

# Ecología de especies de *Candida* encontrada en diversas áreas del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario Tegucigalpa, Honduras

Erika Pérez Alemán <sup>1,3</sup>, Bryan Ortíz, Carmen Galo <sup>1</sup>  
Sandra Montoya <sup>2</sup>  
Maria de Lourdes Enriquez Flores <sup>4</sup>

## RESUMEN

En los últimos 45 años se ha descrito un aumento importante de infecciones por el género *Candida* entre la población general, reportándose como la cuarta causa de infecciones sanguíneas de origen nosocomial(1). Estas infecciones han sido observadas con más frecuencia en pacientes en estado crítico. La identificación de especies de *Candida* es necesaria debido a que, entre cepas se presentan patrones diferentes de resistencia natural hacia los fármacos antifúngicos. Este grado de resistencia podría inhabilitar la efectividad del tratamiento aumentando así la estancia hospitalaria y la mortalidad entre pacientes en estado crítico.

Determinar la ecología de especies de *Candida* encontrada en diversas áreas del Departamento de Pediatría del HEU en 55 cultivos positivos por *Candida*, provenientes de diferentes tipos de muestras de pacientes pediátricos mediante las técnicas de Tubo germinal, CHROMagar y PCR-RFLP, implementando esta última técnica como método diagnóstico. La prevalencia general dentro de las áreas del Departamento de Pediatría del HEU de especies de *Candida*, tomando en cuenta la PCR-RFLP como gold standard en orden de frecuencia descendente, fue *C. tropicalis* con un 25.5%, *C. albicans* con 21.8%, *C. parapsilosis* con 12.7%. *C. glabrata* con 7.3%, y *C. Krusei* con un 5.5%. Se encontró que la mayoría de los cultivos positivos provenían de la Sala de Oncología Pediátrica 12 (21.8%), seguido por la sala de Nutrición 12 (21.8%) y sala de Lactantes 10 (18.2%). El tipo de muestra con positividad más frecuente fue

<sup>1</sup> Profesor, Escuela de Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH), Tegucigalpa, Honduras: erika.perez@unah.edu.hn

<sup>2</sup> Sección de Micología, Hospital Escuela Universitario (HEU) Tegucigalpa, Honduras.

<sup>3</sup> Estudiante de Posgrado en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas (MEIZ), UNAH.

<sup>4</sup> Asesor, Profesora de la Escuela de Microbiología, Facultad de Ciencias UNAH:lourdes@unah.edu.hn

la de orina con 31 aislamientos (56.4%). El método de PCR-RFLP resultó ser una herramienta valiosa para la identificación de especies de *Candida* y en la discriminación de co-infecciones entre estas especies. Las características del método de PCR-RFLP evidencia que es un método rápido y útil en el tratamiento, profilaxis, y en diseños de estrategias de reducción de mortalidad por este género.

Palabras clave: *Candida*, PCR-RFLP, CHROMagar, *Tube germinal*.

## ABSTRACT

In the last 45 years, there has been a significant increase in *Candida* infections among the general population, reported as the fourth cause of nosocomial blood infections (1). These infections have been observed more frequently in critically ill patients. Identification of *Candida* species is necessary because, among strains, different patterns of natural resistance to antifungal drugs are present. This resistance could disrupt the effectiveness of the treatment, thus increasing hospital stay and mortality among critically ill patients.

To determine the ecology of *Candida* species found in different areas of the Department of Pediatrics of HEU in 55 *Candida*-positive cultures from different types of pediatric samples using germ-tube, CHROMagar and PCR-RFLP, Implementing the latter technique as a diagnostic method. The general prevalence of *Candida* within the areas of the Department of Pediatrics of the HEU using PCR-RFLP as a gold standard was *C. tropicalis* 25.5%, *C. albicans* 21.8%, *C. parapsilosis* 12.7%. *C. glabrata* con 7.3% and *C. Krusei* 5.5%. Higher percentage of positivity was observed in Pediatric Oncology Room 12 (21.8%), followed by Nutrition Room 12 (21.8%) and Infants Room 10 (18.2%). The most frequent type of sample was urine with 31 isolates (56.4%). The PCR-RFLP method is a valuable tool for the identification of species causing infection and differentiates between co-infections among *Candida* species. This characteristic of the PCR-RFLP method evidences that this is a fast and useful method in the treatment, prophylaxis, and in the design of strategies of reduction of mortality by this genre.

Key words: *Candida*, PCR-RFLP, CHROMagar, *Germinal tube*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Candida spp.* puede causar infección en situaciones en las que la resistencia del hospedero a la infección está disminuida de forma local o sistémica en cualquier lugar del cuerpo humano, dicha condición aumenta el riesgo de muerte y la estancia hospitalaria entre los pacientes vulnerables. La prevalencia de la infección por *Candida spp.* es alta y las diferentes formas en las cuales el paciente puede volverse susceptible han cambiado actualmente, como por ejemplo las patologías y terapias inmunosupresoras, estancias hospitalarias largas, mayor supervivencia de neonatos con problemas médicos y bajo peso al nacer, han llevado a dichos cambios en la epidemiología y presentación clínica de estas infecciones. La epidemiología de la infección invasiva por *Candida* (IIC) depende de factores como las características propias de la institución, factores intrínsecos asociados al hospedero y al tipo de población estudiada, como es el caso del presente estudio en el cual solamente se incluyó población pediátrica desde 1 mes de nacimiento hasta 18 años.

La circulación de especies de *Candida* en ambientes hospitalarios se relaciona con la expansión del uso de terapia profiláctica con *azoles*, aumentando la proporción de forma variable de las especies no-*albicans* (ver tabla 1). Adicionalmente a esta problemática se agrega la dificultad para establecer la sospecha diagnóstica de forma temprana por parte del clínico o intensivista y los métodos de diagnóstico utilizados dentro del laboratorio, que en ciertos casos pueden tomar varios días en la emisión de un resultado, sobre todo con algunas cepas menos frecuentes o en casos de co-infecciones por lo cual dichas situaciones influyen en el pronóstico del paciente (2-7).

El único estudio de determinación de especies de *Candida* realizado en Honduras fue llevado a cabo mediante aislamientos obtenidos en el Hospital Escuela. Estos aislamientos formaron parte del estudio realizado por *Nucci & Alvarado* en 2013, quienes caracterizaron la epidemiología de las candidemias y determinaron la frecuencia de especies de *Candida* en pacientes hospitalizados en 7 países de Latinoamérica, así como la susceptibilidad y resistencia de tales aislamientos. Esta información es de vital importancia debido a la resistencia natural a fármacos antifúngicos que en el caso del género *Candida* se relaciona con la especie, por lo que es muy importante conocer las especies circulantes en áreas hospitalarias de forma periódica, sobre todo en áreas de atención crítica, como es el caso de las unidades de cuidados intensivos (UCI).

Dicha información es de utilidad para la toma de decisiones al momento de administrar profilaxis por parte del clínico, ya que la profilaxis en especies resistentes conlleva a falla terapéutica. Por otro lado, el hecho de conocer las especies circulantes en diferentes ambientes hospitalarios favorece la pronta administración de fármacos más eficaces, teniendo en consecuencia un menor riesgo de mortalidad para el paciente pediátrico en estado crítico.

**Tabla 1. Patrones de sensibilidad de las principales especies de Candida a anfotericina B, azoles y equinocandinas.**

Patógeno	Anfotericina B	Fluconazol	Itracona-zol	Voriconazol Posaconazol	Caspofungina
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	Sa
<i>C. glabrata</i>	S a I	SDD a Rb	SDD a Rc	Sa	S
<i>C. krusei</i>	S a I	R	SDD a Rc	Sa	S
<i>C. lusitaniae</i>	S a Rd	S	S	S	S
<i>C. guilliermondii</i>	S a R	S a SDD	S	S	S
<i>C. dublinensis</i>	S a la	S,SDD,R	S	S	S

a=Sensible, pero los datos clínicos son limitados. b=10-15% de *C. glabrata* son resistentes al fluconazol. c= Son resistentes al itraconazol 50% de aislamientos de *C. glabrata* y 30% de *C. krusei*. d=Un 20% de los aislamientos son resistentes a anfotericina B. S=sensible; I= intermedio; R= resistente; SDD=sensible dependiente de la dosis; ND= datos no disponibles. Fuente: [Salavert Lletí M et al Enferm Infecc Microbiol Clin 2006;24 Supl 1:36-4]

## MÉTODO

**Diseño del estudio:** Descriptivo, transversal

**Período de Estudio:** Noviembre 2015- Abril 2016.

**Población de Estudio:** Muestras de pacientes pediátricos de diversas salas de atención desde recién nacidos hasta 18 años que llegaron al servicio de Micología del laboratorio clínico del Hospital Escuela Universitario durante el período del estudio.

**Muestra:** Se incluyeron todos los cultivos positivos por *Candida* Independientemente del tipo de muestra (orina, sangre, secreciones, etc.) provenientes de pacientes de

las diversas áreas de atención del Departamento de Pediatría del HEU durante el período de estudio. (Muestreo por conveniencia).

**Entorno:** Cultivos positivos por el género *Candida* provenientes de las diversas áreas del Departamento de Pediatría del Hospital Escuela Universitario (HEU) (Unidad de Cuidados Neonatales, Lactantes, Medicina, Pediatría, Terapia Renal, Cirugía Pediátrica, Nutrición, Ortopedia Pediátrica, Unidad de Cuidados Intermedios Neonatales, Unidad de Quemados, Neurocirugía Pediátrica, Oncología Pediátrica, Hidratación Oral, Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos).

## Intervenciones

### Procesamiento de las muestras en el laboratorio de Micología del Hospital Escuela Universitario

A Los cultivos positivos por levaduras que se obtuvieron en el laboratorio de Micología del HEU se les realizó la técnica del tubo germinal para identificación de especies de *Candida albicans* vrs *Candida no-albicans* (8):

### Recolección y procesamiento de las muestras para el estudio en la UNAH

Los cultivos positivos por el género *Candida* fueron almacenados en el laboratorio de Micología (HEU) y resembrados en medio de Sabouraud para posteriormente ser trasladados al laboratorio de la Maestría de Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Microbiología UNAH con las medidas de bioseguridad para transporte pertinentes. Una vez repicados los cultivos se realizó la determinación de especies de *Candida* mediante la técnica de CHROMagar (9). Conllevó el siguiente protocolo:

### Metodología para la técnica de CHROMagar

Se colocó en un matraz 47.7 g de la base de CHROMagar en polvo en 1 litro de agua purificada y se agitó hasta que el agar estuvo disuelto, se calentó el medio a 100 °C agitando regularmente hasta ebullición, seguidamente se sirvió en platos Petri estériles y se dejó solidificar. Los medios preparados se conservaron a temperatura ambiente durante un día o se refrigeraron 2/8°C por dos meses (para proteger de la luz y deshidratación).

Al momento de realizar la resiembra, estos medios se colocaron a temperatura ambiente y se incubaron en atmósfera aerobia de 30-37°C por un promedio de 48

horas. Como paso final se leyeron los resultados obtenidos comparando colores presentados por las colonias proporcionadas en el inserto de información del medio CHROMagar.

### **Procesamiento de la muestra por biología molecular (PCR-RFLP)**

Se realizó la técnica de PCR-RFLP en el Centro de Investigaciones Genéticas (CIG) de la Escuela de Microbiología. El proceso contó con los siguientes pasos:

Extracción de ADN:

Se realizó un protocolo de extracción de ADN utilizando disolventes orgánicos a partir de las colonias de levadura aisladas en el medio de cultivo Sabouraud. Brevemente, en un vial se llevó a cabo una etapa inicial de lisis celular a partir de un una asada de un cultivo suspendido en 1000 µl de tampón (Tris 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8; 3% de SDS y 100 mM NaCl). Esta suspensión se calentó a 100 °C en baño María durante 1 minuto. Posteriormente en un vial especial se agitó la suspensión junto con 0.1 mm de perlas de vidrio durante 1 minuto en el aparato agitador Mini BeadBeater® (Bio Spec products Inc.) Cuatrocientos µl fueron recuperados sin tomar las perlas, luego se añadió un volumen de fenol - cloroformo (1: 1), se mezcló y se centrifugó a 10.000 RPM.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo vial y se precipitó con un volumen similar de isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato sódico (3M, pH 5,2). Se realizaron luego tres lavados con Etanol al 70% y finalmente se re-suspendió el sedimento en 50 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente la concentración de ADN se calculó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo FisherScientific Inc.). Dependiendo de como fuese necesario, el ADN se diluyó hasta una concentración final de 40 ng / µl y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

### **Desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del género *Candida*.**

La técnica de PCR se realizó basándose según la técnica propuesta por Mirhendi et al 2006 [18, 19]. Agregando ciertas modificaciones. Las amplificaciones se llevaron a cabo con los siguientes reactivos y condiciones para un volumen final de 50 µl por cada muestra: 25,ml de PCR Master Mix (Promega Corp. Madison, WI, EE.UU.), Un (1) µl del cebador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) y 1 µl del cebador ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' llevando esta mezcla a un volumen final de 49 µl con agua estéril libre de nucleasas colocando posteriormente 1,0 µl de ADN (con la

concentración de 40 ng / $\mu$ l). Las reacciones se amplificaron en un termociclador mediante un paso de desnaturalización inicial a temperatura de 95°C durante 5 min, 37 ciclos de 95°C durante 30 s, 56°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s, con una extensión final a 72 ° C durante 5 min. Los amplicones obtenidos se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidas con bromuro de Etidio (5 $\mu$ l/100 ml de agarosa) y se visualizaron en un transiluminador. (BioDoc-It Imaging System (UVP, LLC; Upland, CA). Las imágenes obtenidas fueron fotografiadas e interpretadas.

### **Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para identificación de especies de *Candida***

Las reacciones de PCR-RFLP se realizaron de acuerdo con Mirhendi et al 2006 [18, 19] con ciertas modificaciones. Las amplificaciones se llevaron a cabo en las siguientes condiciones en un volumen final de 20  $\mu$ l para cada muestra: 12.3  $\mu$ l de agua desionizada, 2  $\mu$ l de Buffer RE 10X, 0.2  $\mu$ l de BSA acetilado 10 $\mu$ g/ $\mu$ l y 0,5  $\mu$ l de la enzima de restricción MspI (10 U /  $\mu$ l) (Promega Corp.) llevando con esto a un volumen de 16  $\mu$ l y añadiendo 4  $\mu$ l de ADN del paso anterior para completar 20  $\mu$ l de la mezcla. Se incubó dicha preparación por 2 horas a 37°C dentro de un termociclador para que ocurriera la digestión mediante la enzima MspI. El patrón de fragmentos de restricción obtenidos se corrió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,0 %, teñido con bromuro de Etidio (5 $\mu$ l/100 ml de agarosa) y se visualizaron en el transiluminador, previamente descrito, fotografiando e interpretando dichos resultados.

### **Análisis de datos**

Se generó una base de datos electrónica en IBM-SPSS 21.0 (IBM-SPSS Inc, Cary, NC, EUA, 2012). Posteriormente, utilizando el mismo software, se generó estadística descriptiva (media, mediana, moda, desviación estándar) con el 95% de confiabilidad. Al mismo tiempo se generaron Intervalos de Confianza de 95% utilizando el método binomial (Epi-6.04d, CDC, Atlanta, Georgia, EUA, 2001), se generaron reportes preliminares y posteriormente el reporte final. Se utilizó Microsoft Excel 14.0 (Microsoft Inc <sup>TM</sup>, Redmond, WA, EUA, 2010) para generar gráficos y tablas.

### **Consideraciones Éticas**

Los nombres de los pacientes fueron anonimizados y se emitió una identificación codificada para asegurar la confidencialidad de los mismos. Todos los datos fueron

guardados cuidadosamente en archivo bajo llave del investigador principal.

## RESULTADOS

### Características sociodemográficas

La distribución de la media entre la edad de los pacientes de donde se obtuvieron los cultivos positivos fue de 6.6 años; Desviación estándar 5.8; Rango 1 mes a 18 años. Siendo el grupo de edad más frecuente el de 3-5 años (20.0%), seguido por 1-2 años (18.2%). (Ver Tabla 1).

La mayoría de los pacientes era del sexo masculino; veintinueve (29) pacientes representando un 52.7% del total de la población y del sexo femenino 26 pacientes representando 47.3% del total (Ver Tabla 1).

**Tabla 1. Características sociodemográficas de los pacientes en el estudio**

Características	Frecuencia	Porcentaje
Edad: M: 6.6; DS: 5.8, R: 1 mes-18 años		
<1 año	9	16.4
1-2 años	10	18.2
3-5 años	11	20.0
6-8 años	3	5.5
9-12 años	9	16.4
13-15 años	7	12.7
16-18 años	6	10.9
<b>Sexo</b>		
Masculino	29	52.7
Femenino	26	47.3

### Características clínicas

Según la Sala de Ingreso, se encontró que la mayoría de los cultivos positivos provenían de la Sala de Oncología Pediátrica 12 (21.8%), seguido por la sala de Nutrición 12 (21.8%) y la sala de Lactantes 10 (18.2%). El tipo de muestra más frecuente fue orina 31 (56.4%), seguido por heces 9 (16.4%) e hisopado bucal 7 (12.7%).

**Tabla 2. Características clínicas de los pacientes en el estudio**

<b>Características</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Sala de Ingreso</b>		
Oncología Pediátrica	12	21.8
Nutrición	12	21.8
Lactantes	10	18.2
UCIP	7	12.7
Medicina Pediátrica	6	10.9
Quemados Pediatría	2	3.6
Consulta Externa Pediátrica	2	3.6
Emergencia Pediátrica	2	3.6
Terapia Rehidratación	1	1.8
Autopsia	1	1.8
<b>Tipo de muestra</b>		
Orina	31	56.4
Heces	9	16.4
Hisopado bucal	7	12.7
Secreción	4	7.3
Jugo gástrico	1	1.8
Líquido peritoneal	1	1.8
No consignado	2	3.6

No consignado: No se obtuvieron datos sobre el tipo de muestra

### **Resultados de laboratorio**

En el examen directo se observaron levaduras en 43 de las 55 muestras procesadas (78.1%), No consignado (no se encontró ningún reporte) en 11 de ellas (20%) y no se observó levaduras en 1 (1.8%) (Ver Tabla 3). En el análisis de Tubo Germinal se reportó *Candida albicans* en 18 (32.7%) y *Candida no albicans* en 37 (67.3%) (Ver Tabla 3). El CHROMagar reportó en orden de frecuencia *Candida tropicalis* 13 (23.6%), seguido por *Candida albicans* en 9 (16.4%) y *Candida glabrata* en 7 (12.7%). (Ver Tabla 3). El análisis de PCR reportó en la mayoría de los casos *Candida tropicalis* 14 (25.5%), seguido por *Candida albicans* 12 (21.8%) y *Candida parapsilosis* con 7 aislamientos que colocan a esta especie en tercer lugar en frecuencia (12.7%). (Ver Tabla 3)

**Tabla 3. Resultados de laboratorio de los pacientes en el estudio**

<b>Resultados</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Examen Directo</b>		
Se observan levaduras	43	78.2
No se observan levaduras	1	1.8
No consignado	11	20.0
<b>Tubo Germinal</b>		
<i>Candida albicans</i>	18	32.7
<i>Candida no albicans</i>	37	67.3
<b>CHROMAgar</b>		
<i>C. Tropicalis</i>	13	23.6
<i>C. albicans</i>	9	16.4
<i>C. glabrata</i>	7	12.7
<i>C. krusei</i> y otra	3	5.5
<i>C. albicans, C. tropicalis</i>	2	3.6
<i>C. albicans</i> y otra	2	3.6
<i>C. glabrata, C. tropicalis</i>	2	3.6
<i>C. tropicalis</i> y otra	2	3.6
<i>C. krusei</i>	2	3.6
*Otra	1	1.8
<i>C. tropicalis, C. albicans</i>	1	1.8
<i>C. glabrata</i> y otra	1	1.8
<i>C. krusei, C. tropicalis</i>	1	1.8
<i>C. albicans, C. glabrata</i>	1	1.8
<i>C. krusei, C. tropicalis, C. albicans</i>	1	1.8
No crecimiento	7	12.7
<b>PCR</b>		
<i>C. tropicalis</i>	14	25.5
<i>C. albicans</i>	12	21.8
<i>C. papapsilosis</i>	7	12.7
<i>C. glabrata</i>	4	7.3
<i>C. krusei</i>	3	5.5
**Secuenciar	3	5.5
<i>C. albicans, C. glabrata</i>	3	5.5
<i>C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata</i>	3	5.5
<i>C. albicans, C. tropicalis</i>	1	1.8
<i>C. tropicalis, C. glabrata</i>	1	1.8
<i>C. albicans, C. parapsilosis</i>	1	5.5
***No crecimiento	3	

\*\*"Otra" en CHROMagar: Especie no identificada según color, \*\*Secuenciar en PCR: Resultado de patrones de banda diferentes a los conocidos siendo necesaria la secuenciación para identificación de especie. \*\*\* no crecimiento en PCR: La cepa cultivada en agar sabouraud no creció lo suficiente perdiendo así la capacidad de aislar ADN de ella.

A continuación se muestran los resultados obtenidos al comparar las técnicas diagnósticas utilizadas en dicho estudio (Tabla 4).

**Tabla 4. Comparación de resultados entre métodos diagnósticos utilizados**

Especie	Examen directo	Tubo Germinal	CHROM-Agar	PCR-RFLP
Se observan levaduras	43			
No se observan levaduras	1			
No consignado	11			
<i>C. no albicans</i>		37		
<i>C. albicans</i>		18	16	20
<i>C. glabrata</i>			11	11
<i>C. tropicalis</i>			22	19
<i>C. krusei</i>			7	3
<i>C. Parapsilosis</i>				8
No identificado según color			9	
No crecimiento			7	3
Patrón no identificado				3
Total	55	55	72	67

## DISCUSIÓN

La distribución de especies de *Candida* a nivel global es variable, reportándose en 2003 que *C. albicans* aún es la más frecuente con 66%, seguida de *C. glabrata* (11%), *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (6%) y *C. krusei* (2%) (2, 4, 6). En el presente estudio realizado en niños del Hospital Escuela Universitario con sospecha clínica de infección por levaduras, la especie más frecuentemente aislada por el método de PCR-RFLP propuesto resultó ser *C. tropicalis* con un 25.5% de los casos, seguido de *C. albicans* con 21.8%, *C. parapsilosis* con 12.7%. *C. glabrata* con 7.3%, y *C. Krusei* con un 5.5%. Estos datos son comparables con los obtenidos en otros estudios (2,3,6).

En este estudio, la especie *C. tropicalis* ocupó el primer lugar en frecuencia, posiblemente a expensas de *C. albicans*. En el estudio multicéntrico del grupo ARTEMIS donde participó Honduras, la especie *C. tropicalis* ocupó el tercer lugar en frecuencia en América Latina. El estudio incluyó varios grupos etarios, sobre todo adultos, en los cuales esta especie se encuentra con mayor frecuencia. El estudio multicéntrico no

proporciona información específica de la población pediátrica, por lo que su utilidad, en términos comparativos al presente estudio, es limitada (10).

El reporte del grupo ARTEMIS clasifica a Honduras como un país con la segunda más baja prevalencia de *C. albicans* a nivel terciario (27.4%) después de Venezuela (26.8%) (10), prevalencia que no está muy lejos del 21.8% encontrado en este estudio (Tabla 3). Según datos obtenidos del presente estudio en pacientes pediátricos, existe una prevalencia de *C. parapsilosis* del 12.7%. Este dato es cercano al reportado por el grupo ARTEMIS (14.1%) el cual investigó la población pediátrica y adulta. Este mismo grupo ha reportado que en otros países de Latinoamérica *C. parapsilosis* es la segunda especie más frecuente (26.5%) (10).

*C. guilliermondii*, en los centros terciarios a nivel regional, fue reportada en el año 2013 por tener una prevalencia de 11.6% en la población pediátrica pasando a ser una especie con prevalencia emergente. Esto es válido para Honduras, que reporta la especie en 20.7% de los aislamientos (10). Sin embargo, esto no pudo ser comprobado en este estudio debido a que no se incluyó el patrón de identificación de dicha especie por lo que seguirá con el proceso de secuenciación.

La colonización por más de una especie que ha sido reportada por otros autores oscila entre 3-55% (individuos saludables o no) independientemente del sitio de toma de muestra, Esto es importante ya que 51-90% de los aislamientos de diferentes sitios serán de la misma especie en el caso de los pacientes con Candidemia (4, 6, 11)

En el presente estudio, se aisló principalmente *C. glabrata* causando co-infecciones con otras especies de *Candida*. Esta especie se destaca por su resistencia al fluconazol. En diversos estudios realizados en Estados Unidos, muestran tendencia al aumento porcentual de esta especie, posiblemente debido al aumento de profilaxis empírica con fluconazol en el paciente crítico (4). Se debe hacer notar que en nuestro estudio se identificó más de una especie de *Candida* en una misma muestra en 21.8% (12/55) de los individuos estudiados. Se demostró, que la técnica llevada a cabo y reconocida en la literatura como PCR in-house es factible de utilizar en un laboratorio por un operario capacitado. Esta prueba resultó ser sensible y específica, pero requiere de aparatos básicos de diagnóstico molecular. En caso de tener accesibilidad a estos, la prueba podría mejorar significativamente la esperanza de vida en pacientes que se encuentran en estado crítico ya sufren infecciones por cepas resistentes al tratamiento lo que permite dar un resultado más rápido y preciso.

## CONCLUSIONES

1. Se determinó de manera general por PCR-RFLP que en el Departamento de Pediatría del HEU la prevalencia de especies de *Candida* con mayor frecuencia en orden descendente son: *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. Krusei* aisladas principalmente en muestras de orina; en segundo y tercer lugar muestras de heces e hisopado bucal respectivamente.
2. La frecuencia de especies encontradas muestra una posible tendencia al aumento de cepas de *Candida* resistentes a fluconazol como *C. glabrata* posiblemente a expensas de *C. albicans* o como selección de especies por uso de antimicóticos en salas como la de Oncología Pediátrica.
3. La frecuencia de cultivos positivos por especies de *Candida* es mayor en la Sala de Oncología pediátrica en la cual se administra la profilaxis antifúngica con mayor frecuencia seguida por las salas de Nutrición y Lactantes.
4. El método planteado en nuestro estudio de PCR- RFLP resultó ser más sensible, específico y más rápido en comparación con otras técnicas de discriminación entre especies, por lo que puede ser una herramienta sumamente útil en pacientes críticos que necesiten de un diagnóstico rápido. Este método puede utilizarse directamente en muestras de sangre y orina preferiblemente dada su sensibilidad en muestras de líquidos estériles.

## AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Sandra Montoya por su valiosa colaboración en este estudio, a mis compañeros de proyecto la Doctora Carmen Galo, Doctor Gustavo Fontecha, y Bryan Ortíz; a mis docentes de Maestría y al apoyo del Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM) para poder hacer realidad el presente estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Holland LM, Schroder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grozer Z, Gacser A, Ames L, Haynes K, Higgins DG, Butler G. 2014. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS pathogens* 10:e1004365.

- Jordan I, Hernandez L, Balaguer M, Lopez-Castilla JD, Casanueva L, Shuffelman C, Garcia-Teresa MA, de Carlos JC, Anguita P, Aguilar L. 2014. *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* invasive infections in the PICU: clinical features, prognosis and mortality. *Rev Esp Quimioter* 27:56-62.
- Brian Smith P, Steinbach WJ, Benjamin DK, Jr. 2005. Invasive *Candida* infections in the neonate. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 8:147-162.
- Dignani M-C, Solomkin J, Anaissie B. 2009. *Candida*, p. 197-229. In Anissie E, McGinnis M, Pfaller M (ed.), *Clinical Mycology*, 2 ed. Churchill-Livingstone/Elsevier Inc, London, UK.
- Jordan JA, Durso MB. 1996. Rapid Speciation of the Five Most Medically Relevant *Candida* Species Using PCR Amplification and a Microtiter Plate-Based Detection System. *Mol Diagn* 1:51-58.
- Smith B, Steinbach W. 2012. Chapter 243. *Candida* Species, p. 1196-1202. In Long S, Pickering L, Prober C (ed.), *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 3 ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, Massachusetts, USA.
- San-Blas G, Burger E. 2011. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. *Revista iberoamericana de micologia* 28:1-25.
- Freydiere AM, Guinet R. 1997. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Revista iberoamericana de micologia* 14:85-89.
- 2013, posting date. *CHROMagar™ Candida*, Instrucciones de Uso. [Online.]
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarria JI, Colombo AL. 2013. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* 8:e59373.
- Richardson M, Rautema R, Hietanen J. 2007. Diagnosis of *Candida* infection in Tissue by Immunohistochemistry, p. 1-11. In Kavanagh K (ed.), *Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques*. Chapter 1. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England.