



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LEVADURAS ASOCIADAS A CATÉTERES EN PACIENTES
HOSPITALIZADOS Y SU PATRÓN DE SENSIBILIDAD A LOS
ANTIFÚNGICOS”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CAROLINA PÉREZ ALLENDE PÉREZ



MÉXICO, D.F. CIUDAD UNIVERSITARIA 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JOSÉ ALEXANDRO BONIFAZ TRUJILLO
VOCAL: ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHAVEZ
SECRETARIO: ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO
1er. SUPLENTE: MISAEEL GONZÁLEZ IBARRA
2° SUPLENTE: RUTH EDITH MARTIN FUENTES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México

Institución que colaboró: Hospital General "Dr. Darío Fernández Fierro del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

ASESOR DEL TEMA

ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

SUSTENTANTE

CAROLINA PÉREZ ALENDE PÉREZ

INDICE

1. Antecedentes	6
1.1 Historia de las levaduras	6
1.2 Agentes etiológicos	9
1.2.1 Clasificación taxonómica	10
1.2.2 Morfología	10
1.2.3 Factores de virulencia	15
1.2.3.1 Adhesinas	15
1.2.3.2 Dimorfismo	17
1.2.3.3 Secreción de enzimas	18
1.2.3.4 Fosfolipasas	18
1.2.3.5 Lipasas	19
1.2.3.6 Características de biopelículas	20
1.2.3.6.1 Interacción de bacterias y levaduras	22
1.2.3.6.2 Velocidad de crecimiento de bacterias y levaduras	24
1.3.1 Colonización por levaduras	24
1.3.1.1 Colonización del catéter venoso central y formación de biopelículas	26
1.3.1.2 Métodos para determinar la colonización	28
1.4 Factores de riesgo y enfermedades asociadas	30
1.5 Manifestaciones clínicas de las infecciones sistémicas	30
1.6 Estudios epidemiológicos de colonización e infección	31
1.7 Antifúngicos	34
1.7.1 Mecanismos de acción	34
1.7.2 Sensibilidad antifúngica	35
1.7.3 Mecanismos de resistencia	36
1.7.4 Biopelículas y resistencia a los antifúngicos	38
2. Planteamiento del problema	40
3. Objetivos generales	41
3.1 Objetivos particulares	41
4. Materiales y métodos	42

4.1 Dispositivos médicos	42
4.2.1 Tratamiento de las muestras y técnica de cultivo del catéter	42
4.2.1.1 Procesamiento de los catéteres en el laboratorio de microbiología	42
4.2.1.2 Procesamiento en el laboratorio micología de la Facultad de Medicina, UNAM	43
4.3 Identificación de los aislados levaduriformes	44
4.3.1 Pruebas morfológicas y fisiológicas	44
4.4.1 Metodología para evaluar la sensibilidad a los antifúngicos	47
4.4.2 Preparación de soluciones madre de los antifúngicos	48
4.4.2.3 Preparación del inóculo	50
4.5.1 Pruebas estadísticas	51
5. Resultados	53
6. Discusión	68
7. Conclusiones	77
Perspectivas	78
Abreviaturas	79
Anexos Medios de cultivo y tinciones	81
Bibliografía	87

1. ANTECEDENTES

1.1 Historia de las levaduras

Durante años las levaduras han formado parte de la vida del hombre, desde la fermentación de diversas bebidas alcohólicas, en la preparación del pan, hasta ser causantes de enfermedades. Se tiene evidencia de las primeras descripciones de manifestaciones clínicas a partir de enfermedades causadas por levaduras, realizadas por uno de los célebres médicos griegos de la antigüedad, Hipócrates (430-350 A.C.), el cual describió la presencia de lesiones semejantes a aftas, también en 1300-200 A.C. Galeno las observó en niños debilitados. En el Siglo XVIII, en Francia se le denominó “muguet”, actualmente se conoce como candidosis oral o bucal, infección que afecta las mucosas de la boca^{6, 10}.

Las primeras investigaciones sobre levaduras se realizaron a finales del Siglo XVIII y principios del siglo XIX por Frenchman, AL Lavoisier (1789) al estudiar la fermentación alcohólica, estimó la proporción de los elementos para la conversión del azúcar en dióxido de carbono y alcohol, considerando como elementos principales: azúcar, agua y levadura seca. En 1803 LJ Thenard postuló que el sedimento de la levadura producía todos los líquidos fermentables. JJ Collin, concluyó que las levaduras se formaban durante la fermentación y en ausencia de oxígeno. En 1827 Desmazières examinó mediante el microscopio los organismos presentes en la cerveza y publicó los dibujos nombrando a los microorganismos: *Mycoderma cervisiae* y los del vino *Mycoderma vini*⁹ La palabra levadura literalmente significa “resultado de elevar”, ya que proviene de la palabra en latín *levare* que significa elevar y el sufijo *ura* resultado.

En 1836 Cagniard-Latour, describió la morfología de las levaduras, cuya dimensión fue de 7 µm de diámetro, semejante a “glóbulos sin movilidad”, y las cicatrices de los brotes que correspondían a las marcas ovales, por la separación de un glóbulo de otro, a medida que crecen dejan una cicatriz o “marca de ombligo”, donde las nuevas células provienen de la levadura “madre” (1837). En 1950 estos hallazgos fueron redescubiertos por Barton en

Saccharomyces cerevisiae; finalmente Swchann describió el mismo fenómeno, señalando una ruptura de la membrana⁹.

En 1839 Swchann fue el primero en observar las ascosporas en las levaduras y 18 años más tarde Miles Berkeley las ubicó en *Ascomycetes*; y es Max Reess quien designa a *Saccharomyces* como un ascomiceto⁸.

Entre 1839 y 1844 Fredrick Berg, David Gruby y John Bennet encontraron que los hongos eran los causantes de la infección bucal en recién nacidos; Berg en 1841 observó que la causa de candidosis bucal era producida por las hifas, las cuales se extendían entre las células epiteliales¹⁰. En 1853 Charles Robin aisló a *Candida albicans* la cual nombró *Oidium albicans*, a partir de un caso de candidosis bucal (Fig.1). En 1870 Max Reess publicó sus dibujos donde se observan pseudohifas de *Candida vini*¹⁰.

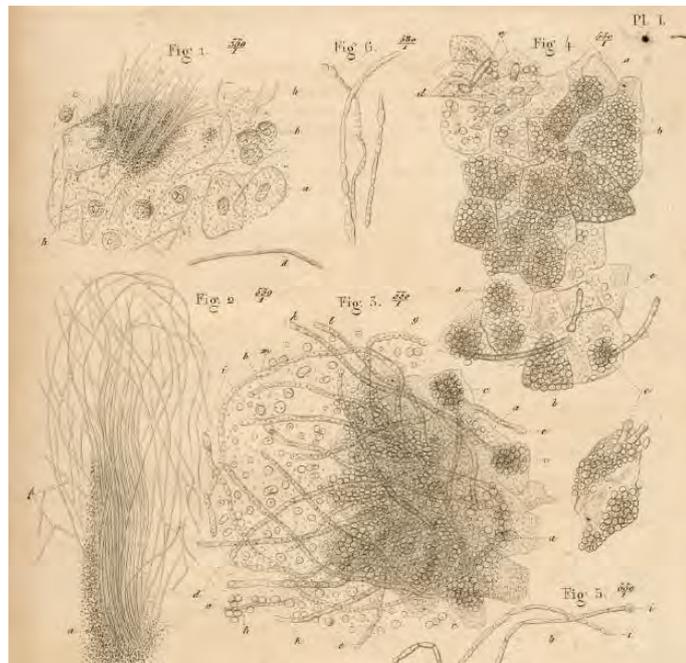


Figura 1. Primeras ilustraciones de *Oidium albicans* en células epiteliales descritas por Charles Robin¹⁰.

En 1864, Burchardt publicó sus observaciones microscópicas, del espécimen obtenido de pacientes con candidosis bucal; estudió el crecimiento del hongo sobre las células epiteliales, cuya evidencia fue la formación de hifas ramificadas con septos, las cuales crecían a partir de los brotes de la célula madre, otras células solo se alargaban sin desprenderse formando la estructura

denominada pseudohifa. En 1869 J. Parrot, describió diversas infecciones por *Candida oidium*: orofaríngea, esofágica, gástrica, intestinal, traqueal y pulmonar. En 1877 P. Grawitz cultivó los hongos a partir de muestras bilógicas obtenidas de pacientes con candidosis, encontrando cambios morfológicos en las levaduras, como la formación de hifas en un medio ácido. Tanto Burchardt como Reess detectaron el dimorfismo de *C. albicans*, por la capacidad de formación de hifas invadiendo las células epiteliales del hospedero^{8, 10}.

Otros autores mediante dibujos describieron las estructuras formadas por *Candida*, entre ellos está Grawitz en 1877, Hugo Plaut y Robert Koch en 1881 quienes mostraron estructuras redondas, desarrolladas a partir de las hifas, al germinar dieron origen a nuevas hifas. Roux y Linossier en 1890, y Paul Vuillemin en 1899, describieron estructuras de doble pared, gruesas, parecidas a una “espora”, a las cuales denominaron clamidosporas, término conocido actualmente como clamidoconidios (Fig.2)⁸.

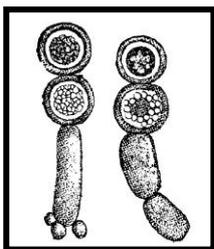


Figura 2. Dibujo de dos clamidoconidios, de *Candida (Oidium) albicans*, publicado por Roux y Linossier en 1890 (Tomada de Barnett, JA, 2004)⁸.

En 1880 Hansen desarrolló técnicas para obtener cultivos monocelulares de levaduras, contribución importante para el desarrollo en la clasificación taxonómica⁸.

Otra de las descripciones interesantes es la modificación en los nombres binomiales que recibió el género *Candida*. En 1890 Wilhelm Zopf cambió el nombre de *Oidium albicans* a *Monilia albicans*, nombre utilizado durante 33 años¹⁰. Tres años después Lindner reportó que las levaduras además de reproducirse mediante brotes también lo hacen por fisión. Finalmente en 1894 las ascas fueron reconocidas como parte del ciclo teleomorfo de las levaduras⁸.

En 1923 Christine Berkhout estudió el género *Candida*, a partir de entonces se menciona el nombre sistemático para *Candida albicans*. En 1937 D. Martin y cols realizaron estudios para diferenciar las especies de *Candida*, consideraron el crecimiento en agar dextrosa Sabouraud, agar sangre, agar harina de maíz, pruebas fisiológicas y serológicas; R. Benham en 1930 clasificó

a las especies y las pruebas de patogenicidad en conejos. En 1939, por un acuerdo del Tercer Congreso Internacional de Microbiología se adoptó el nombre del género *Candida* y se realizó una reclasificación, donde aparecen: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*^{10, 74}.

En 1952 Jacomina Lodder y Nelly Kreger-Van Rij publicaron el primer gran trabajo de taxonomía de todas las levaduras, hicieron referencia a la identificación de *C. albicans* de otras especies aisladas (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. tropicalis*) por aspectos morfológicos de las células levaduriformes, la presencia de hifas o pseudohifas y el uso de varios substratos para pruebas bioquímicas de acuerdo con la propuesta por Wickerham sobre medios químicamente definidos¹⁰.

1.2 Agentes etiológicos

La microbiota está conformada por diversos microorganismos comensales localizados en diferentes zonas anatómicas del humano en estado sano, habitan en la superficie externa como la piel y en la superficie interna de orificios naturales, nariz, boca, tracto respiratorio y genitourinario. Estas áreas son principalmente colonizadas por bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp, *Micrococcus* spp.); bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y diversas especies de levaduras principalmente las del género *Candida*^{15, 80, 116}.

Existen más de 200 especies conocidas de *Candida*, alrededor de 19 se han reportado como causantes de enfermedad, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. utilis*, *C. zeylanoides*, *C. famata*, *C. rugosa*, *C. lambica*, *C. pelliculosa*, *C. haemuloni*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua* y *C. boidinii*^{17, 40, 44, 50, 70, 122}.

Las diversas especies de *Candida* son comensales en diferentes regiones anatómicas del humano, en la cavidad bucal: *C. albicans* (75%), *C. tropicalis* (8%) y *C. krusei* (6%); de tubo digestivo *C. albicans* (50%); en mucosa vaginal *C. albicans* en el 2% a 68 %, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* en el 75%; la mayoría de las especies se encuentra en la piel.^{6, 15, 50, 107}

1.2.1 Clasificación taxonómica

Los seres vivos se pueden clasificar con base en lo propuesto por Kendrick, B. en 2002, el cual consideró las características de los organismos como: morfología, inmunología y estudios fisiológicos, así como las técnicas de biología molecular, los intentos de clasificación molecular hasta la fecha son confusos, para tal fin emplean diversas técnicas para la construcción de árboles filogenéticos⁶⁸.

Para los fines de este trabajo únicamente se describirá la ubicación taxonómica de *Candida*, descrita por Merz WG y Hay RJ (Tabla 1)⁷⁸.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Candida*

Reino	<i>Eumycota</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Candidaceae</i> ¹ <i>Endomycetaceae</i> ² <i>Saccharomycetaceae</i> ³
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>C. albicans</i> ¹ <i>C. parapsilosis</i> ¹ <i>C. glabrata</i> ¹ <i>C. krusei</i> ³ <i>C. tropicalis</i> ¹ <i>C. guilliermondii</i> ² <i>C. dubliniensis</i> ¹ <i>C. famata</i> ²

1.2.2 Morfología

La macromorfología del género *Candida* involucra las características de las colonias en los medios de cultivo de rutina, el más utilizado es agar dextrosa Sabouraud (ADS), generalmente el color va de blanco al amarillo, dependiendo de la especie; la textura puede ser lisa, brillante, cremosa, húmeda o seca, rugosa; de bordes bien definidos (Fig. 3). La micromorfología del género *Candida* comprende la forma (polimorfa) que pueden presentar cuatro tipos de células: a) células ovales, redondas, cilíndricas, cortas o largas; b) pseudohifas;

c) hifas y d) clamidoconidios; el tamaño de las levaduras es de 3-7 μm (Fig.4)^{10,15}.



Figura 3. Colonias de *Candida* spp. crecidas en ADS cremosas, blancas, de superficie lisa, rugosa, convexa y plana.

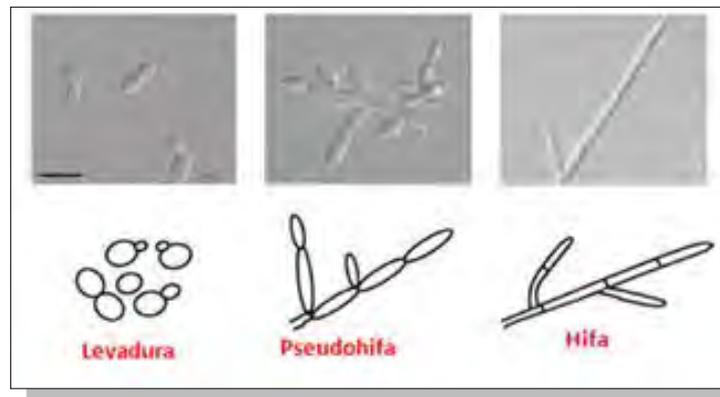


Figura 4. Micromorfología de *Candida* spp. Imágenes visualizadas con el microscopio DIC (10 μm) y representación esquemática (Tomada de Barnett JA, 2004)⁸

Las levaduras del género *Candida* se reproducen de forma asexual, mediante blastoconidios, el proceso se conoce como blastogénesis o gemación, se da por mitosis. Algunas especies pueden reproducirse sexualmente mediante ascosporas por meiosis. En la tabla 2 se describen las características morfológicas de las especies estudiadas en este trabajo.

Tabla 2. Características morfológicas de las especies de *Candida* spp.

Especie	Tamaño de levadura (µm)	Tipos de células	Colonias en ADS
<i>C. albicans</i> ⁷⁴	4 - 6 µm	Blastoconidios, hifas, pseudohifas, clamidoconidios únicas terminales	Convexas, brillosas, húmedas suaves, color crema
<i>C. dubliniensis</i> ⁷⁴	4 - 6 µm	Blastoconidios, hifas, pseudohifas, clamidoconidios dobles o triples	Convexas, brillosas, húmedas suaves, color crema
<i>C. glabrata</i> ^{36, 112}	1- 4 µm	Solo cúmulos de blastoconidios ovoides	Convexas, brillosas, suaves, color crema
<i>C. parapsilosis</i> ¹¹²	2.5 - 9 µm	Pseudohifas alargadas y curvas en la periferia	Convexas, lisas o rugosas, concéntricas cremosas, color blanco
<i>C. tropicalis</i> ¹¹²	4 - 8 µm	Blastoconidios ovoides, pseudohifas e hifas	Convexas, lisas, brillosas u opacas rodeadas por un halo filamentoso, color crema
<i>C. krusei</i> ^{18,103}	4-15 µm	Blastoconidios cilíndricos, alargados en forma de "granos de arroz", pseudohifas en arborización	Planas, rugosas, opacas, color crema
<i>C. guilliermondii</i> ⁹⁵	3- 5 µm	Blastoconidios pequeños ovoides, pseudohifas cortas	Convexas, brillosas, suaves, color crema
<i>C. famata</i> ¹¹²	2-5 µm	Blastoconidios ovoides	Convexas, brillosas, suaves, color crema

A. Blastoconidios. La formación de blastoconidios o gemación inicia por mitosis, con el establecimiento de un septo o tabique en la levadura, la nueva célula (brote o yema) empieza a formarse a partir del ensanchamiento de la pared celular de la célula “madre”, se replica el DN (fase S , el núcleo migra hacia la formación de la nueva gema (fase G₂) y se divide (fase M), además en esta última fase se separa la célula hija de la célula madre, al emerger la nueva célula deja una protuberancia o cicatriz en la célula madre (fase G₁), iniciándose nuevamente el ciclo. (Fig. 5), también puede ser por bipartición, al centro del blastoconidio, se forma un tabique transversal, se da la división y separación de ambos núcleos, generando dos blastoconidios^{11, 13,15}.

La reproducción teleomorfa se da mediante fecundación o fertilización, involucra tres fases, en la plasmogamia dos blastoconidios se acercan y unen sus núcleos en las zonas apicales de acoplamiento, después se da la cariogamia, los núcleos se fusionan y los cromosomas se acoplan, finalmente se da la meiosis, separándose los cromosomas para formar las ascosporas^{15, 18}.

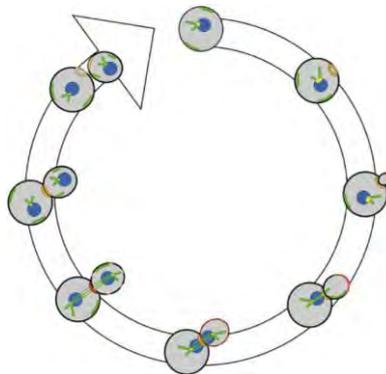


Figura 5. Blastogénesis. Formación de blastoconidios (Tomada de Berman, J, 2006)¹³.

B.- Pseudohifas. El ciclo inicia por la formación de un septo en la célula levaduriforme madre, a partir de ahí emerge la nueva célula levaduriforme mediante mitosis, las nuevas células pasan más tiempo en fase G₂, originando un alargamiento de los brotes, donde adquieren un tamaño similar a la célula madre, las células no se separan completamente después del septo, es decir, en las pseudohifas todas las células en el filamento siguen el ciclo con un patrón unipolar de gemación, el nuevo brote crece a partir del polo opuesto de

formación de la cicatriz, resultando una estructura altamente ramificada, en cadena^{13,115}.

C.- Hifas. La formación de hifa inicia antes de la transición de la fase G₁/S, empieza con el desarrollo del tubo germinativo a partir de la célula levaduriforme, se forma el septo dentro del tubo germinativo, la ramificación ocurre antes del septo, se da el proceso de mitosis en el tubo, el núcleo migra de la célula madre al tubo germinativo y se divide en el tubo, aumenta la masa citoplasmática alargándose la hifa de forma apical; la hifa y el tubo no presentan constricciones (Fig. 6)^{13,115}.

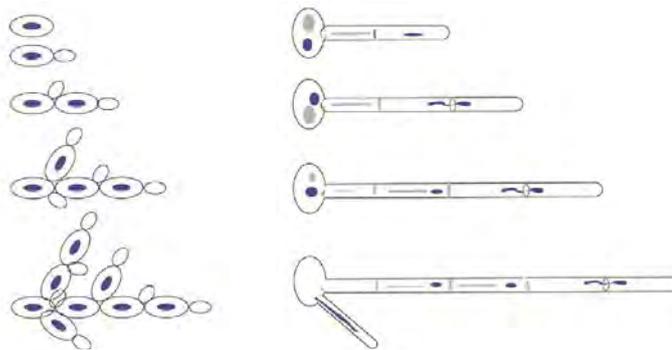


Figura 6. Formación de pseudohifas y de hifas (Tomada de Sudbery, P)¹¹⁵

D. Clamidoconidios. El desarrollo inicia con la transición de la célula levaduriforme a célula filamentosa, esta condición es dependiente de la temperatura (23 a 30 °C), estudios realizados por Martin y cols⁷⁴ demuestran que la producción de clamidoconidios es independiente del desarrollo de las hifas, posteriormente se forma el cuerpo suspensor sobre la hifa, crece hasta alcanzar un diámetro entre 10 y 12 μm . El clamidoconidio se desarrolla en el ápice del cuerpo, la división del núcleo se da en el cuerpo suspensor, quedando un núcleo en la célula del cuerpo suspensor y el otro en el clamidoconidio inmaduro; al madurar se forma un septo entre el clamidoconidio y el cuerpo suspensor, finalmente madura presentando tres capas gruesas de la pared celular, la capa externa compuesta principalmente de β -1,3-D-glucano y en menor proporción por quitina, en cambio la pared interna está compuesta por proteínas (Fig. 7)^{10, 74,114}.

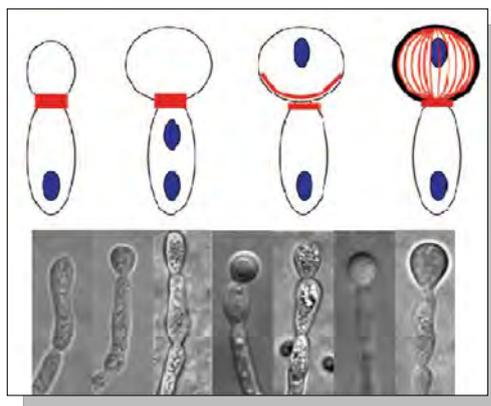


Figura 7. Modelo de la formación del clamidoconidio (Tomada de Martin SW, 2005) ⁷⁴.

1.2.3 Factores de virulencia

Las especies de *Candida* expresan una serie de factores que contribuyen en la patogenicidad y conducen al establecimiento de la infección en el hospedero inmunocomprometido, diversos trabajos indican que los factores de virulencia (dimorfismo, expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, tigmotropismo, formación de biopelículas y la secreción de enzimas proteolíticas) involucran cambios fenotípicos. Además es importante considerar que *Candida* spp, se adapta rápidamente a los cambios de pH del microambiente; presenta flexibilidad metabólica, sistemas potentes de adquisición de nutrientes y mecanismos de respuesta al estrés ^{58,76, 81,118, 119}.

Candida albicans es la especie utilizada como modelo para el estudio de los factores de virulencia debido a que es la más patogénica ⁸¹. Los factores que se mencionan a continuación están principalmente relacionados a *C. albicans*.

1.2.3.1 Adhesinas

La adhesión es un requisito para iniciar la colonización y el desarrollo de la infección; esta se da por el contacto entre la pared celular del hongo con la superficie de las células epiteliales (CE) en las mucosas. La adherencia inicia en la fase de levadura, durante la transición de levadura a hifa se secretan proteínas llamadas adhesinas, las cuales son fundamentales para la adherencia en superficies abióticas (dispositivos médicos) y en las bióticas (células del hospedero) (Fig.8).

Las adhesinas son:

- **HWP1** (“Hyphal-Specific Cell Wall Protein”). Es una proteína relacionada a *C. albicans*, el GPI (glicosilfosfatidilinositol), se expresa en la pared celular de la hifa, este actúa como sustrato de las enzimas Transglutaminasas del epitelio, el dominio N-terminal y C-terminal le confieren una unión covalente generando un complejo estable con las CE. Esta adhesina está involucrada en la formación de biopelículas^{76, 81}.
- **ALS** (“Agglutinin-Like Sequence”). Esta familia de genes codifican para las proteínas que se encuentran presentes en la pared celular, son ocho glicoproteínas (**ALS1-ALS-7 y ALS-9**), actúan como adhesinas, presentes en *C.albicans*; proteínas homólogas en *C.glabrata* **Epa** (“Epithelial Adhesin” son el dominio N-terminal de las proteínas ALS, contiene una secuencia señal, similar a las inmunoglobulinas, donde el dominio rico en treonina, está implicado en el reconocimiento célula-célula, que contribuye a la unión con las proteínas de la matriz extracelular, ejemplo **ALS1-ALS5** que se unen a fibronectina, laminina y colágeno tipo IV, a células epiteliales de boca y faringe y a las células del endotelio vascular. **ALS4** está involucrado en la adherencia de células endoteliales, **ALS6** específicamente se une a colágeno y **ALS9** a laminina. Se ha encontrado que **ALS3** (también Ssa1) es una invasina, es decir, como ligando de la E-caderina presente en CE y la N-caderina en células endoteliales, para desencadenar la endocitosis. Además **ALS** actúa como un receptor de ferritina para el hospedero facilitando la adquisición de hierro y participa en la formación de biopelículas^{76, 81,119}.
- **INT1P** (“Integrin found 1st protein” . Es una proteína presente en *C. albicans* que participa de forma similar a la adhesión de los leucocitos en vertebrados. La proteína Int1p presenta una estructura semejante a la Integrina β de células epiteliales, la cual facilita la unión de fibronectina con el colágeno y a su vez la unión entre células permitiendo la formación de tejido. Las levaduras se unen a proteínas de la matriz extracelular e inducen cambios morfológicos de levadura a hifa. Al ocurrir una delección en

el gen que codifica para esta proteína ocasiona una disminución del 40% de adhesión^{18, 64}.

- **MNT1, PMT1, PMT6** (“ α -1,2 mannosyltransferase, O-glycosylation mannosyltransferase”). Estos genes están involucrados en la síntesis de manana, el mayor constituyente de la pared celular de *Candida* spp. y se relacionan con el reconocimiento por parte del hospedero^{20, 64}.

1.2.3.2 Dimorfismo

Es la capacidad presente en algunas especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*) para desarrollar más de una forma morfológica: células ovoides, hifas o pseudohifas. La fase de levadura participa principalmente en la diseminación durante la colonización y extensión de la enfermedad; mientras que la fase de hifa inicia con el contacto físico con las CE, la forma filamentosa es considerada más dañina que la forma levaduriforme puesto que participa en la etapa de invasión como patógeno e induce un mecanismo de endocitosis formando pseudópodos, para evadir las células de la respuesta inmune del hospedero, este mecanismo involucra la internalización en CE, obtienen el acceso mediante los endosomas, como las vacuolas, de las células del hospedero, se internalizan en ellas, lo cual permite que *Candida* spp. pueda sobrevivir durante largos períodos, hasta que la hifa penetre e invada otras CE. Otro mecanismo de invasión es ejerciendo una presión mecánica en medio o a través de las CE vecinas, como consecuencia el tejido puede sufrir daño tisular (necrosis o apoptosis) (Fig.8)^{76,118}.

Diversos estudios demuestran que el cambio de pseudohifa a hifa se da con una expresión alta del gen UME-6, las pseudohifas están involucradas en la captación de nutrientes y promueven la movilidad en el ambiente del hospedero¹¹⁸. Los genes principalmente relacionados en la formación de las hifas son HG 1 (“hypha specific G1 cyclin”, EFG1 (“positive regulator of filamentous growth”, CPH1 (“*Candida albicans* Ste12-like transcription factor), TUP1 (“transcriptional repressor of filamentous growth”), INT1P, RFG1p (“regulator of filamentous growth and virulence”) en condiciones de 37°C a pH >7, en presencia de suero, o con N-acetilglucosamina y 5% de CO₂^{115, 119}. El

dimorfismo se encuentra regulado por “quorum sensing”, un mecanismo de comunicación microbiana, las moléculas implicadas son el farnesol, tirosol y dodecanol. Finalmente, la formación de la hifa se ve favorecida por una baja densidad celular ($<10^7$)⁷⁶.

1.2.3.3 Secreción de Enzimas

Proteasas. Diversas especies como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* y *C. guilliermondii* activan la secreción de proteasas que se conocen como: SAP's (“secretory aspartyl proteinase” , estas pertenecen a la Familia aspartil proteinasas, están codificadas para diez genes SAP (SAP1-SAP10) existen diferencias temporales y espaciales en la expresión de los genes SAP, dependiendo del tipo de célula y del pH.

- **SAP1 a SAP3** se expresan en levaduras e hifas, son las principales proteasas expresadas durante las infecciones superficiales, es decir, durante la invasión temprana. SAP2 se expresa a un pH de 4 y SAP3 a un pH de 2. Algunas de las funciones de SAP2 consisten en degradar proteínas (albúmina, hemoglobina, queratina, colágeno, fibronectina, mucina e Ig A de secreción) del hospedero, también a los precursores de la cascada de la coagulación sanguínea que hidrolizan al precursor del endotelio-1 (péptido vasoconstrictor), al alterar la homeostasia vascular ^{64, 119}.
- **SAP4 a SAP6** se expresan principalmente en las hifas y son activas a un pH de 5 a 7. La expresión de SAP5 es responsable de la degradación de E-caderina, presente entre las uniones de CE en alta concentración, como consecuencia existe una alteración en la integridad de la mucosa del epitelio, lo que permite la penetración de las hifas entre las CE y SAP6 se expresa en el crecimiento extenso de la hifa ^{64, 81, 119}.
- **SAP7 a SAP10**, SAP8 contribuye en la penetración y se regula por la temperatura; SAP 9 se expresa principalmente en las fases posteriores al crecimiento de la levadura.

1.2.3.4 Fosfolipasas. La actividad de los fosfolípidos se incrementa cuando existe un contacto directo de la hifa con las superficies, la hifa de *Candida* spp.

secreta enzimas hidrolíticas (Fosfolipasa A, B, C y D) capaces de romper los enlaces éster de los glicerofosfolípidos de la membrana celular de las células del hospedero. Sólo la Fosfolipasa B1 es imprescindible como factor de virulencia; ésta es una glicoproteína que tiene actividad de hidrolasa y lisofosfolipasatransacilasa, se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos^{64, 119}.

1.2.3.5 Lipasas. Las lipasas secretadas son codificadas por una familia de genes (LIP1-LIP10), hidrolizan enlaces éster de mono, di y triacilgliceroles, se ha demostrado que la expresión de los genes depende del estado de la infección²⁰.

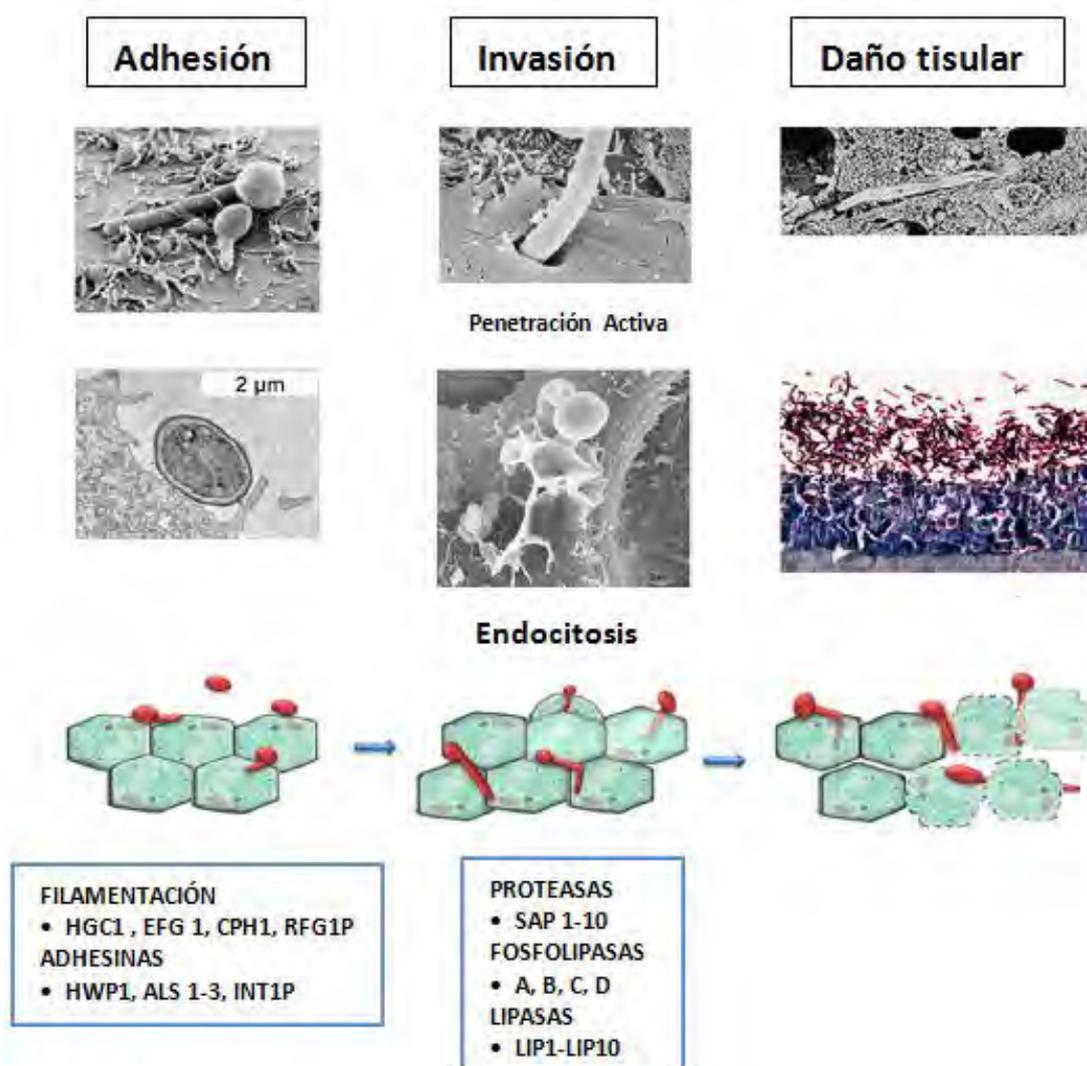


Figura 8. Modelo de infección de *Candida* spp. adhesión, invasión y daño en el tejido (Tomada de Naglik JR, 2011)⁸¹

1.2.3.6 Características de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que colonizan cualquier superficie viva o inerte, embebida en una matriz de polisacáridos; estas sustancias unen las diversas capas de microorganismos, para lograr la adhesión a las superficies y así ser capaces de evadir la respuesta inmune y resistir el tratamiento con antibióticos^{4, 14, 18,45}. La naturaleza química de la superficie de contacto puede ser el tejido del hospedero o dispositivos médicos.

Recientes estudios sugieren que la mayor frecuencia de infecciones adquiridas en los hospitales se debe a las biopelículas formadas principalmente por bacterias y hongos oportunistas como *C. albicans*, asociada a dispositivos médicos⁴. Las biopelículas de *C. albicans* forman una matriz extracelular muy densa, mientras que la de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* es más delgada²⁵. Aparentemente en la región extraluminal del catéter se adhiere una densa capa de levaduras, rodeada por una capa gruesa de material extracelular, con menor número de hifas y/o pseudohifas; en cambio en la superficie intraluminal, se ha descrito que es fácil discernir las formas y el número de los integrantes que forman la biopelícula⁴.

La formación de la biopelícula involucra tres etapas principalmente:

- Etapa temprana (De 0 a 11 h). Inicia con la adherencia y la colonización de las células levaduriformes a la superficie, la unión célula-célula permite formar capas en la biopelícula con diferencias morfológicas en la biomasa, los cationes divalentes como: Ca^{2+} y Mg^{2+} promueven la adherencia a las superficies inertes (Fig.9)^{20,25}.
- Etapa intermedia (De 12 a 30 h). El desarrollo de la biopelícula, se caracteriza por la agregación homogénea de células agrupadas en microcolonias, ordenadas en una superficie. En la matriz extracelular se presenta dimorfismo (excepto en *C. glabrata*) caracterizada por la formación de pseudohifas e hifas, siendo un factor importante en las biopelículas. Los genes expresados en esta fase y asociados a la formación de la hifa son TEC 1 ("Transcription of the hyphal regulator" que regula la expresión de BCR1 ("Candida albicans biofilm regulator"), lo que da lugar a la expresión de moléculas de adhesión presentes en la pared celular (EPA (epitelial adhesin en *C. glabrata*), CPAG ("supposed to be a member of ALS gene family in *C.*

parapsilosis”, HWP1, ALS1 y ALS3 de *C. albicans*) y responsables de mantener el contacto entre las células del hospedero y *Candida* spp. o *Candida* y el dispositivo médico (Fig.9)^{14, 25,75}.

- Etapas de Maduración (De 38 a 72 h). Aumento del material polisacárido en la matriz con una estructura tridimensional la cual está formada de levaduras, hifas y pseudohifas⁵⁶. La matriz extracelular protege a la levadura de las células fagocíticas del hospedero, y mantiene la integridad de la biopelícula y se asocia a la resistencia frente a los antifúngicos (Fig. 9)^{14,20}.
- Etapas de Dispersión. La matriz madura secreta farnesol, una molécula involucrada en el “quorum sensing” que inhibe la germinación de nuevas levaduras, inhibe la formación de hifas, y promueve a ciertas células para que se separen de la biopelícula y se generen nuevos sitios para colonizar (Fig. 9)²⁰.

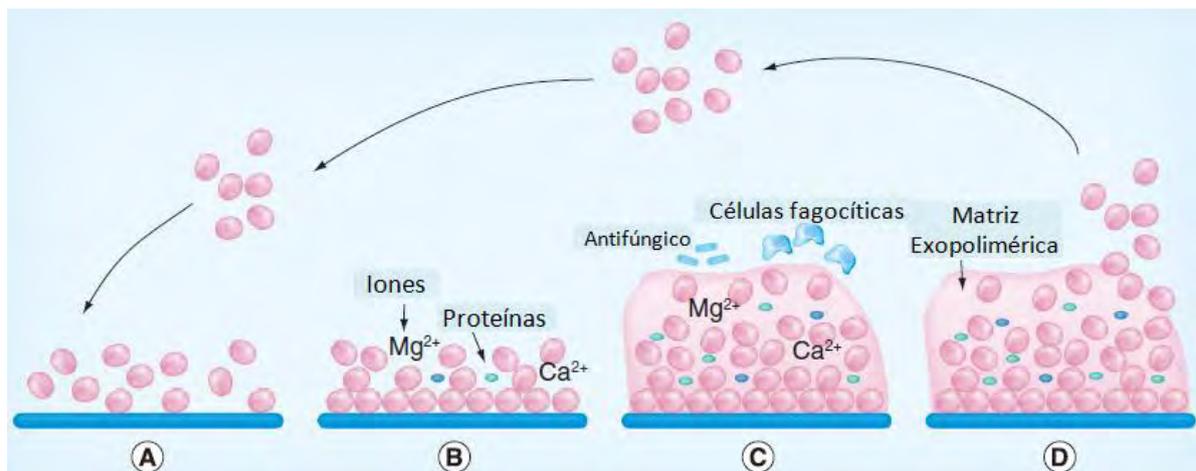


Figura 9. Etapas de la formación de biopelículas en dispositivos médicos. A. Adherencia. B. Desarrollo de la matriz. C. Maduración de la biopelícula. D. Dispersión y colonización a otras superficies (Tomada de Cuéllar-Cruz, M., 2012)²⁵.

La formación de biopelículas se ve favorecida en superficies hidrófobas, en medios ricos en glucosa; estas condiciones se observan en los catéteres urinarios colocados en los pacientes hospitalizados. Particularmente en los pacientes que presentan infecciones por *C. parapsilosis*, en pacientes que reciben nutrición parenteral^{25, 30, 56, 105}.

Diversos trabajos mencionan la relación de las infecciones por *Candida* spp. con el uso de catéteres debido a la formación de biopelículas, causando

infecciones sistémicas. El tratamiento incluye remover el dispositivo y la administración prolongada de antimicrobianos; este hecho ocasiona un importante problema clínico y económico (Tabla 3)⁷⁵.

Tabla 3. Evaluación de criterios para el estudio de biopelículas en *Candida* spp.

Autor	Año	País	Estudios en biopelículas	Antifúngicos
Kuhn DM y cols ⁵⁷	2002	Estados Unidos	Sensibilidad de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> a fluconazol en la formación de la biopelícula en superficies de dispositivos	Fluconazol
Douglas J y cols ³⁰	2006	Gran Bretaña	Papel de la matriz de la biopelícula en la resistencia de <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i> a los antifúngicos	Anfotericina B Fluconazol
Jain N y cols ⁵²	2007	Estados Unidos	Sensibilidad de <i>Candida</i> spp. a los antifúngicos a partir de la biopelícula de aislados con candiduria	Anfotericina B Fluconazol Caspofungina
Ramage G y cols ⁹⁸	2012	Gran Bretaña	Resistencia de biopelículas en hongos	Polienos y Azoles
Nweze E y cols ⁸⁴	2012	Estados Unidos	Sensibilidad de biopelículas de <i>Candida</i> spp. a diversos antifúngicos	Fluconazol Voriconazol Anidulafungina Itraconazol

1.2.3.6.1 Interacción de bacterias y levaduras

En la naturaleza coexisten las comunidades de microorganismos colonizando las superficies de las mucosas del humano, la mayoría de los estudios descritos en la literatura mundial se relacionan con la formación de biopelículas monomicrobianas de *Candida* spp.

Las biopelículas con interacciones polimicrobianas dependen del medio ambiente en el que se encuentran y de factores nutricionales, las cuales pueden presentar efecto benéfico sobre la población; un efecto neutro sobre otros; y del tipo antagónico, por la inhibición de un microorganismo debido a la producción de alguna sustancia tóxica^{99, 102}. Las biopelículas polimicrobianas clínicamente estudiadas son la interacción de diferentes especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) con diversas bacterias (*Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*)^{48, 51,117}. Estas interacciones se han detectado en los dispositivos médicos

(catéteres urinarios, catéteres venoso central, catéteres de diálisis peritoneal o hemodiálisis), aplicados a los pacientes hospitalizados y que cursan con procesos infecciosos¹¹⁷.

De las interacciones más estudiadas destacan:

- a) *C. albicans-Staphylococcus epidermidis*. Interacción comensal, donde las bacterias se adhieren a las formas filamentosas y levaduriformes del hongo, lo que resulta en una mayor adhesión de la biopelícula a las superficies².
- b) *C. albicans-Staphylococcus aureus*. Esta interacción puede tener un efecto comensal o efecto sinérgico con un incremento en la actividad metabólica y el desarrollo y la complejidad de la biopelícula⁵¹.
- c) *C. albicans-Pseudomonas aeruginosa*. Este es un ejemplo de interacción antagónica, donde la bacteria reside y forma una red densa sobre las estructuras fúngicas (hifas y levaduras), mientras que el hongo queda embebido en esta red y en una matriz gruesa de material exopolimérico, además la bacteria produce una molécula de señalización célula-célula (3-oxo-C12 homoserina lactona), lo cual da como resultado la muerte del hongo⁴⁸.
- d) *C. albicans-Escherichia coli*. La interacción entre los dos microorganismos en la biopelícula, es capaz de disminuir la sensibilidad de los antimicrobianos¹⁰².
- e) *Candida albicans- C. dubliniensis*. La interacción antagónica entre estas dos especies fenotípicamente semejantes es la de una inhibición competitiva, probablemente por los nutrientes y/o la generación de metabolitos tóxicos por alguna de las especies¹⁰².
- f) *C. albicans-C. krusei*. Las biopelículas presentan bajo número de hifas y levaduras, aparentemente se observa una inhibición competitiva por los nutrientes y por los sitios de adhesión. *C. krusei* libera sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *C. albicans* así como la capacidad de adhesión de cada una de las especies¹⁰².

1.2.3.6.2 Velocidad de crecimiento de bacterias y levaduras

El crecimiento microbiano depende de las condiciones ambientales, del inóculo inicial y de la composición del medio de cultivo que proporciona la fuente de carbono y nitrógeno. En un ambiente polimicrobiano de bacterias y levaduras, la competencia por la fuente de nutrientes es alta, es decir el crecimiento de los microorganismos se ve limitado por la deficiencia del sustrato. Con base a la teoría del quimiostato (medio de cultivo con alimentación y agitación continua), es decir “ menos que ocurran interacciones microbianas o un uso mixto de sustratos, una población microbiana única competirá por el sustrato y desplazará a todos los demás organismos¹². Cuando no se presenta este fenómeno el consumo del sustrato depende de la afinidad de los organismos por el sustrato y de las velocidades de crecimiento específicas del microorganismo. En la tabla 4 se muestra la velocidad de crecimiento de las levaduras y bacterias. Las levaduras no son capaces de competir de la misma forma con las bacterias que consumen rápidamente la glucosa.

Tabla 4. Velocidades de crecimiento para levaduras y bacterias

AUTOR	Microorganismo	Tiempo de generación (h)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)
Lindavist R ⁶⁵	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,47	1,47
Herendeen RA ⁴⁶	<i>Escherichia coli</i>	0,35	1,98
Gottenbos B ⁴²	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,66	1,05
Basson NJ ¹²	<i>Candida albicans</i>	3,51	0,197

1.3.1 Colonización por levaduras

La colonización es el grado mínimo de microorganismos que tienen la capacidad de establecerse y multiplicarse en el epitelio de las mucosas y piel del hospedero. La cantidad debe ser suficiente para mantener un número poblacional, sin que su presencia sea un estímulo para manifestaciones clínicas e inmunológicas⁷⁷.

La colonización se divide en unifocal y multifocal. La primera es cuando se aíslan los microorganismos de un área del cuerpo y en la segunda el aislamiento es simultáneo de varias áreas⁶⁰. La colonización multifocal es un

requisito para que un microorganismo genere el desarrollo de un proceso infeccioso, aunado al uso de catéteres intravasculares^{80, 97}.

Desde el punto de vista microbiológico y por las técnicas más utilizadas en los laboratorios clínicos de diversos hospitales, se define a la colonización del catéter como el crecimiento de más de 15 unidades formadoras de colonias (UFC) del microorganismo, a partir de un segmento de catéter. Maki y cols⁷¹ describieron un método semicuantitativo, muy utilizado en el laboratorio de microbiología, también denominado como técnica de rotación en placa. Otra definición de colonización es el crecimiento mayor a 1000 UFC, basada en el método cuantitativo por la técnica del vórtex propuesta por Brun-Buisson C y cols¹⁹ y por la técnica de sonicación de Sherertz RJ y cols¹⁰⁹.

Mundialmente, se ha descrito que aproximadamente el 65% de las infecciones sanguíneas están relacionadas con la aplicación de un catéter (ISRC). Éstas se originan a partir de la microbiota cutánea y el 30% por la manipulación de las conexiones⁶⁶. Los pacientes que presentan estas condiciones pueden desarrollar infecciones nosocomiales (locales o sistémicas), las cuales se producen a las 48 horas después del ingreso al hospital por complicaciones debidas a la presencia de agentes patógenos no presentes en la admisión¹²³. En las ISRC pueden estar implicados varios mecanismos: 1) contaminación del catéter en el momento de la inserción, debido a una insuficiente asepsia; 2) migración de los microorganismos de la piel a través de la superficie exterior del catéter o vía extraluminal; 3) contaminación de las conexiones del dispositivo o vía intraluminal; 4) infusión de líquidos contaminados y 5) colonización durante una bacteremia o candidemia originada en un foco séptico distante^{32, 66,89}.

En diversos trabajos se han descrito los microorganismos de los catéteres, tanto bacterias Gram positivas (Estafilocos coagulasa negativo (SCN) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* spp.) como bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp.) y levaduras (Especies de *Candida*)^{32 39, 55, 59, 66, 69,89, 121}. El aislamiento de *Candida* spp. de catéter venoso central (CVC) se ha incrementado como colonizador y agente causal de infección nosocomial, relacionado con la administración prolongada de

antibióticos de amplio espectro^{60,89}. De las especies de mayor importancia asociadas a ISRC destacan *C. albicans*, es la más común causante de candidemias, seguida por *C. glabrata*, la cual ha ido en aumento en pacientes tratados previamente con antifúngicos, por la disminución en su sensibilidad a diversos antifúngicos. En la tabla 5, se muestra la relación entre la especie de *Candida*, el factor de riesgo y el uso de CVC.

Tabla 5. Relación entre la especie de *Candida*, factor de riesgo y el uso de CVC^{83, 93}.

<i>Candida</i> spp.	Factor de riesgo
<i>C. parapsilosis</i>	Prematuros de peso bajo, neonatos, nutrición parenteral
<i>C. tropicalis</i>	Neutropénicos, con leucemia, diabetes mellitus descompensada
<i>C. krusei</i>	Terapia con antifúngicos, neoplasias, trasplante de médula ósea
<i>C. dubliniensis</i>	VIH, neoplasias hemáticas
<i>C. guilliermondii</i>	Cirugía

1.3.1.1 Colonización del catéter venoso central y formación de biopelículas

La colonización de CVC por microorganismos formadores de biopelículas depende de diversos factores: del hospedero, del medio ambiente y del tipo de microorganismo¹¹³. Estos factores tienen un impacto profundo en la transición de la formación de biopelículas atribuible a la colonización del catéter; este fenómeno, generalmente puede terminar en infecciones persistentes en sangre y resistencia a los antimicrobianos⁸⁶. Entre el 30% y el 35% de las infecciones nosocomiales están relacionadas con la aplicación de un catéter intravascular⁴⁹.

Las septicemias nosocomiales son el resultado de la colonización de CVC, principalmente, por los microorganismos formadores de biopelícula^{32,66} Raad y cols⁹⁷ reportaron que la colonización del CVC depende del tiempo y permanencia de éste. En los catéteres de corta duración (<14 días), el principal mecanismo patogénico es la vía extraluminal en el 70-90% de los casos, es

decir durante la inserción del mismo o después, por el contacto con los microorganismos de la piel, los cuales migran hacia la superficie externa del catéter. En los de larga duración (>14 días), especialmente los tunelizados, donde existe un mayor número de manipulaciones de las conexiones (Fig. 10). La vía de colonización más frecuente es la intraluminal (66%), por tanto se da la transferencia de los microorganismos de la piel del personal médico o del paciente a la superficie interna del catéter, seguida de la extraluminal (25%)⁸⁹. Otra vía de contaminación es a través de la administración intravenosa de las soluciones o fármacos contaminados³².

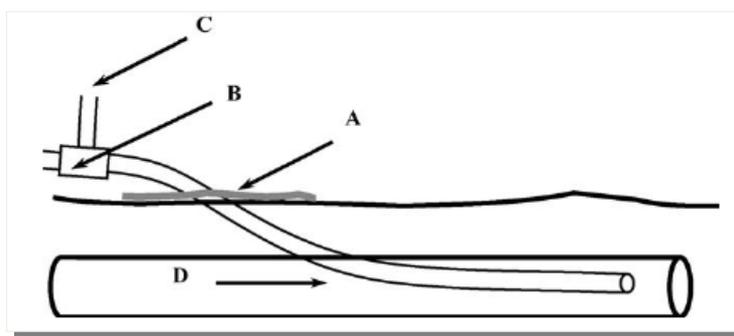


Figura 10. Vías de colonización en ISRC A) Extraluminal por interfase entre piel-catéter. B) Intraluminal por contaminación a través de la válvula. C) Contaminación intrínseca por transfusión de líquidos contaminados. D). Candidemia o bacteremia previa (Tomada de Brun-Buisson C, 1987)¹⁹.

Pittet D y cols⁹⁶, por un lado y Piarroux R y cols⁹⁴ por el otro demostraron que la intensidad de la colonización por *Candida* spp. está relacionada con el riesgo de sufrir candidemia. Además se conoce que un alto número de episodios de candidemia se originan de la colonización de catéteres⁹⁰.

En la tabla 6 se muestran los pocos trabajos descritos acerca de las infecciones sistémicas por hongos, donde destacan la relación de la colonización de CVC y catéter urinario como causa del proceso infeccioso. Por otro lado en la tabla 7 se trata específicamente la colonización de las especies de *Candida* relacionadas a catéteres.

Tabla 6. Colonización o infección fúngica en enfermos críticos

Autor	País	Tipo de dispositivo	Colonización por <i>Candida</i> spp.			Infección por <i>Candida</i> spp.		
			Total de Muestras	Aislados	%	Total de Muestras	Aislados	%
Olaechea, PM y cols, 2004. ⁸⁵	España	CVC	880	870	88.9	105	105	100
		CU	880	866	98.4	105	103	98
León C y cols, 2009. ⁶⁰	España	CVC	864	854	98.8	92	92	100
		CU	864	852	98.6	92	88	95.7
Manolaki y cols, 2010. ⁷²	Estados Unidos	CIV	137	48	35	0	0	0
Seddiki S y cols, 2013. ¹⁰⁸	Argelia	CVC y PVC	63	2	3,17	63	3	4.76

CVC (catéter venoso central), CU (catéter urinario), CIV (catéter intravenoso), PVC (catéter venoso periférico)

Tabla 7. Colonización de catéteres por diversas especies de *Candida* spp.

Autor	País	Total	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>		Otras	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Horn y cols, 2009. ⁴⁹	Estados Unidos	714	317	44.4	175	24,5	136	19	57	5	18	2.5	11	1.5
León y, cols, 2009. ⁶⁰	España	51	38	74.5	2	3.9	5	9.8	2	3.9	0	0	4	7.9
Seddiki, S y cols, 2013 ¹⁰⁸	Argelia	12	3	25	9	75	0	0	0	0	0	0	0	0

1.3.1.2 Métodos para determinar la colonización

El diagnóstico para determinar la colonización de un catéter es mediante técnicas microbiológicas.

- a) Cultivo semicuantitativo de la punta de catéter. Técnica propuesta por Maki y cols⁷¹ en 1977, se basa en cultivar el segmento extraluminal del catéter. La punta se rota de tres a cuatro veces sobre la superficie de una caja Petri conteniendo agar sangre; la interpretación para considerar colonización es el crecimiento de >15 UFC en la placa de agar. Esta técnica solo detecta microorganismos en la superficie externa del

catéter, a pesar de ese inconveniente, es la más utilizada, debido a su sencillez, rapidez y bajo costo.

b) Cultivo cuantitativo de la punta de catéter.

- Cleri y cols²³ en 1980 proponen la técnica que detecta microorganismos en la superficie externa e interna del catéter, consiste en introducir la punta en 2 mL de caldo nutritivo y lavar tres veces la luz del catéter con una jeringa, hacer diluciones y cuenta de las colonias en las placas de agar sangre. La interpretación de colonización se basa en los recuentos superiores a 1000 UFC.
- Brun-Buisson y cols¹⁹ en 1990, simplifican la técnica, introduciendo la punta del catéter en un tubo con 1mL de agua destilada estéril, se agita con un vórtex por un minuto y se siembran 0,1 mL de la suspensión en una placa de agar sangre. La interpretación del resultado es la misma que la técnica anterior.
- Sherertz y cols¹⁰⁹ en 1990, proponen una técnica que consiste en sonicar durante un minuto la punta de catéter sumergida en 10 mL de caldo tripticasa-soya, posteriormente se siembra 0,1 mL de caldo original y dos diluciones 1:10 y 1:100 en placa de agar sangre. El crecimiento de 100 UFC es considerado colonización.

Los métodos anteriormente descritos no distinguen entre una colonización de la superficie interna de la externa del catéter.

- c) Cultivo y tinción de sangre aspirada por el catéter. Rusforth y cols¹⁰⁰ en 1933 proponen aspirar una muestra de 50 mL de sangre a través del catéter, los eritrocitos se someten a lisis con solución salina hipotónica, los leucocitos se sedimentan por centrifugación, se prepara una capa rica mediante cito-centrifugación, se tiñen con naranja de acridina y se observan al microscopio de fluorescencia, es positiva si se observan bacterias. Esta técnica involucra mucho trabajo por parte del laboratorio de microbiología y es costosa.
- d) Cepillado intraluminal. Esta técnica se propuso en 1989, la cual consiste en introducir un pequeño cepillo montado sobre una guía metálica a la

punta del catéter y arrastrar la biocapa. El resultado se basa en la obtención de 5-10 UFC en sangre lo que indica infección¹²³. La técnica es cara, y es difícil disponer de cepillos de diversos tamaños para cada tipo de catéter.

1.4 Factores de riesgo y enfermedades asociadas

Los factores de riesgo aumentan la probabilidad de que las levaduras desarrollen invasión a los tejidos y el resultado final es desencadenar una infección. Las infecciones asociadas a levaduras oportunistas, en general son por comensales endógenas y se vuelven patógenas, dependiendo de las alteraciones en el sistema inmune y los factores de riesgo del hospedero, como la edad (prematuros y ancianos), enfermedades metabólicas (diabetes mellitus descompensadas), neoplasias, portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA); diversos procedimientos terapéuticos como diálisis peritoneal, hemodiálisis, cirugías, administración de antibióticos de amplio espectro y esteroides por tiempo prolongado^{6,27,107}. También las infecciones pueden ser exógenas, debido a intervenciones quirúrgicas, la aplicación de dispositivos médicos como catéteres (catéter venoso central, urinario, para diálisis peritoneal continua ambulatoria o intermitente (Tenckoff) y en hemodiálisis (Mahurkar), prótesis cardiacas y nutrición parenteral^{6, 39,107}.

1.5 Manifestaciones clínicas de las infecciones sistémicas

Los cuadros clínicos de infecciones nosocomiales causadas por bacterias y levaduras son muy similares, la expresión clínica es inespecífica, los signos y síntomas aparecen cuando la enfermedad lleva una evolución clínica prolongada.

Generalmente, los pacientes hospitalizados por infecciones sistémicas presentan fiebre $>38^{\circ}\text{C}$, hipotensión, oliguria y signos cutáneos, los cuales pueden ser eritema e induración alrededor del sitio de aplicación del catéter y exudado purulento en el sitio de entrada y/o salida del mismo. En los cultivos se detectan más de 1000 UFC/mL, aunque en ocasiones se observan episodios de septicemia sin evidencia del microorganismo en los hemocultivos^{19,102}. Algunos autores reportan que es posible diagnosticar una candidemia en

los pacientes que presentan signos y síntomas clínicos y hemocultivos negativos, ya que en algunas ocasiones es difícil diferenciar entre un hemocultivo positivo que corresponde a una infección verdadera o un hemocultivo contaminado que no requiere tratamiento¹⁰¹.

1.6 Estudios epidemiológicos de colonización e infección

El uso de catéteres es habitual en pacientes críticamente enfermos y se ha relacionado con las ISRC; estas representan alto costo por estancia y tratamientos hospitalarios y un incremento en la mortalidad del paciente^{31, 32, 59, 69,108}.

Mundialmente, la epidemiología de las ISRC es variable entre los países y las Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) y depende de la edad, tipo de catéter y tiempo de permanencia en el paciente y el número de manipulaciones diarias. De 2005 a 2011, en los Estados Unidos se reportaron diversos estudios, en los cuales se consideró que la incidencia de ISRC es de 2,7 episodios por cada 1000 días de catéter en adultos y de 3.3 episodios por cada 1000 días de catéter en pacientes pediátricos. En Gran Bretaña fue de 2.8/1000 días de catéter; en Argentina, Brasil e India la incidencia fue de 7.9 a 18.5/1000 días de catéter. En México se ha considerado de 3.29 / 1,000 días de catéter^{35, 39,55, 69}.

Otra consecuencia de la aplicación de catéteres que debe ser contemplada son los costos, los cuales se relacionan con una estancia prolongada en las UCI, reemplazo de catéteres, administración de fármacos y costos de los antimicrobianos. Los datos disponibles en la literatura indican un monto de \$30 000 a \$34 000 por episodio de ISRC en Estados Unidos⁵⁵; en Gran Bretaña fue de €1¹⁰⁶; en España de €21⁸⁵; en Brasil de \$33 000 a \$35 000¹⁷. En México, de acuerdo con el reporte de Sánchez-Velázquez en 2006 fue de \$12 000¹⁰⁴.

De acuerdo a los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y de Europa, se estima que más del 60% de las infecciones microbianas involucran las biopelículas²⁹. Alrededor del 60% de las ISRC están producidas por diferentes especies de bacterias (Gram positivas, principalmente por SCN,

y *Staphylococcus aureus*, seguido de *Enterococcus* spp.); en los últimos años, los bacilos Gram-negativos han aumentado considerablemente hasta en un 40%. En México las infecciones nosocomiales relacionada a catéter son del 13%, la probabilidad asociada a mortalidad es del 29%, siendo las bacterias el principal agente de estudio⁶⁷.

Las levaduras del género *Candida* tienen una participación frecuente en las ISRC y formación de biopelículas (65%), debido a la resistencia a los antifúngicos que desarrollan las levaduras en estas comunidades⁵¹. En los Estados Unidos son la cuarta causa de infección nosocomial, mientras que en Europa es el sexto agente causal. La tasa de mortalidad es de 15 a 40% en adultos; mientras que en neonatos y niños es del 10 al 15%^{4, 32, 39, 55, 59,66}. Del 8% al 10.4% de las infecciones en las UCI están producidas por diferentes especies de *Candida* la mayoría son de origen nosocomial. De la candidosis invasiva (CI), la candidemia sigue siendo la causa más importante de morbilidad y mortalidad a nivel hospitalario^{87, 49}. Un factor de riesgo que ha incrementado el establecimiento de la CI es sin duda prolongar la vida de los pacientes en estado crítico, debido a que se realizan mayor número de procedimientos invasivos, que incluyen la aplicación de dispositivos médicos^{49,59}. *Candida albicans* es la especie más frecuente asociada a candidemias y la más estudiada en el mundo, aunque en los últimos años el aislamiento de las especies de *Candida* no *C. albicans* ha ido en aumento, hasta 55%^{4, 27,34 82, 88}. En Estados Unidos las especies de *Candida* son el tercer agente causal de candidemias relacionada a catéter intravasculares y el segundo agente de infecciones asociadas a catéter urinario⁴⁷. El tracto urinario es uno de los sitios más infectados en los pacientes ingresados en la UCI y la mayoría de las infecciones están relacionadas a catéter urinario (31%), la infección por alguna especie de *Candida* asociada a diálisis peritoneal o hemodiálisis representan del 2.6% al 7%⁵⁶.

En cuanto a candidemia nosocomial hasta la fecha se conoce que la mayor tasa de incidencia se reportó en un estudio multicéntrico con población general en Brasil, donde la incidencia es de 3.7 casos diarios por cada 10,000 pacientes, en comparación Europa reporta una incidencia de 0.5 a 0.7 casos

diarios por cada 10,000 pacientes, en Norte América es de 1.5 casos diarios por cada 10,000 pacientes⁸².

La distribución de las especies de *Candida* varía geográficamente, la mayoría de reportes coinciden en que la principal especie aislada es *C. albicans*, en Europa la frecuencia es más del 50%; en Norte América del 46% al 62%, mientras que en Latinoamérica representa el 37%. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un fenómeno evidente dado por la disminución de *C. albicans* aislada de candidemias en una proporción de 7% a 10% en un periodo de ocho años⁸².

En cambio, los aislamientos por *C. glabrata* han aumentado y es la segunda especie causante de candidemia; la frecuencia de esta especie está en el rango de 20-24%. En Latinoamérica el porcentaje es de 5-8%, mientras que en Europa oscila entre el 9% y 10%. Otra de las especies que ha sufrido variación en su frecuencia de aislamiento es *C. parapsilosis* principalmente relacionada con candidemias. En España la frecuencia en neonatos con candidemia fue de 30% a 38% y en Latinoamérica de 19% a 38%. En Latinoamérica *C. tropicalis* fue considerada la segunda o tercera causa de candidemia de 15% a 21%, en Asia de 12% a 27%; en cambio ha disminuido de 8% a 4% en Norte América. *Candida krusei* se aísla en menor frecuencia de 2% a 4%. Finalmente en diferentes zonas geográficas, las especies aisladas con menor frecuencia fueron *C. guilliermondii* (3% a 5% en Latinoamérica), *C. dubliniensis* es raramente observada en infecciones invasivas, se ha relacionado con infección de vías urinarias en el 8.7%^{27, 40, 73, 82,87, 93}.

En la tabla 8 se muestra la recopilación de resultados epidemiológicos obtenidos por diferentes investigadores en pacientes con infecciones sistémicas causadas por *Candida* spp. y hemocultivos.

Tabla 8. Datos epidemiológicos, distribución geográfica e infecciones sistémicas por *Candida* spp.

Autor	Año	País	Total	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>		Otras	
				#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Antunes, AG cols ^{5,a}	2004	Brasil	120	58	48.3	4	3.3	35	25.8	16	13.3	2	1.7	9	7.5
Pfaller MA y cols ^{92,b}	2008	Europa	1787	-	50.03	-	13.93	-	10.63	-	8.56	-	1.5	-	3.6
González G y cols ^{40,c}	2008	México	398	127	31.9	32	8	151	37.9	59	14.8	11	2.7	18	4.5
Horn y cols ^{49,d}	2009	Estados Unidos	2019	921	45.6	525	26	316	15.6	163	8.07	51	2.53	43	2.12
Pemán J. Cols ^{87,e}	2011	España	1344	614	44.7	158	11.5	400	29.1	113	8.2	27	1.96	32	2.32
Lezama, JI ⁶³	2012	México	41	13	31.7	5	12.2	1	2.4	6	14.6	0	0	15	36.5

a Otras: *C. famata*, *C. sake*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*.

b Otras: *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. famata*, *C. kefyr*, *C. spp.*

c Otras: *C. zeylanoides*, *C. famata*, *C. rugosa*, *C. lusitanae*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*

d Otras: *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *Candida* spp.

e Otras: *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. kefyr*

La mayoría de los estudios epidemiológicos se basan en los resultados provenientes de hemocultivos y representa del 10% al 40% de los casos probados de candidosis invasiva²⁷.

1.7 Antifúngicos

Existen diferentes alternativas terapéuticas para las infecciones sistémicas por *Candida*, el tratamiento depende de la especie y del patrón de sensibilidad a los antifúngicos. Desde los años 80's las alternativas terapéuticas eran anfotericina B deoxicolato, fluorocitosina, ketoconazol. Estos fármacos mostraron eficacia reducida, toxicidad y la aparición de resistencia, por lo cual se desarrollaron nuevos derivados azólicos: fluconazol e itraconazol, así como una nueva formulación lipídica de anfotericina B y en el Siglo XXI la creación de la segunda generación de triazoles voriconazol y posaconazol y equinocandinas^{91, 105}.

1.7.1 Mecanismos acción

AZOLES: Antifúngicos sintéticos con efecto fungistático, de amplio espectro, todos comparten un anillo de imidazol, como ketoconazol (KTZ), también en

este grupo están los triazoles de primera generación como el fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITZ) y los de segunda generación como el voriconazol (VRZ) y el posaconazol (PZC)²¹.

Actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol, sustancia implicada en la formación de la membrana celular del hongo, se une y bloquea la enzima 14- α -desmetilasa de lanosterol, que es dependiente del citocromo P-450 e impide la conversión de lanosterol a ergosterol, aumentan los esteroides tóxicos intermedios, esto ocasiona una mayor permeabilidad y deterioro progresivo de la membrana (Fig. 11); los azoles afectan las membranas de los mamíferos, al metabolizarse en el hígado, pueden provocar hepatotoxicidad^{26, 91}.

POLIENOS: La anfotericina B (AMB) es una lactona macrocíclica con estructura poliénica, se sintetiza por *Streptomyces nodosus*, forma complejos con el ergosterol de la membrana, esta unión genera la formación de poros o canales ocasionando un aumento en la permeabilidad de la membrana. (Fig. 11). Complejo lipídico de amplio espectro que puede causar nefrotoxicidad. Esta molécula puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el sitio de la infección⁴³.

EQUINOCANDINAS: En este grupo está caspofungina y anidulafungina, estos lipopéptidos corresponden a hexapéptidos cíclicos, N- acilados con cadena de ácidos grasos de longitud variable. La caspofungina deriva de la fermentación del hongo *Glarea lozoyensis*, y la anidulafungina de *Aspergillus nidulans*; su mecanismo de acción es bloqueando la enzima β 1-3 glucano sintetasa para inhibir la síntesis de β -1-3- glucano, componente de la pared celular del hongo, causando inestabilidad osmótica en la célula fúngica, dando como resultado la lisis de la misma (Fig. 11), esta molécula presenta un efecto fungicida y no afecta células de los mamíferos²⁸.

1.7.2 Sensibilidad antifúngica

Las Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos representan un medio para predecir concentraciones terapéuticas de antifúngicos utilizados para tratar las infecciones causadas por hongos. Existen métodos estandarizados, como la técnica de macro y micro dilución en caldo para determinar el patrón de

sensibilidad *in vitro* descritos en diversos documentos elaborados por el “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI)²⁴ de los Estados Unidos. El documento vigente es el M27-A3 (2008) para hongos levaduriformes y el M38-A para filamentosos. Guías similares son las descritas por “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) de Europa. El CLSI²⁴ ha establecido puntos de corte para detectar la sensibilidad, sensibilidad dosis dependiente y resistencia para algunos antifúngicos frente a algunos hongos, mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI)⁹¹.

En la actualidad existen otros métodos utilizados para valorar la sensibilidad, dilución en tubo, difusión en disco, en tira o en placa. Los métodos comercializados de microdilución son: panel antifúngico colorimétrico Sensititre® Yeastone, Fungitest®. De difusión en agar con tiras impregnadas con el antifúngico es denominado E-Test® y los de difusión en agar con tabletas Neo-Sensitab™

1.7.3 Mecanismos de resistencia

Existen un menor número de diferentes antifúngicos en comparación con los antibióticos sintetizados. El mayor problema presente es la resistencia a los antifúngicos de algunos hongos causantes de infecciones invasivas, utilizados a nivel hospitalario, por lo tanto esto representa un gran reto en la síntesis de nuevas moléculas con acción fungicida¹⁸.

La resistencia se presenta cuando el hongo no es inhibido con la concentración normal del fármaco en un régimen de dosis ya estandarizada, algunas especies son inherentemente resistentes a un tipo de antifúngico, este mecanismo es conocido como primario, ya que la levadura nunca ha sido expuesta al antifúngico en el hospedero. El otro mecanismo es el secundario, se desarrolla después de estar en contacto con el fármaco debido a tratamientos prolongados²⁷.

Un fenómeno que llega a observarse en la resistencia a los antifúngicos es que más de un mecanismo esté involucrado y los cambios que llevan a la resistencia ocurran en secuencia, también pueden darse efectos aditivos y conducir a una resistencia cruzada⁹¹.

RESISTENCIA A LOS AZOLES. Se han descrito cuatro principales mecanismos para *Candida* spp. (Fig. 11).

1. Alteraciones de la enzima 14- α -desmetilasa de lanosterol, incluyen las mutaciones puntuales en el gen que codifica para esta enzima: ERG 11, lo cual ocasiona una disminución en la afinidad por los azoles^{33,91}.
2. Inducción de bombas de flujo o transportadores, originan una disminución en la concentración del antifúngico fuera de la célula, existen dos tipos de transportadores: los ABC (unión con el ATP) que se codifican por el gen CDR, una sobreexpresión le confiere al hongo multiresistencia a los azoles y los transportadores MFS (Facilitadores mayores) codificados por el gen MDR, una sobreexpresión provoca resistencia exclusiva a fluconazol^{33, 91}.
3. Sobreexpresión de la enzima ERG 11, es decir si ocurre la unión de una cantidad determinada del antifúngico con la enzima, quedará una cantidad mayor de enzima libre, lo cual ocasionará la síntesis de la membrana sin defectos, también puede darse la regulación del gen de la enzima ERG 11 modificada por mutaciones puntuales^{33,91}.
4. Cambios en la ruta de biosíntesis de los esteroides, es una vía alterna como reemplazo del ergosterol, esto debido a lesiones en la enzima $\Delta^{5(6)}$ -desaturasa lo cual produce una acumulación de 14 α -metilfecosterol, molécula precursora del fecosterol, así regresa la integridad y fluidez en la membrana³⁸.
5. Síntesis de enzimas para inactivar al fármaco de forma rápida una vez que entran a la célula fúngica o se excretan enzimas fuera de la célula para degradar el antifúngico³⁸.
6. Bloqueo en la pared celular y/o la membrana de los antifúngicos, para evitar que el antifúngico penetre al interior¹⁸.

RESISTENCIA A LAS EQUINOCANDINAS:

1. Se presentan mutaciones puntuales (cambio de aminoácidos: alanina por prolina) en dos regiones: HS1 y HS2 del gen FKS1 que codifica la subunidad mayor de la enzima β 1-3 glucano sintetasa. Así la célula

fúngica logra sintetizar el componente esencial para la formación de la pared celular (Fig. 11)⁹¹.

RESISTENCIA A POLIENOS:

1. Se genera una disminución de la unión de los polienos con el ergosterol en la membrana celular por cambios en la síntesis del ergosterol, se da una sustitución del ergosterol por otro esteroide que puede ser 3-hidroxi o 3-oxo esteroide, al disminuir el contenido de ergosterol disminuye la afinidad por el antifúngico. La sensibilidad de la unión con los polienos es termodinámicamente o estéricamente desfavorecida, el efecto se asocia a cambios en la fluidez de la membrana³⁸.

1.7.4 Biopelículas y resistencia a los antifúngicos

Al utilizarlos en dosis altas, provocan una alta toxicidad en los pacientes, por lo cual es de suma importancia un diagnóstico temprano. En la formación de biopelículas es recomendable iniciar el tratamiento cuando la capa es delgada, esto significará una dosis menor del fármaco para reducir los efectos adversos¹⁸.

Diferentes mecanismos de resistencia son utilizados dependiendo de la fase de formación de la biopelícula, claramente se ha evaluado el uso de las bombas de flujo durante la fase temprana a la fase intermedia, además la matriz extracelular es capaz de disminuir la actividad del antifúngico impidiendo que penetre; otro factor es la densidad celular en la fase madura, la cual actúa como una barrera física y una disminución de la velocidad de crecimiento bajo diferentes condiciones ambientales beneficiando a las biopelículas. Finalmente, durante el crecimiento de las hifas, la biosíntesis del ergosterol es regulada por el tratamiento antifúngico, molécula blanco de los azoles y polienos. También es importante mencionar la presencia de las células "persistentes", las cuales subsisten en la biopelícula a pesar de la presencia de altas concentraciones del antifúngico, estas son inhibidas *in vitro* pero la biopelícula *in vivo* previene el reconocimiento y la eliminación de ellas por las células del sistema inmune del hospedero^{62,98}.

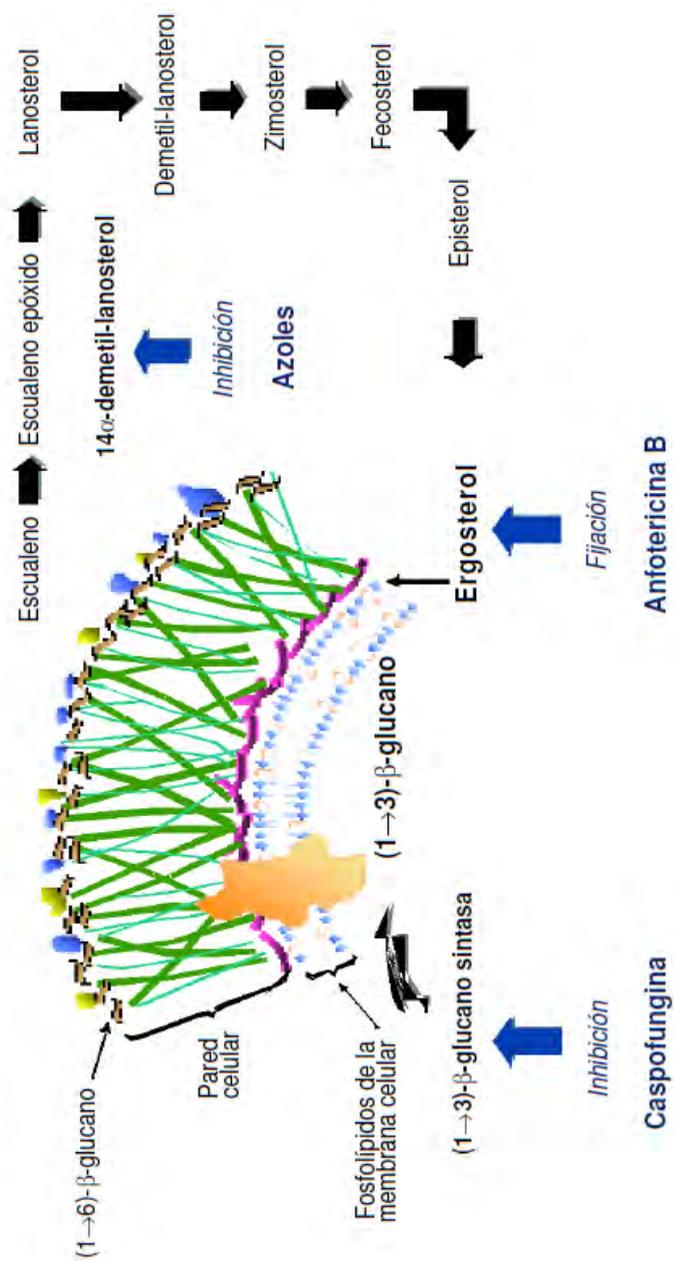


Figura 11. Mecanismos de acción y resistencia de los antifúngicos (Tomada de Catalán, M 2009)²¹

2. Planteamiento del problema

Los dispositivos médicos son ampliamente utilizados en pacientes atendidos en diferentes servicios de los hospitales generales. Estos dispositivos pueden ser colonizados por microorganismos que forman parte de la microbiota cutánea o llegan por vía exógena. Los microorganismos colonizan el catéter por la parte extraluminal o intraluminal, a partir de la cual se pueden diseminar a otros órganos del paciente.

La presencia de levaduras como colonizantes de los catéteres se puede demostrar mediante varias técnicas como la semicuantitativa de Maki, utilizada ampliamente en los laboratorios de microbiología con medios de cultivo enriquecidos para aislar los microorganismos y aparentemente solo se recuperan los localizados en la parte externa del catéter. Por la capacidad de adherencia que presentan las levaduras al colonizar y formar biopelículas en la pared interna del catéter que al desprenderse pueden generar infecciones; por tanto, en este trabajo se planteó la recuperación intraluminal mediante una variante de la técnica cuantitativa del cepillado intraluminal y el uso de medios de cultivo selectivos para levaduras, ya que en México la mayor recuperación de microorganismos de los catéteres son bacterias y se conoce poco sobre la recuperación de levaduras obtenidas de estos dispositivos y la relación con los factores de riesgo para conocer el impacto sobre la morbi-mortalidad. Además la mayor resistencia en las especies de *Candida* y otras levaduras a diversos antifúngicos, está posiblemente relacionada con la formación de biopelículas, por tanto es necesario conocer el patrón de sensibilidad de estas levaduras para establecer un tratamiento oportuno.

3. Objetivos Generales

- ❖ Determinar la asociación de las levaduras obtenidas de la pared interna de los catéteres de pacientes atendidos en el Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”.
- ❖ Conocer el patrón de sensibilidad antifúngica a ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, anfotericina B, caspofungina y anidulafungina contra los aislamientos levaduriformes.

3.1 Objetivos Particulares

- ❖ Identificar los aislados levaduriformes obtenidos de los diversos catéteres procesados.
- ❖ Relacionar el tiempo de permanencia del catéter y la presencia de levaduras.
- ❖ Relacionar las manifestaciones clínicas y los factores de riesgo de los pacientes con los aislamientos levaduriformes.
- ❖ Comparar la sensibilidad y especificidad de CHROMAGAR *Candida*TM, Brillante *Candida*TM, agar dextrosa Sabouraud (ADS) con ciprofloxacino y ADS adicionado con cicloheximida en la obtención de los aislados levaduriformes.
- ❖ Determinar colonización y/o infección de los aislados obtenidos de catéteres.
- ❖ Determinar la sensibilidad y resistencia de los aislados levaduriformes a los antifúngicos probados
- ❖ Comparar la resistencia antifúngica y la especie de *Candida*

4. Materiales y métodos

4. 1. Dispositivos médicos

Estudio transversal, descriptivo, observacional y experimental en levaduras obtenidas de catéteres de los pacientes atendidos en diversos servicios (Medicina Interna, Nefrología, Cirugía, Unidad de Cuidado Intensivo y Neonatología del Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). Para cada una de las muestras procesadas se recabaron los siguientes datos relacionados con el paciente como género, edad, enfermedades o factores de riesgo, evolución de la enfermedad, tratamiento con antimicrobianos, esteroides y antifúngicos, el tipo de catéter y tiempo de permanencia del mismo. El estudio se llevó a cabo de Febrero de 2012 a Septiembre del 2012.

4. 2.1 Tratamiento de las muestras y técnica de cultivo del catéter

4.2.1.1 Procesamiento de los catéteres en el laboratorio de microbiología

Las puntas de catéter se recolectaron y se transfirieron al Laboratorio de Microbiología del Hospital, en tubos con tapón de rosca conteniendo caldo infusión cerebro-corazón (BHI), se incubaron a 30°C durante 24 horas, posteriormente las puntas de catéteres se procesaron mediante la técnica de rotación en placa (técnica semicuantitativa propuesta por Maki⁷¹), en diversos medios de cultivo agar sangre, agar chocolate, agar Mc Conckey y agar sal manitol. Se incubaron a 37°C por 48 horas, con revisión diaria. Los crecimientos bacterianos se identificaron por el método automatizado mediante una suspensión a una concentración de 1×10^6 células/mL (Fig. 12 A y B) y se incubaron en el aparato Phoenix 100™ (Fig. 12 C) por 8 horas y para el resultado de antibiograma durante 12 h.



Figura 12 Método automatizado para identificación de bacterias A. Incubadora Phoenix 10™ B. Galerías para determinar asimilación de carbohidratos C. Incubación de las galerías a 37°C

4.2.1.2 Procesamiento en el laboratorio micología de la Facultad de Medicina, UNAM

Para el aislamiento de las levaduras de localización intraluminal de todos los catéteres procesados se realizó mediante una variante de las técnicas cuantitativas existentes con la ayuda de una jeringa con aguja hipodérmica estéril, se desprendió el material adherido de las paredes internas del catéter (Fig. 13). A todas las muestras obtenidas se les hizo un frotis con tinción de Gram, para la búsqueda de estructuras parásitas de hongos levaduriformes (cúmulos de blastoconidios, pseudohifas y/o hifas) (Fig.14). Aproximadamente se tomaron 2 µL de cada una de las muestras y se inocularon por estría cerrada en cuatro medios de cultivo, agar dextrosa Sabouraud (ADS) con cloranfenicol y cicloheximida (ADS-CC), ADS con ciprofloxacino (ADS-CIP) y los medios selectivos para levaduras fueron CHROMagar *Candida*™ (H y agar Brillante *Candida*™ (B Las placas se incubaron a 28°C, 37°C y 30°C, respectivamente, durante una semana con revisión diaria.



Figura 13. Técnica de obtención intraluminal de la muestra

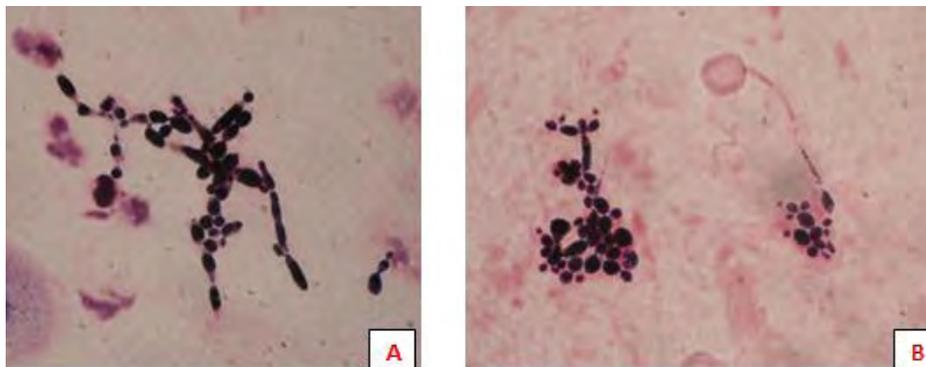


Figura 14 A y B. Frotis donde se muestra levaduras, pseudohifas e hifas Gram positivas

4.3. Identificación de los aislados levaduriformes

El crecimiento de las colonias levaduriformes obtenidas en los cuatro medios de cultivo, fueron contadas y se realizó una tinción de Gram para verificar la morfología de las levaduras. De cada crecimiento levaduriforme se hicieron cultivos monocelulares en CH, se incubaron durante 48 h a 37°C para observar las características morfológicas y el color de las colonias, e identificación presuntiva de algunas especies del género *Candida*.

4. 3.1. Pruebas morfológicas y fisiológicas

- **Filamentación en suero humano.** Del crecimiento levaduriforme de 24h en ADS, se tomó un pequeño inóculo de la colonia y se sembró en 0.5 mL de suero a 37°C durante 2h, posterior a la incubación se observó en el microscopio óptico la formación de tubo germinativo, levaduras o pseudohifas (Fig. 15 A).

- **Formación de clamidoconidios, pseudohifas y levaduras.** Por la técnica de Dalmau se inoculó el medio de cultivo harina de maíz (HM) con Tween 80 al 1%, con los aislados levaduriformes de un crecimiento de 24h en ADS, la cual consistió en tomar una muestra de la colonia del cultivo puro formando dos líneas paralelas de 1cm aprox. sobre la superficie del medio, se colocó un cubreobjetos estéril sobre las líneas y se incubó a 30°C durante 72 h (Fig. 15 B); por medio del microscopio óptico se valoró la presencia de pseudohifas, hifas y clamidoconidios (Fig. 15 C).



Figura 15. A. Tubo germinativo en suero a 40X; B. Placa de HM, técnica de Dalmau; C. Clamidoconidios terminales observados a 40X.

➤ **Pruebas diferenciales para las especies diferentes de *C. albicans***

Los aislamientos purificados provenientes de los medios de cultivo se sembraron en los medios cromógenos CHROMagar *Candida*[™] (37°C/48h) y Agar Brillante (Brilliance) *Candida*[™] (30°C/ 48h). En base a las características de la macromorfología de las colonias (color, forma, aspecto y textura) se realizó la identificación presuntiva de las especies, comparando con las especificaciones de los proveedores (Tabla 9).

Tabla 9. Identificación presuntiva de las especies de *Candida*

Especie	Prueba de filamentación en suero ^a	Clamidoconidios	Colonias CHROMAgar <i>Candida</i> TM	Colonias Agar Brillante <i>Candida</i> TM
<i>C. albicans</i>	+	Terminales, únicos	Color: verde claro Textura: cremosa Superficie: convexa	Color: verde oscuro Textura: cremosa Superficie: convexa
<i>C.dubliniensis</i>	+	Racimo	Color: verde claro Textura: cremosa Superficie: convexa	Color: verde oscuro Textura: cremosa Superficie: convexa
<i>C.glabrata</i>	-	Negativo	Color: morado Textura: cremosa Superficie: convexa	Color: beige Textura: cremosa Superficie: convexa
<i>C. parapsilosis</i>	-	Negativo	Color: rosa pálido Textura: cremosa Superficie: convexa	Color: beige Textura: cremosa Superficie: convexa
<i>C. tropicalis</i>	-	Negativo	Color: azul Textura: cremosa Superficie: convexa	Color: azul oscuro Textura: cremosa Superficie: convexa
<i>C. krusei</i>	-	Negativo	Color: rosa con un halo blanco Superficie: plana Aspecto: seco	Color: café con halo blanco Superficie: plana Aspecto: seco
<i>C.guilliermondii</i>	-	Negativo	Color: lilas Superficie: convexa	Color: beige Textura: cremosa Superficie: convexa
<i>C. famata</i>	-	Negativo	Color: rosa pálido Textura: cremosa Superficie: convexa	Color: beige Textura: cremosa Superficie: convexa

^a Formación de tubo germinativo + (positivo), - (negativo)

➤ **Identificación de las especies diferentes de *C. albicans* por asimilación de carbohidratos.**

El método comercial utilizado fue por el Sistema API 20 AUX®, a los aislados de *Candida* no *C. albicans*, éstos se sembraron en el medio de cultivo ADS durante 24h a 30°C, posteriormente se realizó una suspensión en solución salina estéril al 0.85%, a una concentración al 2,0 de turbidez en la escala Mc Farland, se transfirieron 100µL a una ampollita API médium, con la suspensión se inocularon las galerías de API e incubaron a 30° C, durante 48h. La lectura se realizó por el sistema API Web® del crecimiento observado en cada uno de los pozos de la galería comparado con el control negativo.

➤ **Pruebas fenotípicas diferenciales para *C. albicans* y *C.dublinsiensis*.**

Los medios utilizados fueron agar tabaco, agar caseína y agar papa dextrosa (APD). Los aislados se sembraron en ADS por 24h a 30°C, se inoculó los dos primeros medio por la técnica de puntilleo, se incubaron a 30°C por 72h y se realizaron las observaciones correspondientes para el registro de la macromorfología de las colonias, después se realizó examen directo de las colonias con azul de algodón y se observó mediante el microscopio óptico la presencia de clamidoconidios. La interpretación de estas estructuras se registró por cruces donde un 25%= +; 50%= ++; 75%= +++; 100%= ++++; ninguno fue igual a negativo (-). En la superficie de APD se inoculó una concentración de 10⁶ células/mL por estría cerrada, se incubó a 45°C durante 48h. *Candida albicans* presenta la capacidad de crecer a 45°C a diferencia de *C.dublinsiensis*

Tabla 10. Características fenotípicas diferenciales en *C. albicans* y *C.dublinsiensis*

Especie de <i>Candida</i>	Colonias agar tabaco	Colonias agar caseína
<i>C. albicans</i>	MACROMORFOLOGÍA Color: blanquecino Aspecto húmedo Textura lisa	MACROMORFOLOGÍA Color blanquecino Aspecto: seco Textura: plana
	MICROMORFOLOGÍA Pocos clamidoconidios Terminales únicos	MICROMORFOLOGÍA Pocos clamidoconidios terminales , únicos
<i>C.dublinsiensis</i>	MACROMORFOLOGÍA Color: amarillento Aspecto : húmedo Textura: rugosa con halo veloso alrededor de la colonia	MACROMORFOLOGÍA Color : blanquecino Aspecto : seco Textura : plana Forma : arborescente
	MICROMORFOLOGÍA clamidoconidios numerosos en racimo	MICROMORFOLOGÍA clamidoconidios numerosos en racimo

4.4.1 Metodología para evaluar la sensibilidad a los antifúngicos

El método utilizado en todos los aislados estudiados fue el de microdilución en caldo en base al documento M27-A3 de acuerdo a la descripción del CLSI²⁴. El medio utilizado fue caldo RPMI 1640 al 0.2% de glucosa, con 3-[N-morpholino]

ácido propanosulfónico (MOPS) como amortiguador a un pH de 7 (Anexo A). Se valoró la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diversos antifúngicos probados.

4. 4.2 Preparación de soluciones madre de los antifúngicos

Solución madre de los antifúngicos solubles (Tabla 11)

- Se pesó la cantidad de cada uno de los antifúngicos necesaria para obtener 100 veces la concentración más alta del antifúngico, disolviéndolas en agua químicamente pura.
- Se distribuyeron en alícuotas de 500 μ L en tubos Eppendorf y se congelaron a -70°C .

Solución madre de antifúngicos insolubles (Tabla 12)

- Se pesó la cantidad de antifúngico para obtener 100 veces la concentración más alta y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO).
- Se distribuyeron en alícuotas de 500 μ L en tubos Eppendorf y se congelaron a -70°C .

Diluciones de los antifúngicos

- A partir de la solución madre de cada antifúngico se prepararon diluciones seriadas a una concentración 10 veces la concentración deseada en RPMI 1640, de estas soluciones se hicieron diluciones 1/5 en RPMI. (Fig. 16 y Fig.17)
- Se distribuyeron 100 μ L del contenido de cada tubo de ensayo en los 96 pozos de la microplaca. En la columna 1 la mayor concentración y en la columna 10 la menor. Los pozos de la columna 11 fueron el control de crecimiento y los de la columna 12, la de esterilidad.
- Las placas se conservaron a -20°C , cada placa corresponde a un antifúngico diferente.

Tabla 11. Diluciones seriadas de antifúngicos solubles

AMB, KTZ, ITZ, VRZ, PSZ, ANF

Tubo de ensayo	Concentración final	Tubo de ensayo	Concentración final
1	16	6	0.5
2	8.0	7	0.25
3	4.0	8	0.125
4	2.0	9	0.0625
5	1.0	10	0.125

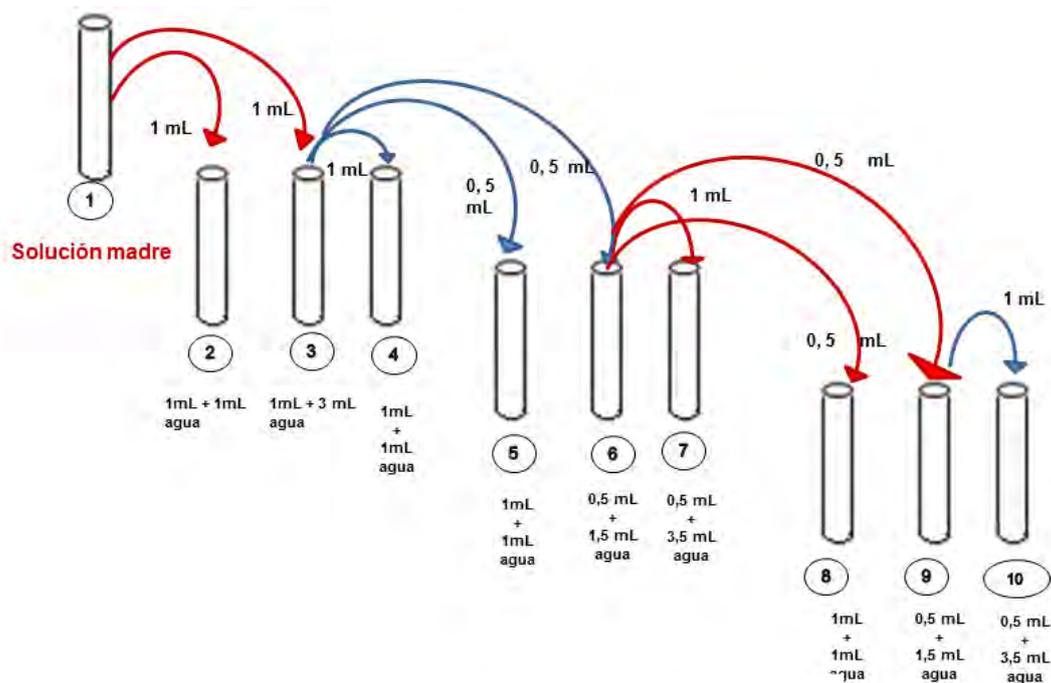


Figura16.Preparación de antifúngicos

Tabla 12. Diluciones seriadas de antifúngicos insolubles. FLZ, CSF

Tubo de ensayo	Concentración final	Tubo de ensayo	Concentración final
1	32	6	0.5
2	16	7	0.25
3	4	8	0.125
4	2	9	0.06
5	1	10	0.03

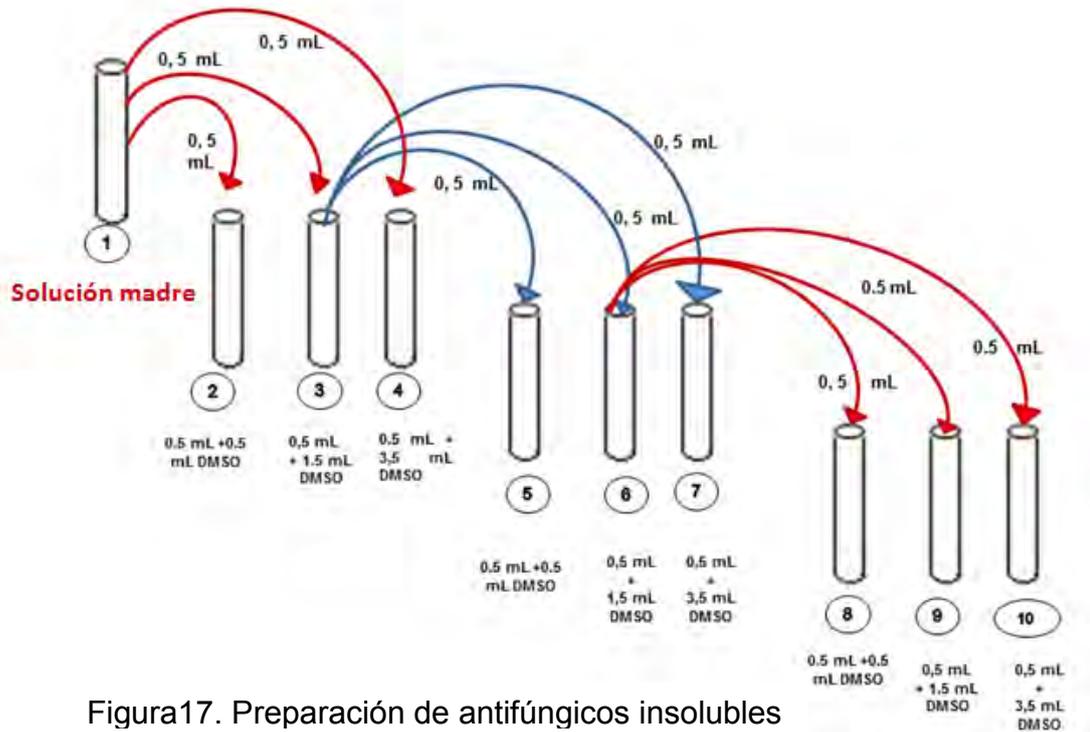


Figura 17. Preparación de antifúngicos insolubles

4.4.2.3 Preparación del inóculo. A partir del crecimiento en ADS durante 24h a 30°C se realizó una suspensión con cada uno de los aislados levaduriformes en solución salina al 0.85%, teniendo una concentración de 1×10^6 células /mL, se realizaron diluciones de la misma en tubos de tapón de rosca que contenían caldo RPMI; se tomó 100 μ L de cada dilución, teniendo como concentración final 2.5×10^3 células /mL y se depositaron en los pozos de la fila C a la H. En las filas A, B se inocularon las cepas control de calidad del método (ATCC *C. parapsilosis* 22019 y ATCC *C. krusei* 6258). Otras cepas utilizadas de control fueron ATCC *C. glabrata* 2002, ATCC *C. dubliniensis* YMA-579. Las placas se incubaron a 35°C y se realizó la lectura visual a las 24 y 48 h con ayuda de un espejo invertido.

Mediante las lecturas se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir la menor concentración a la cual el antifúngico es capaz de inhibir el 80% del crecimiento de la levadura comparado con el control de crecimiento. La interpretación de la inhibición en el crecimiento se comparó con los pozos de la columna 12 que fue: 0: campo claro; 1: ligeramente turbio; 2: disminución muy evidente de la turbidez (50%); 3: casi turbio; 4: ninguna disminución de turbidez. (Fig.18). Los resultados de CMI se compararon con la tabla de referencia del CLSI (Tabla 13).

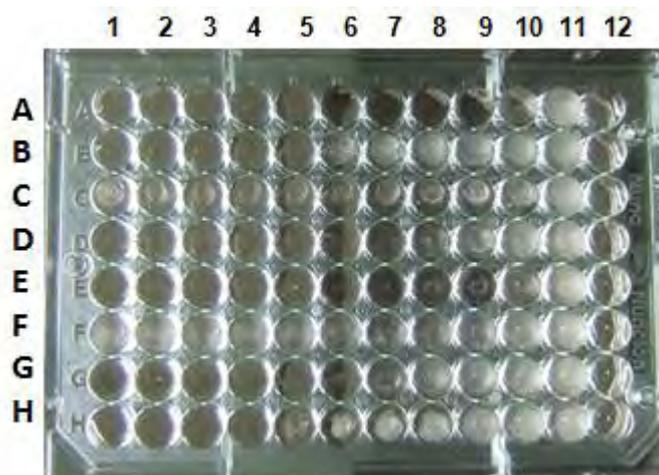


Figura 18. Placa de microdilución en caldo. Columna 11: control de crecimiento
Columna 12: control de esterilidad. Filas A y B cepas ATCC 22019 y 6258,
respectivamente. De la fila C a la H aislados problema.

Tabla 13. Criterios de interpretación de CMI por el CLSI: Sensible, SDD: Dosis
Dependiente y Resistente.²⁴

Antifúngico	Sensible µg/mL	SDD µg/mL	Resistente µg/mL
Itraconazol	< 0.25	0.25-0.5	≥ 1
Ketoconazol	≤ 1	-	≥ 1
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4
Posaconazol	≤ 1	-	≥ 1
Anfotericina B	-	-	≥ 2
Caspofungina	≤ 2	-	> 2
Anidulafungina	≤ 2	-	> 2

4.5.1 Pruebas estadísticas

Para el análisis de resultados se utilizaron porcentajes representados en las tablas y gráficas para evaluar cuál de los cuatro medios de cultivo empleados era el más adecuado para el aislamiento primario de las levaduras. Se obtuvieron los índices estadísticos de Sensibilidad (S) y Especificidad (E) para los fines de este trabajo se definió a la sensibilidad como la probabilidad de identificar correctamente una levadura, cuando está presente en la muestra y la especificidad como la probabilidad para descartar la presencia de una levadura cuando no está en la muestra. Por otro lado, el Valor predictivo positivo (VPP) equivale a la probabilidad de que solo se trate de levaduras presentes en la muestra cuando hay crecimiento en el medio y el Valor predictivo negativo

equivale a la probabilidad de que no existan levaduras en la muestra cuando el medio no presenta crecimiento.

Las fórmulas utilizadas fueron:

S= (Verdaderos positivos/ Verdaderos positivos+ Falsos negativos

$$S = (VP) / (VP+FN)$$

E= (Verdaderos negativos/ Verdaderos negativos + Falsos positivos)

$$E = (VN) / (VN+FP)$$

VPP = (Verdaderos positivos/Verdaderos positivos + Falso positivo)

$$VPP = (VP) / (VP + FP)$$

VPN = (Verdaderos positivos/ Verdaderos positivos +Falso negativo)

$$VPN = (VP) / (VP+FN)$$

5. RESULTADOS

En este estudio se procesaron 57 catéteres obtenidos de 49 pacientes, los cuales correspondieron a 42 adultos (86%) y 7 pediátricos (14%). La mayoría de pacientes fueron del género masculino (25/49) (Tabla 14), cuyo rango de edad fue de recién nacidos de cero años hasta los 89 años, con un promedio de 51.4 años (Tabla 15) de los factores de riesgo asociados a la colonización de los catéteres fueron la administración prolongada de antibióticos de amplio espectro, seguido por diabetes mellitus tipo 2 e infección de vías urinarias. En 16 de los pacientes se presentó solo un factor de riesgo; en 12 la asociación de dos y tres factores, respectivamente; y finalmente en nueve cuatro factores (Tabla 16).

Tabla 14. Género de los pacientes del estudio

GÉNERO	NÚMERO DE PACIENTES	%
Masculino	25	51
Femenino	24	40
Total	49	100

Tabla 15. Edad de los pacientes incluidos en el estudio

EDAD	PROMEDIO \pm σ	MEDIANA
Adultos (años)	62.6 \pm 14.0	64
Pediátricos (meses)	6.7 \pm 12.3	<1
Total (años)	51.4 \pm 27.3	60

Intervalo de edad: Adultos (31-89); pediátricos (1-36). σ : Desviación estándar

Tabla 16. Factores de riesgo relacionados a colonización e infección sanguínea relacionada a catéter

FACTORES DE RIESGO	%
Antibioticoterapia	67
Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	43
Infección de vías urinarias (IVU)	29
Insuficiencia renal crónica (IRC)	22
Septicemia	11
Prematuros y bajos de peso	8
Neumonía	8
Hemodiálisis	8
Peritonitis	8
Neoplasias	6
Tratamiento con esteroides	6

En la tabla 17 se muestra los cuatro tipos de catéteres procesados, la mayoría fueron catéter venoso central (75%) y el menor número los del tipo Mahurkar (6%) (Fig. 19). En general, la permanencia de los catéteres en los pacientes fue variable, en un rango de 10 a 14 días, en promedio de 14.3 días sin considerar los de tipo Mahurkar y Tenckoff, los cuales tuvieron un tiempo más prolongado de permanencia en los pacientes (Tabla 18).

Tabla 17. Tipos de catéteres empleados

TIPOS	NÚMERO	%
Venoso central	43	75
Sonda Foley	7	12
Tenckoff	4	7
Mahurkar	3	6
Total	57	100

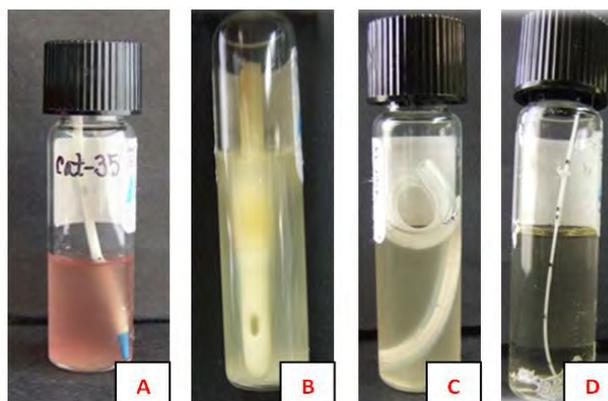


Figura 19. A. Catéter venoso central adulto, B. Sonda Foley, C. Tenckhoff, D. Catéter venoso central pediátrico.

Tabla 18. Tiempo de permanencia de los catéteres en los pacientes

TIPOS DE CATÉTER	PROMEDIO (DÍAS) $\pm \sigma$	MEDIANA (Días)
Venoso Central	11.5 \pm 6.9	10
Sonda Foley	18.2 \pm 12.2	13
Tenckhoff	17.2 \pm 8.7	14
Mahurkar	41.3 \pm 44.1	30
Total	14.3 \pm 13.2	12

σ : Desviación estándar

Los resultados obtenidos de las 57 muestras de catéteres procesadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro” muestran que solo se aislaron bacterias y ninguna levadura. Los

aislamientos representaron el 85% de los catéteres procesados de 46 pacientes.

Todas las levaduras problema se aislaron del área intraluminal de 16 catéteres, en los medios de cultivo selectivos para levaduras, los cuales correspondieron a 13 pacientes adultos y 2 recién nacidos (Tabla 19).

Tabla 19. Aislados microbianos de los diversos catéteres procesados de 49 pacientes

MICROORGANISMOS	NÚMERO DE PACIENTES (%)	CATÉTERES POSITIVOS (%)	CANTIDAD DE AISLADOS (%)
Bacterias *	46 (93.9)	46 (80.7)	49 (85.9)
Levaduras *	15 (30.6)	16 (28.1)	20 (35.0)
Total	49 (100)	57 (100)	57 (100)

*NOTA: Muestras de pacientes con dos o más bacterias y/o levaduras

En la Fig. 20 se presentan los frotis teñidos con Gram de algunas de las muestras obtenidas del área intraluminal de los catéteres, donde se evidenciaron blastoconidios, pseudohifas e hifas.



Figura 20 Frotis del material teñido obtenido de los catéteres A. CAT-09 Hifas; B. CAT-15 Cúmulos de blastoconidios e hifas; C. CAT-52 Pseudohifas y bacilos cortos Gram negativos.

Del total de los aislados levaduriformes que representan el 35%, el mayor número se obtuvo de catéteres urinarios (sonda Foley) en el 51% y el menor de Mahurkar y Tenckoff en el 9%, respectivamente (Fig. 21).

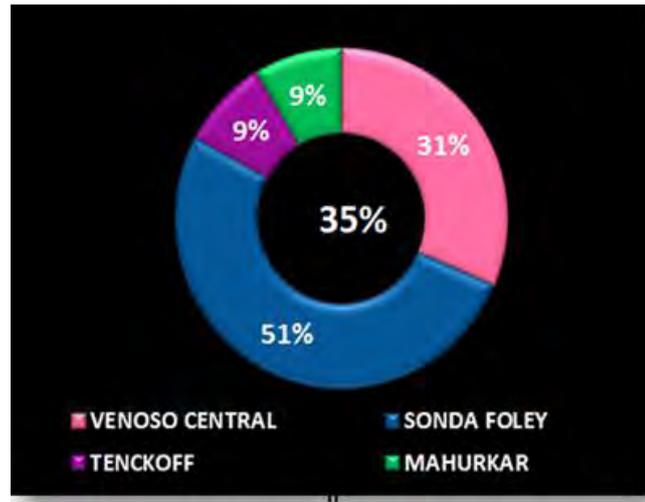


Figura 21. Aislados levaduriformes obtenidos de catéteres procesados.

La evaluación de los cuatro medios (ADS con cloranfenicol y cicloheximida (ADS-CC), ADS con antibiótico (Ciprofloxacino) (ADS-CIP), CHROMagar *Candida*™ (H) y agar Brillante *Candida*™ (B) (Fig. 22)) para el aislamiento primario e identificación presuntiva de levaduras se muestra en la tabla 20, además de las pruebas de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y del valor predictivo negativo (VPN); con la finalidad de seleccionar el medio ideal para el aislamiento de levaduras.

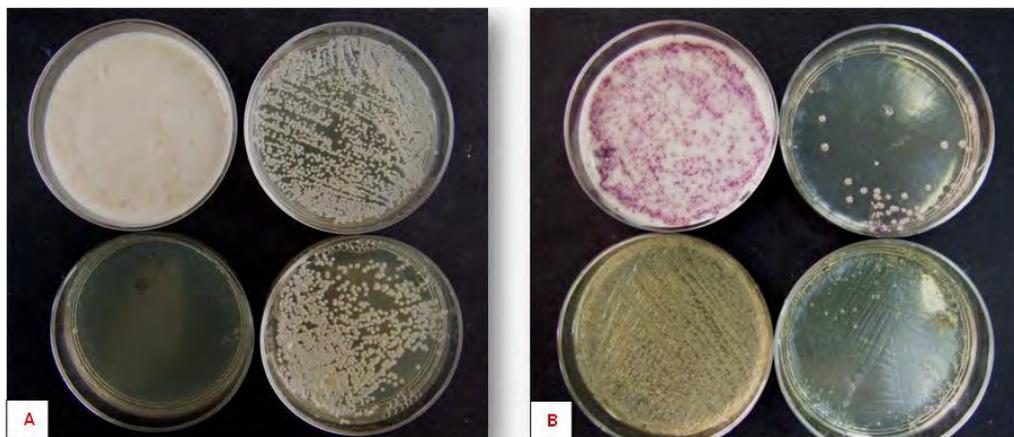


Figura 22. Ejemplo de dos aislamientos en los cuatro medios de cultivo
A. CAT-33; B. CAT-37 (48 h).

En la Fig. 22 A se observa el crecimiento de *C. parapsilosis* en la muestra de CAT-33 (CVC) de un recién nacido. En la placa del lado superior izquierdo de fondo blanco es BC, en la cual se observan colonias pequeñas, cremosas de color beige; mientras que en la placa del lado derecho es CH,

donde las colonias son numerosas de color rosa pálido; en la placa inferior izquierda se ubica el medio ADS-CC sin crecimiento y la del derecho es ADS-CIP, en el que se aprecia numerosas colonias de levaduras, blancas y cremosas. En cambio en la Fig. 22 B la muestra proviene del CAT-37 (Mahurkar), donde en la placa del lado superior izquierdo se observa el medio BC, con crecimiento abundante de bacterias de color magenta, en cambio en la placa del lado superior derecho correspondiente a CH se aprecian 50 colonias cremosas, de color rosa pálido características de *C. parapsilosis*. En los aislados de las placas del lado inferior izquierdo y derecho, que correspondieron a ADS-CC y ADS-CIP, con abundante crecimiento de bacterias y con algunas colonias bacterianas, respectivamente.

En la Figura 23 A se observó solo crecimiento de *C. albicans* en los cuatro medios de cultivo, de la muestra CAT-43 (CVC), en los dos medios de lado izquierdo (CH y BC), colonias cremosas de color verde; mientras que en las placas del lado derecho (ADS-CIP y ADS-CC), las colonias fueron cremosas de color blanco. La Figura 23 B aislamiento del CAT-19 (Sonda Foley), la especie identificada fue *C. tropicalis*. En las dos placas superiores se observan dos medios cromógenos (BC y CH) y las colonias fueron de color azul con abundante crecimiento, en cambio en la placa inferior del medio ADS-CPF se observaron colonias color cremosas de color blanco.



Figura 23A. Ejemplo de 2 aislamientos en los medios de cultivo.
A. CAT-43; B. CAT-19 (48 h).

Tabla 20. Evaluación de los medios de cultivo para el aislamiento primario de levaduras.

MEDIOS DE CULTIVOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
CHROMagar <i>Candida</i>™	70.6	95	85.7	95
Agar BRILLANTE <i>Candida</i>™	30.3	96	90.9	96
ADS + CIP	20.7	92.8	75	92.8
ADS + CC	25.9	96.6	87.5	96.7

El medio que resulto más sensible y específico fue CHROMagar *Candida*™ con un porcentaje de 70.6 y 95%, respectivamente (Fig. 24). De los cuatro medios de cultivo, en los dos cromógenos utilizados (HROMagar™ y Brillante *Candida*™ se identificaron presuntivamente algunas de las especies de *Candida*, por las características del aspecto y el color como se muestra en la Fig. 25.

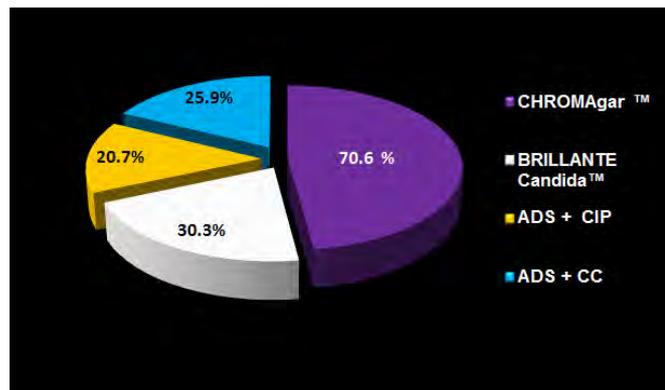


Figura 24. Sensibilidad de los medios de cultivo

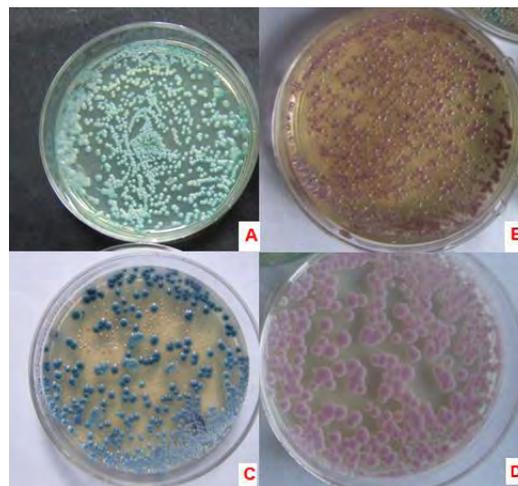


Figura 25. CHROMagar *Candida*™ A. *Candida albicans* CAT-43; B. *C. glabrata* CAT-52; C. *C. tropicalis* CAT-56; D. *C. krusei* CAT-18R.

Por las pruebas fenotípicas realizadas se diferenció a *C. dubliniensis* de *C. albicans* en dos de los aislados (CAT-15V y CAT-18V). Las colonias de *C. dubliniensis* en AT con halo filamentoso abundante y colonias de color amarillento (Fig. 26), microscópicamente la presencia de abundantes clamidoconidios dispuestos en racimo (Fig. 27 A y B), así como crecimiento negativo en APD.

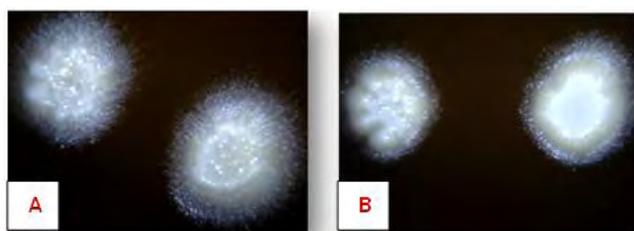


Figura 26. Colonias en agar tabaco (AT) de *C. dubliniensis*

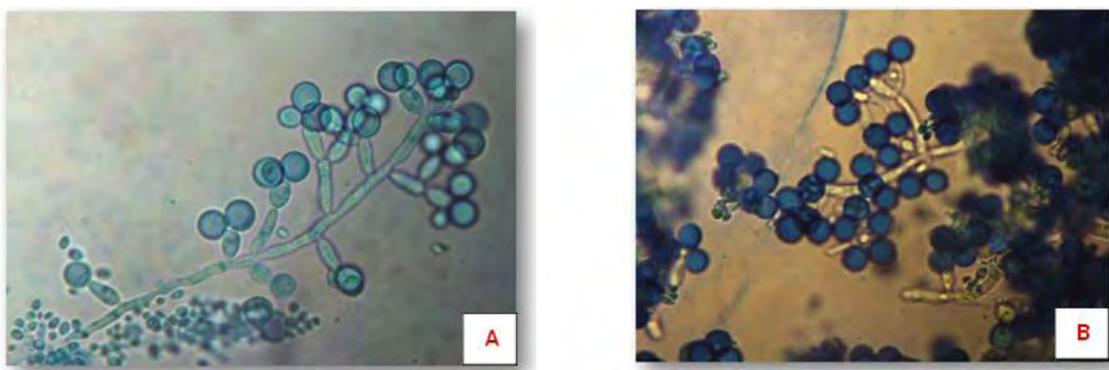


Figura 27. Clamidoconidios abundantes en racimo en examen directo de crecimiento en AT y CAS (100 X) de *C. dubliniensis* A. Muestra de CAT-15V y B. Muestra de CAT-18V.

En las muestras de los diversos catéteres se presentaron asociaciones de especies de *Candida*. Del total de los aislados levaduriformes, el 35% correspondió a la asociación de especies de *Candida* obtenidas de catéteres urinarios (Sonda Foley) (Tabla 21).

Tabla 21. Asociación de especies de *Candida*

MUESTRAS DE CATÉTER	<i>Candida</i> spp.
CAT-15V	<i>C. dubliniensis</i>
CAT-15M	<i>C. glabrata</i>
CAT-18V	<i>C. dubliniensis</i>
CAT-18R	<i>C. krusei</i>
CAT-18M	<i>C. glabrata</i>
CAT-52V	<i>C. albicans</i>
CAT-52M	<i>C. glabrata</i>

En la Fig. 28 A, la placa de CH en el área superior se aprecia asociación colonial, con abundantes colonias color verde claro (*C. dubliniensis*) y pocas colonias pequeñas de color púrpura y colonias color violeta. En las dos placas inferiores de CH se aislaron las levaduras por dilución y se observaron colonias de color morado de lado inferior izquierdo (*C. glabrata*) y del derecho las de color rosa con borde blanco, de superficie plana y aspecto seco (*C. krusei*). En la Fig. 28 B, en la placa superior se observa la asociación de colonias color verde oscuro y morado; y las dos inferiores el aislamiento por dilución de las colonias.

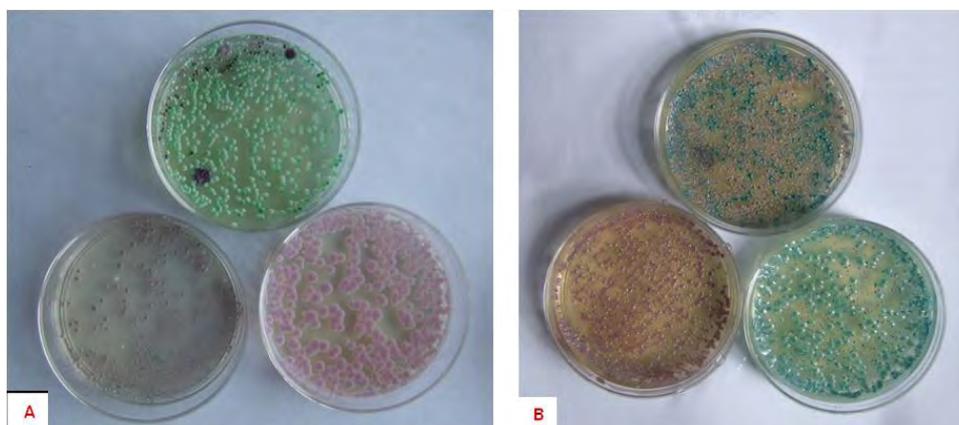


Figura 28. Medio CHROMagar *Candida*™ T -18 (*C. dubliniensis*, *C. glabrata* y *C. krusei*) y B. CAT-52 (*C. glabrata* y *C. albicans*)

Del total de aislados levaduriformes el 75% correspondió a especies de *Candida no albicans* y el 25% a *C. albicans* (Fig. 29).

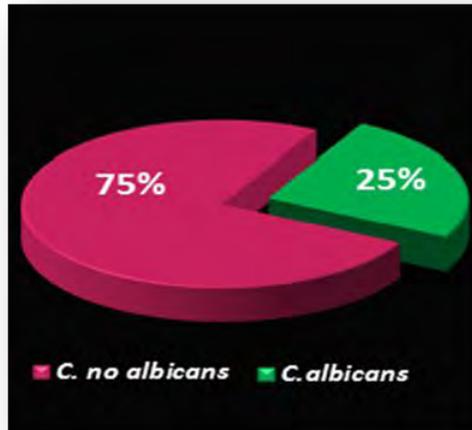


Figura 29. Distribución de las especies de *Candida* spp.

En la Fig. 30 se muestra que de las 8 especies de *Candida* identificadas las dos principales fueron *C. albicans* (25%) y *C. glabrata* (20%).

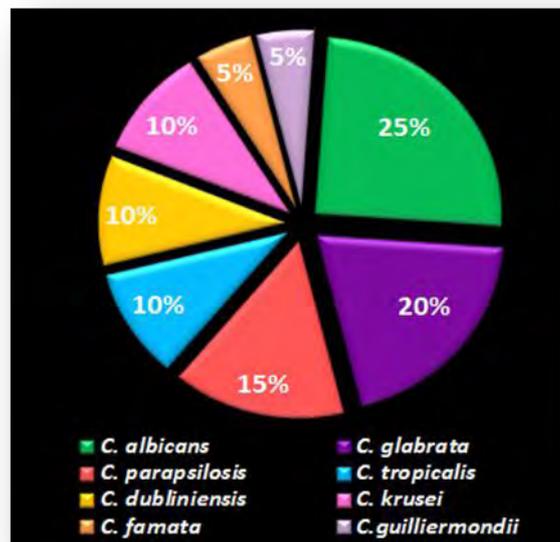


Figura 30. Especies de *Candida* identificadas y obtenidas del área intraluminal de los catéteres procesados.

Al analizar los resultados de la tabla 22 y 23, se muestra la relación entre las UFC de los aislados levaduriformes y bacterias obtenidas, el factor de riesgo y la permanencia del catéter en el paciente. La colonización por *Candida* se presentó en el 14% de los pacientes, ya que los catéteres procesados presentaron un tiempo de permanencia <14 días y las UFC fueron de 15 col/mL, asociados a una variabilidad de factores de riesgo (De 1 a 4). En cambio la infección por *Candida* spp. se presentó en el 38.3% de los pacientes, con tiempo de permanencia del catéter >14 días y UFC >1000 col/mL, con tres o más factores de riesgo asociados.

Tabla 22. Relación entre los aislados obtenidos, factores de riesgo y el tiempo de permanencia del catéter

CATÉTER	No./UFC LEVADURAS	BACTERIAS	LEVADURAS	T. P. *	FACTORES DE RIESGO Y ENFERMEDAD ASOCIADA
CAT-5 (CVC)	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>C. famata</i>	8	Cáncer de ovario
CAT-9 (S. Foley)	> 1000	NEGATIVO	<i>C. albicans</i>	12	DM2, Antibioticoterapia
CAT-11 (2)^a (CVC)	> 1000	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>C. parapsilosis</i>	6	Prematuro y bajo peso
CAT-14 (Tenckoff)	> 1000	<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>C. guilliermondii</i>	30	DM2, IRC, Peritonitis
CAT-15 (S. Foley)	> 1000	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i>	16	Absceso cervical, DM2, FALLECE 23-04-12 Gastrolisis
CAT-18 (S. Foley)	> 1000 2 57	<i>Escherichia coli</i>	<i>C. dubliniensis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i>	8	disfuncional, Antibioticoterapia, Sangrado tubo digestivo
CAT-19 (S. Foley)	> 1000	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	11	Cáncer, IVU , Sepsis grave, Antibioticoterapia FALLECIÓ
CAT-21 (1)^b (CVC)	8	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>C. albicans</i>	22	Sepsis, IVU, DM2, antibioticoterapia
CAT-25 (2)^b (CVC)	2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>C. glabrata</i>	22	Sepsis, IVU, DM2, antibioticoterapia
CAT-33 (4)^c (CVC)	> 1000	NEGATIVO	<i>C. parapsilosis</i>	3	Prematuro, bajo peso, SEPSIS, FALLECIÓ
CAT-37 (Mahurkar)	50	<i>Serratia marcesces</i>	<i>C. parapsilosis</i>	4	DM2, IRC, Hemodiálisis, antibioticoterapia
CAT-43 (CVC)	> 1000	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>C. albicans</i>	13	Neumonía nosocomial, antibioticoterapia
CAT-47 (Mahurkar)	> 1000	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>C. albicans</i>	90	DM2, IRC, Hemodiálisis, antibioticoterapia. FALLECIÓ
CAT-51 (Tenckoff)	> 1000	<i>Escherichia coli</i>	<i>C. krusei</i>	13	DM2, IRC, Peritonitis, antibioticoterapia

CATÉTER	No./UFC COLONIAS	BACTERIAS	LEVADURAS	T. P.*	FACTORES RIESGO ENFERMEDADES ASOCIADAS	DE Y
CAT-52 (S. Foley)	> 1000	<i>Escherichia coli</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i>	42	DM2, IVU, Anemia normocítica, antibioticoterapia.	
CAT-56 (S. Foley)	> 1000	<i>Escherichia coli</i>	<i>C. tropicalis</i>	13	Evento vascular cerebral, IVU, Neumonía nosocomial, antibioticoterapia	

IRC: Infección Renal Crónica, CAT-Número: catéter y número de muestra

*T.P.=Tiempo de permanencia (días)

a Segunda muestra de catéter, la primera muestra CAT-10, mismo paciente

b Primer muestra: CAT-21, segunda muestra: CAT-25, ambas del mismo paciente

c Cuarta muestra de catéter, la tercera fue: CAT-31, la segunda: CAT-27 y la primera: CAT-23

Tabla 23. Relación entre colonización e Infección en los pacientes asociados a catéteres

Colonización	No. Pacientes	%	Infección	No. Pacientes	%
Colonización por bacterias Gram +	10	72	Infección por bacterias Gram -	15	44.10
Colonización por bacterias Gram -	2	14	Infección por bacterias Gram +	6	17.6
Colonización por <i>Candida</i> spp	2	14	Infección por <i>Candida</i> spp.	13	38.3
Colonización TOTAL	14	100	Infección TOTAL	34	100

Al tomar en cuenta únicamente los resultados relacionados con el aislamiento de levaduras a partir se encontró que el 90% de los aislados levaduriformes a partir de las muestras de catéter se relacionaron con infección y una mortalidad del 26.7% (en adultos en el 23.1% y en el recién nacido el 50%). Este fenómeno se presentó en los casos en los que se aislaron especies de *Candida* no *C. albicans*, comparada con *C. albicans*. Por otro lado, también influyó el mayor tiempo de permanencia del catéter (Tabla 24).

Tabla 24. Mortalidad asociada a los aislados de *Candida* spp. y permanencia del catéter.

ESPECIE DE LEVADURA	TIEMPO DE PERMANENCIA (DÍAS)	MORTALIDAD
<i>C. albicans</i>	12-90	1/5
<i>C. parapsilosis</i>	03-06	1/3
<i>C. tropicalis</i>	11-13	1/2
<i>C. glabrata</i>	08-43	1/4
<i>C. dubliniensis</i>	08-16	1/2

Resultados de la prueba de sensibilidad a los antifúngicos.

En la tabla 25 se muestra los resultados de la CMI obtenida para los 8 antifúngicos probados frente a los 23 aislados obtenidos y se compararon con los criterios de sensibilidad, sensible dosis dependiente y resistente descritos en el documento M27-A3 del CLSI²⁴.

Tabla 25. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) obtenida en los diversos antifúngicos frente a las levaduras aisladas.

CLAVE	ESPECIE	KTZ	FLZ	ITZ	VRZ	PZC	AMB	CSF	ANF
ATCC 2002	<i>C. glabrata</i>	0.03	2.0	0.06	0.125	0.125	4.0	0.5	0.125
1721372	<i>C. albicans</i>	16.0	2.0	16.0	1.0	0.25	1.0	0.25	0.06
YMA-579	<i>C. dubliniensis</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	1.0	0.25	0.06
CAT-5	<i>C. famata</i>	0.03	2.0	0.06	0.125	0.125	4.0	0.5	0.125
CAT-9	<i>C. albicans</i>	16.0	64.0	16.0	16.0	16.0	1.0	0.125	0.06
CAT-11 (2)	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.125	0.06	0.06	0.06	1.0	2.0	1.0
CAT-14	<i>C. guilliermondii</i>	0.03	0.125	0.03	0.25	0.25	0.5	0.125	0.125
CAT-15V	<i>C. dubliniensis</i>	0.125	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.125	0.06
CAT-15M	<i>C. glabrata</i>	16.0	2.0	0.5	0.5	16.0	0.5	0.25	0.06
CAT-18V	<i>C. dubliniensis</i>	0.03	0.125	0.03	2.0	0.03	0.5	0.125	0.06
CAT-18R	<i>C. krusei</i>	2.0	4.0	0.5	0.5	0.125	2.0	1.0	0.25
CAT-18M	<i>C. glabrata</i>	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.0	0.25	0.06
CAT-19	<i>C. tropicalis</i>	16.0	64.0	0.125	16.0	0.5	1.0	0.25	0.06
CAT-21(1)*	<i>C. albicans</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	0.5	0.125	0.06
CAT-25(2)*	<i>C. glabrata</i>	0.5	2.0	16.0	2.0	0.25	1.0	0.25	0.06
CAT-33(4)	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	0.125	0.03	0.06	0.06	1.0	16.0	2.0
CAT-37	<i>C. parapsilosis</i>	0.125	2.0	0.03	0.03	0.03	1.0	16.0	2.0
CAT-43	<i>C. albicans</i>	16.0	16.0	4.0	16.0	16.0	1.0	0.25	0.06
CAT-47	<i>C. albicans</i>	2.0	64.0	1.0	8.0	16.0	1.0	0.125	0.06
CAT-51	<i>C. krusei</i>	0.03	0.125	0.03	0.03	0.03	16.0	16.0	4.0

CLAVE	ESPECIE	KTZ	FLZ	ITZ	VRZ	PZC	AMB	CSF	ANF
CAT-52v	<i>C. albicans</i>	16.0	64.0	16.0	16.0	16.0	4.0	0.25	0.06
CAT-52M	<i>C. glabrata</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	0.25	4.0	0.25	0.06
CAT-56	<i>C. tropicalis</i>	1.0	2.0	2.0	16.0	0.5	1.0	4.0	0.06
Promedio	20 aislados	4.48	14.44	2.92	4.78	4.21	2.12	2.9	0.51

Rojo= resistentes; Azul= sensible-dosis dependiente; Negro= sensibles

En la Fig. 31 se presenta la gráfica de las CMI de la actividad de los 8 antifúngicos probados contra los diversos aislados levaduriformes problema. De todos los antifúngicos los que mostraron la mayor actividad fueron anfotericina B y anidulafungina, ya que a la menor concentración del antifúngico (0.3 µg/mL y 0.06 µg/mL, respectivamente), se observó el 100% de inhibición del crecimiento de las levaduras en el 75% y 85%, respectivamente. De los cuatro triazoles (FLZ, ITZ, VRZ, PZC) probados, el que mostró la mayor actividad fue fluconazol, ya que el 80% de los aislados fueron sensibles.

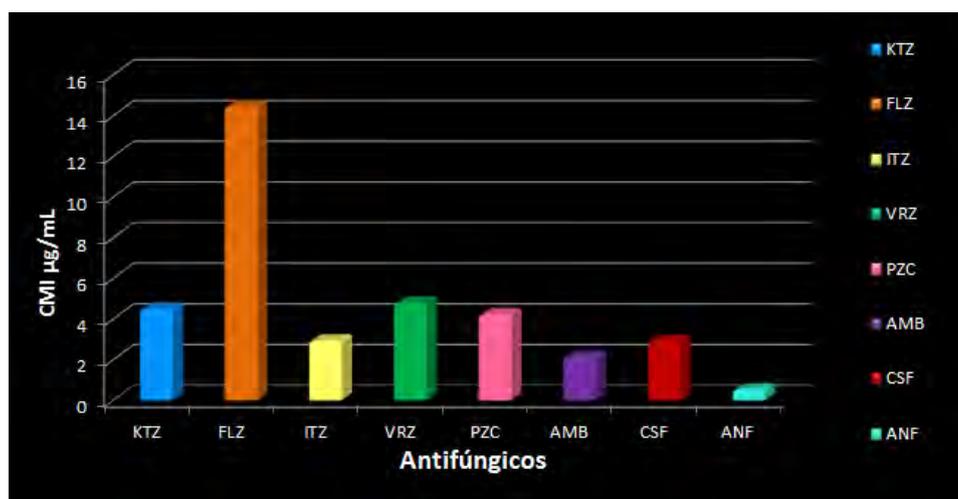


Figura 31 CMI (µg/mL) de los antifúngicos evaluados: KTZ: ketoconazol; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; VRZ: voriconazol; PZC: posaconazol, AMB: anfotericina B, CSF: caspofungina y ANF: anidulafungina

De los antifúngicos evaluados los que mostraron la mayor resistencia fueron ketoconazol en un 50%, seguido por itraconazol en el 40% (Fig.32).

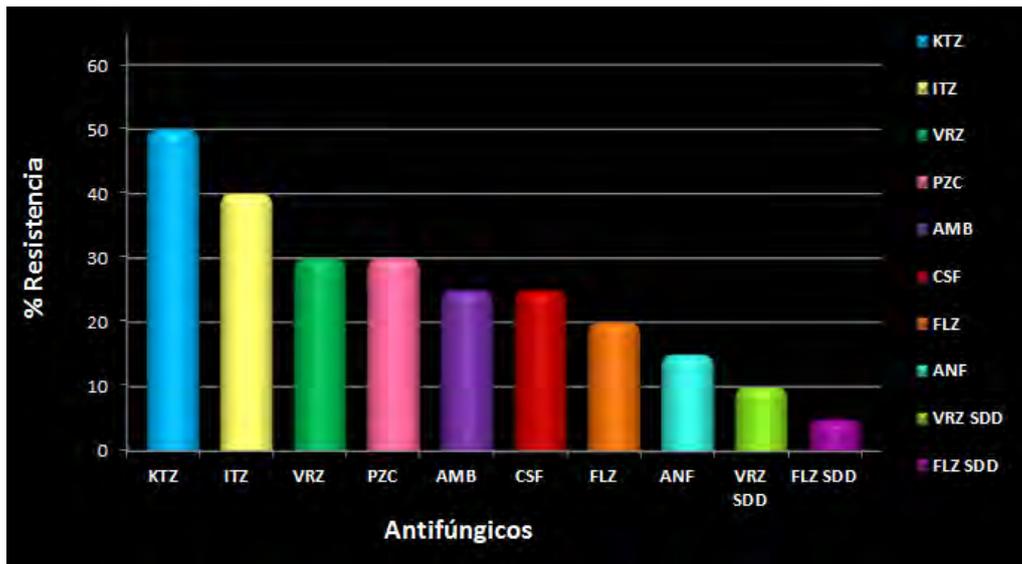


Figura 32. Resistencia de los aislados levaduriformes a los antifúngicos

La actividad de todos los antifúngicos contra las diversas especies de *Candida* se observa en la Fig. 33, donde el 80% de los aislados de *C. albicans* presentaron resistencia a 4 de los azoles (KTZ, ITZ, VRZ y PZC); el 60% a FLZ; y solo el 20% a CSF. El 20% de los aislados mostró resistencia a 6 de los antifúngicos (KTZ, ITZ, VRZ, PZC, FLZ y CSF). En cambio, *C. parapsilosis* presentó resistencia a las dos equinocandinas, CSF y ANF, en el 100% de los aislados y en el 66.6%, respectivamente. *C. glabrata* presentó resistencia frente a tres de los azoles el 75% de los aislados para ITZ y KTZ y el 50% para PZC. El 100% de los aislados de *C. tropicalis* fue resistente frente a KTZ y VRZ, y el 50% a FLZ, ITZ y CSF. Por otra parte el 100% de los aislados de *C. krusei* mostró resistencia frente a AMB y en el 50% a CSF, ANF y KTZ. Finalmente *C. dubliniensis* fue SDD frente a VRZ.

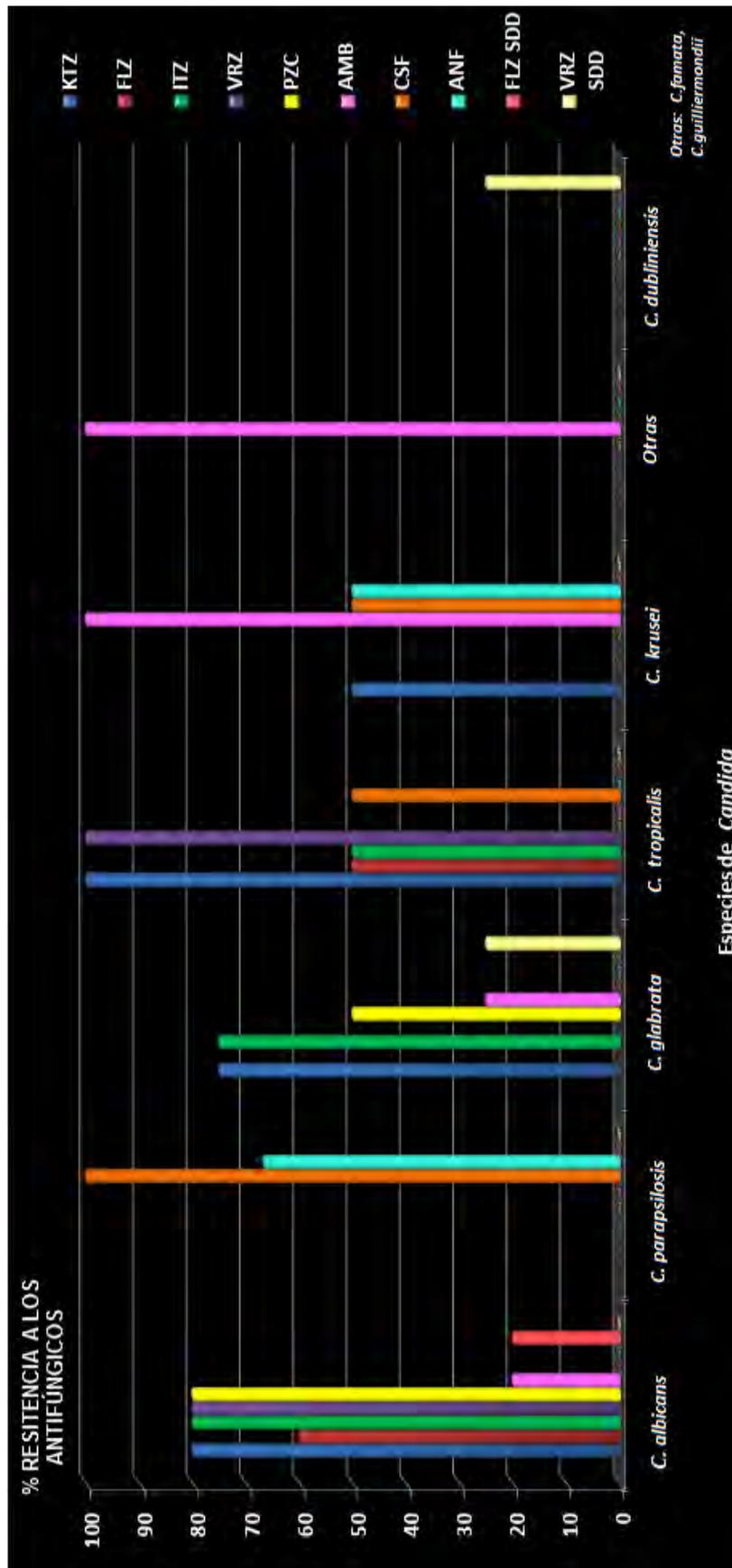


Figura 33. Relación entre la resistencia de las especies de *Candida* a los diversos antifúngicos.

6. DISCUSIÓN

Las levaduras del género *Candida* son los principales hongos causantes de fungemias, llegan al torrente sanguíneo, en su mayoría procedentes de la piel, a través de los dispositivos médicos (CVC), a los cuales pueden adherirse por la secreción de proteínas glicosiladas y posiblemente formen biopelículas²². Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el 86% de la colonización de los catéteres se debe a bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*), seguidas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis*), y solo el 14% se relacionó con *Candida* spp. Mundialmente, la mayoría de descripciones de aislamientos que colonizan los catéteres fueron principalmente bacterias Gram positivas^{22,32,39,55, 59,66, 69, 85,121}. Por otro lado en el presente trabajo, el 60% de los aislados se asoció con infecciones por bacterias; este hallazgo fue similar a lo reportado por otros autores²⁹, aparentemente por la formación de biopelículas microbianas, situación que ha ido en aumento en los últimos años^{32, 39}. En el presente estudio el 38.3% se relacionó con infección causada por especies de *Candida*, a diferencia de los reportes de Pemán J y cols⁸⁷ y Horn D. y cols⁴⁹ que va del 8% al 10.4%.

El aislamiento de levaduras se incrementa aparentemente con la variación en las técnicas cuantitativas como lo han descrito varios autores^{19, 23,109}; en el presente trabajo con la modificación en la técnica de obtención del espécimen se aislaron levaduras del género *Candida* en el 35% de las muestras procesadas. Otra posible explicación es la utilización de medios de cultivo más sensibles y específicos para el aislamiento de levaduras, que a diferencia de la técnica usada en el laboratorio de Microbiología y medios de cultivo para el aislamiento de bacterias, disminuye el desarrollo de levaduras. En el presente estudio el uso de cuatro medios, permitió saber el indicador de sensibilidad, el cual mostró la capacidad del medio de cultivo para permitir solo el crecimiento de colonias levaduriformes y la especificidad confirmó la presencia del crecimiento de levaduras en el medio y de que existe, una baja

frecuencia con levaduras y bacterias (falsos positivos); en este caso el valor de sensibilidad más alto fue obtenido con CH (70.6%) y una especificidad del 95%, seguido por BC con una sensibilidad del 30.3% y con especificidad del 96%. Los valores más bajos de sensibilidad fueron del 25% y 20.7%, la cual correspondió a ADS-CIP y ADS-CC, respectivamente. Posiblemente los valores bajos de sensibilidad obtenidos pueden deberse a la resistencia de los antimicrobianos contra las bacterias utilizados en los medios de cultivo. Otros parámetros que reforzaron los resultados fueron la obtención de los valores de VPP y el VPN, los cuales indicaron la probabilidad de que solo en el medio se desarrolle crecimiento de levaduras, para CH el VPP fue de 85.7% y el VPN de 95%; Con BC el VPP fue de 90.9 % y el VPN de 96%; los valores para los otros dos medios fueron más bajos. Con las pruebas anteriores y con base en el estudio de Albert A. y cols³ el medio que resultó más sensible y específico para el aislamiento primario y la identificación presuntiva de levaduras del género *Candida* fue CHROMagar *Candida*TM. A pesar del resultado este medio se debe complementar con pruebas morfológicas y fisiológicas para identificación final del agente.

Es importante tomar en cuenta que los hongos que forman parte de la microbiota comensal de la piel serían los principales microorganismos que podrían desencadenar diversos mecanismos para invadir los tejidos del hospedero^{50,80,116}, por la transformación o dimorfismo^{76,118}, la capacidad de adherencia^{76,81,119} y la formación de biopelículas en las superficies de los diversos tipos de los catéteres^{4, 14,20,25, 56, 75} y colonizar estos dispositivos^{27,113}; aunado a la carga fúngica, el tiempo de permanencia del catéter y factores de riesgo inherentes a los pacientes^{32,66,86,89,94,96,97,119}. Todos estos factores podrían estar involucrados y desencadenar una infección en el hospedero. Recientemente, Chander y cols²² aislaron a *Candida* en el 5.8% como causante de infecciones sanguíneas detectadas por hemocultivos en pacientes ingresados principalmente en la UCI, de los cuales 9.8% de los pacientes se les aplicó CVC. En el presente estudio la asociación con este factor de riesgo fue de 31%, resultado similar al reportado por otros investigadores^{60, 85,108}. Además de la administración de antimicrobianos de amplio espectro y DM2 fueron otros dos factores de riesgo relacionados a la presencia de levaduras en

el catéter como colonización y/o agente causal de infección sanguínea, hallazgos observados en el presente trabajo y que coincidieron con los reportes de otros autores^{22,60,68,89}. Así mismo, la asociación con DM2 que afectó principalmente a las mujeres y fue un factor que aparentemente ha aumentado el potencial de colonización por *Candida* spp., observación también descrita por Seddiki y cols¹⁰⁸.

Los resultados de este estudio coinciden con la tendencia reportada en diversas partes del mundo, donde la frecuencia de colonización e infección por las especies de *Candida* estuvo relacionada a la aplicación del catéter en los pacientes con enfermedades graves, principalmente por las especies de *Candida* diferentes a *C. albicans*^{4, 27, 34, 40, 49, 63, 82, 88,102,108}. La edad fue otro parámetro que se tomó en cuenta en la colonización de los catéteres por *Candida* spp., con base en los resultados obtenidos, los pacientes más afectados fueron los adultos mayores y los recién nacidos, similar a la descripción por otros autores^{6, 27,107}. En los adultos además se asoció a dos factores más (antibioticoterapia y DM2), donde la principal especie aislada fue *C. albicans* (25%), similar a la descripción de la literatura^{4, 27, 49,88}. Otra de las especies aislada en estos pacientes fue *C. glabrata* (20%), similar a lo reportado en EUA y contrario a las descripciones de América Latina (5-8%)^{27, 82, 87,93}. Mientras que, en los recién nacidos de bajo peso y prematuros; así como pacientes adultos sometidos a hemodiálisis, la especie que predominó fue *C. parapsilosis*, estos resultados coincidieron con lo reportado en América Latina y España^{27, 40, 83,87, 93}.

De acuerdo a los estudios en América Latina, *C. tropicalis* se ha aislado en el 15% a 21%, donde los factores asociados son neoplasias e infección de vías urinarias y administración de antibióticos de amplio espectro por tiempo prolongado^{93, 52,83}. En el presente estudio se aisló en el 10% de los casos, este porcentaje es menor al reporte de González G y cols⁴⁰.

Otras de las especies aisladas fueron *C. krusei* y *C. dubliniensis*, en el 10% y 5%, respectivamente, en comparación a la descripción en diferentes zonas geográficas que va del 2% al 4%^{83,107}. De un paciente se aisló la asociación de las dos especies del mismo dispositivo diversos factores de riesgo (gastrolisis disfuncional, sangrado de tubo digestivo y administración de

antibióticos de amplio espectro) y en otro paciente la asociación de *C. dubliniensis* fue con *C. glabrata*, cuyos factores de riesgo del paciente fueron DM2, peritonitis y tratamiento con antibióticos.

Por otro lado, *C. dubliniensis*, generalmente no se ha asociado a infección sanguínea relacionada a CVC; esta especie es causante de candiduria asociada a DM2 y antibioticoterapia⁷³. En el presente estudio se aisló de un paciente con IVU, hallazgo que coincide con Jain y cols⁵². *Candida guilliermondii* y *C. famata* se asilaron en un 5% similar a la anterior y concuerda con el rango de 3% a 5% reportado en la literatura^{3, 40, 49,92}. En el presente estudio los factores de riesgo que presentaron los pacientes, en quienes se asociaron estas especies fueron peritonitis, DM2 y cáncer.

En este trabajo la colonización por especies de *Candida* se observó en los catéteres que permanecieron de 4 a 8 días en el paciente y no presentaron síntomas asociados (fiebre, >38°C, hipotensión, oliguria, eritema, material purulento en el sitio de entrada y/o salida); el número de UFC obtenido <10³ colonias/mL; estos resultados coincidieron con lo reportado por varios autores^{17, 59,97}, donde asocian una permanencia <14 días para la colonización. En cambio en el establecimiento de la infección por *Candida*, el tiempo de permanencia del catéter fue de 11 a 16 días con un promedio de 14.3 ± 13.2 días y el número de UFC >1000 colonias/mL, además de la presencia de más de dos factores de riesgo en los pacientes y con síntomas de septicemia, estos hallazgos son similares a la descripción de diversos autores^{16, 17, 96,97, 59}, los cuales señalaron que la permanencia de catéteres >14 días, es común la vía de colonización más frecuente sea la intraluminal, aunado a la carga fúngica serían probablemente los dos factores más críticos para el desarrollo de la infección por *Candida*.

Otra observación realizada que cabe mencionar son interacciones relacionadas a la infección por el establecimiento posiblemente de biopelículas en los catéteres, de las cuales fueron catalogadas de tipo monomicrobiana como en el caso de la muestra CAT-9, donde solo se aisló *C. albicans*; también se observaron tipo polimicrobiana, como en la muestra CAT-21 con la interacción entre *Staphylococcus aureus* y *C. albicans*. De acuerdo a Ibarra-

Trujillo C y cols⁵¹ esta interacción tiene un efecto sinérgico, por el incremento de la virulencia de la biopelícula. Otra interacción interesante de mencionar es la de *Pseudomonas aeruginosa* con *Candida famata*, con base en el estudio de Holcombe LJ⁴⁸, esta interacción aparentemente tiene un efecto antagónico puesto que la bacteria Gram negativa secreta una sustancia llamada 3-oxo-C12 que ocasiona la muerte de la levadura, aunque se obtuvo aislamiento levaduriforme solo en BC; puede ser que la presencia de esta bacteria haya ocasionado una inhibición en el crecimiento de esta especie, aunado a la velocidad de crecimiento bacteriano mayor a la levadura, lo que posiblemente no permitió el desarrollo en los medios de cultivo utilizados en 7 muestras de catéter procesadas, donde se aisló solamente esta bacteria y ninguna especie de *Candida*. También debe tomarse la capacidad anti-*Candida* de *Pseudomonas aeruginosa*, fenómeno descrito desde hace 19 años⁵⁴, ya que aparentemente el pigmento (piocinina)^{7,53} producido por esta bacteria tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diversas especies de *Candida* lo que podría explicar la ausencia de crecimiento en agar sangre y manitol. Por otro lado las purpurinas de esta bacteria han demostrado que evita el desarrollo de las hifas que son esenciales para la invasión del tejido por *Candida*¹²⁰.

Es de llamar la atención que en la muestra CAT-18 se presentó una interacción agonista entre la asociación de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. glabrata* con *E. coli*; de acuerdo a las observaciones de Samaranayake LP y cols¹⁰² *C. krusei* produce sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, pero a pesar de la presencia de esta especie, en el presente trabajo se observó el desarrollo de >1000 colonias/mL de *C. albicans*, además si se toman en cuenta los factores de riesgo, probablemente esta especie fue la causante de la infección en el paciente.

Otro de los hallazgos relacionados con la duración y el tipo de catéter, como en el caso de la muestra CAT-47 de tipo Mahurkar, donde se aisló a *C. albicans*, del catéter de paciente con varios factores de riesgo entre ellos DM2, insuficiencia renal crónica en tratamiento con hemodiálisis, cuya tiempo de permanencia fue de 90 días. Este paciente recibió tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro para controlar el aislamiento de

Acinetobacter baumannii; posiblemente el uso de los antibióticos pudo ocasionar que *C. albicans* se comportara como patógeno y expresara diversos factores de virulencia y la mortalidad del paciente. Esta combinación de los dos microorganismos es antagónica, ya que Shirliff M. y cols¹¹¹ demostraron que *C. albicans* produce farnesol capaz de inhibir a las bacterias Gram negativas y potenciar la infección por la levadura.

Diversos autores^{1, 40,61} han reportado que *C. parapsilosis* es causante en 27.6% de septicemias en neonatos la mortalidad que se ha presentado en estos pacientes es menor (23.7%) comparada con *C. albicans* que es 45.6%⁴⁹. En el presente esta especie fue aislada a partir de un CVC (CAT-33) que correspondió a un paciente prematuro y fue aparentemente el causante de su fallecimiento. El CVC fue procesado en cuatro recambios, en el cuarto se obtuvieron numerosas colonias de *C. parapsilosis* solo en CHROMagar *Candida*TM y ningún aislado bacteriano; es relevante mencionar que las tres muestras anteriores de catéteres, el primero con duración de 8 días en el paciente se aisló *Escherichia coli*, el segundo duró 6 días y no se obtuvo ningún microorganismo, a partir del tercer catéter que duró 3 días se aisló *Staphylococcus haemolyticus*. El paciente presentó manifestaciones de septicemia desde el procesamiento del primer catéter, probablemente no se detectó *C. parapsilosis* desde la primera muestra, debido a la formación de la biopelícula polimicrobiana en las paredes internas del dispositivo; un elemento importante a tomar en cuenta es la velocidad de crecimiento, que es mayor para las bacterias, comparada con las levaduras, además de la competencia por los nutrientes¹² a veces una opción oportuna es retirar el catéter a tiempo⁴⁹, aunque en el paciente de este estudio no fue de utilidad a pesar de que el tiempo promedio de la permanencia del catéter fue corta (5 días), la evolución fue fatal.

De acuerdo con el estudio de Horn DL y cols⁴⁹ *C. tropicalis* es la tercera especie causante de candidemias (8.1%), cuyos factores de riesgo fueron diversas enfermedades generales y procedimientos terapéuticos. En este trabajo esta especie se aisló del catéter (CAT-19) de una paciente femenina, adulta, con DM2 descompensada, IVU, cáncer y administración de antibióticos

de amplio espectro y permanencia de 11 días; curso con septicemia y falleció. Esta especie se asoció con *Enterococcus faecalis* los cuales aparentemente tienen la capacidad de formar biopelículas polimicrobianas y presentan un efecto agonista asociado a infección^{48, 51, 117}.

La asociación de *C. dubliniensis* y *C. glabrata* (CAT-15) se relacionó con el fallecimiento de una paciente del género femenino, con un absceso cervical, DM2, con un tiempo de permanencia del catéter de 16 días, existió interacción en la biopelícula polimicrobiana de levaduras con bacterias (*Klebsiella pneumoniae*) es posible que la combinación tuvo un efecto agonista en la prolongación de la infección y el fallecimiento del paciente como lo ha reportado Samaranayake y cols¹⁰².

La causa más probable del fallecimiento de este tipo de pacientes se debe a la interrelación de múltiples factores como la infección secundaria por la aplicación de catéteres, la especie de *Candida* colonizante, la interacción polimicrobiana de la biopelícula, los factores de riesgo asociados e inadecuada terapia. El mayor número de especies de *Candida* no *C. albicans* están asociadas a mayor mortalidad comparada con *C. albicans*. Otro factor a tomar en cuenta es el tiempo prolongado de permanencia del catéter en el paciente. En este trabajo el mayor tiempo de permanencia fue de 12 a 90 días, que correspondió a *C. albicans*; mientras que con *C. parapsilosis*, el tiempo fue de 3 a 6 días. La colonización de *Candida* en catéteres podría ser un marcador que va a indicar candidosis invasiva³⁷, analizando los factores de riesgo del paciente; el inicio de tratamiento antifúngico en muchas ocasiones se retrasa hasta la confirmación de la candidemia, lo cual podría explicar la elevada mortalidad de este proceso.

La administración oportuna de diversos antifúngicos es para limitar el desarrollo de las levaduras. Fluconazol es de los antifúngicos más comunes que se indican en las candidemias (67.7%), seguido por caspofungina (38.1%) y en menor proporción voriconazol (6.7%). Independiente de la sensibilidad de la levadura a los diversos antifúngicos la mortalidad varía del 30 al 81% en candidemias⁷⁹. En este estudio del total de pacientes con aislados

levaduriformes el 26.7% presentó evolución fatal; en adultos representó el 23.1% y en neonatos el 50%. De acuerdo a la descripción Del Palacio y cols²⁷ la tasa de mortalidad de adultos se ubica entre un 15% y un 40%, es decir, los resultados están dentro, pero difiere con la tasa de mortalidad para neonatos que está entre el 10 y el 15%.

Con base en los resultados de la sensibilidad antifúngica *in vitro* en los aislados levaduriformes obtenidos se observó que FLZ presentó la mayor actividad frente a las diversas especies de *Candida* que fue similar al estudio de Pfaller MA⁹¹. En cambio frente a VRZ, triazol de 2ª generación molécula derivada de FLZ, presentó una actividad menor, el 30% de los aislados mostraron resistencia a este antifúngico, comparada con el 20% a FLZ, esto coincide con el reporte de Cuenca-Estrella²⁶ y Pfaller MA⁹³, donde la resistencia fluctúa de 10% a 30% para FLZ. Cabe mencionar que el PZC también es otro triazol de 2ª generación con una actividad *in vitro* cuatro veces mayor al ITZ⁴¹, en el presente estudio se observó que efectivamente la actividad del PZC fue mayor a la de ITZ, ya que el porcentaje de sensibilidad fue de 70% y 60%, respectivamente.

Candida albicans presentó una resistencia alta frente a los azoles^{26,52,91,93} en este trabajo se observó que cerca del 80% de los aislados de *C. albicans* fue resistente a KTZ, ITZ, PZC, VRZ y el 60% a FLZ. Por otro lado diversos autores coinciden con un aumento en la resistencia de *C. glabrata* frente a los azoles^{26, 33, 91}; este hallazgo se relaciona con lo obtenido en este estudio, ya que el 75% mostró resistencia a KTZ e ITZ y el 50% a PZC. En *C. tropicalis* se encontró resistencia cruzada a los azoles ya que todos los aislados fueron resistentes a KTZ y VRZ, la mitad mostró resistencia frente a FLZ e ITZ.

En el presente estudio, se evaluaron dos equinocandinas ANF y CSF, la anidulafungina es la que presentó mayor actividad para inhibir el crecimiento de las especies de *Candida*; algunos autores han descrito que *C. parapsilosis* y *C. krusei* han presentado resistencia a las equinocandinas^{33, 93}. En el presente el 100% de los aislados de *C. parapsilosis* presentó resistencia a CSF y el 66.6% a ANF, mientras que el 50% de los aislados *C. krusei* fue resistente a CSF y a ANF. Espinel-Ingroff³³ reportó que se requieren concentraciones mínimas inhibitorias más bajas para ANF que para CSF, lo cual coincide con este

trabajo. De acuerdo con Ramage y cols⁹⁸ describieron la persistencia en la resistencia en *C. krusei* y *C. albicans* frente a anfotericina B; esto coincide con el presente estudio donde el 20% de los aislados de *C. albicans*, el 100% de *C. krusei* y el 25% *C. glabrata* mostraron dicha resistencia.

Uno de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos en las especies de *Candida* es la formación de biopelículas por la interacción de especies de *Candida* con *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*, esta asociación de microorganismos incrementa la viscosidad de la matriz lo que ocasiona la disminución en la velocidad de difusión y en la actividad de los antifúngicos^{14, 20, 30, 105}. La resistencia a los antifúngicos es una de las principales explicaciones que se presentan en las infecciones nosocomiales que desencadenan en el agravamiento del paciente, estancia prolongada y resulta la mayoría de las veces en su fallecimiento¹⁰².

La importancia de estos trabajos, es identificar oportunamente a la levadura causante de fungemias en los pacientes que presentan múltiples factores de riesgo, a los cuales se les ha aplicado algún dispositivo médico, de tal manera que podría ser un marcador sustituto para indicar una micosis invasiva^{37, 110}. El retraso en la administración del tratamiento antifúngico eleva la mortalidad en estos pacientes, aunado a la remoción tardía del catéter venoso central, lo cual tiene un efecto primordial para evitar la diseminación de la levadura.

7. CONCLUSIONES

- ✚ Con la variación en la técnica de toma de muestra, en el 35% de los catéteres hubo desarrollo de diversas especies de *Candida* en la pared intraluminal.
- ✚ Los principales factores de riesgo relacionados a la infección fueron la administración de antibióticos de amplio espectro y diabetes mellitus tipo 2. El 14% de los aislados se relacionó con la colonización de los catéteres, el tiempo de permanencia en el paciente fue de 4 a 8 días; y el 38.3% con infección, con un tiempo de permanencia mayor a 14 días.
- ✚ CHROMagar *Candida*™ fue el más sensible y específico en el aislamiento primario, la identificación presuntiva y asociaciones de especies de *Candida* spp.
- ✚ El 75% de los aislados correspondió a diferentes especies de *Candida* y el 25% a *Candida albicans*.
- ✚ La tasa de mortalidad relacionada con *Candida* spp. fue del 26.7%, el 23.1% correspondió a pacientes adultos y el 50% a neonatos.
- ✚ De los siete antifúngicos probados el que mostró la mayor resistencia fue ketoconazol (50%) y la menor anidulafungina (15%). contra las diversas especies de *Candida*.
- ✚ *Candida albicans* presentó resistencia cruzada frente a los azoles, el 80% de los aislados a ketoconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol. Mientras que el 75% de los aislados de *C.glabrata* a ketoconazol e itraconazol y el 50% a posaconazol.
- ✚ Todos los aislados de *C. parapsilosis* mostraron resistencia solo a las equinocandinas, en el 100% a caspofungina y en el 66.6% a anidulafungina.
- ✚ El 50% de los aislados *C. krusei* mostró resistencia a las equinocandinas y el 100% frente a anfotericina B.

PERSPECTIVAS

- 1.- Realizar ensayos *in vitro* de formación de biopelículas sobre diversos dispositivos con los aislados de *Candida* spp. obtenidos de catéteres.
- 2.- Identificar y cuantificar por microdilución en placa las especies con capacidad de formar biopelículas
- 3.- Determinar la relación entre la resistencia a los antifúngicos y la formación de biopelículas por las diferentes especies estudiadas.

ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
µg	microgramos
µm	micrómetros
A.C	Antes de Cristo
ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
ADS-CC	Agar Dextrosa Sabouraud más Cicloheximida y Cloranfenicol
ADS-CIP	Agar Dextrosa Sabouraud más Ciprofloxacino
AMB	Anfotericina B
ANF	Anidulafungina
Aprox.	Aproximadamente
BC	Agar Brillante <i>Candida</i> ™
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C.dublinskiensis</i>	<i>Candida dublinskiensis</i>
<i>C.famata</i>	<i>Candida famata</i>
<i>C.glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C.guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C.krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C.parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C.tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Ca ²⁺	Catión calcio
CAT-Número	Número de Catéter
CE	Células Epiteliales
CH	CHROMAgar <i>Candida</i> ™
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Col/mL	Colonias por mililitro
CSF	Caspofungina
CVC	Catéter Venoso Central
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLZ	Fluconazol
h	horas
HM	Harina de Maíz
Ig A	Inmunoglobulina A
IRC	Infección Renal Crónica
ISRC	Infección Sanguínea Relacionada a Catéter
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
ITZ	Itraconazol
IVU	Infección de Vías Urinarias
K ⁺	Catión potasio
KTZ	Ketoconazol
Mg ²⁺	Catión magnesio

mL	mililitros
Na ⁺	Catión sodio
pH	Valor de acidez
PZC	Posaconazol
SDD	Sensible Dosis Dependiente
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
spp.	especies
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
VRZ	Voriconazol

ANEXOS. MEDIOS DE CULTIVO Y TINCIONES.

ADS (Agar Dextrosa Sabouraud) (BD BIOXON ®)

Componentes	
Peptona especial	10 g
Glucosa	20 g
Agar-Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Es el medio clásico de aislamiento, utilizado de forma universal para la identificación y mantenimiento de los hongos saprobios y patógenos.

Preparación.

Preparar 1000 mL de medio, agregar 65 g de ADS, y posteriormente agregar agua destilada, calentar el medio hasta disolución, y por último esterilizar durante 15 min a 121 °C, dejar enfriar y verter en cajas Petri.

ADS (Agar Dextrosa Sabouraud con antibióticos) (BD BBL™ Mycosel™)

Componentes	
Peptona de soya	10 g
Glucosa	20 g
Agar-Agar	15 g
Cloranfenicol	50 mg
Actidiona (cicloheximida)	400 mg
Agua destilada	1000 mL

Este medio se utiliza para el aislamiento de hongos patógenos cabe señalar que la cicloheximida inhibe el desarrollo de los hongos contaminantes y el cloranfenicol inhibe las bacterias.

Preparación.

Disolver 36 g del agar, agregar los 1000 mL de agua destilada esterilizar durante 15 min a 121 °C, calentar el medio hasta disolución, dejar enfriar y verter en cajas Petri.

Agar Harina de maíz (BD BBL™) adicionado con Tween 80

Componentes	
Infusión de harina de maíz	2.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH	6.0 ± 2.0

Se utiliza para la producción de pseudohifas de levaduras del género *Candida* y producción de clamidoconidios.

Preparación.

Disolver en 1000 mL de agua destilada 17 g de agar harina de maíz, disolver por calentamiento, añadir Tween 80 al 1%, mezclar y esterilizar a 121 °C por 15 min, dejar enfriar y verter en cajas Petri.

CHROMAgar *Candida*™ (BBL™)

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

Este medio se utiliza para diferenciar las especies de *Candida* por color de la colonia, color verde para *C. albicans*, azul para *C. tropicalis*, morada *C. glabrata* y de color rosado con halo blanco para *C. krusei*.

Preparación.

Disolver 47,7 g de medio de cultivo en 1000 mL de agua destilada estéril, calentar, agitar constantemente de forma lenta hasta que la mezcla sea homogénea y llevar a ebullición durante 2 min, finalmente dejar enfriar y verter en cajas Petri.

Agar Brilliance™ *Candida*

Componentes	
Peptona	4.0 g
Mezcla cromógena	13.6 g
Ciprofloxacino	0.5 g
Agar	13.6 g
Agua destilada	1000 mL

Medio de cultivo selectivo, diferencial para las especies de *Candida* por color mediante cromógenos, las colonias color verde son indicativo de *C. albicans*, color rosado para *C. parapsilosis*, color beige para *C. glabrata* y para *C. tropicalis* color azul.

Preparación.

Disolver 31.2 g del medio de cultivo con 1000 mL de agua estéril, calentar, agitar constantemente hasta ebullición durante dos minutos, dejar enfriar a 45 °C y adicionar el antibiótico en esterilidad y verter en cajas Petri.

Agar Tabaco

Componentes	
Tabaco natural	50.0 g
Bacto Agar BD BIOXON	13.6 g
Agua destilada	1000 mL

Se utiliza para la diferenciación de especies: *C. albicans* de *C. dubliniensis* con base en la morfología característica, es decir, la formación de clamidoconidios solitarios o en racimo.

Preparación.

Poner a ebullición 20 g de tabaco en agua destilada durante 30 min, filtrar esta infusión por una gasa y aforar al volumen inicial, adicionar esta solución obtenida al Bacto agar™, calentar hasta disolución de la mezcla, ajustar a un pH de 5, esterilizar el medio durante 15 min a 121°C, dejar enfriar y verter en cajas Petri

Agar caseína modificado

Componentes	
Leche semidescremada Svelty [®]	1.0 g
Bacto Agar BD BIOXON [®]	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Este medio de cultivo se utiliza para diferenciar las especies de *C. albicans* de *C. dubliniensis* mediante la morfología microscópica.

Preparación.

Primero disolver la leche en 500 mL de agua destilada.

Por otro lado adicionar los 500 mL de agua destilada a los 15 g del Bacto agar, calentar la mezcla hasta completa disolución, ajustar a un pH de 8.0, esterilizar en autoclave a 121 ° C por 15 min y dejar enfriar.

Finalmente adicionar la primera mezcla de leche a la mezcla con el Bacto agar, agitar hasta la incorporación completa y verter en cajas Petri.

Agar Papa Dextrosa (BD BIOXON[®])

Componentes	
Infusión de papa	4.0 g
Glucosa	20 g
Mezcla cromógena	2.0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

pH final de 5,6 ± 0.2

Preparación.

Adicionar el agua destilada a 39 g de agar papa dextrosa, calentar hasta la disolución del agar, ajustar el pH a 5.6 y esterilizar el medio de cultivo a 121° C durante 15 min.

Tabla 11. Componentes del Medio de cultivo RPMI ^a

Sustancias	Cantidad
RPMI 1640	10,40 g
Solución amortiguador a MOPS ^b	34,53 g
Agua destilada	1000 mL
NaOH 1M	ajustar pH= 7,0 ± 0,1

^a RPMI: Roswell Park Memorial Institute: Adicionado con glutamina y rojo de fenol sin bicarbonato
^b MOPS: Ácido morfolino propano sulfónico

Preparación del medio RPMI.

Disolver el MOPS en 500 mL de agua químicamente pura, agitar la mezcla y ajustar a pH 7.0 ± 0,1 utilizando NaOH 1M, agregar RPMI, ajustar pH 7, finalmente aforar a 1000 mL. Esterilizar por filtración a través de Unidades filtro de 0.2 µm de diámetro. Conservar a 4°C.

Examen directo mediante azul de algodón

Se utiliza para realizar exámenes directos a cultivos, es rápida, tiñe la pared de los hongos permitiendo visualizar fácilmente las estructuras fúngicas

Procedimiento.

- a) Depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos
- b) Tomar con asa parte de la colonia y depositarla sobre la gota de colorante
- c) Disgregar la muestra con el colorante perfectamente y colocar un cubreobjetos
- d) Realizar la observación de la preparación al microscopio óptico.

Tinción Gram

Se emplea para teñir productos biológicos húmedos, la coloración roja indica afinidad por la safranina, como en el caso de las bacterias Gram negativas y la coloración morada afinidad por el cristal violeta como en el caso de las bacterias Gram positivas o estructuras fúngicas.

Procedimiento.

- a) Realizar un frotis y fijarlo con calor
- b) Adicionar el cristal violeta y reposar por un minuto la preparación, posteriormente lavar con agua corriente.
- c) Adicionar el colorante lugol , reposar por un minuto y lavar con agua corriente
- d) Decolorar con 10 a 20 gotas de una solución de alcohol-acetona al 50% y lavar ligeramente con agua corriente.
- e) Adicionar safranina, reposar durante 30 segundos y lavar con agua corriente
- f) Dejar secar la preparación y observar con el microscopio óptico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics* 2005; 116:61–7.
2. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002; 51:344–9.
3. Albert A, Harris EK, Multivariate interpretation of clinical laboratory data. Marcel Dekker 1987, New York.
4. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infect Immun* 2004; 72:6023–6031.
5. Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, d'Azevedo PA, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46:239-41.
6. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 4ª. Edición. Mc Graw Hill. México 2011, 233-236.
7. Bandara HM, Yau JYY, Watt RM, Jing LJ, Samaranayake LP. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in vitro *Candida* biofilms development. *BMC Microbiol* 2012;10:125-133.
8. Barnett JA. A History of Research on yeast 8: Taxonomy. *Yeast* 2004; 21:1141-1193.
9. Barnett JA. A History of Research on Yeasts 1: Work by Chemists and Biologists 1789–1850. *Yeast* 1998; 14:1439–1451.
10. Barnett JA. A History of research on yeasts 12: medical yeasts part 1: *Candida albicans*. *Yeast* 2008; 25: 385-417.
11. Barnett JA. A History of Research on Yeasts 4: Cytology Part II. *Yeast* 2002; 19: 745–772.
12. Basson NJ. Competition for glucose between *Candida albicans* and oral bacteria grown in mixed culture in a chemostat. *J Med Microbiol* 2000; 49:969-975.

13. Berman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin in Microbiol* 2006; 9:595–601.
14. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin in Microbiol* 2006; 9:588–594.
15. Bonifaz A, *Micología Médica Básica*. 4^a.Edición. EDT. Mc Graw Hill. México 2012, 20,25-28, 31,280-283, 291.
16. Bouza E, Muñoz P, López-Rodríguez J, Jesús Pérez M, Rincón C, Martín Rabadán P, Sánchez C, Bastida E. A needleless closed system device (CLAVE) protects from intravascular catheter tip and hub colonization: a prospective randomized study. *J Hosp Infect* 2003; 54, 279–287.
17. Brito CS, Gondim BA, Diogo Filho A, Gontijo Filho PP. Etiology and Pathogenesis of Bloodstream Infections Associated with the Use of Long-Term Central Vascular Catheter (CVC) in Patients Who Undergone Gastrointestinal Surgery. *Braz J Infec Dis* 2007; 11:96-99.
18. Brock DL. *Infectious Fungus. Deadly diseases and epidemics*, Chelsea House Publications, USA 2006, 19-29, 91-105.
19. 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. *Arch Intern Med* 1987; 147:873–7.
20. Castrillón LE, Palma A, Padilla C. Factores de virulencia en *Candida* spp. *Dermatología Rev Mex* 2005; 49:12-27.
21. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 39-49.
22. Chander J, Singla N, Sidhu SK, Gombar S. Epidemiology of *Candida* blood stream infections: experience of a tertiary care center in North India. *J Infect Dev Ctries* 2013;7:670-675.
23. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ. Quantitative culture of intravenous catheters and others intravascular inserts. *J Infect Dis* 1980;141:781-786
24. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3, 2008).

25. Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. *Candida* species new insights into biofilm formation. *Future Microbiol* 2012; 7 :755-771.
26. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter* 2010;23:169-176.
27. Del Palacio A, Villar J, Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26:2-7.
28. Diomedi A. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chil Infect* 2004; 21(2): 89-101.
29. Donelli G, Bayston R, Costerton WB, Shirliff ME. The first European congress on microbial biofilms: EUROBIOFILMS 2009, Rome, Italy. September 2-5. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;59:223–6.
30. Douglas LJ, Al-Fattani MA, Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* 2006; 55: 999–1008.
31. Edgeworth J. Intravascular catheter infections. *J Hosp Infect* 2009; 73, 323-330.
32. Eggimann P, Sax H, Pittet D. Catheter-related infections. *Microbes Infect* 2004; 6:1033–1042.
33. Espinel-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 101-106.
34. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida spp.* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; 14:954–966.
35. Ferrer A, Macías E, Meza J, Cabrera R. Infecciones relacionadas con catéteres venosos: incidencia y otros factores. *Med Int Mex* 2008; 24:112-19.
36. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12-80.

37. Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, Ruiz-Pérez De Piappón M, García-Cabrera E. Invasive fungal infection in critically ill patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30:338–343.
38. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 501-517.
39. Goede MR, Coopersmith CM. Catheter-related bloodstream infection. *Surg Clin N Am* 2009; 89 :463–474.
40. González G, Elizondo M, Ayala J. Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2902-2905.
41. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 12^a. Ed, Mc Graw Hill, México, 2012, 1576-1585.
42. Gottenbos B, Van der Mei HC, Busscher HJ. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res.* 2000,208-214.
43. Gregorí BS, Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm* 2005; 39:2.
44. Guitard J, Angoulvant A, Letcher-Bru V, Lólliver C, Cornet M, Dalle B, et al. Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature. *Med Mycol* 2013.
45. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol* 2011; 19: 557–563.
46. Herendeen SL, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Levels of major protein of *E. coli* during growth at different temperatures. *J Bacteriol* 1979; 139 : 185.
47. Hidron AL, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK, National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare

- Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:996–1011.
48. Holcombe LJ, McAlester G, Munro CA, Enjalbert B, Brown AJ, Gow NA, Ding C, Butler G, O'Gara F, Morrissey JP. *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiology* 2010; 156:1476-1486.
 49. Horn D, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clin Infect Dis* 2009;48:1695–703
 50. Hospenthal DR, Rinaldi MG. *Diagnosis and Treatment of Human Mycoses*. Humana Press, Totowa New Jersey 2008, 144.
 51. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol* 2012; 29 :214–222.
 52. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC. Biofilm Formation by and Antifungal Susceptibility of *Candida* Isolates from Urine. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 1697–1703.
 53. Kang K, Fong WP, Tsang PW. Novel antifungal activity of purpurin against *Candida* species in vitro. *Med Mycol* 2012; 48:904-911.
 54. Kerr JR. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1994;32:525-527.
 55. Kim J, Holtom P, Vigen C. Reduction of catheter-related bloodstream infections through the use of a central venous line bundle: Epidemiologic and economic consequences. *Am J Infect Control* 2011; 39: 640-646.
 56. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 255-267.
 57. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity* 2002; 70: 878–888.

58. Kumamoto CA, Vinces MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1546–1554.
59. Leenders NH, Oosterheert JJ, Ekkelenkamp MB, De Lange DW, Hoepelman AI, Peters EJ. Candidemic complications in patients with intravascular catheters colonized with *Candida* species: an indication for preemptive antifungal therapy? *Int J Infect Dis* 2011; 15: 453-458.
60. León C, Álvarez-Lerma F, Ruiz-Santana S, León MA, Nolla J, Jordá R, Saavedra P, Palomar M; EPCAN Study Group. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: results of the EPCAN observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28:233–242.
61. Levy I, Shalit I, Askenazi S, Klinger G, Sirota L, Linder N. Duration and outcome of persistent candidaemia in newborn infants. *Mycoses*. 2006; 49:197-201.
62. Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad II, Prince RA. Antifungal Activity of Amphotericin B, Fluconazole, and Voriconazole in an In Bloodstream Infection Vitro Model of *Candida* Catheter-Related, *Antimicrob. Agents Chemother* 2012; 46:3499-3505.
63. Lezama JI, Et al., 2012, Candidemias Nosocomiales en la U.M.A.E / Hospital de especialidad Dr. Bernardo Sepúlveda G. del Centro Médico Nacional Siglo XXI en el periodo de diciembre 2010-Febrero 2012. *Revista del Colegio de Medicina Interna Guadalajara* , México, 2012, 28
64. Liang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Inmunol Infect* 2003; 36:223-228.
65. Lindavist R. Estimation of *Staphylococcus aureus* Growth Parameters from Turbidity Data: Characterization of Strain Variation and Comparison of Methods. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:4862–4870.
66. Lomas C, Luque R, Infecciones relacionadas con catéteres vasculares, *Avances en enfermedades infecciosas*. SAEI 2011;12: 2-68.
67. López JR, Méndez AF, Bobadilla RI, Zacate J. Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc* 2012; 20 (2): 85-90.

68. López R, Méndez Luis J, Hernández F, Castañón L. Micología Médica: Procedimientos para el diagnóstico de Laboratorio, 3ª. edición, México: Trillas 2012.pp13-14.
69. Lorente L, Henry C, Martín MM, Jiménez A, Mora ML., Central venous catheter-related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. Crit Care 2005; 9 :31-35.
70. Ma CF, Li FQ, Shi LN, Hu YA, Wang Y, Huang M, Kong QQ. Surveillance study of species distribution, antifungal susceptibility and mortality of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in China. BMC Infect Dis 2013; 13:337.
71. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. N Engl J Med. 1977; 296:1305-1309.
72. Manolakaki D, Velmahos G, Kourkoumpetis T, Chang Y, Alam HB, De Moya MM, Mylonakis E. *Candida* infection and colonization among trauma patients. Virulence 2010; 1:5 367-375.
73. Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, Savala-Velásquez N, Méndez-Tovar MJ, Naquid-Narváez JM, Torres-Rodríguez JM, López-Martínez R. Candiduria en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.Sensibilidad antifúngica in vitro. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2008; 46:603-610.
74. Martin SW, Douglas LM, Konopka JB. Cell cycle dynamics and Quorum Sensing in *Candida albicans* Chlamydospores are distinct from budding and hyphal growth. Eukaryotic Cell 2005; 47:1191–1202.
75. Martinez LR, Fries BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. Curr. Fungal Infect Rep 2010; 4:266–275.
76. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence 2013; 4:2, 1–10.
77. Mendivil C, Egüés J, Polo P, Ollaquindia P, Nuin MA, Del Real C. Nosocomial infection, surveillance and control in Neonatology Infection. ANALES Sis San Navarra 2000; 23(2) 177-184.

78. Merz WG y Hay RJ. Topley and Wilson's, Microbiology and Microbial Infection, Vol. Medical Micology. Euston Road, London, Hooder Arnold, 2005.
79. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, et al. Excess mortality hospital state, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. Infect control Hosp Epidemiol 2005; 26:540-547.
80. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, 6ª. edición. Microbiología Médica. Elsevier 2009;73-77.
81. Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. Microbes Infect 2011; 13: 963-976.
82. Nishikaku AS, Melo, AS, Colombo, AL. Geographic Trends in Invasive Candidiasis. Curr Fungal Infect Rep 2010; 4:210–218.
83. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clin Infect Dis 2010 51:561–570.
84. Nweze EI, Ghannoum A, Chandra J, Ghannoum MA, Mukherjee PK. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. J Antimicrob Chemother 2012 67: 149–153.
85. Olaechea PM, Palomar M, León-Gil C, Álvarez-Lerma F, Jordá R, Nolla-Salas J, León-Regidor MA; EPCAN Study Group. Economic Impact of *Candida* Colonization and *Candida* Infection in the Critically Ill Patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 323–330.
86. Pearson ML, O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Raad II, Randolph A, Weinstein RA. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 2002; 51:1-29.
87. Pemán J, Cantón E, Miñana JJ, Florez JA, Echeverria J, Ortega DN, Alarcón JM, Fontanals D, Sard BG, Moreno BB, Torroba L, Ayats J, Pérez MÁ, Fernández MA, Reus FS, Natal IF, García GR, Ezpeleta G,

- Martín-Mazuelos E, Iglesias I, Rezusta A, de Ocariz IR, Nieto AG; el Grupo de Estudio FUNGEMYCA. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad a fluconazol de los aislamientos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol* 2011; 28:91-9.
88. Pemán J, Zaragoza R. Hacia el diagnóstico temprano de la candidiasis invasora en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol* 2012 ; 29:71-75.
 89. Pérez Castro I, Iborra Obiols MI, Comas Munar MD, Yrurzun Andreu R, Sanz Moncusí M, Lahoz Simón C, Gómez Montoya MI, Comallonga Bartomeu T, Navasa Anadón M. Análisis prospectivo de la colonización de catéteres centrales y sus factores relacionados. *Enferm Clin* 2009;19:141–148.
 90. Pérez-Parra A, Muñoz P, Guinea J, Martín-Rabadán P, Guembe M, Bouza E. Is *Candida* colonization of central vascular catheters in non-candidemic, non-neutropenic patients an indication for antifungals?. *Intensive Care Med* 2009; 35:707–712.
 91. Pfaller MA, Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med* 2012; 125, 1A, S3-S13.
 92. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida spp.* to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 2008; 46:150-156.
 93. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 1:133-163.
 94. Piarroux R, Grenouillet F, Balvay P, Tran V, Blasco G, Millon L, Boillot A. Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 2004; 32:2443-2449.
 95. Pinoni MV, Castán V, Maegli MI, Lorenzo J, Frizzera F, Jewtuchowicz V, Mujica MT. Características fenotípicas útiles para la identificación presuntiva de *Candida guilliermondii*. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39: 81-83.

96. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; 220:751–758.
97. Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993; 168:400-7.
98. Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal Biofilm Resistance. *Int J Microbiol.*2012; 1- 14.
99. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell* 2005; 4: 633–638.
100. Rusforth JA, Hoy CM, Kite P, Puntis JW. Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. *Lancet*,1993; 342:402-403.
101. Sabatier C, Peredo R, Vallés J Bacteriemia en el paciente crítico. *Med Intensiva* 2009; 33:336–345.
102. Samaranayake LP, Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. *Mycoses* 2009; 52, 467–475.
103. Samaranayake YH, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 1994; 41:295-310.
104. Sánchez- Velázquez LD, Ponce de León Rosales S, Rangel Frausto MS. The Burden of Nosocomial Infection in the Intensive Care Unit: Effects on Organ Failure, Mortality and Costs. A Nested Case-Control Study. *Arch Med Res.*2006; 37: 370–375.
105. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62, 10–24.
106. Schelenz, S. Management of candidiasis in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 31-34.
107. Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 837–42.

108. Seddiki S, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Badsı-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. *Int J Gen Med* 2013; 6:1–7.
109. Sherertz RJ, Heard SO, Raad II. Diagnosis of triple-lumen catheter infection: comparison of roll plate, sonication and flushing methodologies. *J Clin Microbiol* 1997; 35:641-646.
110. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1244-1248.
111. Shirtliff M, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 299; 1–8.
112. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 36: 288–305.
113. Singhai M, Malik A, Shahid M, Malik A, Rawat V. Colonization of peripheral intravascular catheters with biofilm producing microbes: Evaluation of risk factors. *Niger Med J.* 2012; 53: 37–41.
114. Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 2006; 50: 1–12.
115. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2004; 12: 317-324.
116. Tay-Zavala J, *Microbiología y Parasitología Médica*, 4ª edición. EDT. Méndez Editores 2012, pp. 30-46
117. Thomas JG, Ramage G, Lopez-Ribot JL. Biofilms and implant infections *Microbial Biofilms*. Washington, DC. ASM Press, 2004: 269–93.
118. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic Cell* 2011; 10: 1173-1182.

119. Tsai Pei-Wen, Yu-Ting Chen, Po-Chen Hsu, Chung-Yu Lan. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host .A mini review, Biomedicine XXX 2012; 1-14.
120. Tsang PW, Bandara HM, Fong WP. Purpurin suppressed *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. Plos One 2012;7:e50866.doi:10.1371/journal.pone.0050866.
121. Vallés J, Ferrer R, Bloodstream Infection in the ICU. Infect Dis Clin N Am 2009; 23 557–569.
122. Vargas H, 2004, Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. Dermatología Venezolana. 42 (2):1-18.
123. Zingg W, Cartier-Fässler V, Walder B. Central venous catheter-associated infections. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 2008; 22:407–421.