



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE
PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA
TÉCNICA INTRALUMINAL

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

SELENE RAMOS SARMIENTO

ASESORES

DR. LUIS JAVIER MÉNDEZ TOVAR

DRA. PATRICIA MANZANO GAYOSSO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2015



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.

**FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE
CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL**

Este trabajo se realizó en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Investigación Médica en Dermatología y Micología, Laboratorio Central ambos de la U.M.A.E. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en la Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, (trabajo incluido en el proyecto FAC MED (107/2014), PAPIIT IN215615) bajo la dirección del Dr. Luis J. Méndez Tovar, la asesoría de la Dra. Patricia Manzano Gayosso y la participación del Q.F.B. Juan Israel Silva González.

I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL	I
II. ABREVIATURAS	III
III. ÍNDICE DE FIGURAS	VI
IV. ÍNDICE DE CUADROS	VIII
IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
V. RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
1.2. CLASIFICACIÓN DE CATÉTERES	3
1.3. COMPLICACIONES DEL USO DE DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES	5
1.3.1. COMPLICACIONES MECÁNICAS	6
1.3.2. COMPLICACIONES INFECCIOSAS	8
1.3.2.1. Colonización del catéter	9
1.3.2.2. Colonización del catéter por levaduras y formación de biopelículas	11
1.5. AGENTES ETIOLÓGICOS DE <i>CANDIDA</i>	14
1.5.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	15
1.5.2. MORFOLOGÍA	16
1.5.3. FACTORES DE VIRULENCIA	18
1.5.3.1. Adaptación a cambios de ambiente	19
1.5.3.2. Producción de enzimas	19
1.5.3.3. Adhesinas	22
1.5.3.4. Morfogénesis	24
1.5.3.5. Cambio de fenotipo	26
1.5.3.6. Biopelículas	26
1.5.4. FACTORES DE RIESGO PARA CANDIDOSIS	29
1.5.5. EPIDEMIOLOGÍA	30
1.6. ANTIFÚNGICOS	32
1.6.1. CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN	33
1.6.2. SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS	38

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. OBJETIVOS	42
4.1. OBJETIVO GENERAL	42
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5. HIPÓTESIS	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS	44
6.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	44
6.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y CULTIVO DE LAS PUNTAS DE CATÉTER	44
6.2.1. PROCESAMIENTO DE LAS PUNTAS DE CATÉTER CON LA TÉCNICA DE MAKI	44
6.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS PUNTAS DE CATÉTER CON LA TÉCNICA INTRALUMINAL	44
6.3. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	45
6.3.1. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS AISLADAS POR LA TÉCNICA DE MAKI	45
6.3.2. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS AISLADAS POR LA TÉCNICA INTRALUMINAL	45
6.3.2.1. Pruebas morfológicas y fisiológicas para la identificación de <i>Candida</i> .	46
6.4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA	50
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
7. RESULTADOS	55
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES	71
10. REFERENCIAS	72
11. ANEXO	85

II. ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
5-FU	5-fluorocitosina
ADS-CC (Mycosel [®])	Agar dextrosa Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida
ADS-CFX	Agar dextrosa Sabouraud con ceftriaxona
ADS-CIP	Agar dextrosa Sabouraud con ciprofloxacino
AHM	Agar harina de maíz con Tween 80
AMB	Anfotericina B
APD	Agar papa dextrosa
AS	Agar sangre
AT	Agar tabaco
BC	Agar brillante <i>Candida</i> [®]
BRC	Bacteriemia relaciona a catéter
BHI	Caldo infusión cerebro corazón
CAT-Número	Número de catéter
CDC	Centro de Prevención y Control de Enfermedades
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorios
CVC	Catéter venoso central
CH	CHROMagar <i>Candida</i> [™]
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CSF	Casposfungina

**FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE
CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL**

DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFI	Enfermedad fúngica invasiva
EUCAST	Comité europeo de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
FLZ	Fluconazol
FOD	Fiebre de origen desconocido
g	Gramos
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
h	Horas
HE	Hospital de Especialidades
HE CMN SXXI	Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI
INCAN	Instituto Nacional de Cancerología
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRC	Infección relacionada a catéteres
ITZ	Itraconazol
KTZ	Ketoconazol
KI	Yoduro de Potasio
LIP	Lipasas
mL	Mililitros

**FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE
CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL**

NaCl	Cloruro de Sodio
PCZ	Posaconazol
PICC	Catéter venoso insertado periféricamente
PL	Fosfolipasa
RHODVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Aspartil proteinasa secretora
TI	Técnica intraluminal
TM	Técnica de Maki
UFC	Unidad formadora de colonia
UMAE	Unidad Médica de Alta Especialidad
UTI	Unidad de Terapia Intensiva
VIH/SIDA	Virus de la inmunodeficiencia humana/ Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VRZ	Voriconazol

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Catéter venoso central	2
Figura 2. Clasificación de los catéteres vasculares centrales según el tiempo de permanencia.....	3
Figura 3. Fisiopatología de las IRCs. Vías de colonización implicadas en las IRCs. Las vías de colonización de la superficie (A) externa y (B) interna del catéter involucran la colonización del sitio de inserción y la conexión, respectivamente. Las vías adicionales incluyen la contaminación microbiana del líquido de infusión (llamada "contaminación intrínseca") y la iniciación hematogénea (26).....	10
Figura 4. Variedad morfológica que <i>C. albicans</i> puede adoptar en respuesta a su entorno	25
Figura 5. Representación esquemática de la formación de biopelícula de <i>C. albicans</i> en un catéter. El esquema muestra la biopelícula formada en la superficie del catéter, visto desde la parte superior y la vista lateral	27
Figura 6. Estructura química 5-Fluorocitosina.	34
Figura 7. Estructura química de anfotericina B.....	36
Figura 8. Estructura química de Caspofungina.	37
Figura 9. Diana de los principales antifúngicos sobre la célula del hongo (Vallejo Llamas, 2003).....	37
Figura 10. Método de microdilución en caldo.	39
Figura 11. Difusión en agar con tiras impregnadas, E-test®. A: Crecimiento inhibido por (a) ITZ, (b) KTZ y (c) FLZ. B: Cepa resistente a (a) KTZ, (b) ITZ y (c) FLZ.	39
Figura 12. Tubo germinativo en suero humano. (100x).....	47
Figura 13. Técnica de Dalmau en AHM.	47

Figura 14. Examen directo de crecimiento en AT. (a) clamidoconidios únicos de <i>C. albicans</i> (40x) y (b) clamidoconidios en racimos de <i>C. dubliniensis</i> (100x).	48
Figura 15. Promoción positiva (+) de <i>C. albicans</i> en APD en ambas temperaturas. (a) crecimiento a 27° C y (b) crecimiento a 45° C.....	49
Figura 17. Preparación de las diluciones de los antifúngicos solubles (Hernández, 2012). 52	
Figura 18. Preparación de las diluciones de los antifúngicos insolubles (Hernández, 2012).	53
Figura 19. Placa de microdilución en caldo. Columnas 1-10: diluciones del antifúngico. Columna 11 y 12: control de crecimiento y de esterilidad. Fila A-E: aislados problema.	54
Figura 18. Cultivos de <i>Candida parapsilosis</i> en (a) ADS-CFX y (b) ADS-CC; <i>Candida albicans</i> se desarrolla muy bien en ambos medios (c) y (d).	61
Figura 19. Crecimiento de (a) <i>C. albicans</i> y (b) <i>C. parapsilosis</i> en ABC. Crecimiento de (c) <i>C. albicans</i> y (d) <i>C. parapsilosis</i> en CH.	62
Figura 20. (a) y (b) examen directo de crecimiento en AT de <i>C. albicans</i> , clamidoconidios únicos escasos (100x).....	63
Figura 21. Crecimiento de <i>Candida albicans</i> a temperaturas de (a) 45°C y (b) 25°C.....	63

IV. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de catéteres intravasculares más utilizados en clínica	5
Cuadro 2. Factores que influyen en las complicaciones mecánicas por el uso de catéteres	6
Cuadro 3. Complicaciones mecánicas asociadas a la instalación de dispositivos intravasculares (14), (15), (16).	7
Cuadro 4. Definiciones usadas de infecciones relacionadas a catéteres.....	9
Cuadro 5. Características morfológicas de las especies del género <i>Candida</i> aisladas en el laboratorio clínico (50).	17
Cuadro 6. Propiedades principales de las enzimas aspartil-proteasas (SAP) de <i>Candida</i> . (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67).	20
Cuadro 7. Proteínas codificadas por los genes Als y sus ligandos (70),(80), (81), (82), (83), (84), (85).	24
Cuadro 8. Factores condicionantes y poblaciones de riesgo para desarrollar candidosis invasiva	30
Cuadro 9. Clasificación y estructuras de antifúngicos azólicos.....	35
Cuadro 10. Identificación presuntiva de especies de <i>Candida</i> con CHROMAgar <i>Candida</i> ™.	46
Cuadro 11. Criterios de identificación de <i>Candida</i> spp. (0) negativo, (+) positivo.	49
Cuadro 12. Intervalo de la CMI de antifúngicos para la interpretación de la prueba establecidos por el CLSI.....	54
Cuadro 13. Factores de riesgo relacionados a la colonización de catéteres.	55
Cuadro 14. Procedencia de las muestras analizadas.	56

Cuadro 15. Porcentaje de catéteres analizados en el estudio.	57
Cuadro 16. Número y porcentaje de microorganismos aislados.	57
Cuadro 17. Asociación de especies de <i>Candida</i> en los catéteres analizados.	58
Cuadro 18. Número de unidades formadoras de colonia del primo aislamiento por las técnicas Intraluminal y de Maki.	59
Cuadro 19. Sensibilidad de los aislados de <i>Candida spp.</i> de catéter venoso central.	64

IV. ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparación del número de cultivos obtenidos por ambas técnicas. TM: Técnica de Maki; TI: Técnica intraluminal.	59
Gráfico 2. Porcentaje de las especies recuperadas de catéteres por la Técnica de Maki. ...	60

V. RESUMEN

La inserción de un acceso venoso puede implicar complicaciones tanto mecánicas como infecciosas, las más frecuentes son infecciosas y a menudo inadvertidas. El diagnóstico microbiológico de estos dispositivos se realiza principalmente por la técnica de Maki. Por dicha técnica el aislamiento de microorganismos es de la superficie extraluminal, permitiendo realizar un diagnóstico la mayoría de las veces certero, sin embargo, aproximadamente el 15% de infecciones son de origen endoluminal, por lo que estas no serían detectadas. El objetivo de éste estudio es determinar la frecuencia de hongos aislados de puntas de catéter mediante la Técnica de Maki y una Técnica intraluminal, así mismo estudiar la sensibilidad de los aislados fúngicos frente a diferentes antimicóticos. Se recolectaron 100 puntas de catéter que fueron procesadas por las técnicas mencionadas. Se obtuvieron cinco aislados levaduriformes y 38 bacterianos. El porcentaje de levaduras aisladas fue de 5.0%, las cuales correspondieron al género *Candida*, 4 aislados fueron identificados como *C. parapsilosis* y uno como *C. albicans*. Contrario a lo reportado internacionalmente *C. albicans* presentó sensibilidad frente a los fármacos probados y *C. parapsilosis* presentó resistencia sólo a 3 de los 6 antifúngicos ensayados. Con base en los resultados de éste protocolo consideramos que la opción adecuada para el diagnóstico de colonización por levaduras en puntas de catéter debido a su sencillez, eficacia y poco consumo de insumos es la técnica de Maki.

1. INTRODUCCIÓN

Los dispositivos de acceso venoso son ubicuos en el sistema de salud moderno, su uso ha sido de gran utilidad clínica pues permiten el acceso al compartimiento vascular para la administración rápida y segura de líquidos endovenosos, fármacos, productos sanguíneos, entre otros. Varían en diseño, material de fabricación y tamaño para su introducción en diferentes zonas del cuerpo dependiendo del tiempo de permanencia y el motivo por el cual se instalan (1), (2).

1.1. Antecedentes históricos

El término catéter deriva de la palabra griega que significa *dejar caer, descender o hacer bajar*. Los romanos usaron la palabra “*desmissum*” que significa “que es introducido”. Celso designó el instrumento como una “fístula” y más tarde fue llamado “*syringa*”. De igual modo en la antigüedad se denominaba “tienta” a todo instrumento delgado y liso para explorar las cavidades o conductos naturales y reconocer la profundidad de las heridas (3).

En China fueron utilizadas hojas largas y curvas del cebollín, las cuales debidamente preparadas eran convertidas en excelentes catéteres. Los sumerios probablemente utilizaron el oro para elaborar catéteres por ser blando y maleable (3).

En el período medieval el catéter de plata se convirtió en el más utilizado por los médicos, se eligió ese metal debido a su maleabilidad, además se creía poseedor de alguna capacidad antiséptica. Favricio de Acquapendente (S. XVI) describió catéteres fabricados con materiales diversos como: cobre, bronce y cuernos, mismos que contaban con orificios laterales y una terminación roma. Mencionó también, la construcción de un catéter flexible hecho con tela, impregnado de cera y modelado sobre una sonda de plata (3), (4), (5).

La introducción de los catéteres o sondas hechas con caucho o goma elástica representó un importante avance. En París en 1768 un orfebre de plata llamado Bernard, tuvo la idea de recubrir una sonda trenzada de plata en su superficie con goma. A pesar de ello, los primeros dispositivos eran de pobre calidad por lo que con la temperatura corporal se volvían débiles y friables, además al contacto con el aire se fragilizaban. Hasta 1839, la goma pudo ser moldeada y formada cuando Charles Goodyear y Thomas Hancock inventaron la vulcanización. El catéter de goma fue subsecuentemente perfeccionado y patentado para su comercialización por James Archibaid Jaques en Inglaterra. En 1883 en Filadelfia, Petrie comenzó la fabricación de catéteres. (3), (4).

En 1956, Fletcher trabajó con hule siliconizado y en 1962, Stewart y Sanislaw comprobaron que los catéteres de este material podían conseguir una adecuada recepción en los tejidos del cuerpo humano (5), (6). Werner Fossman en su momento predijo las posibles aplicaciones y complicaciones de la cateterización. En 1977 Burr y Anfeld compilaron la frecuencia de complicaciones registradas por cateterización, observando que el uso de estos artefactos había ocasionado de alguna manera la muerte de los pacientes por trombosis, formación de émbolos, flebitis y sepsis, éste fenómeno ocurría con cualquiera de los materiales que en ese entonces incluían hule, teflón, polietileno, poliuretano y nailon (7).



Figura 1. Catéter venoso central

1.2. Clasificación de catéteres

Los dispositivos intravasculares se clasifican dependiendo del lugar de inserción del catéter, el tiempo de permanencia y el material de fabricación del instrumento (Figura 2), acorde con las necesidades del paciente (2).

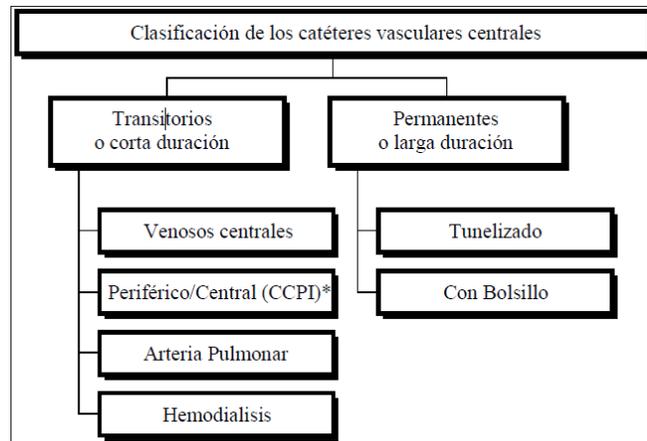


Figura 2. Clasificación de los catéteres vasculares centrales según el tiempo de permanencia (2).

A continuación se menciona la clasificación de los catéteres:

A. Localización del catéter vascular.

-Vía venosa central. Indicada para la administración de soluciones concentradas, nutrición parenteral total, también cuando se necesita un acceso vascular urgente para fluido terapia o administración de fármacos ante la incapacidad para obtener una vía periférica, así como para la medición de la presión venosa central.

-Vía venosa periférica. Acceso vascular para fluido terapia o administración de fármacos principalmente en pacientes recién nacidos (8) (Cuadro 1).

B. Tiempo de permanencia.

-Temporal, transitorio o de corta duración. Dentro de este tipo de dispositivos se encuentran los catéteres venosos centrales (CVC), catéter central de inserción periférica (PICC), catéter arterial pulmonar y catéter de hemodiálisis. El cateterismo es percutáneo de la vena subclavia, yugular interna o externa para un uso inferior a 30 días.

-Permanente o de larga duración. El catéter tunelizado es el dispositivo más utilizado, cuando el tratamiento del paciente es mayor a 30 días y son colocados quirúrgicamente (9).

C. Material de fabricación.

-El material ideal debería ser no trombogénico, tener una relativa rigidez a temperatura ambiente para facilitar su inserción, pero ser flexible a temperatura corporal para minimizar el trauma mecánico intravascular, existe una gran variedad de materiales que ofrecen una o varias de las características deseables, los más comunes son: cloruro de polivinilo (PVC), polietileno, hidrómeros de poliuretano y silicona (9), (10).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Cuadro 1. Tipos de catéteres intravasculares más utilizados en clínica (11).

Tipo de catéter	Comentarios
Catéter venoso periférico	Se usa en venas del brazo. Es el catéter más utilizado. Produce escasas complicaciones infecciosas.
Catéter arterial periférico	Se usa para evaluar el estado hemodinámico durante periodos cortos. Riesgo de infección similar al CVC.
CVC no tunelizado	Es el CVC más empleado. Produce el 90% de las complicaciones infecciosas asociadas a catéteres.
CVC tunelizado	CVC implantado quirúrgicamente, tiene un trayecto subcutáneo con un manguito de dacrón en el punto de salida cutánea que impide la entrada de microorganismos del exterior. Se usa para quimioterapia prolongada, terapia ambulatoria o hemodiálisis.

1.3. Complicaciones del uso de dispositivos intravasculares

La inserción de accesos venosos centrales implica un riesgo reconocido de complicaciones mecánicas o técnicas, e infecciosas locales o sistémicas. Múltiples factores influyen en la incidencia de éstas, entre la principales tenemos: la experiencia del personal médico, la indicación para la inserción de un CVC, la técnica y vía de inserción, la ubicación y el tiempo de permanencia del CVC (12), (13).

1.3.1. Complicaciones mecánicas

Se consideran complicaciones mecánicas o técnicas aquellas ocurridas habitualmente en el momento de la inserción del dispositivo, sea por factores dependientes del paciente o de la capacitación del personal e inclusive por el tipo de catéter a instalar (14).

Cuadro 2. Factores que influyen en las complicaciones mecánicas por el uso de catéteres (14).

Factores del operador	Experiencia Uso del ultrasonido Uso de radioscopia
Factores del paciente	Cardiopatías Coagulopatías Ubicación Punciones previas Estado de conciencia Ventilación mecánica
Factores del catéter	Tipo Tamaño

La incidencia global de las complicaciones mecánicas varía del 5% al 19%, siendo las más frecuentes la punción arterial, el hematoma local, la trombosis y el neumotórax. En el cuadro 3 se enlistan las complicaciones que revisten mayor gravedad en relación a los accesos venosos (15).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Cuadro 3. Complicaciones mecánicas asociadas a la instalación de dispositivos intravasculares (14), (15), (16).

Complicación	Descripción
Neumotórax	Causada por la punción accidental de la membrana pleural. Su frecuencia varía entre el 0%-15%.
Embolia aérea	Producida por la aspiración del aire a través de la vía central. Su frecuencia es de 0.3%.
Mal posición del catéter	Localización de la punta en una vena de pequeño calibre, cavidades cardíacas o una trayectoria perpendicular al eje longitudinal de la vena. La incidencia es del 5%-9%.
Punción arterial	Las consecuencias de lesiones arteriales van desde hematomas hasta accidentes cerebro-vasculares, trombosis, tamponamiento cardíaco y fístula arterio-venosa.
Perforación de venas grandes	Producidas por guías, dilatadores o introductores, teniendo como resultado lesiones vasculares intra-torácicas o perforaciones. La incidencia es de 0.25%- 0.4%.
Arritmias cardíacas	Producidas por la estimulación cardíaca durante el paso de la guía. Son frecuentes y en general transitorias.
Trombosis venosa	El riesgo depende del paciente, del lugar de inserción, del catéter, de la duración y de la dificultad en la canalización. Su incidencia oscila entre el 33%-67%.
Oclusión del catéter	En su génesis puede ser por obstrucción mecánica, precipitación de medicamentos o trombosis. La oclusión del lumen del CVC ocurre de 14%-36% en uso crónico y alrededor de 10% en el uso de catéteres transitorios.

1.3.2. Complicaciones infecciosas

Las complicaciones infecciosas por el uso de líneas vasculares son frecuentes y al inicio pasan inadvertidas. Pueden manifestarse de manera localizada o diseminada, las primeras comprenden la infección en el punto de entrada (flebitis) y las relacionadas con el procedimiento de inserción. Entre las segundas, se encuentran las BRCs con o sin producción de complicaciones a distancia como endocarditis, abscesos pulmonares, cerebrales, etc. (17), (18).

Las complicaciones infecciosas pueden producirse a través de diversos mecanismos: (i) contaminación del catéter en el punto de inserción como consecuencia de la pérdida de la integridad de la barrera cutánea o de las técnicas de asepsia inadecuadas, (ii) migración de microorganismos de la piel hacia la superficie extraluminal del dispositivo, (iii) contaminación endoluminal del catéter producida por la manipulación de las manos contaminadas del personal, (iv) infusiones contaminadas y (v) diseminación hematógena desde otros sitios de infección (18), (19).

En México, la Dirección General de Epidemiología, a través de la RHODVE informa una incidencia de BRC de 7.9 y 6.5/ 1 000 días-catéter en 2007 y 2008 respectivamente. La incidencia está en relación a la eficacia de los programas de control de infecciones nosocomiales. El INCAN reporta una incidencia menor a 2 episodios/ 1 000 días-catéter y el INCMNSZ 1 episodio/ 1 000 días-catéter, manteniendo esa prevalencia por más de 10 años. En la UMAE del IMSS la BCR tiene una incidencia varia de 3.5 en 2007 a 2.9/ 1 000 días-catéter en 2011 (22).

Para prevenir las BRCs es importante comprender el proceso por el cual se generan, su precursor comúnmente es la colonización del catéter, ya que a menudo los microbios encontrados sobre la superficie extraluminal o intraluminal de los dispositivos médicos son la principal causa y la fuente (23).

1.3.2.1. Colonización del catéter

Colonización es el establecimiento y multiplicación de microorganismos en los tejidos de un hospedero en cantidades suficientes que permitan mantener cierto número poblacional sin que su presencia estimule la respuesta inmunológica del mismo (24). La colonización puede ser de tipo unifocal o multifocal. En la primera, los microorganismos son aislados de un área específica, mientras que en la segunda, el aislamiento es simultáneo en áreas no contiguas del hospedero. La colonización multifocal precede al proceso infeccioso ocasionado por un microorganismo derivado del uso de catéteres (25).

Cuadro 4. Definiciones usadas de infecciones relacionadas a catéteres (20), (21).

Infección	Descripción
Colonización del catéter	Aislamiento significativo en la punta del catéter (cultivo cuantitativo o semicuantitativo).
	Bacteremia o fungemia vinculada con el catéter (diagnóstico con retiro de la línea venosa): aislamiento del mismo microorganismo en hemocultivo y en cultivo semicuantitativo de la punta del catéter, en un paciente con cuadro clínico de sepsis, y sin otro foco aparente de infección.
Bacteremia relacionada al catéter (BRC)	Bacteremia o fungemia asociada a catéter (diagnóstico sin retiro de la línea venosa): episodio de sepsis sin otro foco aparente en el que se aísla en hemocultivos simultáneos el mismo microorganismo, con un tiempo diferencial de positividad de al menos dos horas.
	Bacteremia o fungemia quizá relacionada con el catéter: en ausencia de cultivo de catéter, episodio de bacteremia cuyos síntomas desaparecen a las 48 horas del retiro de la línea venosa y sin que exista otro foco aparente de infección.

Existen dos mecanismos los cuales son las vías más comunes, identificadas en el desarrollo de las IRCs. (i) La colonización de la superficie externa puede comenzar con la colonización del sitio de inserción por microorganismos que pueden moverse progresivamente a través de la parte transcutánea del túnel dérmico que rodea el catéter.

La colonización de la piel es un fuerte predictor de las IRCs, (ii) la colonización de la superficie interna se puede producir por la contaminación de la conexión y la superficie intraluminal del catéter durante su manipulación, además la manipulación frecuente de la conexión, actualmente es vista como una fuente importante de colonización (26). En la figura 3 se muestran las vías de colonización en las IRCs.

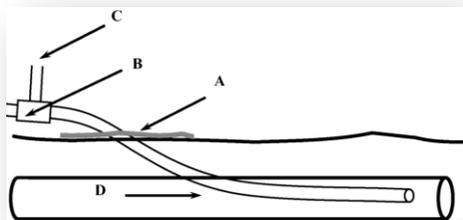


Figura 3. Fisiopatología de las IRCs. Vías de colonización implicadas en las IRCs. Las vías de colonización de la superficie **(A)** externa y **(B)** interna del catéter involucran la colonización del sitio de inserción y la conexión, respectivamente. Las vías adicionales incluyen la contaminación microbiana del líquido de infusión (llamada "contaminación intrínseca") y la iniciación hematógena (26).

En términos de diagnóstico microbiológico la colonización de un catéter se define en función del crecimiento del microorganismo y depende de la metodología empleada. La técnica de elección en diversos laboratorios clínicos es el rodamiento en placa del extremo distal del catéter, propuesta por Maki y Cols. (1977), en la cual, la colonización del catéter se define como el crecimiento de más de 15 UFC del microorganismo (27). Otras técnicas menos utilizadas, propuestas por Cleri y Cols. (1980): método de barrido (28), Brun-

Buisson y Cols. (1987): método de barrido simplificado (29), y Sherertz y Cols. (1990): sonicación (30), consideran como colonización el desarrollo microbiano $\geq 1\ 000$ UFC (2).

La colonización significativa de la superficie externa del catéter se documenta de 20-30% en los dispositivos colocados por punción percutánea. Los patógenos implicados en las IRCs son estafilococos coagulasa negativos, la mayor parte de los casos producidos por *Staphylococcus epidermidis* (30-60%), seguido de *Staphylococcus aureus* (15-20%), enterococos y estreptococos (10%), y algunos bacilos Gram negativos como: *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* representan de 20-30% en conjunto y finalmente, especies de *Candida* (particularmente *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*) con una frecuencia de 5-20% (31).

La tasa de infecciones relacionadas a catéter venoso central en las unidades de cuidados intensivos de EUA varía entre 1.8 y 5.2 por 1 000 días catéter (38). Una investigación de la frecuencia de infecciones del torrente sanguíneo ocasionadas por *Candida* realizado en Barcelona, reveló una incidencia global de 0.53 casos por cada 1 000 egresos hospitalarios, donde el 89% de los pacientes tenía un CVC instalado al momento del diagnóstico (39). En México, un estudio realizado en UTIs para adultos reportó una tasa de infección de 23.1 casos por 1000 días catéter (40).

1.3.2.2. Colonización del catéter por levaduras y formación de biopelículas

La mayoría de las infecciones fúngicas nosocomiales son causadas por levaduras del género *Candida* spp. Las líneas intravasculares pueden ser colonizadas por éstas, gracias a la capacidad de adherencia del microorganismo sobre la superficie con el subsecuente desarrollo de una biopelícula (32), (33), (34).

El uso cada vez mayor de dispositivos biomédicos invasivos, especialmente de los catéteres intravasculares, ha incrementado el número de fungemias, así como el de

candidosis diseminadas. La detección de *Candida* en sitios diferentes a la sangre constituye un desafío, ya que puede ser considerado como una colonización, una infección local o una infección invasiva (35), (36).

Si bien hay descritas entre 150 y 200 especies distintas de *Candida*, el 95-97% de las EFI en el hombre producidas por levaduras de este género son causadas por 5 especies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (35). La candidemia constituye la tercera causa de infección del torrente sanguíneo en la infección nosocomial y la cuarta de todas las infecciones fúngicas (37).

1.4. Métodos de diagnóstico microbiológico para determinar la colonización del catéter

El diagnóstico de la colonización del catéter se determina mediante técnicas microbiológicas, cuya clasificación es independiente del tipo de catéter central. Los métodos de diagnóstico pueden ser no conservadores, es decir, requieren la remoción del catéter o conservadores que no requieren la remoción del catéter (2). Para los fines de este trabajo, solo se expondrán los métodos no conservadores.

A. Cultivo semicuantitativo de la punta del catéter.

- Método propuesto por Maki y Cols. en 1977 (27). Consiste en rodar un segmento (≤ 5 centímetros) del extremo distal del catéter en la superficie de una placa con agar sangre de tres a cuatro veces hacia adelante y atrás. El criterio de colonización significativa se evalúa con la presencia de ≥ 15 UFC por placa.

El inconveniente que presenta de esta técnica, es únicamente la recuperación de microorganismos de la superficie externa del catéter, pero dada su rapidez, poca laboriosidad y economía, es considerado como método de referencia para el diagnóstico de infecciones relacionadas a accesos venosos.

B. Cultivo cuantitativo de la punta del catéter.

- Método de *flush*, barrido o irrigación, descrito por Cleri y Cols. en 1980 (28). Consiste en realizar un lavado del lumen del catéter con 2 mL de caldo nutritivo, del cual se hacen diluciones seriadas con la posterior siembra en placas de agar sangre. El cultivo es positivo si el desarrollo microbiano es $\geq 1\ 000$ UFC/mL. Aunque esta técnica implica un procedimiento sencillo, sólo recupera los microorganismos intraluminales.
- Método de *flush* simplificado, la modificación de la metodología fue realizada por Brun-Buisson y Cols. en 1987 (29). El catéter se introduce en 1 mL de agua destilada estéril, se agita con el vórtex durante un minuto y se siembra 0.1 mL en una placa con agar sangre. Los resultados se interpretan de la misma manera que en la técnica anterior. A diferencia del método previo, este recupera los microorganismos de la superficie intraluminal y extraluminal del dispositivo.
- Sonicación, método planteado por Sherertz y Cols. en 1990 (30). La punta de catéter es sumergida en 10 mL de caldo tripticasa de soya, es sometido a sonicación por un minuto y se realizan dos diluciones, 1: 10 y 1: 100, a partir de las cuales 100 μ L serán sembrados en una placa con agar sangre. El recuento $\geq 10^3$ UFC es considerado como colonización.

C. Tinción del catéter.

- Tinción de Gram del extremo distal, descrito por Cooper y Cols. (41) Un segmento del catéter se somete a la tinción de Gram para su observación al microscopio. Se visualizan los microorganismos de la superficie externa, el resultado es considerado positivo si se observa un microorganismo cada 20 campos.
- Tinción con anaranjado de acridina del extremo distal, propuesta por Zufferey y Cols. en 1988 (42). Método similar al anterior, por ser una tinción fluorescente disminuye el tiempo de observación, se considera positivo la apreciación de uno o más microorganismos por campo.

La limitación de estos métodos tintoriales es el empleo solamente para el diagnóstico de la colonización del dispositivo, por lo que no permite la identificación de los agentes causales y mucho menos los estudios de susceptibilidad.

1.5. Agentes etiológicos de *Candida*

Diversas especies de *Candida* son comensales de la piel y superficies de mucosas en el humano. Habitan boca, laringe y faringe, también se encuentran en el tracto gastrointestinal (40-50%), colonizan intestino delgado y grueso. Del mismo modo son parte de la microbiota en mucosas genitales, *Candida spp.* y *Candida albicans* se sitúan en vagina. Esporádicamente se han encontrado en axilas, ingles y región perianal. En ocasiones se recupera de superficies sintéticas como dispositivos intravenosos y raramente es aislada del medio ambiente (43), (44).

Existen aproximadamente 200 especies de *Candida*, actualmente clasificadas con base en su secuenciación genética; sin embargo, sólo 20 especies han sido asociadas a infección en mamíferos (45), (46). Las especies frecuentemente relacionadas con patologías son las siguientes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. guilliermondi* y *C. lusitaniae*. Aunque este género comprende un grupo extremadamente heterogéneo de levaduras, también posee características definidas facilitando la distinción de cada especie. La reproducción de estos organismos unicelulares es por gemación holoblástica; además algunas especies son capaces de formar pseudohifas e hifas con excepción de *C. glabrata* (24), (46).

1.5.1. Clasificación taxonómica

Con el paso del tiempo, este género ha presentado modificaciones en su ubicación taxonómica. Actualmente la clasificación de las especies de *Candida* es la siguiente:

Reino Eumycota

Phylum Ascomycota

Clase Hemyascomycetes

Orden Saccharomycetales

Familia Candidacea

Género *Candida*

Especies *C. albicans*, *C. dubliniensis*,
C. famata, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*,
C. krusei, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*
(47), (48).

1.5.2. Morfología

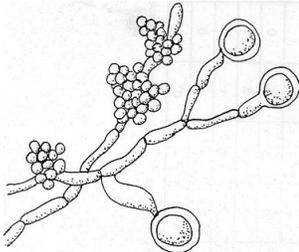
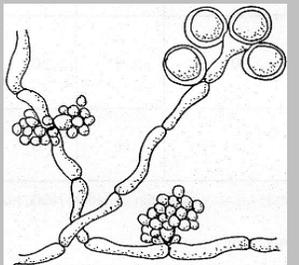
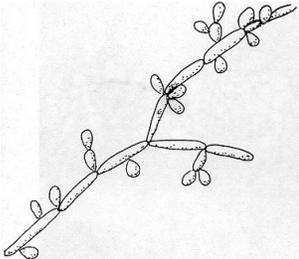
Las especies del género *Candida* tienen características macroscópicas y microscópicas definidas, las cuáles son utilizadas como parámetros para su identificación. El desarrollo de *Candida* en los medios de cultivo habituales se observan colonias de color blanco a amarillo, planas; de aspecto liso, brillante, opaco, cremoso, húmedo o seco y con bordes definidos (45).

Candida tiene dos presentaciones micromorfológicas (dimorfismo): la forma pequeña y ovalada conocida como levadura (4-6 μm) que se reproduce por gemación simple y otras formas conocidas como hifas o pseudohifas. Las pseudohifas son cadenas de levaduras unidas entre sí y separadas por constricciones pero conservando cada levadura su individualidad; las hifas están formadas por células alineadas con comunicación entre ellas. Ambas, hifas o pseudohifas son estados morfogénicos relacionados con su capacidad patógena (49), (50).

Para fines prácticos en este trabajo se enunciarán las características de las especies (Cuadro 5) comúnmente encontradas en el medio hospitalario (51).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

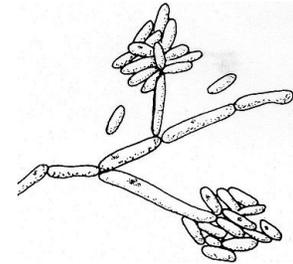
Cuadro 5. Características morfológicas de las especies del género *Candida* aisladas en el laboratorio clínico (50).

ESPECIE	MORFOLOGÍA		ESTRUCTURAS
	MACROSCÓPICA	MICROSCÓPICA	
<i>C. albicans</i>	Colonias redondas, cremosas, opacas, planas, con bordes definidos, color blanco.	Células redondas (3.5-7x 4-8 μm), forma pseudohifas con clamidoconidios terminales; presenta cúmulos de blastoconidios alrededor de los septos.	 <p style="text-align: center;">Pseudohifas con clamidoconidios terminales</p>
<i>C. dubliniensis</i>	Colonias redondas, cremosas, opacas, planas, color blanco.	Células redondas (3.5-7x 4-8 μm), forma pseudohifas con clamidoconidios terminales agrupados en racimos; presenta cúmulos de blastoconidios alrededor de los septos.	 <p style="text-align: center;">Pseudohifas con clamidoconidios terminales en racimos</p>
<i>C. tropicalis</i>	Colonias redondas, cremosas, planas, color blanco y en ocasiones presentan bordes rugosos.	Células redondas (3.5-7x 5.5-10 μm), forma blastoconidios solos o en pequeños grupos a lo largo de la pseudohifa. Algunas veces pueden presentarse verdaderas hifas.	 <p style="text-align: center;">Blastoconidios a lo largo de la pseudohifa</p>
<i>C. glabrata</i>	Colonias pequeñas, cremosas, lisas, de color blanco a crema.	Células ovaladas (2-3x 3-4 μm), no forma pseudohifas y en raras ocasiones forma cadenas cortas de células.	 <p style="text-align: center;">Blastoconidios</p>

C. krusei

Colonias planas, seca y sin brillo, color crema.

Células ovaladas y alargadas (2-6x 4-10 μm), forma pseudohifas con blastoconidios alargados.

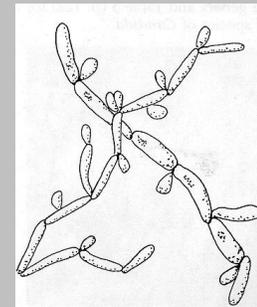


Pseudohifas con blastoconidios alargados

C. parapsilosis

Colonias redondas, cremosas, planas.

Células ovoides (2.5-4x 3-8 μm), forma pseudohifas con blastoconidios solos o agrupados. Ocasionalmente se presentan elementos hifales largos llamados células gigantes.



Pseudohifas con blastoconidios solos o agrupados

1.5.3. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los componentes microbianos o la capacidad de adaptación de los microorganismos, capaces de causar daño al hospedero (52). *Candida* tiene la capacidad de producir factores de virulencia que mejoran su capacidad para colonizar las mucosas o superficies sintéticas y para invadir los tejidos del hospedero (43). Los más característicos son mencionados a continuación.

1.5.3.1. Adaptación a cambios de ambiente

Las especies de *Candida* poseen gran capacidad de adaptación a diversos medios y sustratos. Por ejemplo, el soportar cambios de pH está regido por dos genes CdPHR1 y CdPHR2, el primero solo se activa a pH neutro o ligeramente alcalinizado y se inactiva en medio ácido, activándose a su vez el segundo. Otra facultad que tienen estas levaduras es la transición morfológica, es decir, se comportan como hongos dimórficos cambiando de blastoconidio a pseudohifa e hifa. Estos cambios morfológicos se deben a la supresión de varios reguladores de la transcripción y proteínas mediadoras de transducción de señal para estos reguladores, traduciéndose en cambios morfológicos (45), (52).

1.5.3.2. Producción de enzimas

Diversas enzimas permiten a las levaduras descomponer barreras y polímeros para obtener acceso a nutrientes durante su crecimiento, al mismo tiempo, posibilitan la inactivación de ciertas moléculas de defensa del hospedero. Las principales enzimas de tipo extracelular relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas (43), (45), (53).

- PROTEASAS. Las especies patógenas como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* poseen genes de la familia SAP (conformada por 10 genes SAP1-SAP10) que permiten la secreción de enzimas. Las funciones de estas enzimas son: a) digerir moléculas proteínicas para adquirir nutrientes y proporcionar nitrógeno a las células, b) degradar o distorsionar las membranas del hospedero facilitando la adhesión e invasión a los tejidos del mismo y c) contribuir a la destrucción de las células del sistema inmunitario del hospedero para evitar o resistir el ataque antimicrobiano durante el proceso infeccioso (34), (49), (54), (55), (56), (57).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Los genes SAP se expresan diferencialmente, dependiendo del tipo de célula (levadura o hifa) y durante distintos estadios de la interacción entre el patógeno y el hospedero (58). En el cuadro 6 se muestran las propiedades que poseen los genes de la familia SAP.

Cuadro 6. Propiedades principales de las enzimas aspartil-proteasas (SAP) de *Candida*. (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67).

Característica	SAP1	SAP2	SAP3	SAP4	SAP5	SAP6	SAP7	SAP8	SAP9
Presentes en infecciones orales	X	X	X			X			
Presentes en infecciones vaginales	X	X							
Presentes a las 72 h de infección	X	X		X	X				X
Presentes en la superficie de levadura e hifa	X	X	X						
Presentes en hifa				X	X	X			
Importantes en enfermedad invasiva	X	X	X	X	X	X			
Regulada por retroalimentación positiva		X						X	
pH óptimo (2 a 5)	X	X	X						
pH óptimo (3 a 7)				X	X	X			
Proteína anclada en la membrana o pared celular									X
Proteína anclada en la pared celular							X		
Expresadas durante el cambio de fenotipo	X		X						
Activas en infecciones sistémicas	X	X	X	X					
Se expresan en hifa con polipéptidos como fuente de nitrógeno				X	X	X			
Las mutantes de esta enzima son invasoras	X	X	X						
Las mutantes de esta enzima reducen su invasividad				X	X	X			

- FOSFOLIPASAS. Las PLs producidas por hongos forman un grupo heterogéneo de enzimas que comparten la capacidad de hidrolizar uno o más enlaces éster de los glicerofosfolípidos presentes en la membrana de las células del hospedero, tales enzimas posibilitan la penetración de las hifas en células y tejidos, puesto que son secretadas en la punta de dicha estructura.

Se han identificado cuatro tipos de fosfolipasas extracelulares producidas por el género *Candida*: PLA, PLB, PLC y PLD, pero sólo PLB1 es considerada un factor de virulencia. Los primeros ensayos para evaluar la capacidad de la producción de fosfolipasa en diferentes especies de *Candida* mostraron que sólo *C. albicans* secretaba la enzima, posteriormente, se demostró la secreción de PL por especies no *albicans*: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *C. krusei*, aunque en menor cantidad (34), (59), (68), (69), (70), (71).

- LIPASAS. Las LIPs se caracterizan por su capacidad para catalizar la hidrólisis de los enlaces éster mono, di y triglicéridos e incluso fosfolípidos (70), (59). La actividad de la enzima extracelular en especies patógenas de *Candida* fue detectada por primera vez por Werner (72).

Las LIPs secretadas son codificadas por una familia de genes con, al menos, 10 miembros (LIP1-LIP10). Las especies que poseen estos genes son: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* pero no *C. glabrata* (34), (59). Asimismo, ha sido demostrada que la expresión de las LIPs depende más del estadio de la infección que de la localización del órgano. Además de alterar los tejidos y proporcionar nutrientes, también pueden desempeñar un papel importante durante la infección mediante la modulación de la respuesta inmune a través de la inhibición de la quimiotaxis y la modificación de la actividad fagocítica de los monocitos, macrófagos y granulocitos (69), (73).

1.5.3.3. Adhesinas

La adhesión a menudo es citada como la primera etapa del proceso de infección para los miembros del género *Candida*, incluso, han sido descritas algunas interacciones específicas entre estos hongos y otros organismos, dispositivos médicos y componentes de los tejidos de mamíferos (53).

Las proteínas fúngicas involucradas en este proceso se denominan adhesinas, una adhesina es una biomolécula que reconoce componentes específicos en los tejidos del hospedero o a ligandos específicos de distinta naturaleza y son reguladas por genes específicos (74). Los ligandos pueden ser:

- Proteínas: colágeno tipo I y tipo IV, fibronectina, laminina, fibrinógeno, entactina y componentes del sistema del complemento C3b.
- Carbohidratos: polisacáridos, glicoproteínas y residuos de fructosa que aparecen en todos los grupos sanguíneos del sistema ABO.
- Lípidos.

Los genes reguladores más relevantes son: **Int.** (Integrin found first protein), **Hwp.** (Hyphal-Specific Cell Wall Protein), **Als.** (Agglutinin-like sequence), **Mnt.** (Manosiltransferase) (34), (75).

- **Int.** La Int1p es una proteína heterodímera transmembranal presente en *Candida albicans* implicada en la adhesión, morfogénesis y señalización, uniéndose a diferentes ligandos en la matriz extracelular, tales como fibrinógeno, laminina y colágeno tipo I y IV. Esta proteína tipo integrina posee un dominio con una homología similar a la integrina humana α -M, involucrada en la coordinación de cationes divalentes.

Igualmente presenta una homología con una proteína de *Staphylococcus aureus* que se une al fibrinógeno. Al parecer, la Int1 juega un papel importante en la filamentación de *C. albicans*. Datos recientes indican que la talina, una proteína del citoesqueleto, podría interactuar con Int1p para mediar en la morfogénesis modulando la actina del citoesqueleto (75), (76).

- **Hwp.** Fue aislado originalmente como gen específicamente en hifas y tubos germinativos, codifica una manoproteína, con un dominio amino terminal y un carboxilo terminal. Su dominio N-terminal (rico en prolina y glutamina) está orientado hacia la superficie exterior y el extremo C-terminal está integrado covalentemente al β -glucano de la pared celular a través de un remanente de GPI, siendo este el sustrato de las transglutaminasas secretadas por células epiteliales formando a su vez un complejo estable con las células del hospedero. Hwp1 es la primer proteína superficial de *C. albicans* requerida para la formación de biopelículas *in vivo* (77).
- **Als.** La familia de genes Als está conformada por al menos nueve genes y se caracteriza por codificar grandes glicoproteínas poseedoras de un carboxilo terminal hidrofóbico que sugiere un ancla GPI. El extremo amino terminal de las Als, contiene una señal secuenciada, un dominio similar a las inmunoglobulinas y un dominio rico en treonina implicados en la unión célula-célula para el proceso de adhesión. En el cuadro 7 se mencionan los ligandos a los que son afines ciertos genes Als (70), (75), (78), (79).
- **Mnt.** La proteína Mnt1 es una proteína de membrana tipo II, con actividad α -1,2-manosiltransferasa, necesaria para los procesos de N- y O-glicosilación en hongos, cuya delección disminuye la adherencia y la virulencia de *Candida*. En vista de que las mananas son el principal constituyente de la pared celular de los hongos, los cambios en los niveles de glicosilación de las proteínas afecta la ultra estructura de la superficie celular, el fenotipo y la hidrofobicidad de *C. albicans* (75), (86).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Cuadro 7. Proteínas codificadas por los genes Als y sus ligandos (70),(80), (81), (82), (83), (84), (85).

ADHESINA	FUNCIÓN	LIGANDO
Als1	Adhesión, colonización y organización de la pared celular	Fibronectina Laminina Colágeno tipo IV
Als5	Adhesión	Células epiteliales de boca y faringe Células del endotelio vascular
Als2	Formación de biopelícula y micelio	Células endoteliales
Als3	Formación de biopelícula	Células del endoteliales (E-caderina y N-caderina)
Als4	Organización de la pared celular Adhesión a células endoteliales	Células endoteliales
Als6	Adhesión	Colágeno
Als9	Adhesión	Laminina

1.5.3.4. Morfogénesis

Es la habilidad que poseen algunas especies del género *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*) de producir de manera alternativa células levaduriformes (blastoconidios) o formas filamentosas (hifas y pseudohifas), es decir, el microorganismo puede realizar la transición de forma unicelular (levadura) a crecimiento filamentosos (34), (87), (88).

El crecimiento unicelular es adecuado para aumentar el número de unidades infecciosas y facilitar la diseminación en los pacientes infectados. Generalmente, predominan durante la colonización de las mucosas, en la enfermedad o en tejido necrótico. En contraste, la forma filamentososa aparece durante la adhesión y la penetración del agente en células epiteliales o endotelios, además emergen cuando las defensas del hospedero declinan y predominan en el estado temprano de la colonización (34), (88).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

La morfogénesis de levadura a hifa se revierte conforme avanza la infección y quizá sea el resultado de cambios temporales de su medio ambiente. Además es controlada por una compleja red de vías de señalización, comúnmente acompañadas por la regulación de los genes asociados con los estados morfológicos. Los estudios bioquímicos que establecen las rutas de transducción de señales y la activación de la filamentación, concluyen con la existencia de dos rutas principales, la cascada de cinasas MAPK y el activador y represor transcripcional EFG1p (“positive regulator of filamentous growth”) (34), (70). En la figura 4 se muestra la morfología que *C. albicans* puede adoptar en diferentes entornos.

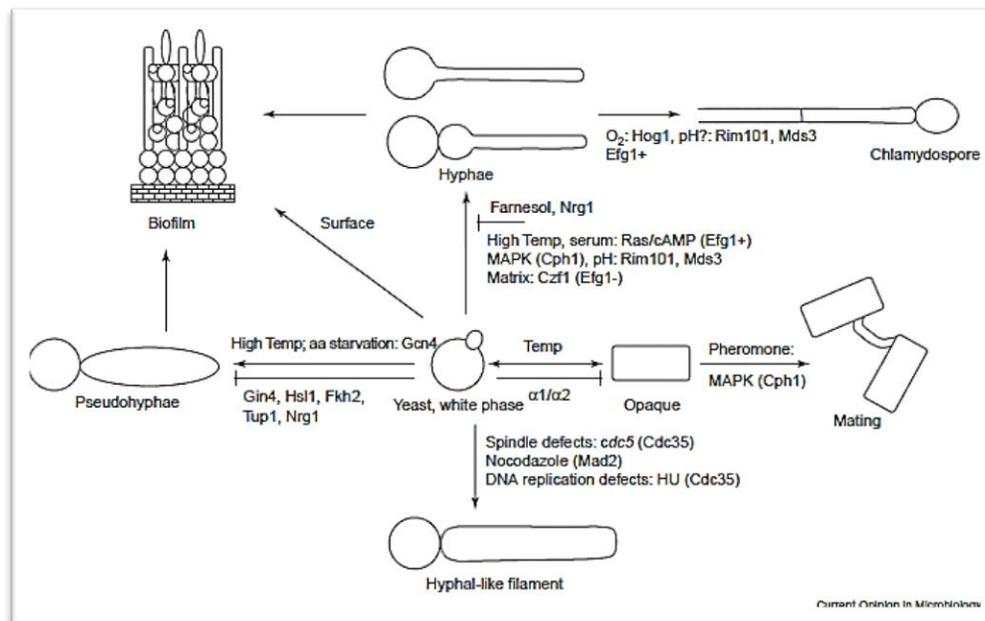


Figura 4. Variedad morfológica que *C. albicans* puede adoptar en respuesta a su entorno (89).

1.5.3.5. Cambio de fenotipo

En 1985, los reportes de Slutsky y Cols. y Pomes y Cols., demostraron por vez primera que cepas comunes de *C. albicans* cambiaban reversiblemente y con frecuencia de fenotipos, al mismo tiempo, las diferentes cepas exhibían variantes de fenotipos en su cambio, no obstante todas mostraban características comunes (90).

Este fenómeno denominado cambio fenotípico obedece a un mecanismo reversible desarrollado por el hongo para sobrevivir a un entorno adverso, en el desarrollo de una infección permite evadir los sistemas de defensa del hospedador y/o expresa genes de virulencia en respuesta a la modificación del entorno de acogida (91). Los agentes generan cambios en la macromorfología colonial (lisa o rugosa) o espontáneamente en la antigenicidad (aumento o disminución en la producción de enzimas o toxinas) (45). Estos factores son expresados específicamente en fases: los genes SAP1 y SAP3 son específicos para las células opacas, que forman colonias color gris, lisas y planas; mientras que los genes SAP2 y EFG1 son específicos de células blancas que forman colonias lisas y semiesféricas (52). En un modelo cutáneo, halló que las células opacas colonizan fácilmente la piel más que las células en fase blanca, pero son menos virulentas sistémicamente en los modelos animales (75).

Los cambios fenotípicos se han estudiado principalmente en *C. albicans* pero se sabe que también existen en otras especies de *Candida* como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* y *C. glabrata* (91).

1.5.3.6. Biopelículas

Las biopelículas, son comunidades microbianas bien estructuradas constituidas por células sésiles embebidas dentro de una matriz extracelular de polisacáridos, unidas a una superficie inerte o a un tejido vivo formando una arquitectura tridimensional compleja. La

gran parte de las células están irreversiblemente ligadas a un sustrato y sus componentes celulares sésiles muestran característicamente un fenotipo que es marcadamente diferente al de las células planctónicas (92), (93), (94). En la figura 5 se muestra la formación de biopelícula de *C. albicans* en un catéter.

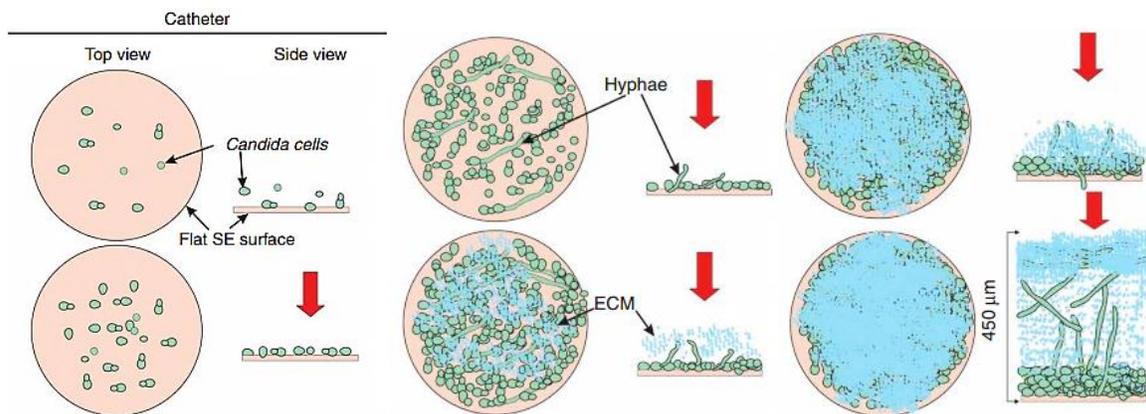


Figura 5. Representación esquemática de la formación de biopelícula de *C. albicans* en un catéter. El esquema muestra la biopelícula formada en la superficie del catéter, visto desde la parte superior y la vista lateral (97).

La formación de biopelículas es un proceso organizado efectuado en tres etapas: temprana, intermedia y de maduración.

- Etapa temprana (0-11horas). El proceso inicia con la adhesión del microorganismo sobre una superficie, seguido de una cascada de expresión génica diferencial. La adhesión de los hongos puede ser facilitada también por la formación de una capa orgánica acondicionada, que puede incluir compuestos liberados por la respuesta inflamatoria del hospedero en el suero, la saliva, etc. (83), (94), (95), (96).

- Etapa intermedia (12-30 horas). Está caracterizada por la agregación homogénea de las células en flotación organizadas en microcolonias sobre una superficie y la secreción de un exopolisacárido que constituye la matriz de la biocapa, formando estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales. Teniendo en cuenta la proximidad existente entre las células dentro de la microcolonia, esta presenta un ambiente formidable para el establecimiento de gradientes de nutrientes, intercambio genético y la autoinducción (quórum sensing) (83), (94), (95), (96).
- Etapa de maduración (38-72 horas). Las biopelículas maduras consisten en una disposición densa de células embebidas dentro de las grandes cantidades de material exopolimérico, puede ser plana o dependiendo de la fuente de nutrientes en forma de seta. Las células dentro de una biopelícula madura se pueden separar o dispersar como células individuales o agregados de células en el medio ambiente circundante, lo que conduce lentamente a una enfermedad sistémica aguda (83), (94), (95), (96).

La formación de biopelículas es un factor de virulencia importante en numerosas especies de *Candida*, de ahí que proporciona una resistencia considerable a la terapia antifúngica y a los mecanismos de defensa del hospedador, evitando la penetración de sustancias y células inmunitarias a través de la matriz (98), (99), (100).

Los aislados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* capaces de formar biopelículas durante la infección se han relacionado con tasas mayores de mortalidad en comparación con aquellos incapaces de formar biopelículas (101).

La formación de biopelícula por *C. albicans* está asociada con su dimorfismo entre levadura y el crecimiento de las hifas. Las biopelículas de esta especie por lo general tienen dos capas distintas: una capa basal delgada de levaduras y una capa gruesa de hifas menos compacta. En contraste con *C. albicans*, las biopelículas de *C. parapsilosis* tienden a

ser más delgadas, menos estructuradas y están constituidas casi exclusivamente por blastoconidios. Curiosamente, la formación de biopelículas por *C. parapsilosis* depende de la cepa aislada. La preferencia selectiva de esta especie por el material de los dispositivos médicos es de particular interés, dado que mejora la capacidad de *C. parapsilosis* a colonizar los catéteres y las líneas centrales intravasculares. Los aislados clínicos de *C. tropicalis* han sido clasificados como formadores de biopelículas prolíficos y sus biopelículas maduras consisten en una densa red de levaduras más algunas morfologías filamentosas. Las biopelículas de *C. glabrata* exhiben una estructura más compacta que las de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (101).

I.5.4. Factores de riesgo para Candidosis

Los hongos del género *Candida*, son patógenos oportunistas, normalmente afectan a individuos inmunosuprimidos. Las infecciones por *Candida* spp. en general no se asocian con ocupación, género o raza y son producidas por levaduras endógenas o exógenas dependiendo de las alteraciones intrínsecas del sistema inmune del hospedero y factores predisponentes como la edad, enfermedades crónicas (DM2, VIH/SIDA), procedimientos terapéuticos (hemodiálisis, quimioterapia), intervenciones quirúrgicas o implantación de dispositivos médicos (catéteres, prótesis cardiacas, etc.), administración de esteroides o antibióticos de amplio espectro. Los factores condicionantes en un solo paciente pueden ser uno o varios y pueden estar relacionados (36), (43), (102), (103).

La prevalencia de los factores predisponentes en los diferentes sistemas de salud, puede explicar en parte, las diferencias geográficas en la epidemiología de las infecciones causadas por *Candida* spp., pero, los datos geográficos sobre la prevalencia de las intervenciones médicas específicas por ejemplo, del cateterismo, son escasos por lo que la verdadera contribución de las prácticas de la salud para las candidemias sigue siendo desconocida (35), (98), (104).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

En el cuadro 8 se resumen las características individuales actualmente reconocidas que favorecen el desarrollo de candidosis invasiva, así como la población más expuesta a la misma.

Cuadro 8. Factores condicionantes y poblaciones de riesgo para desarrollar candidosis invasiva (36). ^a Factores de riesgo independientes en estudios específicamente diseñados.

Factores de riesgo generales	Condicionantes interindividuales o población de mayor riesgo
Gravedad de la enfermedad aguda ^a Edad: < 1 año o > 65 años Comorbilidades: diabetes mellitus, cirrosis, malnutrición, VIH, etc. Cirugía (gastrointestinal) previa Estancia prolongada en la UCI Dispositivos invasivos Transfusiones múltiples Nutrición parenteral Catéter vesical Ventilación mecánica	Uso prolongado de catéter venoso central ^a Antibióticos de amplio espectro ^a Esteroides Colonización previa por <i>Candida</i> spp. ^a Insuficiencia renal y/o hemodiálisis ^a Neutropenia ^a Quimioterapia, corticoides e inmunosupresores Pancreatitis, perforación visceral, etc. Politraumatismo Quemaduras de II o III grado Neonato con corta edad gestacional Enfermedad gastrointestinal o shock

I.5.5. Epidemiología

En las últimas dos décadas, *Candida* se ha convertido en un importante patógeno nosocomial en el mundo. Las especies de *Candida* han sido aisladas como agente causal del 10-15% de todas las infecciones nosocomiales, ocupan del 70-80% de todas las infecciones fúngicas nosocomiales y de 8 a 10% de las infecciones del torrente sanguíneo (105).

Un gran número de episodios de candidemia han sido originados por la colonización de catéteres. Pittet y Cols. (1994) y Piarroux y Cols. (2004), demostraron que el grado de colonización por *Candida* es un factor condicionante para propiciar una candidemia. Al mismo tiempo, Olaechea y Cols. (2004), León y Cols. (2009), Manolakaki y Cols. (2010) y Seddiki y Cols. (2013), destacaron la relación entre la colonización de catéteres venosos centrales y el proceso infeccioso (106), (107), (108), (109), (110).

Los datos de los CDC de EUA señalan que las tasas de colonización de catéter son mayores al 50%, y las infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con el catéter ocurren del 3-8%. Las IRCs aparte de aumentar la morbilidad del paciente, elevan las tasas de mortalidad, prolongan la duración de la hospitalización de 7 a 21 días y aumentan los costos. Después de una revisión sistemática de la literatura, Stone y Cols., en 2002, estimaron el costo atribuible de una infección del torrente sanguíneo entre \$ 36 441 y \$ 37 078 dls. Recientemente, Anderson y Cols., calcularon el costo de las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo entre \$ 23 242 ± \$5184 dls. (111). En España, el cálculo fue de €21 000, en Gran Bretaña de €10 000, en Brasil entre \$33 000 a \$35 000. En México Sánchez-Velázquez reportó el costo en \$12 000 (110).

Dentro de los microorganismos causantes de infecciones del torrente sanguíneo, *Candida* ocupa el cuarto lugar en EUA y el séptimo en Europa (104), (112), (113). *Candida albicans* sigue ocupando el primer lugar como agente etiológico de candidosis tanto superficial como invasiva, también predomina en ambos lados del océano Atlántico, sin embargo, los últimos años se ha observado el aumento de casos de infección originados por especies de *Candida* no *albicans*, dando lugar a diferencias geográficas en la distribución de las especies, así *C. glabrata* se encuentra generalmente en el hemisferio norte, mientras que *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* en la región sur del planeta. Las especies halladas usualmente en América Latina son: *C. albicans* (42%), *C. tropicalis* (21%), *C. parapsilosis* (19%) y *Candida glabrata* (7%) (36), (104), (114), (115).

En comparación con la incidencia en la década de 1980, la mayor proporción de las infecciones ahora son causadas por *Candida glabrata* en EUA y por *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* en Europa, Canadá y hospitales de América Latina. La epidemiología cambiante de *Candida* ha generado preocupación por los diferentes patrones de sensibilidad a antifúngicos disponibles (114), (116).

1.6. Antifúngicos

Los primeros registros de antifúngicos datan de 1800 cuando se empleaba el yoduro de potasio (KI), para el tratamiento de la esporotricosis, cigomicosis subcutáneas y gran número de patologías que no respondían a los tratamientos convencionales como la sífilis. Es necesario mencionar que el KI no tiene efecto antifúngico directo, más bien es un inmunomodulador (117).

La griseofulvina fue el primer antimicótico, fue sintetizado en 1939 por Oxford (118), se utilizó principalmente para las dermatofitosis. En 1908, se sintetizaron los primeros compuestos, hoy conocidos como sulfonamidas, entre los derivados empleados actualmente tenemos la diaminodifenil sulfona y el trimetoprim-sulfametoxazol, utilizados para el tratamiento de la paracoccidiodomicosis y el actinomicetoma, patología ésta última para el que aún, son el tratamiento de primera elección (119).

Entre 1940 y 1950, surgieron los tratamientos tópicos con acción fundamentalmente exfoliante y queratolítica, además de un débil poder antifúngico. Entre los compuestos históricamente más importantes tenemos el ungüento de Whitfield, el ácido salicílico y la urea a diversas concentraciones (120).

El primer compuesto poliénico utilizado fue la nistatina (tetraeno), útil para infecciones superficiales y de mucosas. En 1955 se descubre el poliénico más importante que es la AMB (heptaeno). Este grupo de antimicóticos se caracterizan por su efecto

fungicida por alterar la estructura de la membrana, dada su elevada toxicidad la búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos continúa (120).

Las alilaminas aparecen en la década de los 70, de estos compuestos, el más utilizado es la terbinafina, útil principalmente contra dermatofitos, también ha sido ensayada sola o en combinación con otros antifúngicos en casos de esporotricosis, feohifomicosis y eumicetomas (121).

La era moderna del tratamiento antimicótico, inicia con el descubrimiento de los primeros compuestos azólicos para uso tópico como el miconazol, poco tiempo después, se descubre el KTZ, primer azólico de uso tópico y sistémico que se administraba por vía bucal. Más adelante se descubren nuevos triazólicos como el FLZ que además de tener un amplio espectro es hidrosoluble, otros compuestos con un triple anillo azólico son: VRZ, PCZ el más utilizado hasta el momento es el ITZ (122).

En la década actual se cuenta con antimicóticos con mecanismos de acción diferentes como las equinocandinas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared y se utilizan en pacientes graves con aspergilosis y candidosis. Otros compuestos tópicos de gran utilidad son la amorolfina (123), el bifonazol y la ciclopiroxolamina (124).

1.6.1. Clasificación y mecanismos de acción

Los antimicóticos pueden clasificarse acorde con su mecanismo de acción en:

- Medicamentos que actúan a nivel de núcleo
 - A. La 5-FU (Figura 6) interfiere con el metabolismo de la pirimidina, RNA / DNA y la síntesis de proteínas. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa al citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil por la citosina diaminasas, el cual es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el

dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico (120), (124).

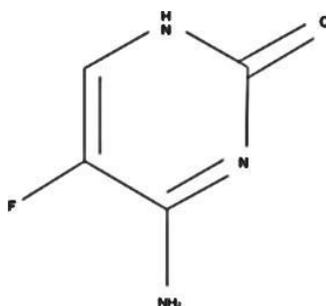


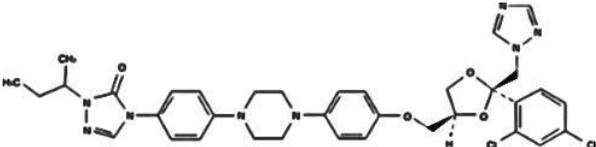
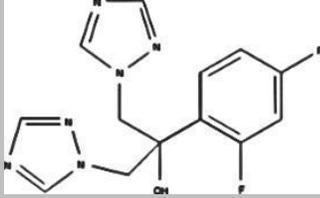
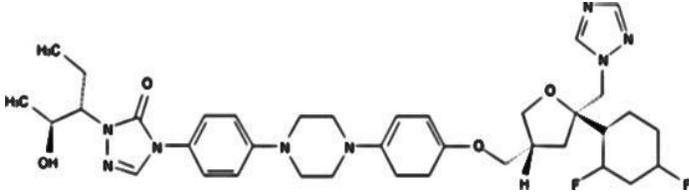
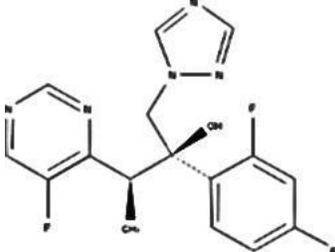
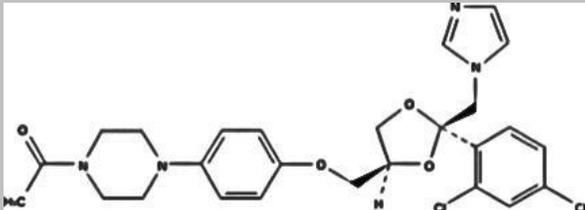
Figura 6. Estructura química 5-Fluorocitosina.

- Medicamentos que inhiben la síntesis de membrana
 - A. Los azoles son antifúngicos sintéticos de amplio espectro con efecto fungistático, inhiben de la demetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450 incrementando la acumulación de metil esteroides y reduciendo la concentración de ergosterol, esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica (124).

Los azoles tienen un anillo con átomos de N libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos (ver Cuadro 10). La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad, etc. En función del número de nitrógenos que posee el anillo se dividen en imidazoles: miconazol y KTZ y triazoles: FLZ, ITZ, VRZ, PCZ (120), (124).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Cuadro 9. Clasificación y estructuras de antifúngicos azólicos.

AZOL		ESTRUCTURA
1° generación		
Imidazol	Ketoconazol	
	Fluconazol	
Triazoles	Itraconazol	
2° generación		
	Voriconazol	
Triazoles	Posaconazol	

- Medicamentos que alteran la estructura de la membrana

Los polienos alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite la pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causa de muerte celular. El agente más conocido es la AMB (Figura 7), extraído de la bacteria *Streptomyces nodosus*. Puede tener efecto fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección (120), (124).

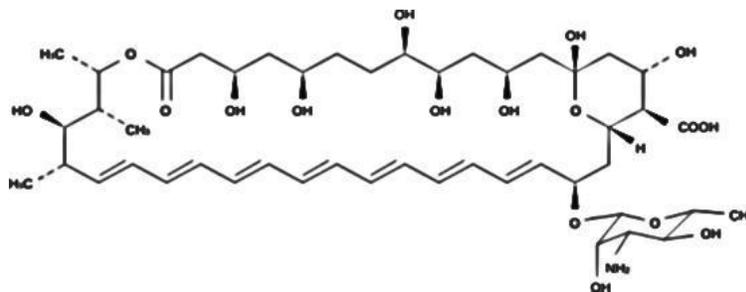


Figura 7. Estructura química de anfotericina B.

- Medicamentos que alteran la estructura de la pared celular

Las equinocandinas son lipopéptidos que actúan inhibiendo la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa, responsable de la formación de este polímero y esencial para la estructura de la pared de la célula fúngica. Al debilitarse la pared, la célula es incapaz de soportar el estrés osmótico provocando su lisis y no afecta a las células mamíferas. Son productos naturales derivados de hongos, cuyo efecto es fungicida. La caspofungina (Figura 8) deriva del hongo *Glarea lozoyensis* (120), (124).

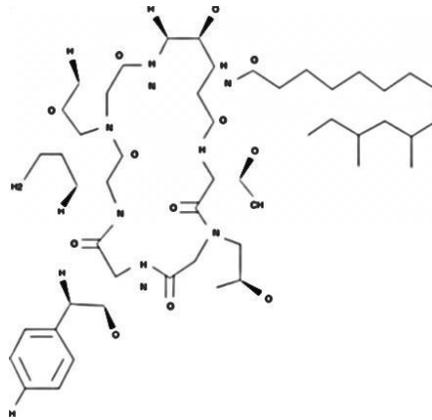


Figura 8. Estructura química de Caspofungina.

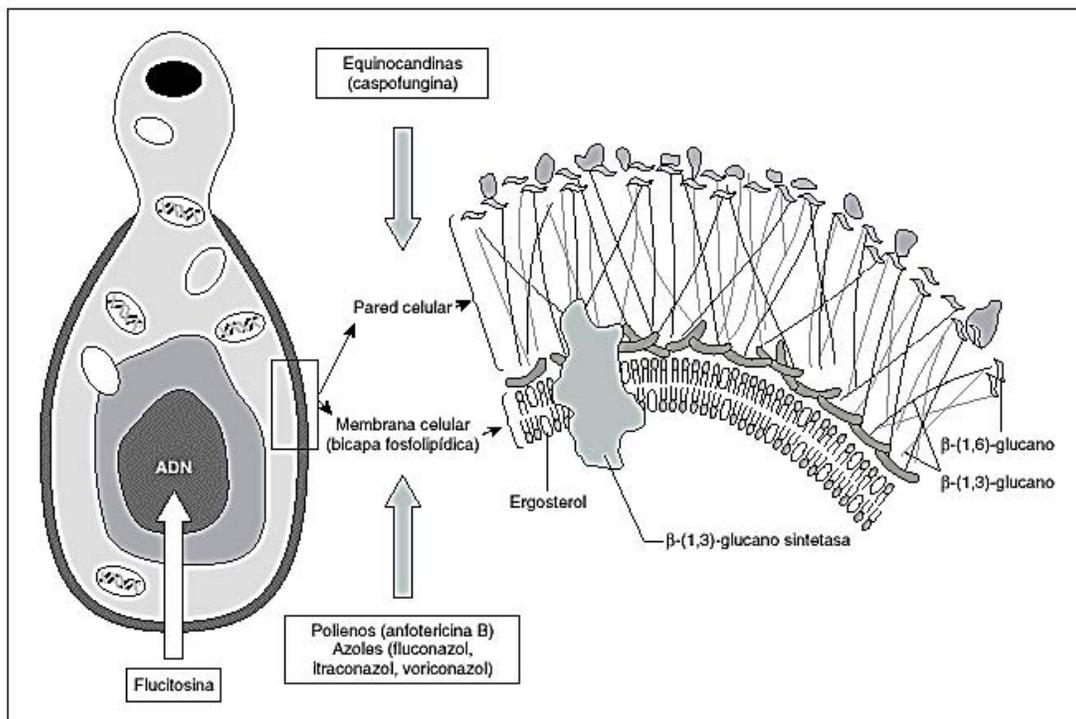


Figura 9. Diana de los principales antifúngicos sobre la célula del hongo (Vallejo Llamas, 2003).

1.6.2 Sensibilidad a antifúngicos

En los últimos años, el desarrollo de nuevos antifúngicos y su uso clínico, ha ocasionado la aparición de cepas con resistencia secundaria y la sustitución de especies sensibles por otras con resistencia intrínseca, esto último relacionado a varios tipos de antimicóticos como la 5 fluorocitosina, triazoles en incluso algunos de resistencia a polienos (125), (126).

La resistencia puede ser primaria, donde la levadura es naturalmente resistente, siendo el mejor ejemplo *C. krusei* frente a FLZ. También puede ser secundaria, donde cepas sensibles se transforman en organismos resistentes debido al contacto con el antimicótico ya sea a dosis bajas o bien durante periodos prolongados, esto en pacientes inmunosuprimidos en quienes se emplean como profilácticos, o en personas con inmunidad normal que reciben tratamientos inadecuados (iatrogenia). Este último tipo de resistencia, inusual en el pasado, es hoy el más frecuente y se observa en cepas de *C. glabrata*. El consenso es que la resistencia antifúngica depende de la interacción entre el hospedero, el fármaco y el hongo (125), (126).

Se han estandarizado varias técnicas *in vitro* para la evaluación de la sensibilidad de las levaduras del género *Candida* a los antifúngicos y correlacionar los resultados con la respuesta clínica del paciente, contribuyendo a la instauración del tratamiento adecuado y eficaz para el paciente con candidosis (125), (126).

Los métodos estandarizados como la técnica de micro y macro dilución en caldo (Figura 10) para determinar el patrón de sensibilidad *in vitro* elaborados por el CLSI en EUA y el EUCAST en Europa, propusieron los métodos de dilución en medio líquido. Estos han sido evaluados en estudios multicéntricos y actualmente sirven de referencia para el desarrollo de nuevas pruebas (127).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL



Figura 10. Método de microdilución en caldo.

Otros métodos utilizados actualmente para valorar la sensibilidad son los métodos comerciales de microdilución: panel antifúngico colorimétrico Sensitre[®] Yeastone y Fungitest[®], y los de difusión en agar con tiras impregnadas del antifúngico denominado E-test[®] (Figura 11) o con tabletas Neo-Sensitab[®] (110), (127).

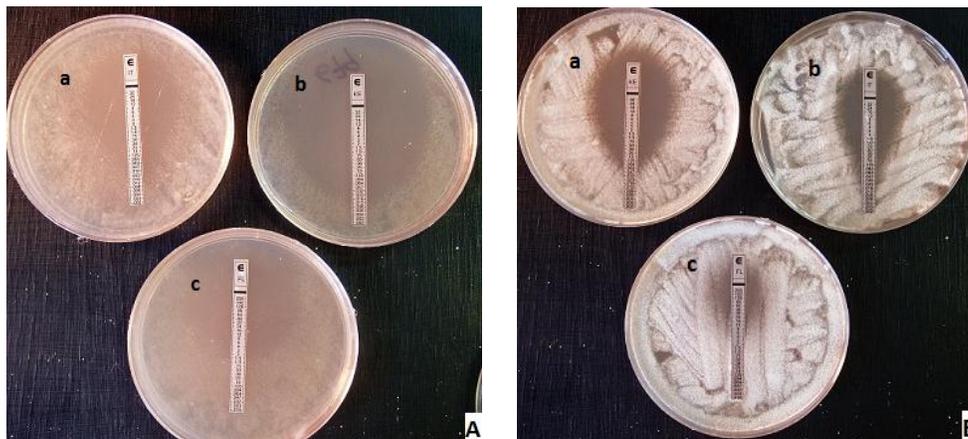


Figura 11. Difusión en agar con tiras impregnadas, E-test[®]. **A:** Crecimiento inhibido por (a) ITZ, (b) KTZ y (c) FLZ. **B:** Cepa resistente a (a) KTZ, (b) ITZ y (c) FLZ.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el uso de dispositivos intravasculares en la práctica clínica es imprescindible, representa una ventaja para el tratamiento de los pacientes; si bien los catéteres han contribuido a salvar vidas y acelerar curaciones, un gran inconveniente de su uso es la colonización por microorganismos procedentes de la microbiota de la piel del paciente o de otras personas. Los microorganismos se pueden adherir tanto a la superficie extraluminal como a la intraluminal de los catéteres produciendo una infección localizada o diseminada.

En las últimas cuatro décadas las infecciones originadas por especies del género *Candida* han aumentado de manera constante debido al incremento de factores predisponentes. Los factores de virulencia como: la capacidad de adherencia, la formación de biopelículas en superficies vivas o inertes y la resistencia antifúngica que presentan algunos de los aislados hace necesario, desarrollar mejores técnicas de diagnóstico y estudiar los perfiles de sensibilidad antimicótica.

El método de elección para el aislamiento de microorganismos a partir de puntas de catéter utilizado en hospitales de alta especialidad es la técnica semicuantitativa de Maki, en la cual solo se recuperan los microbios de la parte externa del dispositivo, por tal razón, en este estudio, se planteó la recuperación intraluminal a partir de una modificación a la técnica cuantitativa de cepillado intraluminal y el uso de medios de cultivos selectivos para levaduras.

En México, existe poca bibliografía acerca de la frecuencia de aislamientos fúngicos a partir de puntas de catéter, la mayor parte de la información documentada es sobre la recuperación de bacterias, por lo tanto, es necesario conocer la proporción de levaduras en el medio hospitalario y al mismo tiempo estudiar la sensibilidad antifúngica de los aislados, necesario para actualizar los conocimientos sobre alternativas terapéuticas en los pacientes del HE CMN SXXI lugar sede de esta investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

En el HE CMN SXXI, se atienden pacientes con múltiples patologías que obligan con frecuencia al internamiento y uso de dispositivos intravasculares. Considerando que estos pacientes frecuentemente cursan con FOD sin aislamiento de bacterias, existe la posibilidad que los enfermos presenten infecciones fúngicas no detectadas incluso por el hemocultivo. En la actualidad estas infecciones han ido incrementando en los hospitales generales, por lo que es importante implementar una nueva técnica para el procesamiento de las puntas de catéter, que permita incrementar el número de aislados fúngicos, y consecuentemente brindar a los pacientes un mejor diagnóstico y tratamiento. Hasta el momento no se ha estudiado la sensibilidad antimicótica de los aislados fúngicos de catéteres y el tratamiento se prescribe empíricamente siguiendo lo publicado en investigaciones realizadas generalmente en otros países.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

1. Determinar la frecuencia de levaduras en puntas de catéter provenientes de pacientes internados en el HE “Dr. Bernardo Sepúlveda” mediante la Técnica de Maki y la Técnica intraluminal; de igual manera estudiar la sensibilidad de los aislados fúngicos a diferentes antimicóticos por la técnica de microdilución en caldo.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la colonización del catéter y el porcentaje de aislados fúngicos por la técnica de Maki y la técnica intraluminal.
- Relacionar los factores predisponentes de los pacientes con los aislamientos levaduriformes.
- Identificar los aislados fúngicos provenientes del procesamiento de las puntas de catéteres.
- Conocer la sensibilidad de los aislados fúngicos a: ITZ, FLZ, VRZ, PCZ, CSF y AMB.

5. HIPÓTESIS

- El número de aislados fúngicos a partir de puntas de catéter incrementará con el empleo de la técnica intraluminal, en comparación con el que se obtendrá por la técnica de Maki. Además, aproximadamente el 25% de levaduras aisladas presentarán resistencia a uno o varios compuestos azólicos y el agente aislado con mayor frecuencia será *C. albicans*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Procedencia de las muestras

Se efectuó un estudio experimental comparativo de dos técnicas de aislamiento fúngico de los segmentos distales de catéteres provenientes de pacientes atendidos en los diferentes servicios en el HE “Bernardo Sepúlveda” (IMSS) y a cada aislado se le realizó su perfil de sensibilidad antifúngica. La recolección de los dispositivos médicos se realizó en un período comprendido del 1° de octubre del 2012 al 30 de enero del 2013. De igual manera, se registró la información relacionada con los pacientes como la edad, el género, el tipo de catéter, factores de riesgo y el tratamiento con antimicrobianos, antifúngicos o esteroides.

6.2. Procesamiento de las muestras y cultivo de las puntas de catéter

6.2.1. Procesamiento de las puntas de catéter con la técnica de Maki

Las puntas de catéter fueron transportadas en placas Petri estériles al Laboratorio Central. Posteriormente, se procesaban usando la técnica de rodamiento en placa propuesta por Maki y cols. (27), la cual consiste en rodar un segmento del extremo distal del catéter en una placa con AS e incubarla a 37 °C durante 24 horas. Para continuar con el desarrollo de la segunda técnica, la punta del catéter era retirada de la superficie de la placa y se introducía en un tubo de ensaye que contenía BHI, el cual se incubaba a 27 °C durante 24 horas.

6.2.2. Procesamiento de las puntas de catéter con la técnica intraluminal

Para el aislamiento de los microorganismos situados en la superficie interna del catéter, se utilizó una aguja hipodérmica (22Gx32mm) adaptada a una jeringa con la que se raspó el interior del dispositivo y también, se aspiró el medio de cultivo contenido en el

interior (aproximadamente 2 µl). Cada una de las muestras fue inoculada con técnica de estriado por dilución en dos medios de cultivo selectivos: ADS-CFX y ADS-CC y dos medios de cultivo diferenciales: CH y ABC. Los medios de cultivo selectivos se incubaron a 27°C, revisándolos diariamente durante una semana; CH se incubó a 35 °C por 48h y ABC a 30°C por 72h.

6.3. Identificación de levaduras

Al observar crecimiento colonial en los medios de cultivo, se realizó una tinción de Gram a cada aislado para diferenciar morfológicamente las levaduras de las bacterias y de esta manera ratificar la presencia de hongos levaduriformes.

6.3.1. Identificación de levaduras aisladas por la técnica de Maki

Cuando las características coloniales de los aislados en AS correspondían a *Candida* sp., y la tinción de Gram era positiva para levaduras, se sembraban nuevamente en AS para mantener un cultivo puro y fresco; después de 24 h de incubación con cada resiembra se preparaba una suspensión a una concentración de 1×10^6 cels/mL. A cada muestra le era asignada una tarjeta de identificación para levaduras del sistema automatizado Vitek® MS. Pasadas 48 h, los resultados podían ser consultados en la base de datos del equipo.

6.3.2. Identificación de levaduras aisladas por la técnica intraluminal

Los aislados obtenidos por esta técnica, además de ser identificados con el sistema automatizado Vitek® MS, fueron sometidos a una serie extra de estudios realizados manualmente con el fin de corroborar la identificación taxonómica.

6.3.2.1. Pruebas morfológicas y fisiológicas para la identificación de *Candida*.

- **Diferenciación de especies de *Candida* basándose en sustratos cromógenos.** Los aislados purificados, se sembraron en los medios de cultivo cromógenos: a) CH incubado 48h a 35°C y b) ABC incubado 72h a 30°C. La identificación presuntiva de las especies se estableció a través de las características macromorfológicas coloniales como aspecto, forma y coloración desarrollada en la placa, comparando las características coloniales con las proporcionadas por el fabricante (ver Cuadro 10).

Cuadro 10. Identificación presuntiva de especies de *Candida* con CHROMAgar *Candida*™.

Especie	Crecimiento CHROMAgar <i>Candida</i> ®			Crecimiento Agar Brillante <i>Candida</i> ®		
	Color	Textura	Superficie	Color	Textura	Superficie
<i>C. albicans</i>	Verde claro	Cremosa	Convexa	Verde oscuro	Cremosa	Convexa
<i>C. dubliniensis</i>	Verde claro	Cremosa	Convexa	Verde oscuro	Cremosa	Convexa
<i>C. glabrata</i>	Morado	Cremosa	Convexa	Beige	Cremosa	Convexa
<i>C. krusei</i>	Rosa con halo blanco	Seca	Plana	Beige	Cremosa	Convexa
<i>C. parapsilosis</i>	Lila	Cremosa	Convexa	Beige	Cremosa	Convexa
<i>C. tropicalis</i>	Azul	Cremosa	Convexa	Azul oscuro	Cremosa	Convexa

- **Formación de tubo germinativo.** La prueba consistió en colocar un pequeño inóculo de la levadura en 0,5 mL de suero humano descomplementado, por un lapso de 2 horas a una temperatura de 37°C. El suero fue observado al microscopio en busca de tubos germinales, el resultado era considerado positivo (+) con la confirmación la formación de dichas estructuras, de lo contrario el resultado era negativo (0) (ver Figura 12).

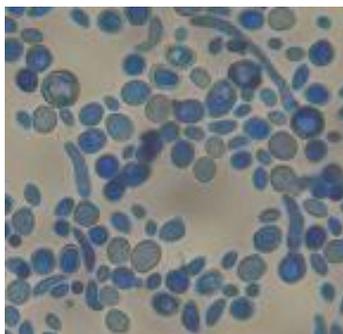


Figura 12. Tubo germinativo en suero humano. (100x).

- **Formación de clamidoconidios.** Para este ensayo se utilizó el método de Dalmau (Figura 13). De los cultivos de 24h se tomó el inóculo con el que se trazaron dos líneas paralelas de 1 cm de longitud sobre la superficie de AHM, encima de estas se colocó un cubreobjetos estéril y fue incubado a 27°C durante 72h; transcurrido el tiempo de incubación se estimó por microscopía óptica la producción de clamidoconidios.



Figura 13. Técnica de Dalmau en AHM.

- **Diferenciación fenotípica para *C. albicans* y *C. dubliniensis*.** Se empleó el medio de cultivo AT; inoculado por técnica de puntillero e incubado a 30 °C durante 72h. La macromorfología colonial fue registrada, se efectuó un examen directo de las colonias y la presencia de clamidoconidios se valoró con microscopía óptica. Los resultados se

expresaron con cruces en base al porcentaje de clamidoconidios por campo visual: (0)= 0% ausente; (+) = 25%; (++) = 50%; (+++) = 75%; (++++)= 100%.

Para diferenciar *C. albicans* de *C. dubliniensis*, se toma en cuenta la disposición de los clamidoconidios: en *C. dubliniensis* en forma de racimos, mientras que, *C. albicans* presenta clamidoconidios únicos y escasos (Figura 14).

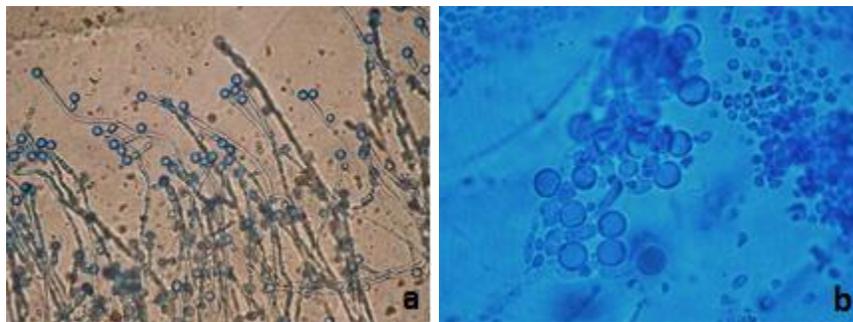


Figura 14. Examen directo de crecimiento en AT. **(a)** clamidoconidios únicos de *C. albicans* (40x) y **(b)** clamidoconidios en racimos de *C. dubliniensis* (100x).

- **Termotolerancia.** De cada aislado en ADS-CFX, se realizó un sembrado masivo sobre la superficie de APD, este procedimiento se efectuó por duplicado, las placas se incubaron una a 27 °C y otra a 45°C durante 48 h (Figura 15). La prueba se interpretó como promoción positiva (+) si había desarrollo en las placas, sino el resultado era considerado como negativo (0).

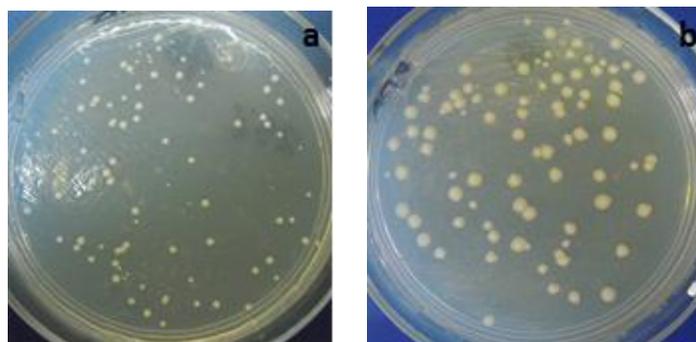


Figura 15. Promoción positiva (+) de *C. albicans* en APD en ambas temperaturas. **(a)** crecimiento a 27° C y **(b)** crecimiento a 45° C.

Los criterios de identificación para la diferenciación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Cuadro 11) de las demás especies de *Candida* fueron los siguientes con base en las pruebas descritas con anterioridad.

Cuadro 11. Criterios de identificación de *Candida* spp. (0) negativo, (+) positivo.

Prueba	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	Especies de <i>Candida</i> no <i>albicans</i>
Tubo germinativo	+	+	0
Termotolerancia	+	0	0
Producción de clamidoconidios en AHM	Ausentes o escasos únicos	Abundantes en racimos	0
Formación de clamidoconidios en AT	Ausentes o escasos únicos	Abundantes en racimos	0

6.4. Estudio de sensibilidad antifúngica

Las pruebas de sensibilidad antifúngica consisten en cuantificar la inhibición de crecimiento producida por el antifúngico comparada con el crecimiento de la levadura o en el mismo medio, pero sin antifúngico (control). El método empleado fue el de microdilución en caldo para levaduras (M27-A3) propuesto por el CLSI. Los antifúngicos empleados fueron ITZ, FLZ, VRZ, PSZ, CSF y AMB.

1. Preparación de la solución madre. Se pesó el antifúngico para obtener la concentración más alta a ensayar. El FLZ y la CSF fueron disueltos en 10mL de agua ultrapura (milli-Q®, MQ). Para los fármacos insolubles en agua: AMB, ITZ, VRZ y PSZ el disolvente empleado fue DMSO. Las soluciones fueron esterilizadas por filtración y distribuidas en alícuotas de 500 µL en tubos eppendorf, conservadas a -20°C hasta su uso.
2. Preparación del inóculo. Se preparó tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de SDA que fueron resuspendidas en un tubo de NaCl al 0,85%. Se ajustó hasta una concentración de 1×10^6 cels/ mL (Figura 16).

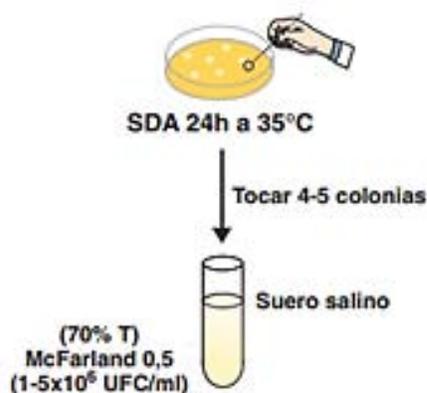


Figura 16. Preparación del inóculo de levaduras (documento M27-A3).

3. Preparación de la serie de diluciones y llenado de la placa. A partir de la solución madre, se realizó una dilución 1:5, el disolvente utilizado fue RPMI 1640 para los antifúngicos solubles en agua y una dilución 1:50 en DMSO para los insolubles, completando el volumen de todos los tubos con RPMI (Figura 17 y 18).

En cada pozo de la placa se colocaron 100 μ L de las diluciones decrecientes. El control se llenó con 100 μ L de RPMI para los antifúngicos solubles y en el caso de los insolubles en agua, se llenó con 100 μ L de RPMI con 2% de DMSO. Se añadieron a los pozos 100 μ L del inóculo, de cada aislado y se incubaron a 35°C por 48 h (Figura 19). Finalmente se realizó la lectura a las 24 y 48 horas, utilizando un espejo invertido, comparando la turbidez con los pozos de control, para determinar la CMI. La inhibición del crecimiento se comparó con la turbidez de los pozos de la columna 12. Los resultados se compararon con los puntos de corte determinados por el CLSI (Cuadro. 12).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

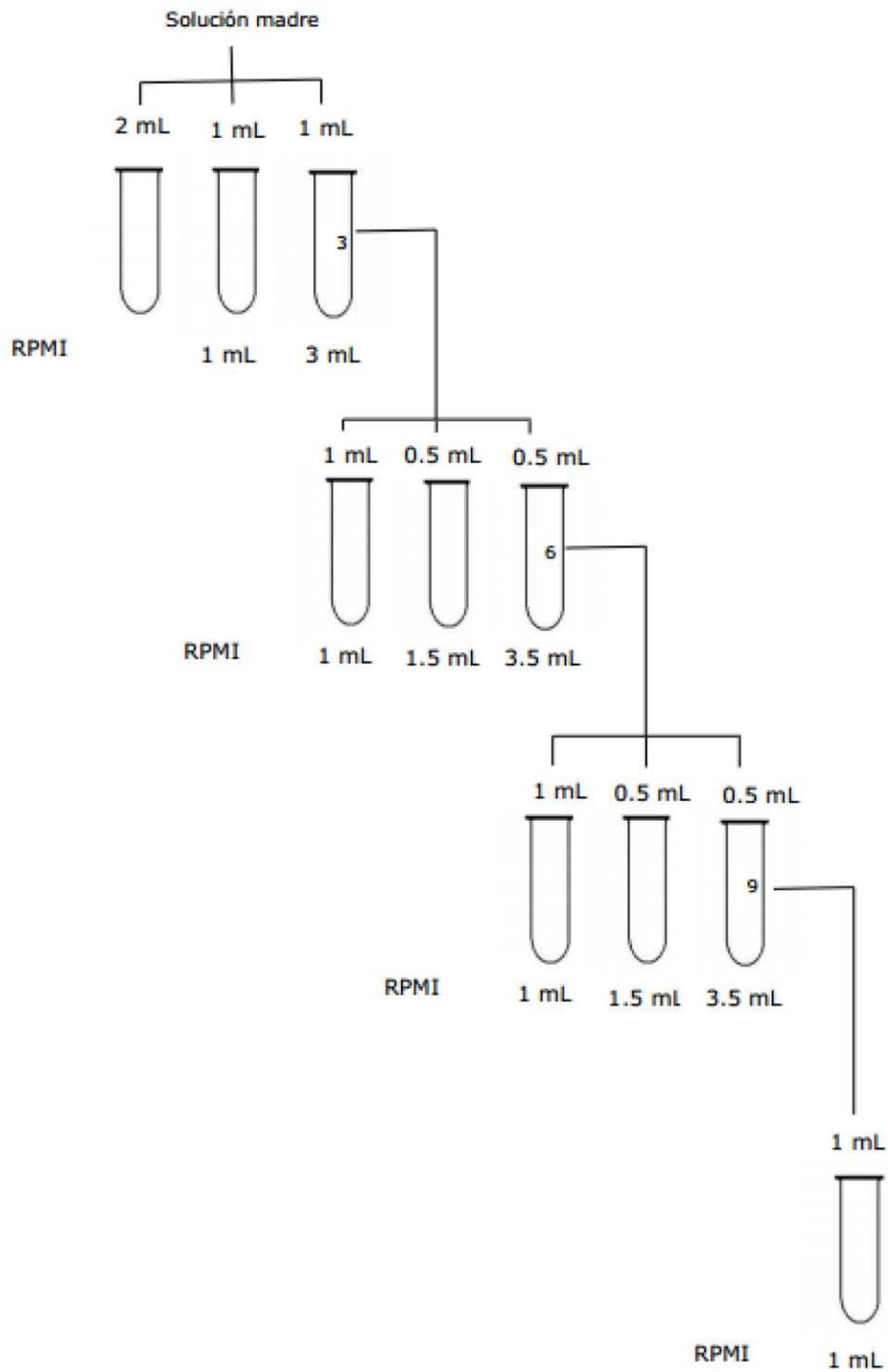


Figura 17. Preparación de las diluciones de los antifúngicos solubles (Hernández, 2012).

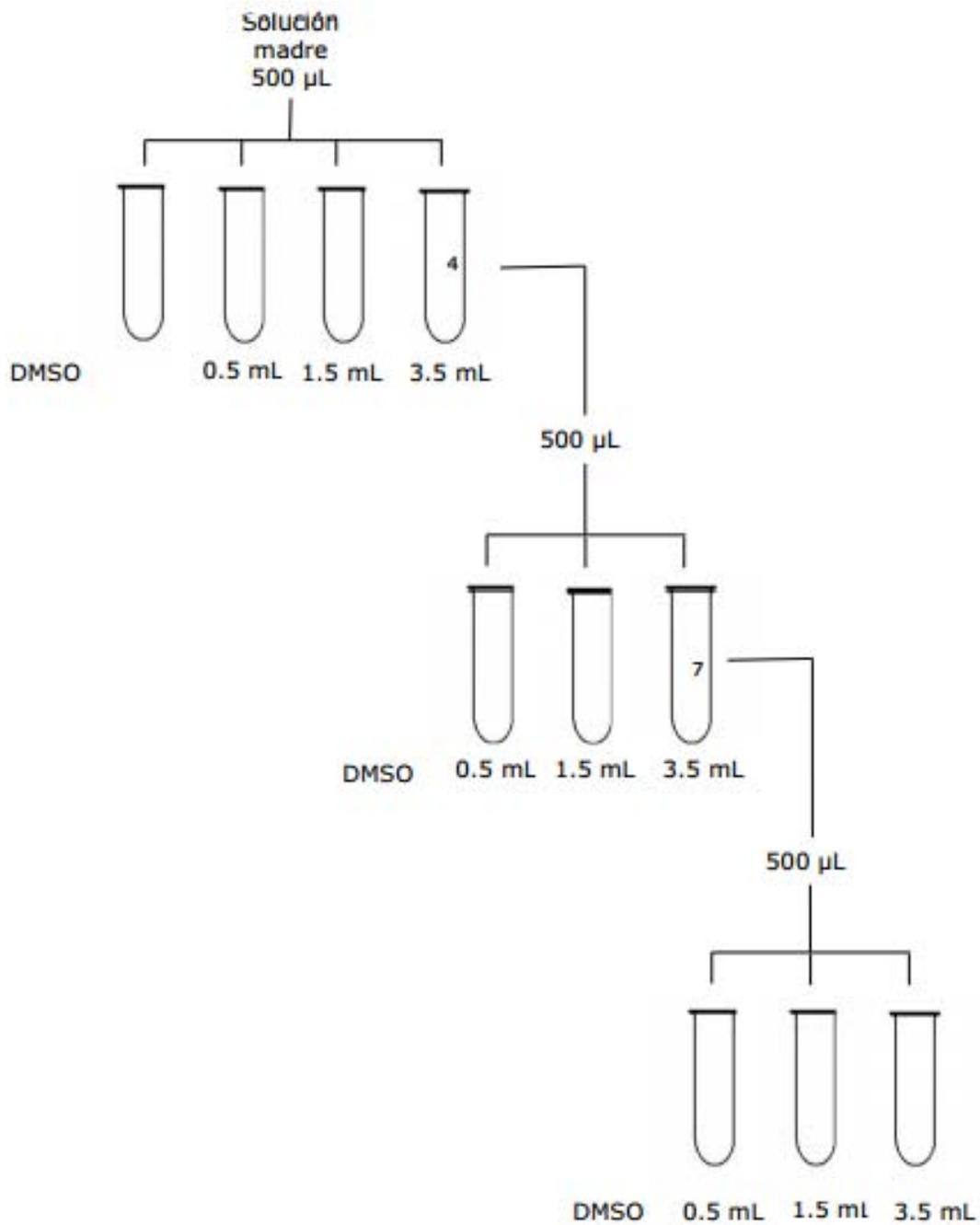


Figura 18. Preparación de las diluciones de los antifúngicos insolubles (Hernández, 2012).

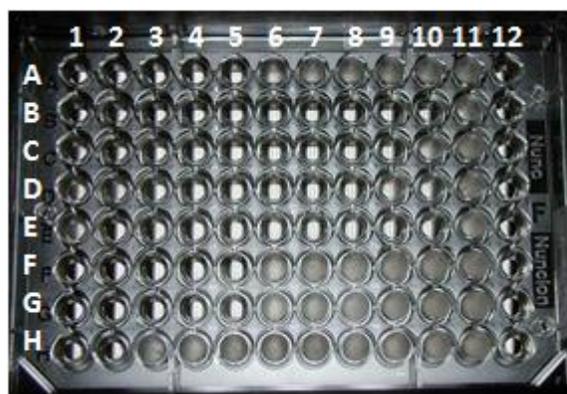


Figura 19. Placa de microdilución en caldo. Columnas 1-10: diluciones del antifúngico. Columna 11 y 12: control de crecimiento y de esterilidad. Fila A-B: cepas ATCC 22019 y ATCC 6258; Filas C-G: aislados problema.

Cuadro 12. Intervalo de la CMI de antifúngicos para la interpretación de la prueba establecidos por el CLSI.

Antifúngico	Sensible $\mu\text{g/mL}$	Sensible Dosis Dependiente $\mu\text{g/mL}$	Resistente $\mu\text{g/mL}$
Itraconazol	<0.25	0.25-0.5	≥ 1.0
Fluconazol	<8	16-32	64
Voriconazol	≤ 1.0	2.0	≥ 4.0
Posaconazol	<1.0	-	≥ 1.0
Caspofungina	≤ 2.0	-	>2.0
Anfotericina B	-	-	≥ 2.0

6.5 Análisis estadístico

La evaluación estadística comprendió las siguientes pruebas:

- Determinación de medidas de tendencia central: promedio, mediana y desviación estándar.
- Representación de porcentajes en cuadros y gráficos.

7. RESULTADOS

De las 100 puntas de catéter procesadas en el Laboratorio Central; 58% pertenecían a pacientes del género femenino. El rango de edad fue de 20 a 96 años, con un promedio de 50.15 años.

Cuando utilizamos la TM, se detectaron 42 catéteres colonizados por bacterias, hongos o ambos, mientras que por la TI se detectaron 41 catéteres. De todos los catéteres contaminados, 30 se obtuvieron de pacientes que presentaban por lo menos uno de los siguientes factores de riesgo.

Factores de riesgo.

Los principales factores de riesgo asociados a la utilización de catéteres se muestran en el cuadro 13, donde predominó la asociación con antimicrobianos.

Cuadro 13. Factores de riesgo relacionados a la colonización de catéteres.

Factores de riesgo	%
Antibioticoterapia ¹	29
Insuficiencia renal crónica	9
DM2	8
Hemodiálisis	4
Infección de vías urinarias	1
VIH	1

¹Antibióticos prescritos: vancomicina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacino, imipenem, piperacilida y metronidazol.

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Los servicios de procedencia (Cuadro 14) de los pacientes fueron principalmente aquellos en los que se practican cirugías con frecuencia como Neurocirugía y Gastrocirugía, otros casos fueron atendidos en la Unidad de Cuidados Intensivos.

Cuadro 14. Procedencia de las muestras analizadas.

PROCEDENCIA	MUESTRAS (%)
Neurocirugía	34
Gastrocirugía	19
UCI	11
Nefrología	10
Medicina Interna	7
Hematología	6
UTR	4
Hemodiálisis	4
Admisión Continua	1
Cirugía Maxilofacial	1
Reumatología	1
Otorrinolaringología	1
Sin datos	1

UCI: Unidad de cuidados intensivos, UTR: Unidad de trasplante renal.

Tipos de catéter.

La mayoría de catéteres procesados (Figura 17) fueron de tipo venoso central, en menor proporción Mahurkar para hemodiálisis y Tenckoff utilizado para diálisis peritoneal.

Los aislados levaduriformes obtenidos por las técnicas enunciadas, estaban relacionadas a catéteres venosos centrales, de los catéteres tipo Mahurkar se obtuvo únicamente un aislado bacteriano, contrario a los catéteres tipo Thenckoff, que no presentaron desarrollo.

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

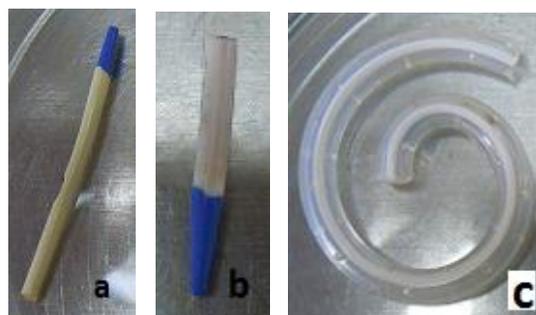


Figura 17. Tipos de catéter procesados. **(a)** Catéter venoso central, **(b)** Mahurkar y **(c)** Tenckhoff.

Cuadro 15. Porcentaje de catéteres analizados en el estudio.

Tipos de catéteres	Porcentaje
Venoso central	92%
Mahurkar	6%
Tenckoff	2%

Microorganismos aislados.

De los 100 dispositivos procesados por la TM se obtuvieron 51 aislados de los cuales 5 fueron hongos y 46 bacterias; con la TI, el número de hongos recuperados fue el mismo (5), sin embargo, disminuyó el número de aislados bacteriológicos obteniéndose 42 microorganismos (ver Cuadro 16).

Cuadro 16. Número y porcentaje de microorganismos aislados.

Técnica	No. de microorganismos aislados	No. de muestras polimicrobianas	Porcentaje de aislados	
			Fúngicos (%)	Bacterianos (%)
Intraluminal	47	6	5	42
Maki	51	8	5	46

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Los cinco agentes micóticos correspondieron al género *Candida*, la especie más frecuente fue *C. parapsilosis* (4 aislados) y *C. albicans* (un aislado). El número de aislamientos fúngicos y su identificación tuvieron 100% de concordancia con las dos técnicas empleadas (Cuadro 17).

Cuadro 17. Asociación de especies de *Candida* en los catéteres analizados.

Muestra de catéter	<i>Candida spp.</i>	
	Técnica Maki	Técnica intraluminal
CAT- 39 CVC	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CAT- 40 CVC	<i>Candida spp.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CAT- 48 CVC	<i>Candida spp.</i>	<i>Candida albicans</i>
CAT-89 CVC	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CAT- 100 CVC	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>

Con ambas técnicas, en algunos catéteres se aisló más de un agente; en un caso, por la TM se aisló *C. parapsilosis* asociada a *Citrobacter freundii* y *Enterococcus faecium*, la misma muestra procesada por la TI sólo presentó desarrollo del hongos en tanto que el desarrollo bacteriano fue negativo por los antibióticos presentes en los medios de cultivo utilizados (Gráfico 1).

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

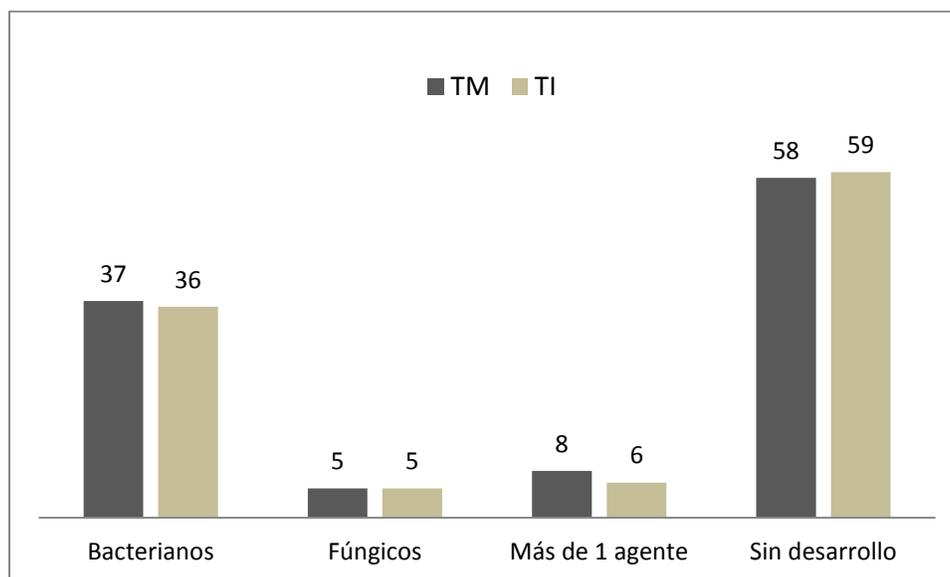


Gráfico 1. Comparación del número de cultivos obtenidos por ambas técnicas. TM: Técnica de Maki; TI: Técnica intraluminal.

Después de la inoculación de los medios de cultivo con los aislados obtenidos con la TI, el crecimiento fúngico tardó de una a cuatro semanas; con la TM, la velocidad de crecimiento levaduriforme se presentó en menos de una semana, el número de UFC detectadas en los aislados de la TM fue mayor (Cuadro 18).

Cuadro 18. Número de unidades formadoras de colonia del primo aislamiento por las técnicas Intraluminal y de Maki.

Muestra	No. UFC	
	TI	TM
CAT-39	40	>100 000
CAT-40	28	100 000
CAT-48	5	>100 000
CAT-89	35	100 000
CAT-100	27	100 000

Mediante el sistema automatizado Vitek® MS se identificaron los microorganismos levaduriformes y bacterianos aislados por ambas técnicas (Gráfico 2).

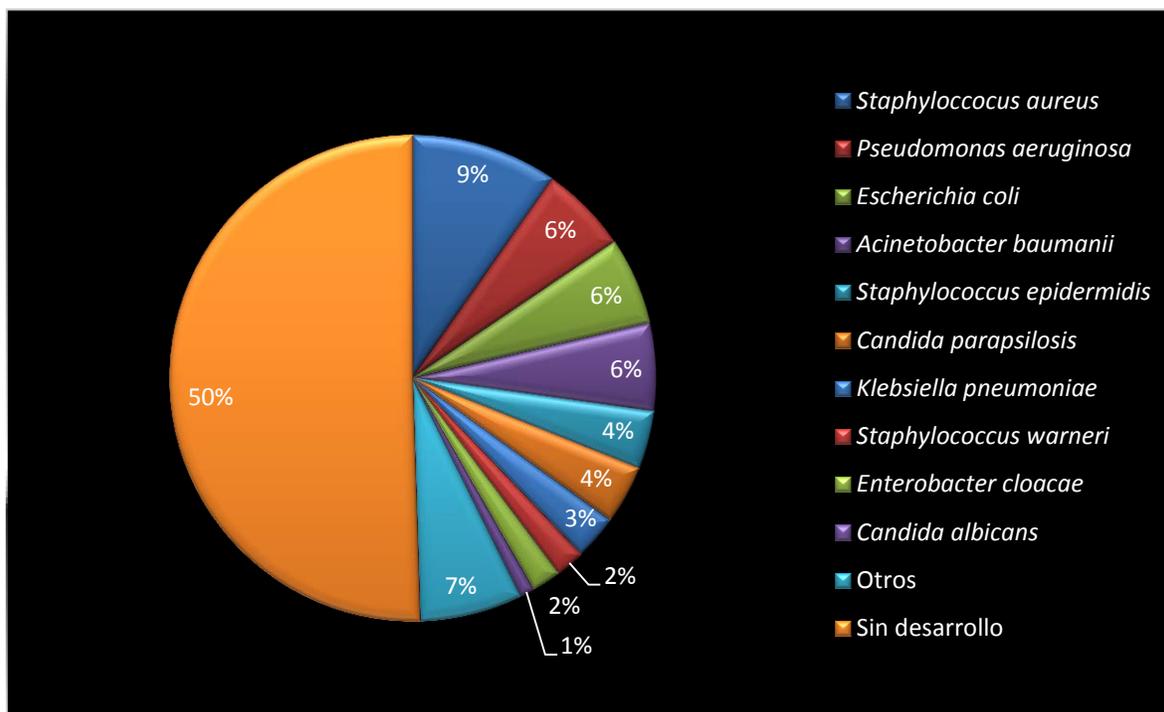


Gráfico 2. Porcentaje de las especies recuperadas de catéteres por la Técnica de Maki.

Los aislados obtenidos por la TI, se les realizaron pruebas fenotípicas manuales. Con estos métodos, además de completar la identificación fúngica se puede diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans*, levaduras que por los métodos automatizados no presentan ninguna diferencia.

Identificación fenotípica de los aislados de *Candida* sp.

La promoción del crecimiento en medios de primo aislamiento como el ADS-CFX fue positiva para todos los aislados. En el medio ADS-CC no hubo desarrollo de *Candida parapsilosis* (Figura 18).

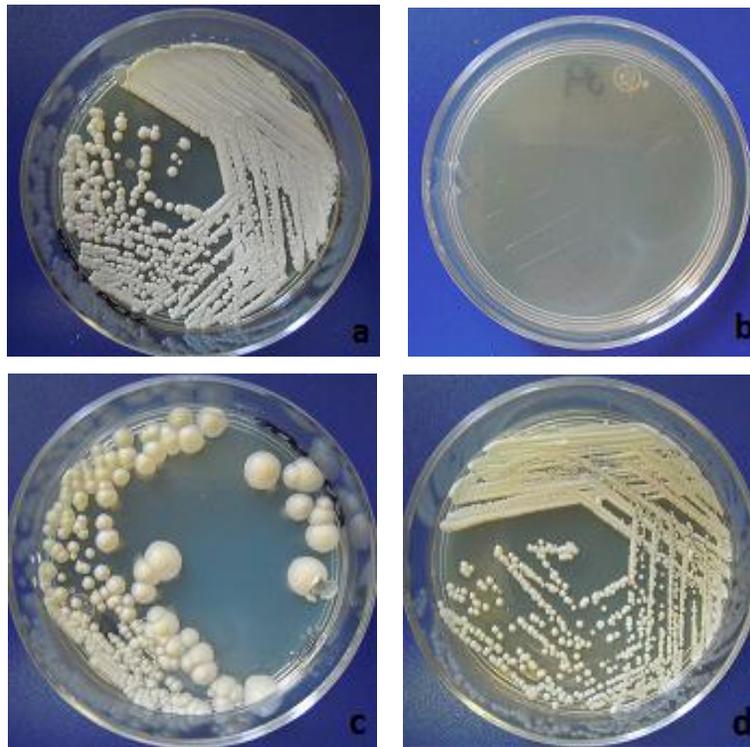


Figura 18. Cultivos de *Candida parapsilosis* en (a) ADS-CFX y (b) ADS-CC; *Candida albicans* se desarrolla muy bien en ambos medios (c) y (d).

Para la identificación presuntiva de las especies de *Candida* obtenidas, mediante el uso de medios cromógenos: CH y ABC. La coloración en ABC se observó una semana después de la inoculación, a diferencia del CH. En ambos medios cromógenos las especies de *Candida parapsilosis* desarrollaron un color ligeramente beige, mientras que *Candida albicans* desarrollo una coloración verde (Figura 19).

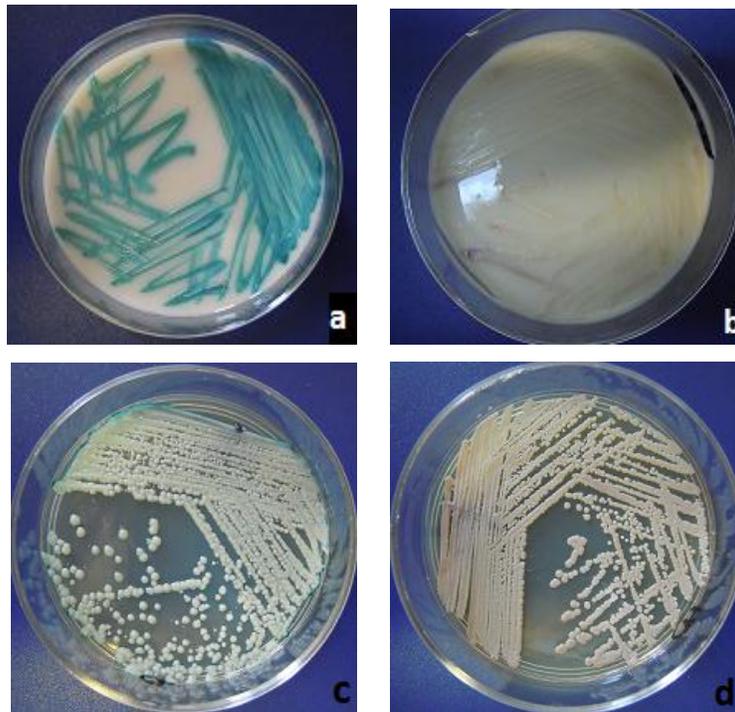


Figura 19. Crecimiento de **(a)** *C. albicans* y **(b)** *C. parapsilosis* en ABC. Crecimiento de **(c)** *C. albicans* y **(d)** *C. parapsilosis* en CH.

Para la diferenciación del aislado CAT-48 CVC entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* se realizaron pruebas fenotípicas ya establecidas. Las colonias de *C. albicans* en AT produjeron colonias marrón claro, de superficie lisa, brillantes y de contorno irregular. En la morfología microscópica se hallaron escasos (+) clamidoconidios únicos (Figura 20). El crecimiento en APD fue abundante a diferentes temperaturas. La interpretación mostró que se trataba de *Candida albicans*.

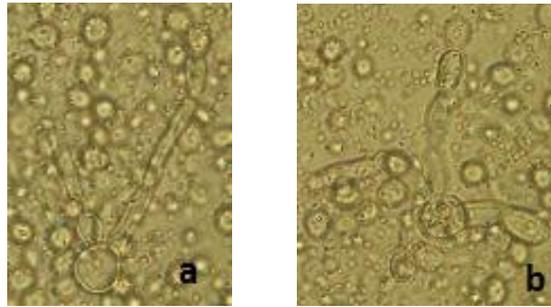


Figura 20. (a) y (b) examen directo de crecimiento en AT de *C. albicans*, clamidoconidios únicos escasos (100x).

El resultado anterior fue corroborado por medio del estudio de termotolerancia esto para concluir si la cepa de la muestra CAT-48 era *C. albicans*, en la cual, se observó la promoción positiva del microorganismo sobre la superficie del medio de cultivo APD (Figura 21).

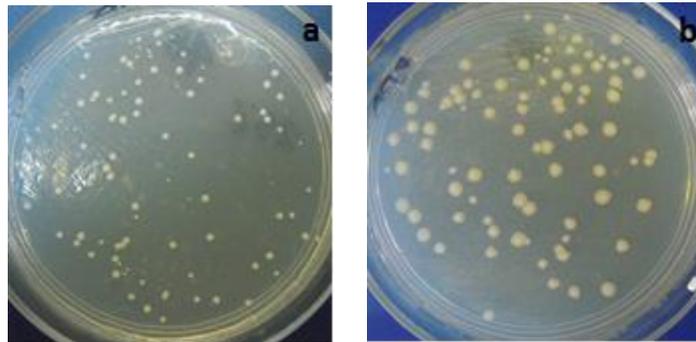


Figura 21. Crecimiento de *Candida albicans* a temperaturas de (a) 45°C y (b) 25°C.

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Estudios de sensibilidad antifúngica.

En el Cuadro 19 se muestran los resultados del estudio de sensibilidad realizado a los cinco aislados levaduriformes frente a seis fármacos. Las CMI se compararon con los puntos de corte establecidos en el documento M27-A3 del CLSI y de acuerdo con la publicación de Phaller, M. y Cols. (2013).

Cuadro 19. Sensibilidad de los aislados de *Candida spp.* de catéter venoso central.

Aislado	Especie	ITZ	FLZ	VRZ	PSZ	CSF	AMB
CVC-39	<i>C. parapsilosis</i>	0.03	0.125	0.5	0.03	0.5	0.5
CVC-40	<i>C. parapsilosis</i>	0.06	0.125	0.5	0.06	0.5	0.5
CVC-48	<i>C. albicans</i>	0.03	0.25	0.5	0.03	0.5	0.5
CVC-89	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	0.125	0.5	0.06	2.0	2.0
CVC-100	<i>C. parapsilosis</i>	0.03	0.125	2.0	0.03	1.0	0.5

Clave de colores: rojo: resistentes R, azul: sensible dosis dependiente SDD, gris: sensibles S.

El 100% de los aislados fúngicos presentaron sensibilidad frente a los triazoles: ITZ, FLZ y PSZ. El 20% de los aislados presentó resistencia a VRZ, siendo *C. parapsilosis* (CVC-100) la cepa resistente, mientras que el resto incluyendo *C. albicans* fueron sensibles dosis dependiente al fármaco mencionado. Se realizó la evaluación del efecto de una equinocandina, en este caso caspofungina, sólo un aislado de *C. parapsilosis* (CVC-89) fue resistente, mismo que presentó resistencia a AMB.

8. DISCUSIÓN

El aumento del número de pacientes que requieren la implantación de un catéter vascular ha llevado a un creciente interés en las infecciones relacionadas con estos dispositivos médicos. El 87% de los casos de infecciones del torrente sanguíneo se relacionan con la utilización de líneas vasculares, los agentes principales son bacterias, sin embargo, el uso de catéteres, constituye un factor de riesgo para el desarrollo de candidemia, que en los últimos años se ha convertido en la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales (128).

Para el diagnóstico de este tipo de complicaciones, Maki y Cols. (27), desarrollaron una técnica de cultivo semicuantitativa de puntas de catéter, actualmente éste método es empleado en numerosos laboratorios, incluyendo los de México. A pesar de la sensibilidad de la TM para la detección de microbios en catéteres, el aislamiento de especies de origen fúngico, de acuerdo con algunos investigadores es menor que la cantidad real de infecciones reportadas en la literatura internacional (129), (130), (131).

En una tesis dirigida por Manzano-Gayosso y realizada por Pérez Allende, tomando muestras intraluminales de puntas de catéter de pacientes atendidos en el Hospital “Dr. Darío Fernández Fierro” ISSSTE, sembradas en ADS-CIP, ADS-CC, ABC y CH, se aislaron levaduras del género *Candida* en el 35% de las muestras procesadas porcentaje superior al obtenido con la técnica de Maki (14%) (110), este hecho, originó la inquietud de comprobar sus resultados con los que pudieran obtenerse de los pacientes del HE y que pudieran estarse subdiagnosticando las infecciones fúngicas.

De acuerdo con los resultados de esta investigación y pese a la utilización de medios selectivos para hongos, el porcentaje de levaduras aisladas con la técnica modificada fue de 5%, cifra igual a la obtenida con la TM; por lo que no se logró comprobar lo reportado por Manzano-Gayosso y Cols. (110).

Entre las hipótesis para explicar la diferencia en los resultados de ambas investigaciones tenemos: a) el procesamiento de las muestras por la TM en el Laboratorio de Microbiología del Hospital “Dr. Darío Fernández Fierro” (ISSSTE) no se realiza de manera adecuada o b) el equipo (incubadoras) podrían estar descalibrados. Contrario a los resultados reportados en el HE, el número de especímenes fúngicos aislados fue el mismo por ambas técnicas constatando su efectividad, cuando se llevan a cabo en condiciones controladas.

Los especímenes fúngicos aislados correspondieron a especies de *Candida*, mayoritariamente *Candida parapsilosis* (80%) y el resto a *Candida albicans* (20%). Numerosas investigaciones clínicas han reportado una prevalencia elevada de *C. parapsilosis* en los aislados de sangre y en dispositivos vasculares, a la par ha sido sugerida la asociación de esta especie con las infecciones relacionadas a líneas venosas centrales. En otros países, *C. albicans* sigue siendo la levadura aislada con mayor frecuencia en E.U.A. (56%) y Europa (53%) (36), (104). La prevalencia de *C. parapsilosis* ha sido reportada también en otros trabajos latinoamericanos (132).

La detección de *C. parapsilosis* en las muestras procesadas por ambas técnicas se debe a distintos elementos en conjunto. Esta levadura es parte de la microbiota cutánea y repetidamente es la responsable de epidemias de origen exógeno (133). Con mayor frecuencia, la contaminación del catéter se produce por la colonización extraluminal, aunque puede inferir la manipulación por el personal (134), (135).

Uno de los factores que más influye en la colonización de las puntas de catéter por *C. parapsilosis* de acuerdo con algunos investigadores, es su alta afinidad por materiales sintéticos, formando biopelículas extensas en la superficie del catéter, permitiendo su multiplicación, permanencia y consecuentemente su diseminación (128), (135).

Kojic y Darouich (2003) realizaron un estudio comparativo de la adherencia de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en catéteres de silicón, sin encontrar diferencia. Otros factores relacionados con el dispositivo, tales como el material, la forma y la superficie, pueden afectar la adherencia de *Candida*. En un estudio, se investigó la estructura de las biopelículas de *C. albicans* demostrando que su adhesión era dependiente de la naturaleza de la superficie de contacto (136). Lo que podría explicar el pobre aislamiento de esta especie a partir de dispositivos médicos en este protocolo y haría pensar que la adhesión a líneas vasculares depende de la virulencia de cada cepa.

Algo que sí es claro, es que la formación de biopelículas tiene un impacto clínico notable, ya que la mortalidad es mayor en pacientes infectados con aislados formadores de biopelículas comparados con los infectados por cepas no formadoras de biopelículas (51% frente a 32%, respectivamente) (137). *Candida parapsilosis* sigue siendo considerada una especie de baja virulencia comparada con otras especies de *Candida* y generalmente tiene una baja tasa de mortalidad (138).

En este trabajo, no se investigó la formación de biopelículas, por tanto, no podemos atribuir directamente a esta característica el gran número de aislamientos de *C. parapsilosis*, es necesario considerar que el incremento de aislamiento de ésta especie a partir de catéteres en estudios latinoamericanos, sea debido en parte, al mal manejo de los implantes, comparado con los cuidados que siguen en EUA y Europa.

La implantación de un dispositivo invasivo *per se* es un factor predisponente para el desarrollo de candidemia en el paciente. Otros factores relacionados a los CVC colonizados por *Candida* encontrados en esta investigación fueron: la administración de antibióticos de amplio espectro, padecimientos crónicos como DM2 e insuficiencia renal crónica, y hemodiálisis.

Las infecciones relacionadas a catéteres son multifactoriales y dada la naturaleza de *Candida* como patógeno oportunista, la mayoría de los factores predisponentes mencionados se encuentran asociados entre sí. Así mismo, el estado del sistema inmunitario del paciente es determinante para el desarrollo de infecciones por estos patógenos.

Uno de los factores determinantes en una infección por *Candida* es la administración de antibióticos de amplio espectro en dosis elevadas, contribuyendo a la disminución de bacterias permitiendo así la proliferación excesiva de *Candida*. Los padecimientos crónicos como DM2 e insuficiencia renal crónica juegan un papel importante. McKane y Cols. (2014) encontraron que la inmunosupresión en los pacientes puede estar relacionada con la hiperglucemia, dado que disminuye la función de neutrófilos y monocitos, la adhesión, la fagocitosis, el estallido respiratorio, y la función bactericida (139).

La insuficiencia renal crónica es una de tantas complicaciones en pacientes con DM2. Los pacientes con insuficiencia renal igualmente presentan alteración de los mecanismos de defensa, debido en parte al tratamiento con hemodiálisis. La uremia y la inflamación inducida por los filtros de hemodiálisis pueden causar estrés oxidativo y activación de la apoptosis en las células, con disminución del número de linfocitos T, ocasionando un déficit de inmunidad celular y favoreciendo la aparición de infecciones (140).

Los pacientes dependientes de hemodiálisis crónica tienen un riesgo significativamente mayor a adquirir infecciones nosocomiales que la población general del hospital; el aumento del riesgo es reflejo de un sistema inmunológico deteriorado. La infección adquirida en el hospital más común en esta población es la infección del torrente sanguíneo (141).

En México, generalmente no se hacen estudios de sensibilidad a los aislados y la terapia antifúngica se prescribe de manera empírica, esto es un factor de riesgo para fallas terapéuticas, pues al no tener un estudio completo del agente causal, existe la probabilidad de desarrollar resistencia a los fármacos empleados. Los antifúngicos más comunes indicados en las candidemias son el FLZ (67.7%), la CSF (38.1%) y el VRZ (6.7%) (110).

En este estudio, el fármaco que presentó mayor actividad en la inhibición de las especies *Candida* fue el VRZ. Generalmente, las cepas de *C. albicans* suelen ser resistentes a los triazoles. En esta investigación se encontró que contrario a lo reportado internacionalmente *C. albicans* al igual que *C. parapsilosis* fueron sensibles a todos los triazoles, la inhibición del crecimiento frente al ITZ, FLZ y PZC fue del 100%. La resistencia *in vitro* de *C. parapsilosis* a VRZ es rara, los primeros informes demuestran 100% de sensibilidad. Aunque recientemente, un análisis de 9371 aislados de *C. parapsilosis* mostró que 1,9% eran resistentes al fármaco, sin embargo, este antimicótico es útil ya que incluso 36,7% de los aislados resistentes a FLZ fueron sensibles a VRZ (142), (143).

Fue notable que uno de los cuatro aislados estudiados de *C. parapsilosis* fue resistente a CSF. La base de esta resistencia al fármaco aún no se entiende claramente, posiblemente influyen las diferencias estructurales en los componentes de la pared celular, la afinidad reducida para el complejo de proteína de glucano sintasa, o una diferencia en su red de regulación (143).

La resistencia a AMB de los aislados de *C. parapsilosis* también fue de 20%; se han publicado informes de casos individuales que documentan la resistencia de AMB en cepas infectantes durante el tratamiento; otros estudios han reportado resistencia *in vitro* de *C. parapsilosis* a AMB a una tasa de 2 a 3% (143).

La importancia de la determinación de sensibilidad antifúngica de cualquier aislado micótico de tejidos profundos, radica en la necesidad de identificar los patrones de resistencia de los agentes causales de fungemias en los pacientes con diversos factores de riesgo como la implantación de un catéter, para poder brindarle una mejor opción terapéutica.

9. CONCLUSIONES

- ❖ El número de aislados fúngicos tanto por la técnica de Maki y la técnica intraluminal en este estudio, fue de 5.0%. Dado que, no existe una diferencia entre la frecuencia de aislados obtenidos por ambas técnicas y tomando en cuenta la relación costo-beneficio, podemos considerar la técnica de Maki como la mejor opción para el diagnóstico de colonización por levaduras en puntas de catéter en pacientes del HE, pues su procedimiento es sencillo, rápido y la utilización de insumos es menor en comparación con la TI.
- ❖ Acorde con lo reportado mundialmente el aislamiento de agentes micóticos a partir del segmento distal de un catéter fue minoritario. Asimismo, la especie de *Candida* predominante fue *C. parapsilosis* (80%) y no *C. albicans* (20%), como se había previsto. El 20% de los aislados fúngicos presentó resistencia a los antifúngicos. Contrario a lo publicado internacionalmente *C. albicans* fue sensible a los fármacos ensayados y *C. parapsilosis* presentó resistencia frente a 3 de los antimicóticos (VRZ, CSF, AMB).

10. REFERENCIAS

1. Hadaway LC. Aplicación de tratamiento mediante dispositivos de acceso venoso central. *Nursing*. 2009; 27(3): p. 21-26.
2. García CP, Payá GE, Olivares CR, Cotera FA, Rodríguez TJ, Sanz RM. Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Revista Chilena de Infectología*. 2003; 20(1): p. 41-50.
3. Fredrotovich N. Historia de un emblema de la urología: las sonda. *Revista Argentina de Urología*. 2003; 68(3): p. 121-124.
4. Beheshti V. A Concise History of Central Venous Access. *Techniques in vascular and Interventional Radiology*. 2011; 14: p. 184-185.
5. Gerson R, Rojas G, Guadiana E. Catéteres venosos centrales. Historia. *Anales Médicos Hospital ABC*. 1994; 39(1): p. 22-26.
6. Rivera AM, Strauss KW, Van Zundert A, Mortier E. The history of peripheral intravenous catheters : How little plastic tubes revolutionized medicine. *Acta Anaesthesiologica Belgica*. 2005; 56: p. 271-282.
7. Gerson R, Rojas G, Guadiana E. Catéteres Venosos Centrales. Historia. *Anales Médicos Asociación Médica del American British Cowdray Hospital*. 1994; 39(1): p. 27-31.
8. Amboage Mato C, Agüera Peñafiel M. Guía de administración intravenosa de medicamentos de urgencias España: Arán Ediciones S.L.; 2003.
9. Echeverri de Pimiento S, Pimiento JM. Acceso venoso central. In *Guía para manejo de urgencias*. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2009. p. 103-114.
10. Gálvez R. Accesos venosos centrales y complicaciones. In *Andresen H. M. Manual de medicina intensiva*. Santiago: Editorial Mediterráneo Ltd.; 2010. p. 33-43.
11. Bouza E, Liñares J, Pascual Á. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares. In *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC*; 2004. p. 1-10.
12. Medina Gutiérrez RE. Complicaciones mecánicas del cateterismo venoso central en pacientes de cuidados intensivos. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 2005; 18(1): p. 11-14.

13. Imigo GF, Elgueta CA, Castillo FE, Celedón L. E, Fonfach Z. C, Laanderos F. J, et al. Accesos venosos centrales. Cuadernos de Cirugía. 2011; 25: p. 52-58.
14. Rivas TR. Complicaciones mecánicas de los accesos venosos centrales. Revista médica Clínica Las Condes. 2011; 22: p. 350-360.
15. Hernández Hernández MA, Álvarez Antoñan C, Pérez-Ceballos MA. Complicaciones de la canalización de una vía venosa central. Revista Clínica Española. 2006; 206(1): p. 50-53.
16. García Rebollo S, Solozábal Campos CA. Accesos vasculares percutáneos. Nefrología al día. 2011;; p. 413-424.
17. Osuna Huerta A, Carrasco Castellanos JA, Borbolla Sala ME, Díaz Gómez JM, Pacheco Gil L. Factores que influyen en el desarrollo de infección relacionada a catéter venoso central y gérmenes relacionados. Salud en Tabasco. 2009; 15(2 y 3): p. 871-877.
18. Leonidou L, Gogos CA. Catheter-related bloodstream infections: catheter management according to pathogen. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010;; p. S26-S32.
19. Kehr J. Complicaciones infecciosas asociadas a catéter venoso central. Revista Chilena de Cirugía. 2002; 54(3): p. 216-224.
20. Ferrer Espín A, Macías Garrido E, Meza Cardona J, Cabrera Jardines R, Rodríguez Weber F, Díaz Greene E, et al. Infecciones relacionadas a catéteres venosos: incidencia y otros factores. Medicina Interna de México. 2008; 24(2): p. 112-119.
21. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven ED, Flynn P, O'Grady NP, et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. Clinical Infectious Diseases. 2009; 49: p. 1-45.
22. General CdS. Prevención, diagnóstico y tratamiento de las infecciones relacionadas a líneas vasculares. Catálogo maestro de guías de práctica clínica IMSS-273-13. 2012;; p. 2-26.
23. Zhang L, Gowardman J, Rickard CM. Impact of microbial attachment on intravascular catheter-related infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 2011; 38: p. 9-15.
24. Romero Cabello R. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Tercera ed. México, D.F.: Médica Panamericana; 2007.

25. Paradiso B. www.clinica-unr.org. [Online].; 2009 [cited 2014 Mayo 20. Available from: www.clinica-unr.org.
26. Eggimann P, Sax H, Pittet D. Catheter-related infections. *Microbes and Infection*. 2004; 6: p. 1033-1042.
27. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *New England Journal Medical*. 1977; 296: p. 1305-1309.
28. Cleri D, Corrado M, Seligman S. Quantitative culture of intravenous catheter and other intravascular insert. *The Journal of Infectious Diseases*. 1980; 141: p. 781-786.
29. Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Archives of Internal Medicine*. 1987; 147: p. 873-877.
30. Sherertz R, Raad I, Belani A. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28: p. 76-82.
31. Sociedad Española de Quimioterapia , Asociación Española de Hematología y Hemoterapia , Sociedad Española de Oncología Médica , Sociedad Española de Medicina Interna. Tratamiento de las infecciones relacionadas con catéteres venosos de larga duración. *Revista Española de Quimioterapia*. 2003; 16(3): p. 343-360.
32. Cantón E, Viudes Á, Pemán J. Infección sistémica nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2001; 18: p. 51-55.
33. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005; 28(2): p. 163-175.
34. Castrillón R. LE, Palma RA, Padilla DC. Factores de virulencia de *Candida sp*. *Revista Mexicana de Dermatología*. 2005; 49(1): p. 12-27.
35. Pemán J, Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013; 31(5): p. 328-341.

36. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013; 31(6): p. 380-384.
37. Figueras Nadal C, Díaz de Heredia Rubio C, Navarro Gómez ML, Roselló Mayans E, Álvez González F. Infección fúngica invasiva (IFI): actualización. In *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de la Asociación Española de Pediatría: Infectología pediátrica.*: ERGON; 2011. p. 135-146.
38. Pronovost P, Needham D, Berenholtz S, Sinopoli D, Chu H, Cosgrove S, et al. An Intervention to Decrease Catheter-Related Bloodstream Infections in the ICU. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355(26): p. 2725-2732.
39. López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Origüen J, Belarte-Tornero LC, Carazo-Medina R, Panizo-Mota F, et al. Clinical significance of *Candida* colonization of intravascular catheters in the absence of documented candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012; 73: p. 157-161.
40. Ramírez Barba EJ, Rosenthal VD, Higuera F, Sobreyra Oropeza M, Torres Hernández H, Sánchez López , et al. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units in four Mexican public hospitals. *American Journal of Infection Control*. 2006; 34(4): p. 244-247.
41. Cooper GL, Hopkins CC. Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct Gram staining of catheter segments. *The New England Journal of Medicine*. 1985; 312: p. 1142-1147.
42. Zuffery J, Rime B, Francioli P, Bille J. Simple method for rapid diagnosis of catheter-associated infection by direct acridine orange staining of catheter tips. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988; 26: p. 175-177.
43. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003; 3(11): p. 685-702.
44. Hasan F, Xess I, Wang , Jain , Fries C. Biofilm formation in *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*. 2009; 11: p. 753-761.
45. Bonifaz A. *Micología Médica Básica México*, D.F.: McGrawHill; 2010.
46. López Martínez R. *Micología Médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio México*, D.F.: Trillas; 2012.

47. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012; 30(1): p. 33-39.
48. Hibbet DS, et al.. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* III. 2007; 111(5): p. 509-547.
49. Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. Primera ed. Washington D.C.: ASM Press; 2002.
50. Larone DH. *Medically important fungi: A guide to identification*. Quinta ed. Washington, USA: ASM Press; 2011.
51. Martino Bofarull R, Sierra Gil J. *Infecciones fúngicas graves en Hematología y oncología*. Tercera ed. Barcelona, España: Ars Médica; 2003.
52. Casadevall A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews*. 2007; 21(4): p. 130-132.
53. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*. 2001; 9(12): p. 591-596.
54. Ramage G, Williams C. The clinical importance of fungal biofilms. *Advances in Applied Microbiology*. 2013; 84: p. 28-63.
55. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; 67(3): p. 400-428.
56. Schaller. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000; 114: p. 712-717.
57. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infection and Immunity*. 2001; 69: p. 405-412.
58. Koelsh G, Rockwell N, Wang GT, Krafft GA, Fuller RS. Enzymatic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1480: p. 117-131.
59. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005; 48: p. 365-377.

60. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinbauer S, Nichterlein T. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg-1 regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infection and Immunity*. 2002; 70(7): p. 3689-3700.
61. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartic proteinases in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. 1994; 14: p. 87-89.
62. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology*. 1998; 144: p. 2731-2737.
63. Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M. The expression of the secreted aspartic proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Molecular Microbiology*. 1998; 28: p. 543-554.
64. Schaller , Schäfer , Korting H, Hube B. Differential expression of secreted aspartic proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Molecular Biology*. 1998; 29: p. 605-615.
65. Staib , Kretschmar , Nichterlein T. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 2000; 97: p. 6102-6107.
66. Korting HC, Hube , Oberbauer , Januschke , Hamm G, Albrecht A. Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *Journal of Medical Microbiology*. 2003; 52(Pt8): p. 623-632.
67. Hube B. Possible role of proteinases in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1998; 15: p. 68-71.
68. Ghannoum MA. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13(1): p. 122-143.
69. Paraje MG, Correa SG, Albesa I, Sotomayor CE. Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 390: p. 263-268.

70. Tsai PW, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: a mini review. *Biomedicine*. 2013; 3(1): p. 51-64.
71. Taniguchi L, Faria BF, Takaki Rosa R, de Paula e Carvalho A, Gursky LC, Lobo Elifio-Esposito S, et al. Proposal of a low-cost protocol for colorimetric semi-quantification of secretory phospholipase by *Candida albicans* grown in planktonic and biofilm phases. *Journal of Microbiological Methods*. 2009; 78: p. 171-174.
72. Werner H. Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi. *Zentralbl Bakteriol [Orig]*. 1966; 200: p. 113-124.
73. Schofield DA, Westwater C, Warner , Balish. Differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 244: p. 359-365.
74. Caminero Rodríguez de Lamo A. Identificación, caracterización y ensamblaje de nuevos componentes manoproteicos de la pared celular de *Candida albicans*. Valencia; 2013.
75. Calderone A, Fonzi W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001; 9(7): p. 327-335.
76. Hostetter M. Integrin-like Proteins in *Candida spp.* and Other Microorganisms. *Fungal Genetics and Biology*. 1999; 28: p. 135-145.
77. Nobile J, Nett E, Andes R, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* Adhesin Hwp1 in Biofilm Formation. *Eukaryotic Cell*. 2006; 5(10): p. 1604-1610.
78. Hoyer L. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001; 9(4): p. 176-180.
79. Sheppard DC, Yeaman R, Welch , Phan T, Fu , Ibrahim A, et al. Functional and Structural Diversity in the Als Protein Family of *Candida albicans*. *The Journal of Biological Biochemistry*. 2004; 279: p. 30480-30489.
80. Kamai K, Kubota M, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infection and Immunity*. 2002; 70: p. 5256-5258.
81. Castillo L, Martínez AL, Garcerá A, García Martínez J, Ruíz Herrera J, Valentín E, et al. Genomic response programs of *Candida albicans* following protoplasting and regeneration. *Fungal Genetics and Biology*. 2006; 43: p. 124-134.

82. Zhao X, Oh SH, Yeater KM, Hoyer LL. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology*. 2005; 151: p. 1619-1630.
83. Nobile CJ, Michell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiology*. 2006; 8: p. 1382-1391.
84. Klots SA, Gaur NK, Lake DF, Chan V, Rauceo , Lipke PN. Degenerated peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infection and Immunology*. 2004; 72: p. 2029-2034.
85. Hoyer LL, Hetch JE. The Als6 and Als7 genes of *Candida albicans*. *Yeast*. 2000; 16: p. 847-855.
86. Thomson LM, Bates S, Yamazaki S, Arisawa M, Aoki Y, Gow NA. Functional characterization of the *Candida albicans* MNT1 mannosyltransferase expressed heterologously in *Pistia pastoris*. *The Journal of Biology Chemistry*. 2000; 275: p. 18933-18938.
87. Mitchell AP. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Current opinion in Microbiology*. 1998; 1: p. 687-692.
88. Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *The EMBO Journal*. 1997; 16(8): p. 1982-1991.
89. Whiteway , Oberholzer. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 2004; 7: p. 350-357.
90. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*. 2001; 81: p. 101-110.
91. Franca JG, Andrade GTJ, Furlaneto-Maia , Serpa , Oliveira T, Quesada MB, et al. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. *Micron*. 2011; 42: p. 726-732.
92. Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*. 2011; 86: p. 238-242.

93. Harriott MM, Noverr C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends in Microbiology. 2011; 19(11): p. 557-563.
94. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Current Opinion in Microbiology. 2006; 9: p. 588-594.
95. Donlan M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. Clinical Infectious Diseases. 2001; 33: p. 1387-1392.
96. Martinez R, Fries. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. Current Fungal Infections Reports. 2010; 4(4): p. 266-275.
97. Chandra J, Mukherjee K, Ghannoum A. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nature Protocols. 2008; 3(12): p. 1909-1924.
98. Quindós G. Candidemias y Candidiasis invasivas nosocomiales. Medicina Clínica. 2010; 134(1): p. 17-19.
99. Cateau E, Berjeaud JM, Rodier MH, Imbert C. Fungal biofilm inhibition by a component naturally produced by *Candida albicans* yeasts growing as a biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008; 31: p. 166-170.
100. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. Current opinion in Microbiology. 2005; 5: p. 608-611.
101. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends in Microbiology. 2011; 19(5): p. 241-247.
102. Aguilar García CR. Colonización por *Candida* en pacientes no neutropénicos en la unidad de cuidados intensivos. Medicina Interna de México. 2013; 29(6): p. 295-299.
103. Eggimann P, Pittet D. Candidemia y Candidiasis generalizada. EMC - Anestesia-Reanimación. 2010; 36(2): p. 1-26.
104. Hobson RP. The global epidemiology of invasive *Candida* infections- is the tide turning? Journal of Hospital Infection. 2003; 55(3): p. 159-168.
105. Gürcüoğlu E, Akalin , Ener , Ocakoglu , Sınırtas , Akçaglar , et al. Nosocomial candidemia in adults: Risk and prognostic factors. Journal de Micologie Médicale. 2010; 20: p. 269-278.

106. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C, Álvarez-Lerma F, Jordá R, León-Regidor MA. Epcan study group. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critical ill patient. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2004; 23: p. 323-330.
107. León C, Álvarez-Lerma F, Ruíz-Santana S, León MA, Nollá J, Jordá R, et al. EPCAN study group. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009; 28: p. 233-242.
108. Manolakaki D, Velmahos G, Kourkoumpetis T, Chang Y, Halam HB, De Moya MM, et al. *Candida* infection and colonization among trauma patients. *Virulence*. 2010; 1(5): p. 367-375.
109. Seddiki S, Boucherit-Otomani Z, Boucherit K, Badsí-Amir S, Taleb M, Kunkel D. Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria. *International Journal of General Medicine*. 2013; 6: p. 1-7.
110. Pérez Allende C. Levaduras asociadas a catéteres en pacientes hospitalizados y su patrón de sensibilidad a antifúngicos. México; 2014.
111. Weber DJ, Rutala A. Central Line-Associated Bloodstream Infections: Prevention and Management. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2011; 25: p. 77-102.
112. Blumberg HM, Jarvis WR, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Fausto MS, et al. Risk Factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care Unit Patients: The NEMIS Prospective Multicenter Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33(2): p. 177-186.
113. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, et al. Epidemiology, Management, and Risk Factors for Death of Invasive *Candida* Infections in Critical Care: A Multicenter, Prospective, Observational Study in France (2005-2006). *Critical Care Medicine*. 2009; 37(5): p. 1612-1618.
114. Cavling Arendrup M, Bruun B, Jørgen Christensen J, Fuursted K, Krogh Johansen H, Kjældgaard P, et al. National Surveillance of Fungemia in Denmark (2004 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(1): p. 325-334.
115. Nucci M, Thompson-Moyab L, Guzman-Blancoc M, Nora Tiraboschi I. Recomendaciones para el manejo de la candidemia en América Latina. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2013.

116. Almirante , Rodríguez , Park BJ, Cuenca-Estrella , Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(4): p. 1829-1835.
117. Barton Sterling J, Heymann WR. Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21st century—Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000; 43(4): p. 691-697.
118. Gubbins PO, Anaissie EJ. Antifungal Therapy. In *Clinical Mycology*. Londres: Elsevier; 2009. p. 161-196.
119. Zhu , Stiller. Dapsone and sulfones in dermatology: Overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001; 45(3): p. 420-434.
120. Allevato J. MA, Negroni , Galimberti. Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. *Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas*. 2007; 30: p. 8-19.
121. Venadero Albarrán , Orellana Arauco R, Castellón Alcaraz , Bonifaz , Padilla Desgarenes MdC. Esporotricosis linfangítica. A propósito de diferentes alternativas de tratamiento. *Dermatología Revista Mexicana*. 2010; 54(3): p. 145-149.
122. FROMTLING R. Overview of Medically Important Antifungal Azole Derivatives. *Clinical Microbiology Reviews*. 1988; 1(2): p. 187-217.
123. Kathiravan MK, Salake A, Chothe A, Dudhe P, Watode R, Mukta MS, et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012; 20: p. 5678-5698.
124. Gregorí Valdés. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacología*. 2005; 39(2).
125. Dolande Franco E, Reviákina , Mercedes Panizo , Macero , Moreno , Calvo , et al. Distribución y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de *Candida* en seis centros de salud del área metropolitana de Caracas, Venezuela (años 2003-2005). *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008; 25: p. 17-21.
126. Silva V. V, Díaz J. C, Febré N, Red de diagnóstico en Micología Médica. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Revista Chilena de Infectología*. 2002; 19(2): p. 149-156.

127. Pihet , Marot. Diagnostic biologique des candidoses. Revue Francophone des Laboratoires. 2013;(45): p. 47-61.
128. Kojic EM, Darouiche RO. Comparison of adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to silicone catheters in vitro and in vivo. Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2003; 9: p. 684-690.
129. Fariñas M, García-Palomo , Gutiérrez-Cuadra. Infecciones asociadas a los catéteres utilizados para la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2008; 26(8): p. 518-526.
130. Aguinaga A, Del Pozo. Infección asociada a catéter en hemodiálisis: diagnóstico, tratamiento y prevención. NefroPlus. 2011; 4(2): p. 1-10.
131. Pawar M, Mehta , Kapoor , Sharma , Gupta , Trehan. Central Venous Catheter–Related Blood Stream Infections: Incidence, Risk Factors, Outcome, and Associated Pathogens. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia. 2004; 18(3): p. 304-308.
132. Corzo-Leon E, Alvarado-Matute , Colombo , Cornejo-Juarez P, Cortes , Echevarria I, et al. Surveillance of *Candida spp* Bloodstream Infections: Epidemiological Trends and Risk Factors of Death in Two Mexican Tertiary Care Hospitals. PLOS ONE. 2014; 9(5): p. e97325.
133. Paugam A, Baixench MT, Taieb F, Champagnac C, Dupouy-Camet J. Émergence de candidémies à *Candida parapsilosis* à l'hôpital Cochin. Caractérisation des isolates et recherche des facteurs de risque. Pathologie Biologie. 2011; 59: p. 44-47.
134. Bonassolia LA, Bertolia M, Svidzinski T. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. Journal of Hospital Infection. 2005; 59: p. 159-162.
135. Corti , Solari , De Carolis L, Cangelosi , Arechavala , Negroni. *Candida parapsilosis* meningitis in a patient with AIDS. Report of a case and review of the literature. Revista Iberoamericana de Micología. 2013; 30(2): p. 122-124.
136. Shinde R, Raut , Karuppayil M. Biofilm formation by *Candida albicans* on various prosthetic materials and its fluconazole sensitivity: a kinetic study. Mycoscience. 2012; 53: p. 220-226.
137. Tumbarello M, Fiori B, Trecarichi EM, Posteraro P, Losito AR, De Luca A, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. Public Library of Science. 2012; 7(3): p. e33705.

138. Levin S, Costa S, Mussi , Basso , Sinto S, Machado , et al. *Candida parapsilosis* Fungemia Associated with Implantable and Semi-Implantable Central Venous Catheters and the Hands of Healthcare Workers. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1998; 30: p. 243-249.
139. McKane CK, Marmarelis M, Mendu ML, Moromizato T, Gibbons K, Christopher KB. Diabetes mellitus and community-acquired bloodstream infections in the critically ill. *Journal of critical care*. 2014; 29(1): p. 70-76.
140. Fariñas C, García-Palomo , Gutiérrez-Cuadra. Infecciones asociadas a los catéteres utilizados para la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008; 26(8): p. 518-526.
141. Hosoglu , Akalin , Kidir , Suner , Kayabas H, Faruk Geyik. Prospective surveillance study for risk factors of central venous catheter–related bloodstream infections. *American Journal of Infection Control*. 2004; 32(3): p. 131-134.
142. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20(1): p. 133-163.
143. Trofa D, Gácsér A, Nosan JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21(4): p. 606-625.
144. Willard Rippon J. *Micología Médica: hongos y actinomicetos patógenos*. Tercera ed. México, D.F: McGraw-Hill; 1990.
145. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001; 147: p. 1997-2005.
146. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases. *Current Topics in Medical Mycology*. 1996; 7: p. 55-69.
147. Loeffler , Stevens A. Antifungal Drug Resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36: p. S31-41.

11. ANEXO

Tinción de Gram

Se emplea para teñir productos biológicos como líquidos, exudados de lesiones, improntas y macerados de biopsia. Los hongos se tiñen de color violeta, a excepción de *Cryptococcus*, y se diferencian de otros microorganismos por su tamaño.

1. Hacer un frotis y fijarlo con calor.
2. Cubrir con cristal violeta durante un minuto y lavar con agua corriente.
3. Cubrir con lugol durante un minuto y lavar con agua corriente.
4. Agregar 2 a 3 gotas de alcohol-acetona, durante 3 segundos y enjuagar.
5. Cubrir la preparación con safranina durante 30 segundos y lavar con agua, dejar secar.
6. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

Tubo Germinativo

Se usa para diferenciar a *C. albicans* y *C. dubliniensis* de otras especies, ya que éstas forman tubos germinativos en un lapso de 2 a 3h en condiciones adecuadas.

Procedimiento:

1. Suspender una pequeña porción de una colonia aislada de levadura en 0.5 mL de suero.
2. Incubar durante a 37°C por 2 horas.
3. Tomar una gota y realizar lectura al microscopio, en busca de tubos germinales.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar Dextrosa Sabouraud (BD BIOXON®)

Medio de cultivo estándar utilizado para el aislamiento y mantenimiento de hongos saprobios y patógenos.

Componentes	
Peptona de caseína	5.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Dextrosa	40.0 g
Agar	15.0 g
pH final	5,6 ± 0,2

Preparación:

Suspender 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y verter en cajas Petri.

Agar Dextrosa Sabouraud con antibióticos (BBL™ Mycosel™)

Medio de cultivo selectivo utilizado para el aislamiento de la mayoría de los hongos patógenos. La cicloheximida inhibe el desarrollo de los hongos contaminantes y el cloranfenicol inhibe el crecimiento de las bacterias.

Componentes	
Harina de soja digerida por enzimas papaícas	10.0g
Dextrosa	10.0g
Agar	15.5g
Cicloheximida	0.4g
Cloramfenicol	0.05g
pH 6,9 ± 2,0	

Preparación:

Suspender 36 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar y verter en cajas Petri.

CHROMagar *Candida*™

Medio selectivo para el aislamiento, diferenciación e identificación presuntiva de levaduras. La inclusión de sustratos cromógenos ante la presencia de actividad enzimática específica de las levaduras producen un color determinado. Las enzimas que se revelan son hexosaminidasa y fosfatasa alcalina; la primera está presente en *Candida tropicalis*, *C. albicans* y *Candida dubliniensis*, en tanto que *Candida krusei* posee fosfatasa alcalina, otras especies también pueden presentar discreta actividad de esta última enzima y la variación en la tonalidad depende del sustrato cromógeno y la pigmentación natural de la levadura.

Componentes	
Cromopeptona	10g
Glucosa	20g
Mezcla cromógena	2.0g
Cloranfenicol	0.5g
Agar	15g
Agua destilada	1000mL

Preparación:

Suspender 47.7 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta obtener una mezcla homogénea, llevar a ebullición durante 2 minutos. Dejar enfriar y verter en cajas Petri.

Agar Brilliance™ Candida

Medio selectivo diferencial para el aislamiento e identificación de especies de *Candida* clínicamente importantes. Los sustratos cromógenos que utiliza para evidenciar la actividad enzimática de las levaduras son el X-NAG que detecta la actividad de la enzima hexosaminidasa presente en *C. tropicalis* y en *C. albicans/C. dubliniensis*. El BCIP, que detecta la actividad de la fosfatasa alcalina presente en *C. krusei*. Además cuenta con otros sustratos que hacen que en lugar de azul, *C. albicans/C. dubliniensis* aparezcan de color verde.

Componentes	
Peptona	4,0 g
Mezcla Cromogéna	13,6 g
Agar	13,6 g
pH final 6,0 ± 0,2	

Preparación:

Suspender 15,6 g de medio deshidratado en 500 mL de agua destilada. Mezclar cuidadosamente y llevar a ebullición agitando frecuentemente. Este medio NO se puede esterilizar en autoclave, por lo que una vez preparado se debe enfriar y colocar en placas Petri estériles.

Agar Tabaco (Khan)

Medio de cultivo diferencial para *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Componentes	
Tabaco Natural	50.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación:

Hervir 50 g de tabaco natural en 1000 mL de agua destilada, filtrar y recuperar el volumen inicial. Agregar el líquido resultante en un matraz con 20 g de agar, calentar hasta obtener una mezcla homogénea. Ajustar a pH 5.0, esterilizar 15 minutos a 121° C. Dejar enfriar y verter en cajas Petri.

Agar Harina de Maíz adicionado con Tween 80

Se utiliza para la producción de pseudohifas e hifas de algunas especies de *Candida*. El Tween 80 se incorpora para favorecer la producción de clamidoconidios de *C. albicans* y de *C. dubliniensis*.

FRECUENCIA DEL AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE PUNTAS DE CATÉTER UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MAKI Y UNA TÉCNICA INTRALUMINAL

Componentes	
Harina de maíz	62.5 g
Agua destilada	1500 mL
Agar	19.0 g
Tween 80	15.0 mL
pH 6.0 ± 2.0	

Procedimiento:

En 1500 mL de agua destilada disolver la harina de maíz, dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, filtrar y reconstituir el anterior volumen. Añadir 19.0 g de agar, calentar hasta disolverlo y agregar 15.0 mL de Tween 80, homogenizar. Esterilizar la mezcla durante 20 minutos a 121° C. dejar enfriar y verter en cajas Petri.

Agar Papa Dextrosa

Medio para la estimulación de la formación de clamidoconidios, utilizado con frecuencia en microcultivos para observar las características morfológicas.

Componentes	
Infusión de papa	200 g
Dextrosa	10.0 g
Agar	15.0 g
(comercial: 39g para 1000mL de agua destilada)	

Preparación:

Pelar la papa y cortarla en pedazos finos, poner en ebullición durante 30 minutos, filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior, añadir el agar y la glucosa, disolver por calentamiento. Esterilizar a 120° C durante 15 minutos.