras, el examen en fresco entre porta y cubreobjetos es un método de bajo costo, rápido y que no requiere equipamiento especial; sin embargo, debe ser realizado por personal entrenado. Su sensibilidad depende del tipo y cantidad de muestra y del número de microorganismos presentes en ella. Cuando la muestra tiene detritos celulares se utiliza hidróxido de potasio del 10% al 20%, el cual clarifica el material orgánico y deja intactas las estructuras fúngicas.^{3;17}

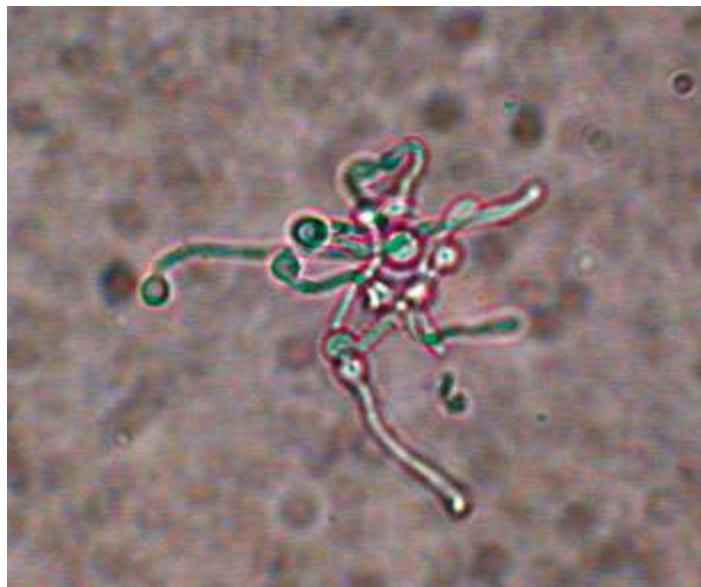


Figura 1. Examen directo, pseudofilamentos de *C. albicans* en una muestra de sangre

3.6.2 Hemocultivos

El hemocultivo constituye en los casos de septicemia, el único examen que permite su confirmación. Actualmente, el hemocultivo sigue siendo la mejor técnica para el diagnóstico de una candidemia, a pesar de su escasa sensibilidad global (50%). Se define como hemocultivo al cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por una punción independiente.¹⁵

En caso de que el paciente ya está recibiendo antibióticos, la probabilidad de aislar agentes infecciosos en hemocultivos disminuye en forma muy significativa.

3.6.3 Clasificación de los hemocultivos

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de paciente, si se trata de un paciente inmunosuprimido, inmunocompetente, adulto o pediátrico, ya que en base a esto cambia el agente etiológico a identificar.

También se pueden clasificar según la toma de muestra como hemocultivos periféricos o centrales, según el tipo de microorganismos que se esté investigando. Por último, se pueden clasificar según la metodología de los distintos sistemas de hemocultivos en métodos convencionales (manuales), sistemas semiautomatizados como el sistema Lisis-centrifugación o sistemas automatizados como BACTEC, BacT/Alert, etc.¹³

3.6.3.1 Sistemas manuales

3.6.3.1.1 Hemocultivo en placa/tubo

En este tipo de sistemas la elección del medio de cultivo, la temperatura y atmósfera de incubación es decisión del microbiólogo basado en el diagnóstico clínico. Sin embargo las desventajas mas grandes de este sistema con relación al automatizado son: el mayor riesgo de contaminación por la manipulación de las jeringas y/o tubos, al realizar los procedimientos de tinción y traspasos, la sensibilidad del observador al realizar la inspección del tubo o caja, así como la baja sensibilidad a la hora de la recuperación si el paciente se encuentra bajo tratamiento.

3.6.3.1.2 Hemocultivo bifásico

Castañeda, en los años 40, introdujo un frasco con un medio bifásico compuesto de una fase sólida y otra líquida. Al inclinar el frasco, el medio líquido cubre totalmente el medio sólido, realizando un subcultivo en el mismo cuantas veces se desee, sin necesidad de abrir la botella.

Posteriormente se han introducido variaciones de este sistema como el Septi-Check® (Hoffman-La Roche) y el Opticult® (Becton-Dickinson). Los frascos se inoculan con la sangre y a su llegada al laboratorio se abre el tapón y se sustituye éste por un cilindro roscado que contiene distintas superficies con diferentes tipos de agar. Cada día, al inspeccionar el frasco, se invierte éste para hacer que la sangre y el caldo bañen el agar y realizar así un subcultivo.

Con este procedimiento la detección de bacterias y hongos es tan buena o mejor que con el método convencional y más rápido.^{3;17;28}

3.6.3.2 Sistemas semi automatizados

3.6.3.2.1 LISIS-CENTRIFUGACIÓN

La base es el sistema Isolator® (DuPont). Consiste en un tubo de lisis cuyo contenido es polianetol sulfonato de sodio (SPS) o ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) como anticoagulante, saponina como agente lítico de eritrocitos, leucocitos y macrófagos, polipropilenglicol como antiespumante y un fluoroquímico inerte de alta densidad. Tras la inoculación de la sangre, esta se mezcla con el contenido del tubo para conseguir la lisis de las células. A continuación se somete la muestra a una centrifugación a alta velocidad que permite la concentración de microorganismos en el sedimento que se siembra en medios de cultivo específicos, este método permite mejorar en un 25 a 50% la detección de hongos levaduriformes y filamentosos, pero si se sospecha de una infección sistémica por un hongo dimórfico la técnica de lisis-centrifugación parece ofrecer mayores ventajas como por ejemplo *H. capsulatum*, cuya fase levaduriforme es esencialmente intracelular. Por otra parte, al permitir la siembra en cualquier medio sólido, también es muy útil para el aislamiento de levaduras con

requerimientos especiales para su crecimiento, como las especies del género *Malassezia*, incapaces de crecer en los frascos de hemocultivos automatizados al no estar enriquecidos con ácidos grasos. Por último, al inocular en las placas un volumen conocido de inóculo, también permite conocer el grado de infección a través de conocer el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), se considera el método de elección en bacteriemias por Micobacterias (pacientes con SIDA) y permite realizar hemocultivos cuantitativos que son útiles para diagnóstico de bacteriemia relacionada a CVC.^{22;28;31}

Sus mayores inconvenientes derivan de la necesidad de procesar cada muestra individualmente y dentro de los 30 minutos posteriores a su extracción, de su laborioso manejo y de la alta distribución de contaminaciones que genera. El sistema es caro y por todo ello no es una alternativa a otros métodos, pero es complementario de ellos, por las ventajas apuntadas y por la facilidad con la que el sistema permite hacer recuentos del número de colonias presentes en sangre, dato que se utiliza cada vez más en el diagnóstico de las bacteriemias relacionadas con catéteres intravasculares.^{17;32}

3.6.3.3 SISTEMAS AUTOMATIZADOS

Los sistemas automatizados consisten básicamente en botellas con diversos medios de cultivo (aeróbicos, anaeróbicos, hongos, micobacterias y con resinas que captan antibióticos) que se incuban en equipos que agitan constantemente las muestras y que poseen modernos sistemas de detección microbiana. Estos se basan en la detección de productos del metabolismo por ejemplo el CO₂ mediante técnicas radiométricas, espectrofotométricas, fluorométricas y/o colorimétricas. El computador asociado a los equipos relaciona las mediciones con índices y/o gráficas de crecimiento microbiano que dan un aviso cuando la detección sobrepasa un punto de corte. Las botellas se descargan, se realiza un examen directo o tinción de GRAM y se reportan precozmente.²⁸

El Bactec-9240® (Becton Dickinson) es un sistema totalmente automático, no invasor, de agitación continua, que se compone de una incubadora, un detector y un ordenador. El CO₂ producido por el metabolismo microbiano reacciona con un material fluorescente situado en el fondo del frasco del hemocultivo, lo que modula la cantidad de luz que es absorbida por un sensor. Los fotosensores miden el nivel de fluorescencia, que se corresponde con la cantidad de CO₂ producida por el microorganismo. Esta medida es interpretada por el sistema de acuerdo con unos parámetros programados. Este sistema realiza una lectura de todos los frascos cada 10 minutos y mediante un sistema luminoso de alarma indica los frascos positivos detectados en cada lectura.³³⁻³⁵

3.6.3.4 IMPACTO DE LA AUTOMATIZACIÓN DE LOS HEMOCULTIVOS

La implementación de sistemas automatizados de hemocultivos con monitoreo sensibles, continuos y con agitación constante han llevado a un aumento de la velocidad de detección, con una disminución del tiempo de respuesta y a un aumento de la sensibilidad de los hemocultivos, esto permite mejorar la capacidad diagnóstica, también ha ayudado a procesar grandes volúmenes de muestras, disminuir la contaminación cruzada por técnicas de detección no invasivas y un aumento del espectro de microorganismos que se detectan por estos sistemas.

A nivel del laboratorio significa un aumento del costo por botella 2 a 4 veces el costo de lo convencional, con una disminución de los costos del material de resiembra, también con una disminución del riesgo por el manejo de punzocortantes por parte del operador.²⁸

Finalmente hay que señalar que la positividad de un hemocultivo depende de varios factores, como el número de blastoconidios por mililitro de sangre durante la fungemia; la viabilidad de los blastoconidios en pacientes que ya han iniciado terapia antimicótica; una fungemia persistente; la frecuencia con que se cultivan las muestras; el número de muestras cultivadas y la forma clínica de la micosis

(candidosis).

La detección de *Candida* por el método BACTEC® de la serie 9240, se realiza cuando hay más de 10 unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) entre 19.7 a 32.5 horas. Cuando hay más de 100 UFC/mL, la detección se realiza en un promedio de 17.7 a 28.2 horas después de inoculada la muestra, la lectura de los hemocultivos se realiza de manera automatizada cada 20 a 30 minutos por lo tanto este método es más sensible que la prueba de lisis-centrifugación.^{17;27;29}

3.7 IDENTIFICACION DE HONGOS LEVADURIFORMES

La identificación de los hongos levaduriformes se puede llevar a cabo atendiendo a cuatro criterios diferentes: micro y macromorfológicos, bioquímicos, inmunológicos o genéticos.

3.7.1 Criterios morfológicos

Los criterios morfológicos son macro y microscópicos. Los criterios macroscópicos tienen en cuenta el aspecto de las colonias levaduriformes al crecer en los diferentes medios de cultivo, por ejemplo la mayor parte de estas crecen en los medios que se utilizan de rutina en el laboratorio (Agar gelosa sangre, Agar gelosa chocolate, CLED [Cistina Lactosa Electrolito Deficiente], etc.^{3;17}), sin embargo el medio de elección es el agar dextrosa de Sabouraud (ADS) con o sin antibióticos, en este medio las colonias de levaduras suelen ser pequeñas, redondas u ovales, ligeramente abombadas o planas, de consistencia cremosa, lisas o rugosas y húmedas, volviéndose más densas a medida que envejecen, otros hongos levaduriformes pueden presentar prolongaciones arecniformes lo que pudiera suponer que se trata de algún hongo dimórfico o de algún género que pudiera formar micelio verdadero como *Geotrichum sp* o *Trichosporum sp*, o pigmentación como el género *Rhodotorula sp*.^{3;17}

3.8 IDENTIFICACIÓN DEL GENERO *Candida*

Primero se realizan exámenes directos con KOH al 20% de las colonias aisladas donde se observarán formas de reproducción asexual: los blastoconidios que pueden ser globosos ovoides, de 4 hasta 8 μm de tamaño. Se puede realizar tinción de Gram, donde se observaran las estructuras antes descritas. En la mayoría de los casos se observaran “pseudohifas” que son las estructuras de parasitación del genero *Candida* excepto *C. glabrata*.

Estos métodos tienen la ventaja de ser muy rápidos y sencillos de realizar sin embargo las limitaciones y los problemas del examen microscópico también deben ser tomados en cuenta ya que un examen negativo no excluye la infección y el examen microscópico puede originar falsos positivos al confundirse ciertas estructuras con elementos fúngicos como linfocitos lisados por *Cryptococcus neoformans* en la tinción con tinta china, fibras de colágeno o del hisopo pueden confundirse con elementos fúngicos, gotas de grasa con blastoconidios gemantes, etc.

3.8.1 Cultivos especiales

Biggy-Nickerson agar: Se toma una asada de la colonia del primoaislamiento y se cultiva por estría de agotamiento. Después de 36 horas desarrollaran colonias café obscuro debido a que el género *Candida* transforma los sulfitos en sulfuros. No es un medio selectivo estricto ya que otros hongos levaduriformes generan pigmento café.

3.8.2 Cultivo en CHROMagar *Candida*®

El fundamento de este se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de *Candida* mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. Estos pueden ser utilizados como medios de aislamientos primarios o de identificación, después del

aislamiento de los blastoconidios en los medios convencionales.

El medio CHROMagar Candida fue descrito por Odds y Bernaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*, este permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio. Al cabo de 48 horas las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y además, es incapaz de crecer a 45 °C, *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea, *C. krusei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco, *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio. 17;36;37

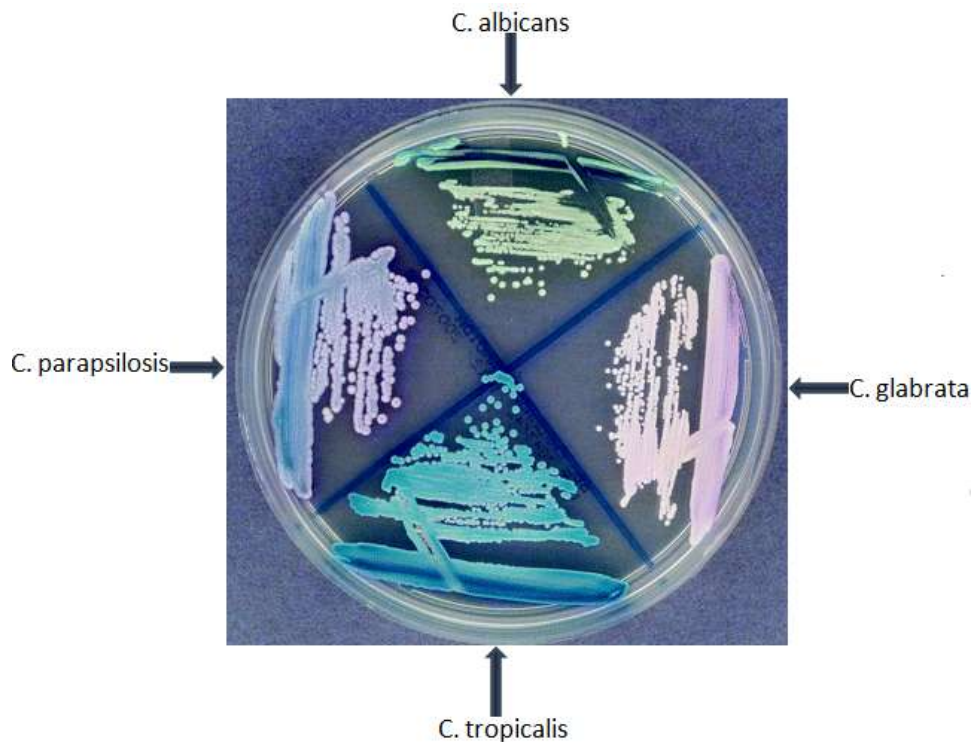


Figura 2. Crecimiento de las cepas ATCC usadas como control positivo durante el estudio en CHROMagar-Candida, *C. albicans* (verde) *C. tropicalis* (azul), *C. glabrata* (rosácea rugosa), *C. parapsilosis* (rosácea lisa),

Una de las principales ventajas de este medio es que permiten diferenciar los cultivos mixtos e identifica eficazmente a *Candida albicans* en cuanto a especificidad y sensibilidad (97%), sin embargo la principal desventaja es que las otras especies no son tan fácilmente identificadas.

En lo que respecta a este trabajo se utilizó el medio CHROMagar Candida® después de verificar la positividad de los hemocultivos para tratar de tipificar lo mas rápido posible al agente etiológico.

METODOS DE IDENTIFICACIÓN DEL GENERO *Candida*

FISIOLOGICOS

Para la identificación del género *Candida* se realizan pruebas fisiológicas:

- a) La inducción de tubo germinativos en suero humano durante 2 horas y media a 37°C, solo *C. albicans* da esta prueba positiva (aunque *C. dubliniensis* y *C. stellatoidea* suelen darla positiva).
- b) Inducción de la formación de clamidoconidios en agar de Corn-meal + tween 80 al 1%.
- c) *C. albicans* genera la producción de blastoconidios de 4-8 µm de tamaño + pseudohifas + clamidoconidios (*C. dubliniensis* suele dar esta prueba muy positiva con mas del 75% de clamidoconidios).

AUXONOGRAMA

Se fundamenta en la aplicación por separado de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para apreciar el crecimiento selectivo de una levadura en la cercanía de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Para su realización pueden emplearse soluciones acuosas esterilizadas por filtración, cilindros de Oxford en pocillos hechos en el agar o bien discos de papel absorbente empapados con el nutriente (Como fuente de carbono se puede ensayar todos los azúcares y alcoholes conocidos. Como substrato de nitrógeno se suele emplear peptona, urea, sulfato amónico, nitrato de potasio y

diferentes aminoácidos). Sin embargo, las pruebas de asimilación en medios líquidos no ofrecen ninguna ventaja adicional sobre los medios sólidos, resultando mucho más laboriosas y costosas.^{13;17;20}

API 20C AUX®

La galería API 20 C AUX (bioMerieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y los blastoconidios sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.

ZIMOGRAMA

En este se valora la capacidad enzimática frente a más de 20 sustratos, además estos se realizan cuando las formas fisiológicas son negativas.

Rapid Yeast Identification Panel MicroScan®

El Rapid Yeast Identification Panel MicroScan (Dade Behring) es un método automatizado para la identificación rápida de 40 especies de levaduras y otros microorganismos afines. Se basa en la utilización de pruebas convencionales y cromogénicas en una placa de microdilución de 96 pocillos que utiliza 27 sustratos deshidratados.

Durante la realización de este trabajo esta técnica ayudó a la tipificación de la levadura aislada previamente en el medio CHROMagar Candida® y solo en el casos donde se obtuvieron porcentajes menores de 95% de confiabilidad se utilizó una técnica alternativa para realizar la tipificación.

METODOS INMUNOLOGICOS

PRUEBAS SEROLÓGICAS

El diagnóstico de candidosis sistémica se confirma mediante el aislamiento repetido de blastoconidios en muestras biológicas generalmente estériles (sangre, orina) pero el resultado de los cultivos micológicos sigue siendo difícil de interpretar, ya que los blastoconidios se pueden aislar en el caso de una simple colonización, los hemocultivos pueden resultar negativos aun cuando se trata de una infección diseminada^{13;17;20}

AGLUTINACIÓN EN LÁTEX

Las técnicas de aglutinación en látex fueron utilizadas en su mayoría debido a que la rapidez del método y que la obtención del resultado era mucho menor que el de cultivo de sangre, sin embargo la sensibilidad de la detección del antígeno manano en sangre resulto ser muy baja (20-40%) y obteniéndose un gran número de inconsistencias entre las diferentes pruebas existentes por lo que estas técnicas han casi desaparecido por completo y en su lugar se utilizan técnicas de ELISA.^{25;26;38;39}

ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Este tipo de ensayo se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

PLATELIA CANDIDA Ag

Es un ELISA que detecta manano en suero utilizando el anticuerpo monoclonal EBCA-1. Este anticuerpo reconoce residuos β -1,5 del manano de *C. albicans*, *C.*

tropicalis, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. pseudotropicalis* a excepción del de *C. krusei*, su límite de sensibilidad es 0.25 ng/ml de suero, 10 veces más sensible que las pruebas de aglutinación en látex, sin embargo para aumentar el rendimiento se aconseja utilizarla conjuntamente con la técnica de detección de anticuerpos Platelia Candida Ac/Ak/Ab.

Los valores de sensibilidad y especificidad para esta prueba han sido de 94.4% y 92.4% respectivamente, por lo que esta prueba puede usarse satisfactoriamente como complemento de los hemocultivos.^{23;25;40}

PLATELIA CANDIDA Ac/Ak/Ab.

En los últimos años, se ha cuestionado la utilidad de la detección de anticuerpos anti-Candida en pacientes con candidiasis invasiva debido a que puede presentar dos limitaciones importantes

- La detección de títulos altos de anticuerpos en pacientes que están solamente colonizados por *Candida*, sin infección.
- La respuesta de anticuerpos puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunodeprimidos.

Sin embargo estas pruebas deben utilizarse para estudiar muestras seriadas del paciente, lo que permite analizar la evolución de los títulos de anticuerpo y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos.^{17;23;40}

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

La aplicación de técnicas de biología molecular que permiten la detección de los ácidos nucleicos fúngicos es sin duda el mayor progreso tecnológico en el campo de la detección directa de los hongos en muestras clínicas. La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una alta especificidad de algunos de los fragmentos amplificados hace posible la identificación de la especie directamente de la muestra clínica, se han utilizado dos tipos de estrategias

- ✓ La amplificación de fragmentos génicos altamente conservados en los hongos, con la intención de saber si la etiología de un proceso infeccioso es fúngica o no.
- ✓ La amplificación de secuencias génicas específicas que permitan la identificación de la especie.

A pesar de los prometedores resultados obtenidos en algunos trabajos, debe esperarse a la realización de estudios prospectivos para conocer el verdadero alcance de esta técnica en el diagnóstico de la candidosis invasiva.

Finalmente, las técnicas de ELISA Y PCR parecen ser la mejor opción para el diagnóstico de infecciones sistémicas.^{17;20;23}

Todos los métodos antes mencionados serían inútiles, ya que un cultivo positivo no indica la presencia de candidosis, pues *Candida* es parte de la microbiota normal.^{3;17;25}

Por esto es necesario correlacionar los aspectos clínicos y micológicos para llegar al diagnóstico. Para esto se revisaron los expedientes clínicos de los cuales se obtuvieron los diagnósticos de base y la sintomatología presentada.

IDENTIFICACION DE *Cryptococcus neoformans*

a) MICOLOGICO

Cultivo selectivo: De las colonias aisladas del hemocultivo se toma una asada y se cultiva por estría de agotamiento en el medio de agar de alpiste negro. Después de 48 horas, desarrollaran colonias pequeñas redondas de aspecto mucoso de color café-negro brillante. Debido a la transformación del ácido cafeínico a pigmentos del tipo melánico por acción de la fenol-oxidas producidas por este hongo.

Tinción negativa: se toma una asada de la colonia en estudio, la que se pone en portaobjetos agregando de 2-3 gotas de tinta china o nigrosina. *C. neoformans* genera blastoconidios monogemas de 4-10 µm con una

gran capsula de 15-30 μm de tamaño. Para su tipificación certera se realizan pruebas bioquímicas por auxacolor o Microscan.

b) INMUNOLOGICO

Detección de glucoroximanana (GXM) en LCR suero u orina en partículas de látex.

IDENTIFICACION DE *Fusarium sp*

Para la identificación de *Fusarium spp* se requiere del aislamiento del hongo en repetidas ocasiones para ser considerado como el agente causal, este hongo crece en medio ADS obteniéndose colonias blancas que pueden tener pigmento (naranja, lila amarillo según la especie) y basta con realizar examen directo o alguna tinción como la de Gram para observar macroconidios de 5-8 μm y microconidios en forma de media luna o canoa.



Figura 3. Tinción de Gram de un cultivo donde se observan macroconios y microconidios en forma de media luna o canoa característicos de *Fusarium spp*.

IDENTIFICACION DE *H. capsulatum*

Los exámenes directos no son eficaces en este caso ya que las levaduras son muy pequeñas e intracelulares, por lo cual pasan desapercibidas, debido a esto las tinciones son técnicas mas rápidas y eficientes en este caso, se hacen de preferencia Giemsa, Gomori, PAS. Al microscopio se observan estructuras levaduriformes de 1-2 μm de diámetro generalmente dentro de polimorfonucleares.

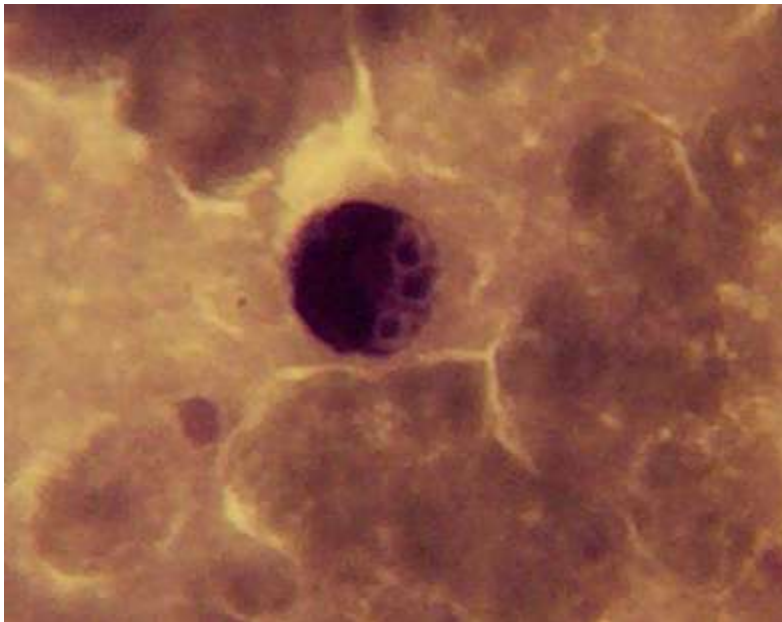


Figura 4. Tinción de Gram a una muestra de sangre donde se observan blastoconidios de 1-2 μm intracelulares dentro de un fagocito, forma parasitaria característica de *H. capsulatum*.

H. capsulatum es un hongo dimórfico temperatura y nutriente dependiente, por lo cual la fase filamentosa o saprofítica se da en condiciones deficiente de nutrientes a temperaturas de 25°C a 28°C, debido a esto si se quiere corroborar la etiología simplemente debe probarse el dimorfismo haciéndose crecer las colonias en medios ricos como Agar gelosa sangre o BHI en incubarlos a 37°C.

Al estar en estas condiciones se obtendrán colonias vellosas blancas-ocre, secas y al examen directo se podrán observar macroconidios espiculados de doble membrana de entre 8 y 15 μm similares a “corcholatas” además de micelio

delgado tabicado e hialino.

Existen pruebas serológicas que se usan en el laboratorio, las más usadas son.

Intradérmica-reacción a la histoplasmina: únicamente tiene valor de primocontacto o de hipersensibilidad retardada. Se aplica una dilución 1:100 del antígeno y se lee a las 48 horas, siendo positiva una induración y eritema de más de 5mm.

La otra técnica es la de Inmunodifusión en gel, la cual da una valoración del título de anticuerpos y la evolución del padecimiento. Esta técnica se realiza en gel de agarosa en donde el antígeno en suspensión se vierte sobre una placa. Una vez solidificado, pocillos que contendrán la muestra de suero. Se deja incubar de modo que el suero con anticuerpos se difunde por la placa de agar y reacciona con el antígeno embebido en la placa. Al cabo de 24 horas se ha creado un precipitado fruto de la reacción entre antígeno y anticuerpo que se muestra en la placa como una línea blanca rodeando al pocillo

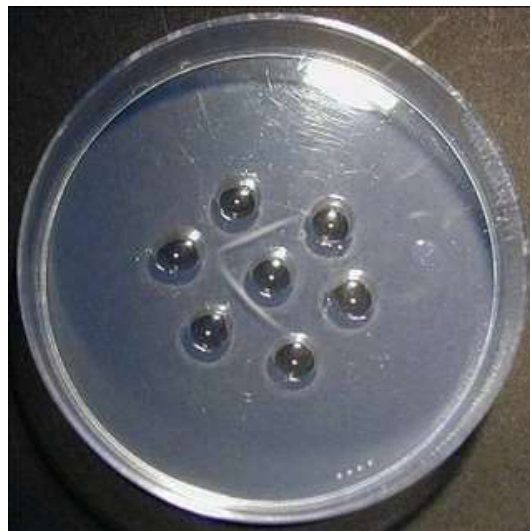


Figura 5. Placa de inmunodifusión en donde se ponen a prueba diferentes concentraciones de antígeno con suero presuntamente con *H. capsulatum* y donde solo los controles dan un resultado positivo.

TRATAMIENTO

En los casos de *Candidosis* dependerá de las formas clínicas, los tratamientos pueden ser desde lavados con soluciones ácidas o básicas para el caso de infecciones vaginales. En el caso de infecciones diseminadas como las fungemias los tratamientos de elección son con derivados azólicos ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol y posaconazol.

KETOCONAZOL

Este antimicótico pertenece a la familia de los azoles y actúa como fungistático y fungicida a concentraciones altas, en esta familia de fármacos su mecanismo de acción afecta la síntesis del ergosterol, a nivel de la 14- α -desmetilasa esterol, dependiente de la citocromo P-450 oxidasa, al alterar esta vía metabólica se produce una pared celular fúngica defectuosa al intercambio de iones y ATP, esto ocasiona daños en tres enzimas específicas: citocromo oxidasa, catalasa y peroxidasa, lo que genera acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) provocando a su vez daño intracelular.

La dosis para micosis profundas es variable de 200 a 600 mg/día, y entre los efectos colaterales que presenta son afectaciones gastrointestinales como náuseas y diarrea.

FLUCONAZOL

Su mecanismo de acción es el mismo que para todos los azoles, en niños la dosis recomendada es de 3-6 mg/día y existe una presentación pediátrica, para casos severos se debe aumentar la dosis de 200-400 mg/día.

Se sabe de la resistencia de cepas de *Candida sp*, pero generalmente existe una sensibilidad hacia este antibiótico en particular de *Candida albicans*, sin embargo *C. glabrata* y *C. krusei* con facilidad pueden adquirir resistencia, de aquí la importancia de determinar el agente causal. Es el único azólico que atraviesa la

barrera hemato-encefalica, debido a esta propiedad, es el mas indicado en casos de meningitis fúngicas.

ITRACONAZOL

Este fármaco se utiliza de manera similar al ketoconazol, en general este medicamento presenta un mecanismo de acción similar a los otros antes mencionados, pero presenta una mayor potencia en comparación con el fluconazol, y además provoca menos efectos secundarios que este.

ANFOTERICINA B

La Anfotericina B es una molécula del tipo heptaeno con una micosamina en el carbono 19, es de origen natural, extraído de *Streptomyces nodosus*, y que tiene como mecanismo de acción la alteración de membrana celular mediante la formación de poros, en general esta se administra via intravenosa en infección sistémica y cuando el tratamiento con los derivados azólicos ya no da resultados, el uso prolongado de este o cuando la dosis sobrepasa los 3 gramos totales causa hepatotoxicidad llevando al paciente a falla renal. En general las especies de *Candida* no presenta una gran resistencia a la Anfotericina B, sin embargo se han reportado casos como los de *Candida krusei* y algunas cepas de *C. albicans* deficiente de ergosterol que si presentan resistencia.

4. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado un aumento en el número de casos de candidosis sistémica en pacientes pediátricos en unidades hospitalarias, por lo cual es importante conocer los métodos de diagnóstico que existen en el mercado actualmente para llevar a cabo un diagnóstico rápido y eficiente. Además se sabe que el aislamiento de especies de *Candida* no *albicans* se está incrementando, debido a esto es importante conocer la distribución de especies en la población del INP.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El uso de hemocultivos automatizados aunados al uso de pruebas complementarias conllevará al diagnóstico rápido y oportuno de sepsis por *Candida*?

6. HIPÓTESIS

- El uso de diversos métodos aunado a la utilización de procedimientos automatizados dará mayor sensibilidad y rapidez al laboratorio en la detección de candidosis sistémica, lo que supondrá una pronta acción terapéutica para el paciente pediátrico, y a su vez una menor mortalidad en este tipo de paciente que es tan vulnerable, disminuyendo de esta manera los costos para el tratamiento específico y la estancia hospitalaria.
- A pesar que la especie *albicans* de *Candida* seguirá siendo la de mayor frecuencia en los aislamientos, se observará el aumento en los casos de otras especies emergentes.

7. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- ✓ Conocer los diferentes métodos de diagnóstico que existen en el mercado para la identificación oportuna de candidosis sistémica en pacientes pediátricos del INP.
- ✓ Conocer la distribución de especies de *Candida* en el INP.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Corroborar la distribución de las diferentes especies de *Candida* en pacientes pediátricos del INP, tomando los datos recopilados de estudios de laboratorio de micología del periodo del 15 Julio de 2008 a 15 de Julio de 2010.
- ✓ Verificar la compatibilidad de los resultados entre hemocultivo y la prueba serológica de aglutinación en látex.

8. CRITERIOS DE SELECCIÓN

8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de pacientes pediátricos de 0-18 años que fueron enviadas al Laboratorio de Parasitología y Micología del INP.

8.2 CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

Hemocultivos mal tomados

- Para el método manual: jeringas coaguladas o sin el volumen requerido.
- Para el método automatizado: volumen menor de 1mL o mayor de 5ml

Pacientes con tratamiento antifúngico multifarmaco.

9. MÉTODOLÓGÍA

Se estudiaron niños con diagnóstico de candidosis sistémica hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría, del 15 de Julio de 2008 al 14 de Julio de 2010. A estos pacientes se les realizaron hemocultivos y detección de antígeno por el método de aglutinación en látex. A todos los pacientes se les realizará historia clínica, en la cual se incluirá inicio del padecimiento, factores de riesgo, evolución y tratamiento.

A continuación se explica brevemente el método manual utilizado hasta el periodo de julio de 2009 en el Laboratorio de Micología y Parasitología del INP y del cual provienen los datos retrospectivos

9.1 HEMOCULTIVO POR EL MÉTODO MANUAL

Para la realización del método manual se requería que el clínico utilizara una jeringa “heparinizada”, para esto se instruyó al clínico en la forma de hacerlo.

Esto consistía simplemente en succionar heparina con la jeringa y después desecharla, este paso del proceso dependía del tamaño de la jeringa ya que al principio se solicitaba que fuera en jeringas de insulina pero después ya no se solicitaba alguna en especial. El volumen requerido era de aproximadamente 1ml.

En el laboratorio y bajo condiciones de asepsia se colocaba 1 ml en un tubo de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) inclinado adicionado con cloranfenicol, este se ponía a incubar a 27°C y se revisaba semanalmente para advertir cualquier crecimiento que pudiera existir.

Una vez obtenido un tubo presuntamente positivo se le realizó un examen directo, tomando una colonia y colocándola entre porta y cubreobjetos y adicionándole una gota de azul de algodón, si en el examen directo se lograba observar presencia de blastoconidios y/o pseudofilamentos se sembraba en estría por agotamiento en una caja de CHROMagar-Candida® y se incubaba a 37°C durante 24 a 48 horas

hasta obtener un buen crecimiento.

A continuación se expone una breve explicación de los pasos que se siguieron para realizar el estudio:

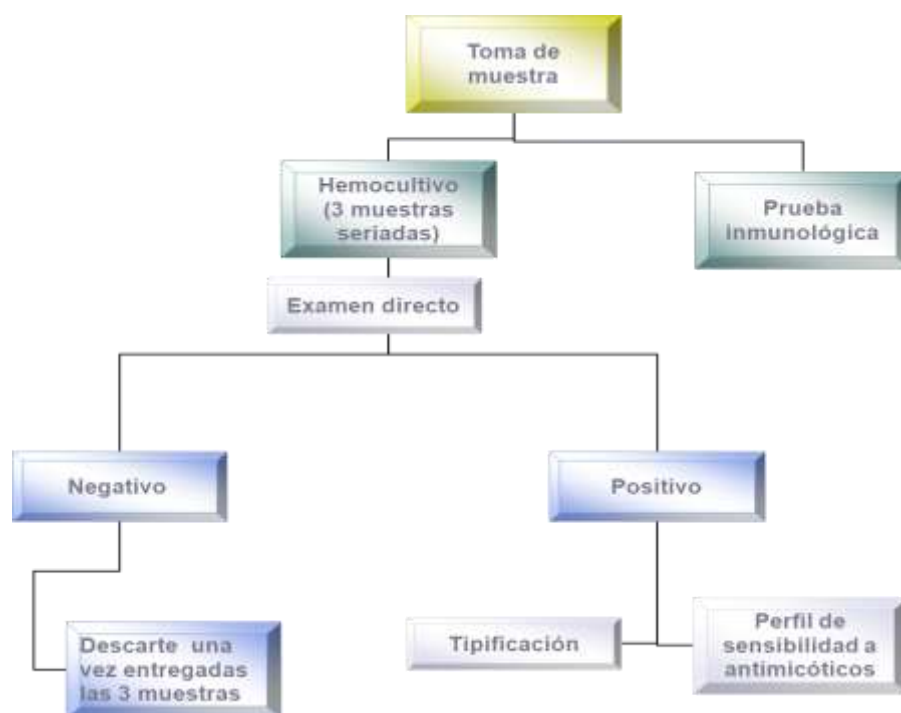


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología seguida durante el periodo del 15 julio de 2008 al 14 de julio de 2010.

HEMOCULTIVO POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO

Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes hospitalizados con hemocultivos para hongos. Las muestras de hemocultivos fueron depositadas en frascos de hemocultivo (Frasco de cultivo BACTEC Myco/F Lityc®) y estas fueron incubadas en un equipo automatizado (BACTEC 9240 de Becton Dickinson®) que se encuentra a 35°C con un protocolo de 30 días, En este equipo se midió la disminución de oxígeno medido por el aumento de fluorescencia y leído por el sistema BACTEC de la serie 9240, un resultado positivo indica la presencia de microorganismos viables en el frasco de hemocultivo. Este es un medio líquido que cuenta con una resina absorbente de intercambio iónico y no iónico, la cual está diseñada para atrapar los antibióticos y así evitar su acción, esta resina ha

sido probada en contra de algunos antibióticos de amplio uso y en lo concerniente a este trabajo también en contra de los antifúngicos más utilizados como son: Anfotericina B en ambas, su forma soluble y en la liposomal, fluconazol, ketoconazol, voriconazol, itraconazol y griseofulvina.^{33;34;41-43}

Una vez obtenido un frasco presuntamente positivo se le realizó un examen directo, homogenizando primero el frasco y después colocando una gota de muestra entre porta y cubreobjetos, no fue necesario adicionar ninguna solución aclarante como KOH al 10% para realizar la lectura. A la par se tomó una alícuota de aproximadamente 0.2 ml y se sembró masivamente en un tubo de ADS adicionado con cloranfenicol incubándose a 27°C. En este punto si en el examen directo se lograba observar presencia de blastoconidios y/o pseudofilamentos se tomó una alícuota del frasco y se sembró por estría en agotamiento en una caja de CHROMagar-Candida® y se incubó a 37°C durante 18 a 48 horas hasta obtener un buen crecimiento

PRUEBA SEROLÓGICA

Junto a las muestras de hemocultivo se solicitó a los clínicos que proporcionaran muestras sanguíneas para montar la prueba serológica de antígeno de *Candida* por el método de aglutinación en látex PASTOREX CANDIDA® como apoyo a la detección de blastoconidios en sangre, esta detecta mediante una técnica simple de aglutinación el polisacárido manano de *Candida*, principal componente de la pared celular de la levadura y principal antígeno circulante, para esto se utilizan partículas de látex recubiertas con el anticuerpo monoclonal de rata EBCA-1 dirigido contra los β 1-5 del manano de *Candida*.

Esta prueba tiene un límite de sensibilidad de 2.5 ng/ml, los sueros se manejan previamente con un tratamiento térmico-mecánico para dissociar los inmunocomplejos circulantes y tratar de eliminar las reacciones inespecíficas^{26;38;39}

.A las muestras sanguíneas se les separó el suero y se hicieron alícuotas de 300 μ l en tubos eppendorf de 1.5 ml y se congelaban a una temperatura de -20°C para su posterior tratamiento.

Para el procedimiento se añadió 100 µl de la solución de tratamiento de suero a cada tubo eppendorf, se homogenizó durante 20 segundos y se puso en una gradilla inmersa en baño María durante tres minutos (temperatura aproximada de 94°C), transcurrido el tiempo se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 10,000 revoluciones por minuto (Rpm). Se separó el sobrenadante y se colocaron 40 µl de este sobre una placa y se le añadió 10 µl del reactivo de partículas de látex, con la ayuda de un aplicador de plástico se homogenizó, finalmente la placa era colocada sobre un agitador durante 20 minutos para ayudar a que la reacción se llevara a cabo.

TIPIFICACIÓN

La tipificación se llevó a cabo mediante los métodos de MicroScan® y el de API Yeast 20C Aux.

8.3.1 TIPIFICACIÓN DE LEVADURAS MEDIANTE EL METODO DE MicroScan®

Para realizar la tipificación mediante la técnica de placa MicroScan®, a las colonias aisladas que fueron sembradas en CHROMagar-Candida® y que no pudieron ser identificadas por este medio cromogénico se les sembró en un tubo de 14x100 con tapón de rosca con ADS incubados a 37°C durante 24 horas para poder obtener el crecimiento necesario para la prueba.

Posteriormente se realizó una emulsión con 3 ml de agua desionizada y esterilizada. La suspensión debe compararse y ser equivalente al patrón de turbidez (1 en la escala de Mcfarland).

Se rotuló el panel con el número de la muestra y en condiciones asépticas se añadieron 50 µL de suspensión de blastoconidios a cada pocillo marcado incluyendo los pocillos control con la leyenda BNAC y NPC.

El panel se incubó durante 4h a 37°C, colocando un panel sobre la placa montada, para evitar la evaporación. Para realizar la lectura de algunos de los paneles se utilizaron 2 reactivos reveladores, el primero fue peptidasa y el segundo fue el

NaOH al 0.5N. Para la primera reacción de identificación se añadió una gota del reactivo peptidasa con una pipeta Pasteur a los siguientes pocillos: BNAC, HPR, ILE, PRO, TYR, GLY, GGLY, GLAR, GLPR, AARG, LYAL, ALA, STY e HIS, las reacciones son positivas solamente si se observa una coloración roja o rosa.

Para la segunda reacción se añadió una gota de NaOH 0.05N con una pipeta Pasteur a los siguientes pocillos: AGL2, BDF, AGAL, NPC, NAG, CELL y NGAL

La lectura del panel para la identificación de la levadura se realiza de forma computarizada mediante el análisis de las 27. Se realizó también la verificación de dichas lecturas visualmente para corroborar la lectura del equipo. Teniendo como confiable el resultado de tipificación un valor de probabilidad de más del 95%, marcado por el equipo, en caso de tener un porcentaje menor mediante este método, se utilizó el método de tira API 20 C AUX para la identificación.

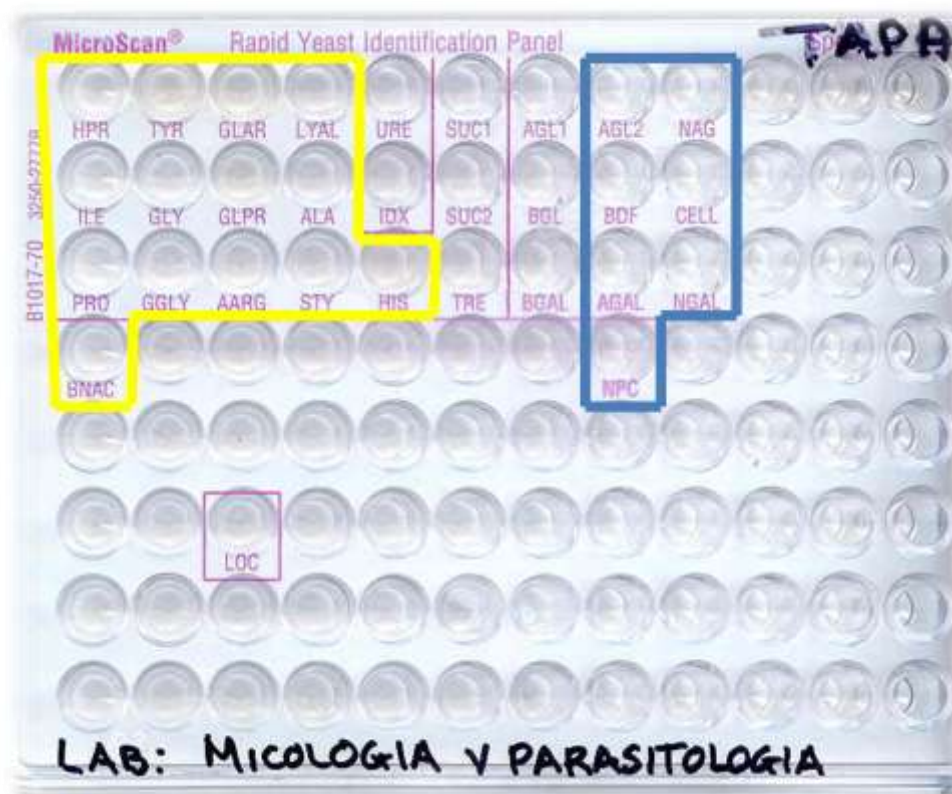


Figura 7. Placa usada para la prueba automatizada MicroScan®, a la parte en amarillo se le adiciona peptidasa después del tiempo de incubación para llevar a cabo el revelado, mientras que a la parte en azul se le agrega NaOH 0.1N como revelador.

8.3.2 IDENTIFICACION DE HONGOS LEVADURIFORMES POR EL MÉTODO DE TIRA API 20 C AUX

Para realizar esta técnica se utilizaron colonias jóvenes de 24 horas que fueron aisladas en el medio CHROMagar Candida® y resembrado en un tubo con ADS masivamente, después de esto se hizo una emulsión en un vial de agua estéril a una densidad óptica de 2 en la escala de McFarland, posteriormente se alicuotaron 100 µl de esta emulsión en una vial de 7ml con la leyenda Medio C incluido en el kit, finalmente después de homogenizar se llenaron las cúpulas a un 80% de su capacidad y se incubaron durante 48 horas a 37°C para poder ser leídas mediante el programa de computo. El porcentaje de aceptación para los resultados de esta prueba fue de 95%.



Figura 8. Ejemplo de tira API inoculada con *C. albicans*, las cúpulas con un grado de turbidez mayor o igual a la cúpula marcada como O se consideran positivas.

8.5 CONTROL DE CALIDAD

Se llevo acabo un control de todas las técnicas que fueron utilizadas, esto se consiguió realizando todo el procedimiento antes descrito cada 15 días o cuando se hacia un cambio de lote de cualquier kit de pruebas con las siguientes cepas:

- *Candida albicans* ATCC 90028
- *Candida tropicalis* ATCC 750
- *Candida krusei* ATCC 5264
- *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Para el control positivo de hemocultivo se colocaron dos frascos, cada uno inoculado con 0.1 ml de una suspensión con las cepas antes descritas tomadas aleatoriamente, con una densidad óptica de 1 en la escala de McFarland y dos

frascos sin inóculo como control negativo, después se verificó el tiempo en el que se activo la alerta dada por el equipo para después proseguir a la tipificación como se a descrito anteriormente.

10. PROCESAMIENTO DE DATOS

Para el análisis se revisaron los resultados de hemocultivos enviados al laboratorio de Micología y Parasitología del INP entre julio de 2008 y julio de 2010. Una vez obtenidos dichos datos, se procedió a revisar los expedientes de cada paciente con los siguientes registros: edad, sexo, diagnóstico de base, especie aislada, servicio, número de hemocultivos y la solicitud de estudios para antígeno de *Candida* que correlacionara con los aislamientos positivos.

Se realizó mediante estadística descriptiva, para las variables demográficas buscadas.

11. RESULTADOS

Durante este estudio se recibieron un total 1226 muestras de hemocultivo tomados en los frascos Myco F/ Lityc en el periodo del 15 julio del 2009 al 14 julio de 2010, mientras que se revisaron los registros del periodo del 15 julio del 2008 al 14 julio de 2009 y se obtuvieron 1165 muestras de hemocultivo en total (Gráfico 1).

El aislamiento de levaduras en el método manual fue en promedio de 6 días y el de la tipificación fue de 10 días, por otro lado el promedio del aislamiento y tipificación del otro método fue de 2 y 4 días respectivamente

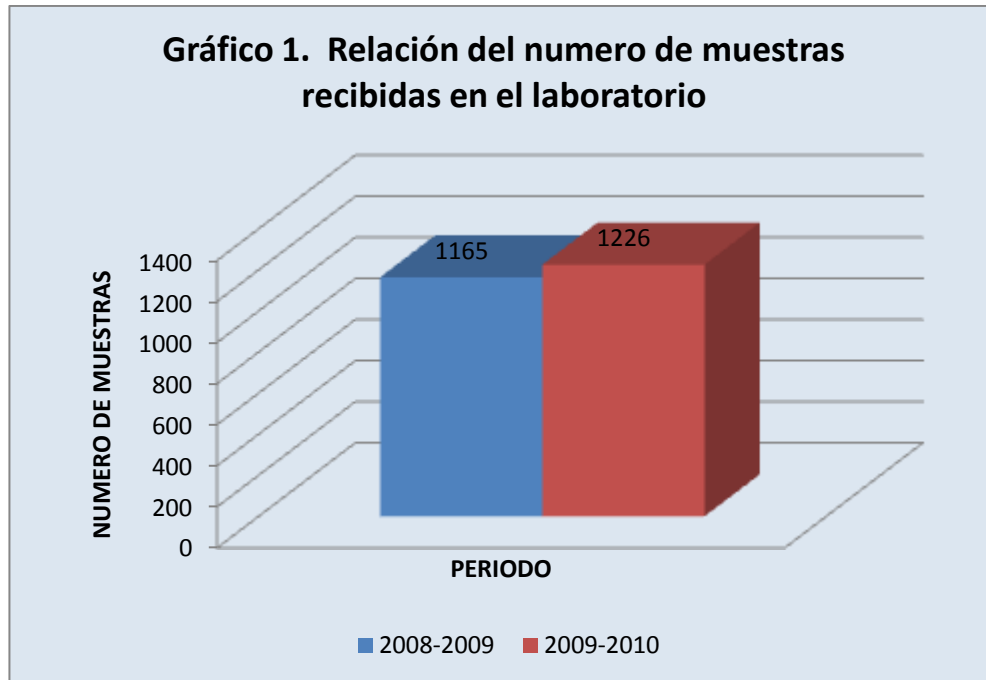


Gráfico 1. Relación de número de hemocultivos recibidos en el laboratorio durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2010.

De estos resultados se observó que por el método manual se encontraron solo siete resultados positivos para levaduras y 43 aislamientos de crecimiento bacteriano, por el contrario se encontró que en el método automatizado se obtuvieron 32 aislamiento positivos y 112 aislamientos bacterianos en todo el tiempo de estudio (Gráfico 4)



Gráfico 2. Relación de aislamientos positivos en hemocultivos durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2010

Los aislamientos resultantes de ambos métodos se muestran a continuación:

PORCENTAJE DE ESPECIES AISLADAS DURANTE EL PERIODO 2008-2009

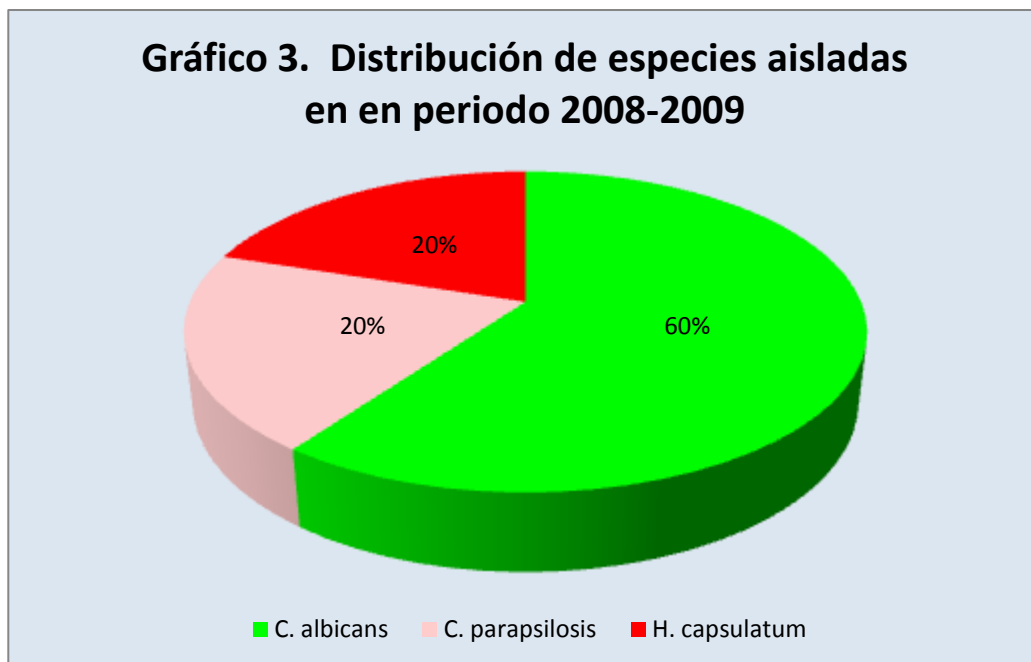


Gráfico 3. Distribución de especies obtenidas mediante la técnica de hemocultivo manual expresada en porcentajes

DISTRIBUCIÓN DE GENEROS AISLADOS DURANTE EL PERIODO 2008-2009 POR CASOS

<i>Especie aislada</i>	<i>Distribución</i>
<i>C. albicans</i>	3
<i>C. parapsilosis</i>	1
<i>H. capsulatum</i>	1
TOTAL	5

Tabla 2. Distribución de especies obtenidas mediante la técnica de hemocultivo manual por casos

La identificación de *H. capsulatum* se realizó al aislar colonias blanco-ocre en medio de agar Micosel a las cuales se les realizó examen directo con KOH al 20% y se observaron al microscopio macroconidios en forma de corcholata.



Figura 9. Cultivo de *H. capsulatum* en agar de Micosel donde se observan dos tipos de colonias vellosas una blanca y otra ocre



Figura 10. Examen directo con KOH al 20% de las colonias aisladas en agar de Micosel donde se observan macroconidios en forma de corcholata característicos de *H. capsulatum*.

Finalmente se resembraron las colonias en agar gelosa sangre a 37°C y se tiñeron con Giemsa para demostrar el dimorfismo característico.

PORCENTAJE DE ESPECIES AISLADAS DURANTE EL PERIODO 2009-2010

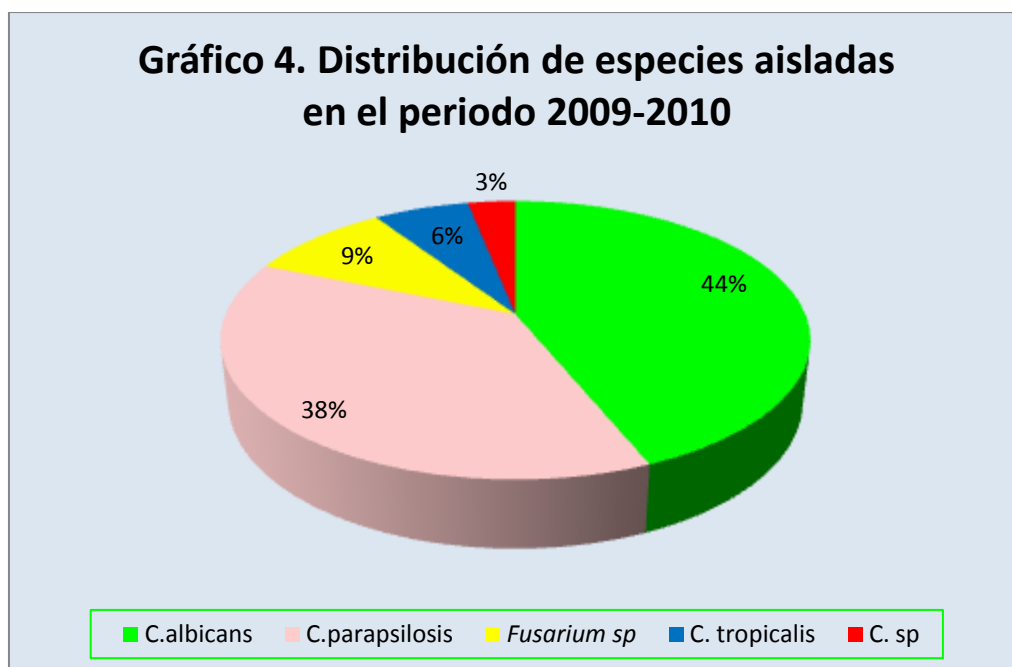


Gráfico 4. Distribución de especies obtenidas mediante la técnica de hemocultivo automatizado

DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES AISLADAS DURANTE EL PERIODO 2009-2010 POR CASOS

<i>Especie aislada</i>	<i>Distribución</i>
<i>C. albicans</i>	14
<i>C. parapsilosis</i>	12
<i>Fusarium sp.</i>	3
<i>C. tropicalis</i>	2
<i>C. sp</i>	1
TOTAL	32

Tabla 3. Distribución de especies obtenidas mediante la técnica de hemocultivo automatizado

Las colonias blancas y filamentosas obtenidas de los frascos de hemocultivo fueron cultivadas en ADS y Micosel, a las colonias resembradas se les realizó un examen directo donde se pudieron observar macroconidios en forma de media luna característicos de *Fusarium sp.*, lo que llevó al diagnóstico.



Figura 11. Examen directo de la resiembra de un cultivo donde se pueden observar macroconidios en forma de media luna característicos de *Fusarium sp.*

Para los análisis demográficos en los que se tomó en cuenta el sexo, la edad, el servicio y factores predisponentes se obtuvieron los siguientes resultados.



Gráfico 5. Distribución de aislamientos por servicio durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2010.

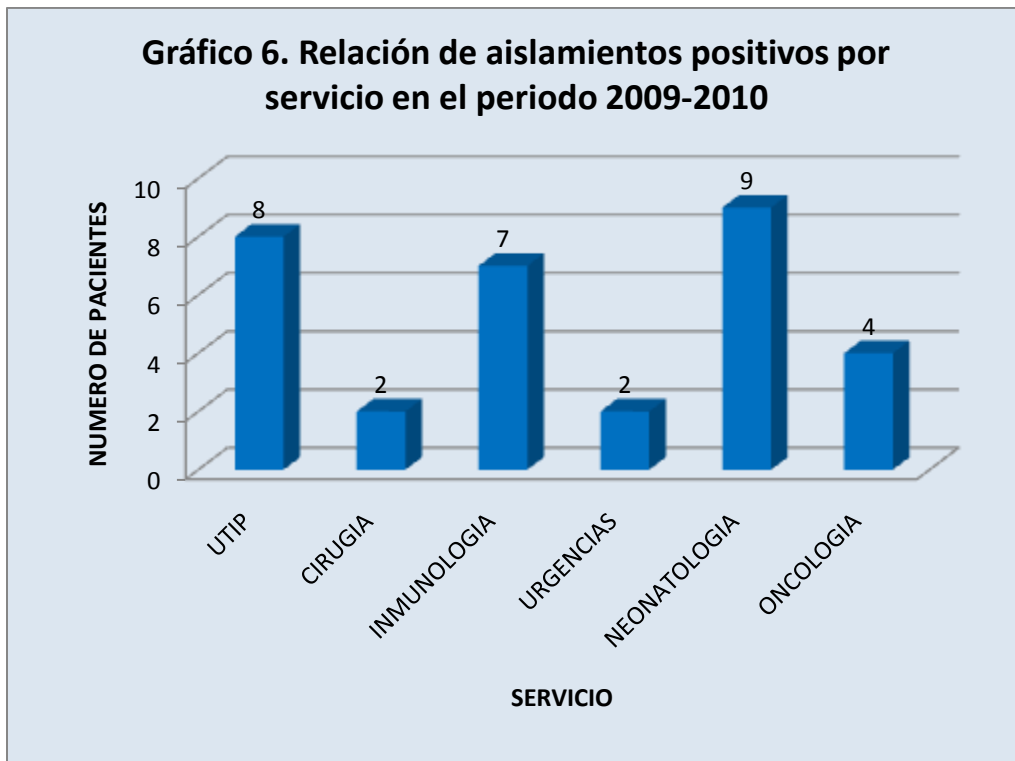


Gráfico 6. Distribución de aislamientos por servicio durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2009.

También se elaboró una grafica en la cual se aprecia la distribución de las especies aisladas en los servicios de mayor número de casos

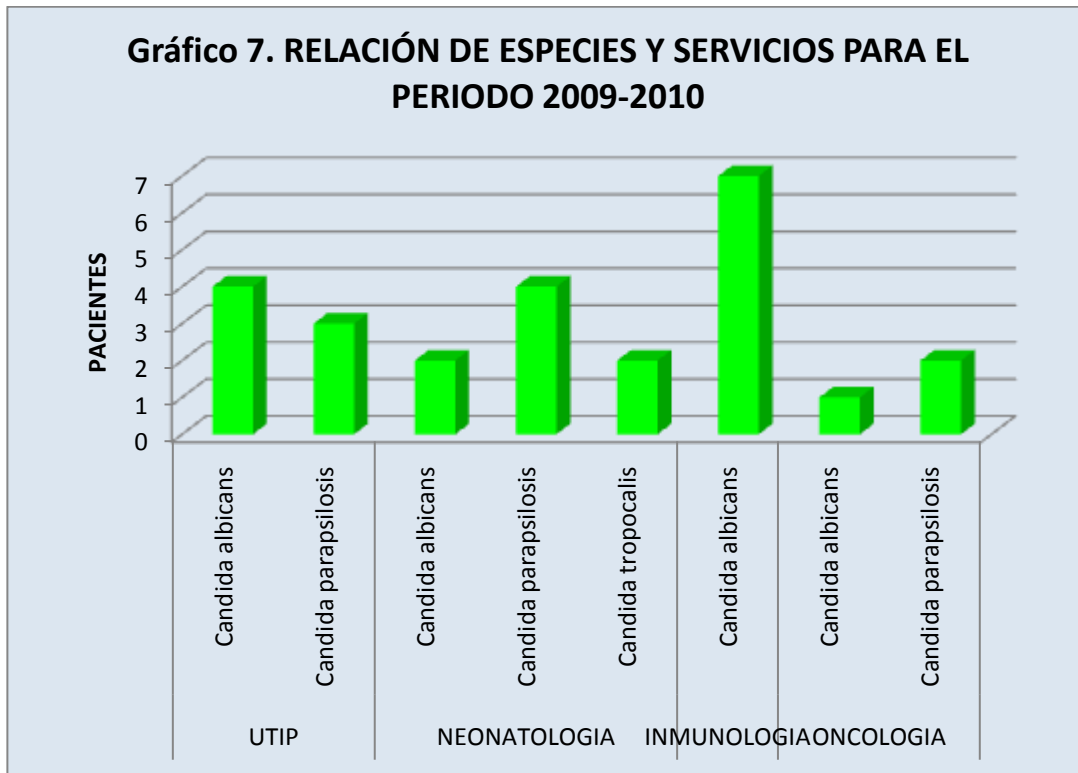


Gráfico 7. Distribución de aislamientos por servicio y por especie durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2010.

La relación de edad se tomó en cuenta en dos grupos para poder apreciar la significancia que tiene el aislamiento de *Candida* en pacientes recién nacidos, ya que esta población es la más susceptible a contraer infecciones intrahospitalarias

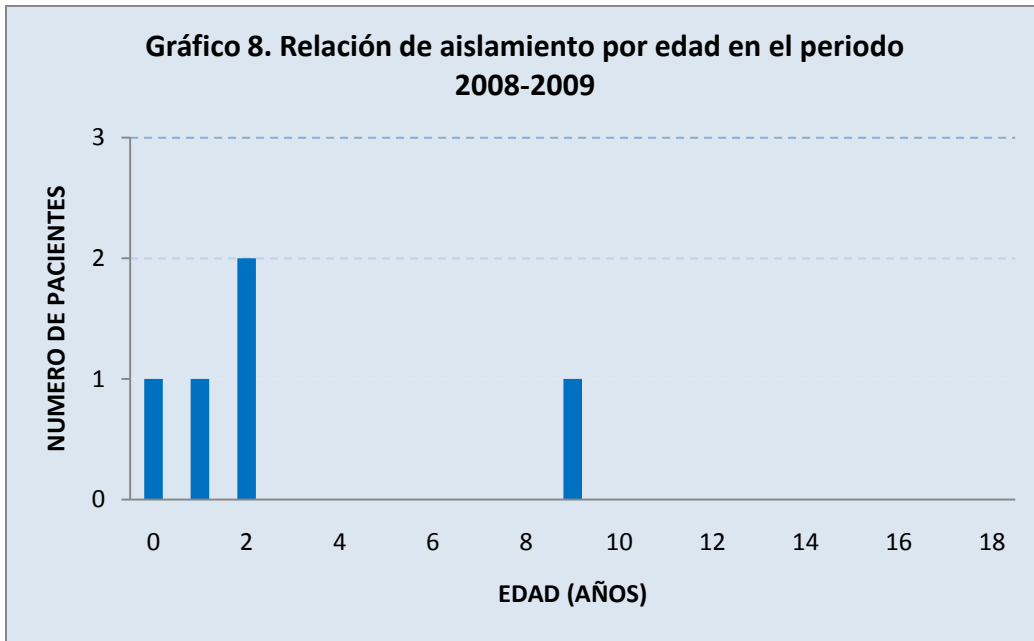


Gráfico 8. Distribución de aislamientos por edad durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2009.

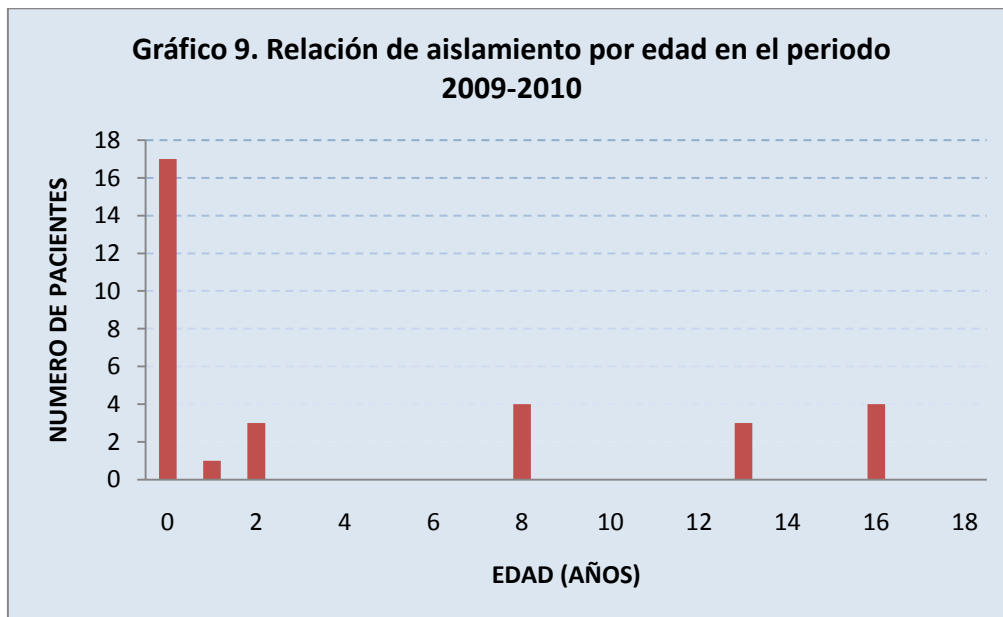


Gráfico 9. Distribución de aislamientos por edad durante el periodo de julio del 2009 a julio de 2010.

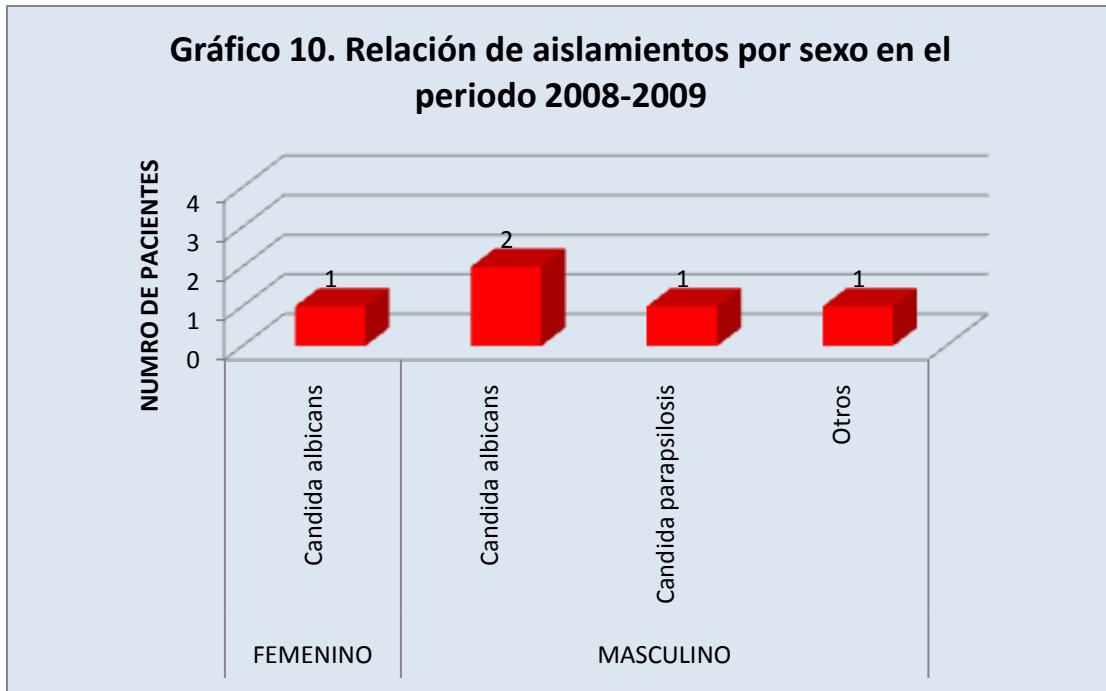


Gráfico 10. Distribución de aislamientos por sexo durante el periodo de julio del 2008 a julio de 2009.
Otros: Hongos diferentes de *Candida*

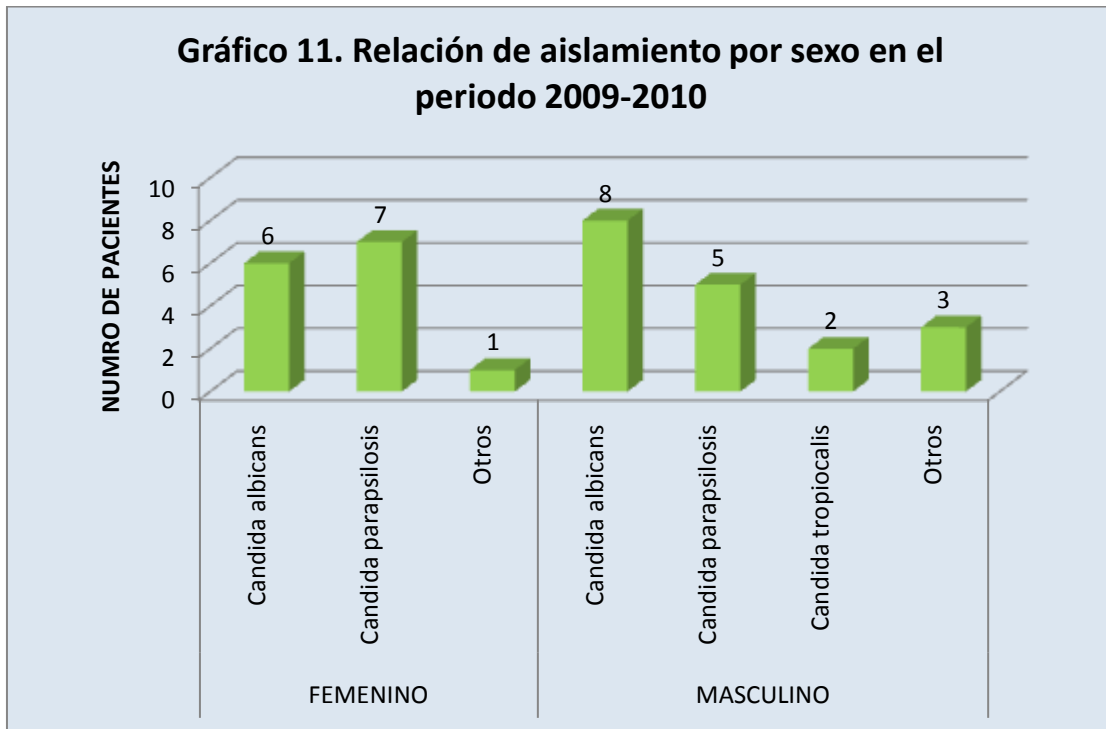


Gráfico 11. Distribución de aislamientos por sexo durante el periodo de julio del 2009 a julio de 2010.
Otros: Hongos diferentes de *Candida*

A los resultados con crecimiento bacteriano se les practicó tinción de Gram para obtener como dato adicional la distribución de bacterias encontradas.

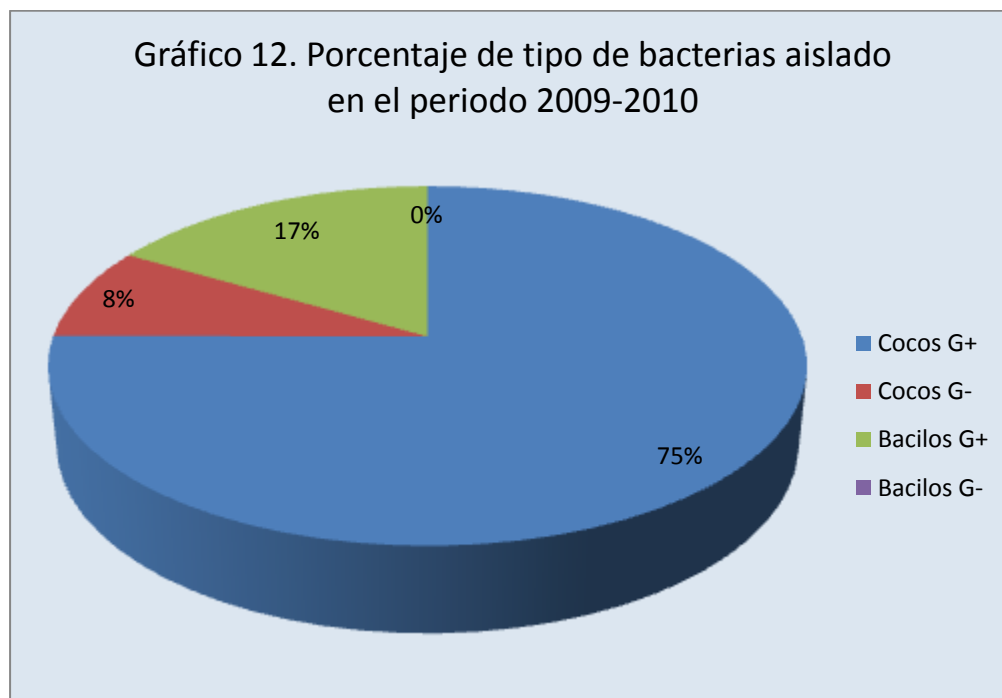


Gráfico 12. Relación de hemocultivos con crecimiento bacteriano y tipo de crecimiento durante el periodo de julio del 2009 a julio de 2010.

DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DURANTE EL PERIODO 2009-2010 POR CASOS

<i>Tipo de bacteria</i>	<i>Aislamiento</i>
Cocos G+	84
Cocos G-	9
Bacilos G+	0
Bacilos G-	9
TOTAL	112

Tabla 4. Relación de hemocultivos con crecimiento bacteriano y tipo de crecimiento durante el periodo de julio del 2009 a julio de 2010.

La cantidad de antígenos de *Candida* recibidos y su relación con los hemocultivos positivos en el laboratorio se presenta a continuación en donde se muestra la poca relación entre las pruebas inmunológica y de hemocultivo.

MES*	TOTAL DE ANTIGENOS PROCESADOS	ANTIGENOS POSITIVOS	AISLAMIENTOS POSITIVOS
julio/2009	30	2	4
agosto/2009	48	0	4
septiembre/2009	23	1	2
octubre/2009	41	2	13
noviembre/2009	21	0	2
diciembre/2009	40	0	0
enero/2010	33	0	2
febrero/2010	36	0	0
marzo/2010	30	0	0
abril/2010	22	0	0
mayo/2010	25	0	2
junio/2010	37	0	3
TOTAL	386	5	32

Tabla 5. Análisis prospectivo de muestras para Antígenos de *Candida* procesados durante el periodo 15 de Julio de 2009-al 14 de julio de 2010

La relación en la cual dieron positivas ambas pruebas en el diagnóstico de candidiasis fue de solo uno, este resultado correspondió con una *Candida* de la especie *tropicalis*, los demás positivos para la prueba del Antígeno de *Candida* por el método de aglutinación en látex no coincidieron con la positividad de los hemocultivos

Finalmente se hace un comparativo en donde se revisa la cantidad de hemocultivos positivos y en que rango de muestras enviadas al laboratorio (ya sean de 1, 2 o 3 muestras) se encuentran.

NUMERO DE HEMOCULTIVOS	2008-2009			2009-2010		
	NUMERO DE PACIENTES	NUMERO DE POSITIVOS ENCONTRADOS	PORCENTAJE	NUMERO DE PACIENTES	NUMERO DE POSITIVOS ENCONTRADOS	PORCENTAJE
1	565	1	20	410	5	22.4
2	153	1	20	157	3	21.5
3	98	3	60	164	7	56.1
TOTAL	816		100	731		100

Tabla 6. Relacion de muestras entregadas en el laboratorio y hemocultivos en ambos periodos

12. ANALISIS DE RESULTADOS

Los casos positivos reportados mediante hemocultivos automatizados fueron mayores con respecto a los reportados mediante hemocultivos manuales, esto se debe a que el método automatizado es más sensible ya que contiene un medio liquido en el cual los microorganismos se encuentran inmersos durante la incubación, la constante agitación y la adición de resinas de intercambio iónico y no iónico que ayudan a atrapar moléculas de antibióticos, ayudando así al rápido crecimiento de éstos, mejorando de este modo el tiempo en el cual se tipifican y se les realizan los perfiles de sensibilidad a antimicóticos. Tomando en cuenta esto se puede minimizar la posibilidad de crear cepas resistentes al proporcionar un tratamiento específico y no solo uno profiláctico, el cual se verá reflejado en la disminución del costo día/tratamiento en el hospital. También se pudo observar que no existió una diferencia significativa entre el número de muestras entregadas al laboratorio cada año.

Además el sistema automatizado permitió el aislamiento de un hongo filamentoso, *Fusarium sp* fue encontrado en tres hemocultivos de dos pacientes diferentes, los cuales desarrollaron en menos de 24 horas y creciendo antes de que los síntomas en el paciente fueran notables reforzando la idea de que estos nuevos sistemas son cruciales para una detección más rápida de los agentes patógenos. El método manual permitió el desarrollo de un hongo dimórfico que fue *H. capsulatum*, sin

embargo para lograr el crecimiento de este hongo se requiere de medidas de seguridad estrictas, ya que es altamente patógeno por lo que el cultivo en seco no es una opción viable en estos casos.

Por otra parte se obtuvo un crecimiento positivo en el equipo automatizado, al cual se le realizó un examen directo y se averiguó que se trataba de una levadura, sin embargo no se logró obtener crecimiento en la resiembra en CHROMagar *Candida* ni en ADS por lo cual no se pudo hacer su identificación, cabe señalar que el paciente presentaba un tiempo de al menos dos semanas de tratamiento con Fluconazol y que las resinas de intercambio iónico y no iónico funcionaron permitiendo el crecimiento en el medio líquido.

El incremento en la distribución de especies de *Candida* no *albicans* durante el periodo 2009 – 2010 se pudo apreciar a simple vista durante el análisis prospectivo siendo *C. parapsilosis* el segundo lugar con un 38%, muy cercano al de *C. albicans* quien presentó 44% y *C. tropicalis* el tercer lugar con un 6%, mientras que en el periodo 2008-2009 la distribución de *C. albicans* fue mayor a razón de 3 a 1 con respecto a *C. parapsilosis*. Los datos recolectados de los expedientes clínicos mostraron también que el 90% de los pacientes tuvieron como factor predisponente a la infección una cirugía y/o colocación de CVC por lo que se puede decir que los casos positivos se debieron a la falta de higiene y precaución en la manipulación de los pacientes.

Otro punto importante de mencionar es acerca del rango de edad en la que se encontraron los casos positivos, siendo los menores de un año los más afectados con más del 50% de casos presentados durante el periodo 2009-2010 en contraste con el periodo 2008-2009 en donde al menos el 80% de los resultados positivos se encuentran entre los primeros 2 años de edad, en cuanto a los servicios con mayor número de casos encontramos 3 que son: UTIP, Inmunología y Neonatología, siendo este último el que contó con el mayor número de casos durante el periodo 2009-2010, en comparación con el periodo 2008-2009 en el

cual se tuvieron casos de Cirugía, UTIP, Oncología, Infectología y Urgencias, uno en cada uno y donde el caso de histoplasmosis llego por Urgencias.

En cuanto al sexo no se presento una diferencia significativa en el tropismo de las especies siendo prácticamente el mismo numero de casos de las especies de *Candida albicans* y *parapsilosis* para ambos sexos durante el periodo 2009-2010, mientras que en el periodo 2008-2009 el 80% de los casos pertenecieron al sexo masculino.

En este sistema también se mejoró el aislamiento de bacterias las cuales aumentaron más del 100% en comparación con lo obtenido en 2008-2009, además de que se realizó una relación de tipo de bacteria en el que se pudo observar que el 75% de estos aislamiento bacterianos fue de cocos Gram positivos, los cuales probablemente sean simple contaminación por arrastre en la toma de muestra, aunque esto no se puede asegurar ya que no se realizo la tipificación de microorganismo encontrado.

Respecto a la compatibilidad de los métodos serológico y manual se puede observar que no existe esta, ya que solo hubo un resultado en los que ambos resultaron positivos, la antigenemia transitoria es una de las causas por las que se pueden obtener falsos positivos, y la baja sensibilidad debido a que la vida media del manano en suero suele ser muy corta, y al no entregarse muestras seriadas se pueden obtener falsos negativos como en nuestro caso al cual solo el 10% de los clínicos entregaron dos muestras, también cabe mencionar que ninguno entrego tres muestras seriadas al laboratorio lo que disminuye la sensibilidad de la prueba.

Finalmente se encontró que el rango de muestras en los cuales se encontraron el mayor número de positivos es en el de tres muestras seriadas enviadas al laboratorio, recalando la importancia de no quedarse solo con un resultado, ya que la posibilidad de una contaminación por arrastre es muy grande sin embargo estas se pueden descartar al compararse con la sintomatología presentada por el paciente y con la realización de pruebas complementarias mas sensibles.

13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mejora del método en cuanto a sensibilidad se puede apreciar a simple vista, así como el tiempo en el cual se obtiene la tipificación completa y el perfil de sensibilidades a antifúngicos el uso de esta metodología de vanguardia ayuda al hemocultivo a seguir siendo un estándar de oro al no encontrar una técnica definitiva de diagnóstico.

Por otro lado la distribución de especies encontradas con la nueva metodología es muy semejante de lo reportado en la literatura en cuanto al predominio de especies de *Candida sp* ya que se encontró un 38% de *Candida parapsilosis* cuando es reportado hasta en el 35% de los aislamientos en hemocultivo y de un 8% para *C. tropicalis* cuando es reportado hasta en un 15% de los casos lo que nos habla del movimiento existente entre especies oportunistas

Los resultados muestran que los servicios en donde se encuentran los pacientes con enfermedades que provocan severa inmunosupresión son los que se encuentran el mayor número de casos reportados, así como también el rango de edad en el que existen mas casos es el de menores de dos años y sobre todo en recién nacidos. Cabe mencionar que el 96% de los casos tienen como antecedente el uso de catéter y/o una cirugía previa, esto nos muestra que probablemente estos casos se presentaron debido a contaminación durante o post-cirugía.

El crecimiento bacteriano y de hongos filamentosos logrado muestra que el medio no solo funciona para hongos levaduriformes y que el tiempo para un resultado positivo cada vez es menor siendo este de horas. Por otro lado el uso de una prueba complementaria como fue la aglutinación en látex, en este caso no fue realmente útil ya que solo se obtuvo un caso en el que ambas pruebas fueron positivas, esto pudo deberse a una antigenemia presente en los pacientes al momento de tomarse la muestra o a la baja sensibilidad que tiene el anticuerpo

monoclonal a los tipos de mananos encontrados en las diferentes especies de *Candida*.

Finalmente el mayor numero de casos encontrados positivos continúan estando dentro del rango de las tres muestras consecutivas, sin embargo se puede apreciar que el método es tan sensible que inclusive con solo una muestra es posible obtener un resultado positivo y este no ser precisamente contaminación por arrastre puesto que se verificaron los casos con la historia clínica del paciente y la sintomatología coincidía con el diagnóstico

14. CONCLUSIONES

La candidosis sistémica y la candidemia son micosis causadas por diferentes especies del género *Candida*, estas se han convertido en un severo problema de infecciones intrahospitalarias, siendo entre el 10% y el 20% de los casos de infecciones de torrente sanguíneo, afectando en su mayoría a pacientes que tienen enfermedades que generan una severa inmunosupresión, y teniendo un rango en el porcentaje de mortalidad de entre 10-40% en pacientes pediátricos menores de 8 años. El uso de nuevas y mejores tecnologías tales como el hemocultivo automatizado, las técnicas de serodiagnóstico, de utilización de sustratos e incluso con técnicas de biología molecular ayudan a que los pacientes reciban en menor tiempo un tratamiento específico al tipo de microorganismo causal y así evitar la aparición de cepas resistentes. La complementación de dos o mas técnicas ayuda a mejorar la sensibilidad de las técnicas en la identificación, sin embargo, en este estudio se demostró que la técnica de aglutinación en látex no es un método con la suficiente sensibilidad para ser complementario, por eso este debe ser sustituido por algún otro, como por ejemplo la técnica de ELISA que apenas esta entrando en el mercado nacional. En este estudio también se logró observar una tendencia creciente en la cantidad de casos de especies no *albicans* de *Candida* como *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* en donde la primera es casi de la misma proporción que *C. albicans*, y en donde el numero de casos referentes a estas dos especies es diferente en Estados Unidos donde *C. tropicalis* tiene el segundo lugar en distribución. Finalmente se encontró que la población mas afectada resulto ser los niños menores de 2 años y además que el 90% de la población tenía como antecedente una cirugía asociada en su mayoría al uso de CVC lo que podría indicar la falta de higiene y atención por parte del personal en la manipulación del paciente.

15. PERSPECTIVAS

En este trabajo se verificó la poca concordancia en los resultados entre el nuevo método de hemocultivo y la prueba rápida de aglutinación de antígeno en partículas de látex por lo que el utilizar otro método de diagnóstico como las pruebas comerciales de ELISA que apenas están entrando en el mercado nacional o métodos comerciales que ocupan técnicas de biología molecular supondría una forma de ampliar este trabajo. Otra forma de complementar este estudio podría ser la tipificación exhaustiva de las cepas de *Candida albicans* pudiendo determinar la proporción en la que se encuentra *Candida dubliniensis*, una especie que es difícilmente distinguible de la primera y que requiere de otros métodos para su tipificación. Finalmente otra adición a este trabajo pudiera ser el reporte de sensibilidad a antimicóticos realizados por métodos manuales, de los cuales se obtiene la concentración inhibitoria exacta y no solo un rango como en las pruebas comerciales.

16. REFERENCIAS

1. Resendiz, J and Morales, J. Risk factors associated with mortality due to *Candida* sp. infections in children. 2008.
2. Theoklis, E, Zaoutis, T. E., and Mollie, H. Risk factors of disseminated candidiasis in children with candidemia. *The pediatric infectious disease journal* 23(7), 635-641. 2004.
3. Bonifaz A. Candidosis. In: Mc Graw Hill, ed. *Micologia Medica Basica*. Mexico, DF 2009:301-326.
4. Chen S, Slavin M, Nguyen Q et al. Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg.Infect.Dis.* 2006;12:1508-1516.
5. Samonis G, Kofteridis DP, Saloustros E et al. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infection in patients in a tertiary hospital: an analysis of microbiological data. *Scand.J.Infect.Dis.* 2008;40:414-419.
6. Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, Armaganidis A, Falagas ME. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections: differences in risk factors and outcome. *Anesth.Analg.* 2008;106:523-9, table.
7. Zaoutis TE, Prasad PA, Localio AR et al. Risk Factors and Predictors for Candidemia in Pediatric Intensive Care Unit Patients: Implications for Prevention. *Clin.Infect.Dis.* 2010

8. Celebi, S, Mustafa, H, Ozlem, O, and Guven, O. Nosocomial candidaemia in children: results of a 9-year study. *Clin.Infect.Dis.* 100, 1439-1457. 2007.
9. Poikonen, E, Koukila, P, and Petri, R. Nosocomial candidaemia in a Finnish tertiary care centre during 1987-2004. *Scand.J.Infect.Dis.* 41, 590-596. 2004.
10. Carrillo, R, Carrillo, J, and Cordova, L. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cir.Ciruj* 77, 301-308. 2009.
11. Sanchez, G, Diaz, H, Diaz, RD, and Jimenez, C. Epidemiologia de las infecciones sistemicas por candida en el Hospital de Pediatria del Centro Medico Nacional Siglo XXI. *Bol Med Hosp Infant Mex* 61, 289-296. 2004.
12. Loza, A, Resendiz, J, Salgado, R, and Bernal, R. Aislamiento, identificación y patrones de susceptibilidad de cepas de *Candida* causantes de infección sistémica en un hospital infantil. *Inv.Univ.Multi* , 41-48. 2005.
13. Gehna, DJ and Roberts, GD. Laboratory detection of fungemia. *Clin.Lab.Med* 14, 83-97. 4.
14. MacDonald, L, Baker, C, and Chenmoweth, C. Risk factors for candidemia in a children's hospital. *Clin.Infect.Dis.* 26, 642-645. 1998.
15. Roig, T and Gonzalez, R. Infección por especies de *Candida* durante los cuidados intensivos neonatales. 2010.
16. Viudes, A, Perman, J, Canton, E, and Ubeda, P. Candidemia in tertiary hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21, 767-774. 2002.

17. Perman J, Mazuelos E, Rubio M. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica.; 2001.
18. Jaramillo, A., Martines, E., Tenorio, I., Arroyo, S, and Arenas, R. Prevalencia de hemocultivos positivos para *Candida sp.* *Distribucion de levaduras aisladas de pacientes internados en un hospital de segundo nivel de la ciudad de mexico.* Revista Mexicana de Dermatologia 53(1), 3-6. 2009.
19. Vazquez, T, Garcia, G, Campos, T, and Martinez, A. Detección de antígeno manan de *Candida* en suero mediante anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de candidiasis aguda diseminada. Rev Mex Patol Clin. 221-228. 2002.
20. Lewis, P, Archer, A, and Barnes, R. Comparison of Non-Culture-Based Methods for Detection of Systemic Fungal Infections, with an Emphasis on Invasive *Candida* Infections. J.Clin.Microbiol. 2181-2187. 2005.
21. Mussaret, ZJ, Monearla, BD, and Ponce de León, RS. Infecciones nosocomiales en una unidad de pediatría. Bol Med Hosp Infant Mex 54, 415-423. 1998.
22. Archibald LK, McDonald LC, Addison RM et al. Comparison of BACTEC MYCO/F LYTIC and WAMPOLE ISOLATOR 10 (lysis-centrifugation) systems for detection of bacteremia, mycobacteremia, and fungemia in a developing country. J.Clin.Microbiol. 2000;38:2994-2997.
23. Amhad, s, Khan, Z, Mustafa, A, and Khan, ZU. Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: Comparison with Culture, Antigen Detection, and

- Biochemical Methods for Species Identification. *J.Clin.Microbiol.* 2483-2489. 2002.
24. Gutierrez, J, Maroto, C, Piedrola, G, Martin, E, and Pera, JA. Circulating Candida Antigens and Antibodies: Useful Markers of Candidemia. *J.Clin.Microbiol.* 2550-2554. 2003.
 25. Fujita, S and Hashimoto, T. Detection of Serum Candida Antigens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a Latex Agglutination Test with Anti-Candida albicans and Anti-Candida krusei Antibodies. *J.Clin.Microbiol.* 3132-3137. 2000.
 26. Becker, K, Almasri, A, von Eiff, C, and Peters, G. Systematic Survey of Nonspecific Agglutination by Candida spp. in Latex Assays. *J.Clin.Microbiol.* 1315-1319. 2007.
 27. Vazquez, T and Campos, T. Candidemia. *Acta Pediatr Mex* 27(1), 30-35. 2003.
 28. Fernandez, E, Planes, A, and Rodriguez, M. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Soc.Esp de Enf.Clin.Inf.* 2003.
 29. Vazquez T, Campos T, Martinez I et al. Micosis Profundas y Oportunistas. En: *Infectología Clínica Pediátrica.*: Ed.McGraw-Hill Interamericana; 2003:981-1002.

30. Thomas, J and John, HR. Clinics of North America. Fungal Infections, Part I: Recent Advances in Diagnosis, Treatment, and Prevention of Opportunistic Mycoses. Scand.J.Infect.Dis. 16(4). 2002.
31. Vetter, E, Torgerson, C, Feuker, A, Hughes, J, and Roberts, G. Comparison of the BACTEC MYCO/F Lytic Bottle to the Isolator Tube, BACTEC Plus Aerobic F/Bottle, and BACTEC Anaerobic Lytic/10 Bottle and Comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/Bottle to the Isolator Tube for Recovery of Bacteria, Mycobacteria, and Fungi from Blood . J.Clin.Microbiol. 4380-4386. 2001.
32. Peter, D, Jan, H, and Paul, H. Blood culture bottles are superior to lysis-centrifugation tubes for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. J.Clin.Microbiol. 30(3), 667-669. 1992.
33. BD Diagnostics. BD BACTEC™ Myco/F Lytic Culture vials. 2010.
34. BD Diagnostics. BD Frascos de cultivo BACTEC Myco/F Lytic. 2010.
35. BD, Diagnostics. www.bd.com/diagnostics/BACTEC 9000. MD . 2009.
36. Martinez, A, Gaitan, M, and Lopez, R. Candidiasis cutánea: utilidad del CHROMagar Candida en la identificación de especies. Revista Mexicana de Dermatología (52), 3-121. 2008.
37. Odds, C and Bernaerts, R. CHROMagar Candida a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. J.Clin.Microbiol. 32, 1923-1929. 1994.
38. BIORAD. Inserto PASTOREX CANDIDA. 2000. BIORAD.

39. Herent, P, Stynen, D, Hernando, F, Fruit, J, and Poulain, D. Retrospective Evaluation of Two Latex Agglutination Tests for Detection of Circulating Antigens during Invasive Candidosis. *J.Clin.Microbiol.* 2158-2164. 1992.
40. Oliveri, S, Trovato, L, Betta, P, Romeo, G, and Nicoletti, G. Experience with the Platelia Candida ELISA for the diagnosis of invasive candidosis in neonatal patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14, 391-397. 2008.
41. Mach CR, Crowther LS, Stewart L. Effectiveness of the BACTEC™ Blood culture resin-based antimicrobial removal system with fluoroquinolones, antifungals, daptomycin, tigecycline and polimixin B. MD 2006
42. Waite, R and Woods, G. Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic Medium for Recovery of Mycobacteria and Fungi from Blood. *J.Clin.Microbiol.* 1176-1179. 1998.
43. Fuller, D, Davis, T, Denys, G, and York, M. Evaluation of BACTEC MYCO/F Lytic Medium for Recovery of Mycobacteria, Fungi, and Bacteria from Blood. *J.Clin.Microbiol.* 2933(2936). 2001.