

*Universidad Nacional del Nordeste*  
FACULTAD DE MEDICINA  
Maestría en Micología Médica

***Candiduria en una UCI pediátrica. Agentes  
etiológicos, perfil de sensibilidad y capacidad de  
formación de biopelícula***

**Tesis presentada para la obtención del título de  
Magíster en Micología Médica**

---

**Maestrando:** Bioq. ALVAREZ, Christian

**Director:** Dra. CORDOBA, Susana

**Co-director:** Dr. GIUSIANO, Gustavo

**AÑO-2016**

## Dedicatoria:



A mis padres por su apoyo incondicional, que me inculcaron la cultura del trabajo, esfuerzo, perseverancia y estudio.

## Índice:

- 
- Resumen.....pag.4.
  - Introducción.....pag.6
  - Justificación o problemática de tema.....pag.18.
  - Hipótesis.....pag.21
  - Objetivos.....pag.22
  - Materiales y métodos.....pag.23
  - Resultados.....pag.33
  - Discusión.....pag.53
  - Conclusiones.....pag.75
  - Bibliografía.....pag.76

## Resumen:

Durante el período de enero de 2010 a septiembre de 2013 se procedió a realizar un estudio de tipo descriptivo y prospectivo sobre candiduria, tomando como población de estudio pacientes pediátricos sondados admitidos en la UCI del Hospital del Niño Jesús de Tucumán (HNJT)-Argentina y que habían presentado cultivos positivos para *Candida* en las muestras de orina. Se confirmaron 46 de 68 casos mediante una segunda toma de muestra previo recambio de sonda, determinando una prevalencia del 5,9 % e incidencia anual de 14,3 cada 1000 pacientes ingresados. En 8 pacientes se aislaron hasta tres veces *Candida*, de estos la mitad tuvieron hasta un cuarto cultivo positivo. Los análisis estadísticos realizados no pudieron demostrar diferencias significativas con ningún factor predisponente registrado (edad, sexo, enfermedad de base, instrumentación médica-quirúrgica, tipo de tratamiento, micosis por *Candida* u otro hongo y sobrevida). Se encontró gran variabilidad en los valores de leucocitos por campo de orina y UFC/mL en las muestras de orina. *Candida albicans* fue el aislado más común (41,3 %), seguida de *C. tropicalis* (30,4 %), *C. glabrata* (8,7 %), *C. krusei* y *C. parapsilosis* cada una con (4,3 %) y en tres pacientes coexistieron *C. albicans* y *C. tropicalis* y en uno *C. tropicalis* y *C. lusitaniae*. Se detectaron dos aislados resistentes a fluconazol, ambos por *C. krusei*. Y se observó que el 100 % de las cepas testeadas fueron capaces de formar biopelículas *in vitro*. En base a estos datos, se concluye que independientemente de los factores de riesgo, el número de leucocitos y UFC/mL observados y de la especie aislada, todas aquellas muestras de orina positivas para *Candida* provenientes de pacientes pediátricos sondados deben ser consideradas como compatibles con candiduria hasta confirmación con un nuevo cultivo positivo, previo recambio de sonda. El tratamiento de profilaxis y/o empírico con fluconazol es adecuado en el HNJT. Sin embargo, es esencial identificar las levaduras a nivel de especie debido a existencia de cepas con resistencia intrínseca o secundaria a dicho antifúngico. Por último, la formación de biopelícula por

*Candida* podría explicar la poca o nula actividad del fluconazol en aislados sensibles *in vitro* y la duración de la infección en los pacientes con sucesivos aislados.

## Introducción:



Las levaduras del género *Candida* pueden ser encontradas en varios ecosistemas tales como suelo, comida, agua, o bien, formar parte de la micobiota de los humanos y animales. Son microorganismos comensales que habitan principalmente el tracto gastrointestinal y también forman parte de la biota vaginal, la uretra y los pulmones. Sin embargo, si se producen alteraciones o modificaciones en el equilibrio existente entre (Individuo-*Candida*), dicha levadura puede expresar factores de virulencia y comportarse como un patógeno oportunista produciendo una gran variedad de enfermedades (1).

La ruptura del equilibrio puede ser producida por uno o varios factores al mismo tiempo. Entre ellos, la disminución de las defensas del hospedador de origen fisiológico (edades extremas, embarazo), por enfermedades de base (diabetes, endocrinopatías), por inmunodepresión (virus de inmunodeficiencia humana (VIH), leucemia), por tratamientos (antibioticoterapia, quimioterapia, corticoterapia), entre otros. O bien, por la disrupción anatómica producto de quemaduras, la implantación de dispositivos médicos o cirugías invasoras. Estas afirmaciones fueron corroboradas por técnicas de biología molecular, demostrando que en algunos casos los microorganismos aislados de las infecciones eran idénticos a los provenientes de la biota autóctona del paciente (2).

Las infecciones fúngicas, invasoras o no, han aumentado en los últimos años en frecuencia y en complejidad. Entre los hongos levaduriformes es de destacar el incremento de las infecciones por *Candida*, especialmente las fungemias nosocomiales. En la década de los años 80, el National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS) confirmó el crecimiento significativo de la incidencia de infecciones fúngicas que pasaron de 2,0 a 3,8 infecciones/1000 pacientes al final de esa década, el 78 % de las mismas fueron causadas por levaduras del género *Candida*. Asimismo, entre los

microorganismos que causaban infección del torrente sanguíneo y que se aislaban en hemocultivos, los hongos ocuparon el 4º lugar, por delante de patógenos tan comunes como *Escherichia coli*. Las candidemias nosocomiales representaron el 8-10 % del total de infecciones hospitalarias adquiridas por vía hematológica en EE.UU. Esto corresponde a un aumento del 487 % en su frecuencia durante este período; con 5 a 10 casos cada 10.000 ingresos, tanto en pequeños como grandes hospitales; y con una tasa de mortalidad del 38-50 % (3).

En un reciente estudio multicéntrico, realizado entre 2008 al 2010, Nucci *et al.* (4) constataron que Argentina fue el país de Latinoamérica con la tasa más alta de candidemia 1,95 casos por cada 1000 admisiones y 0,24 casos cada 1000 pacientes-día; un alto porcentaje de niños (44,2 %) habían sufrido al menos un episodio de candidemia; *Candida albicans* fue la especie aislada con más frecuencia en sangre, seguida de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*; y la mayoría de las cepas presentaron bajas tasas de resistencia frente a los antifúngicos testeados.

Es necesario aclarar que el uso de las drogas azólicas como el fluconazol en profilaxis o en tratamientos continuos a bajas dosis, en ocasiones, genera selección de especies con resistencia primaria o con capacidad de desarrollar resistencia secundaria (5).

La ruta de infección por *Candida* puede ser endógena o exógena. La mayoría de las veces la infección por *Candida* es de origen endógeno, es decir, causada por levaduras integrantes de la microbiota autóctona del paciente. En tales circunstancias, el tracto digestivo constituiría la principal puerta de entrada del microorganismo en la sangre. Se postula que en pacientes neutropénicos las lesiones de la mucosa digestiva favorecerían el paso de las levaduras de la luz intestinal al torrente sanguíneo. Mientras que, en los pacientes no neutropénicos la invasión sanguínea sería precedida por la colonización del tracto digestivo y posterior translocación del hongo a través de la pared

intestinal. En cualquier caso, la colonización del tracto digestivo condicionaría, en gran medida, el desarrollo de candidiasis invasora (6). En otras ocasiones el origen de la infección es exógeno, tras colonización de catéteres, dispositivos intravasculares, o debido a la transmisión cruzada (por las manos del personal). Es importante aclarar, que algunas especies de *Candida* son capaces de permanecer hasta 45 min en las manos del personal sanitario (7).

Independiente de la vía de infección, *C. albicans* es la especie que con mayor frecuencia se aísla de muestras biológicas. Aunque con el paso del tiempo se observaron cambios paulatinos de la prevalencia de especies de *Candida* productora de las infecciones hospitalarias. Estos hallazgos se encuentran condicionados por los factores predisponentes presentes en los pacientes.

En la actualidad, en los países Latinoamericanos existe un significativo incremento de infecciones por *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (4,5,8-10). En contraste con la alta incidencia de *C. glabrata* en los Estados Unidos de Norteamérica. Además, se han descrito especies que tienen similitudes fenotípicas a algunas de las especies conocidas de *Candida*, pero que son genéticamente distintas. Entre ellas, *Candida dubliniensis*, especie muy próxima a *C. albicans*, al principio se aisló en infecciones orales y orofaríngeas en pacientes con SIDA y también se observó que algunos aislados pueden presentar resistencia al fluconazol (11). Otras especies descritas son *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, las mismas forman parte del complejo *C. parapsilosis* y tienen mínimas diferencias en su respuesta a los antifúngicos (12). Cabe destacar que *C. orthopsilosis* ha sido implicada en brotes nosocomiales (13).

También se han descrito *C. nivariensis* y *C. bracarensis* como especies que forman parte del complejo *C. glabrata* (14,15). La primera fue descrita por primera vez en España y luego fue aislada de diferentes tipos de infecciones en Indonesia, Japón e

Inglaterra; los aislados en general son menos sensible a los azoles que *C. glabrata*. *C. braccarensis* ha causado diferentes tipos de infecciones en Portugal, Inglaterra y Estados Unidos, siendo su sensibilidad a los antifúngicos similar a la de *C. glabrata* (16).

Por otro lado, las infecciones hospitalarias constituyen un problema endemo-epidémico controlable, aunque son difíciles de erradicar. En la actualidad se las denominan como Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud (IACS), debido al incremento de los procedimientos ambulatorios y con el objeto de acercar su significado al concepto de calidad de la atención médica y seguridad del paciente. Las IACS son complicaciones que ocurren en todos los hospitales del mundo, aunque su incidencia varía según el tipo de pacientes y la calidad de atención que se les brinde. En general, afectan a entre el 4 y el 13 % de las personas que requieren internación y son más frecuentes en las unidades de cuidados intensivos (UCI) (17).

La internación en las UCI promueve y hace más susceptibles a los pacientes a las IACS debido a: la enfermedad de base que padecen, la instrumentación diagnóstica, los procedimientos médicos-quirúrgicos, las estancias prolongadas y al uso previo de antibióticos de amplio espectro. Asimismo, los avances diagnósticos y terapéuticos surgidos en las últimas décadas han favorecido el aumento del número de pacientes: trasplantados, onco-hematológicos, con enfermedades crónicas, recién nacidos prematuros, inmunodeprimidos, quemados, críticos, traumatizados, quirúrgicos sometidos a cirugía mayor, etc.; lo cual, condiciona la aparición y el incremento de una población con alto riesgo de sufrir infecciones fúngicas (3,4,10,17).

Una de las principales complicaciones de los pacientes hospitalizados en las UCI son las infecciones del tracto urinario (ITU), las cuales representan del 30 al 40 % de las IACS (18-21). Estos porcentajes varían en los diferentes centros asistenciales y dependen de múltiples factores inherentes al hospedador, así como, de los

procedimientos y tratamientos que les son aplicados. En un estudio multicéntrico realizado en las UCI de Europa demostraron que las ITU se encontraban como la tercera causa de infección de los pacientes hospitalizados (22). Mientras que, los datos de la Encuesta Nacional de Prevalencia de IACS de Argentina, en 2004 y 2005 indicaron que de 68 hospitales, 53 notificaron datos de UCI de adultos polivalente (26 en 2004 y 27 en 2005), con un total de 359 pacientes (158 en 2004 y 201 en 2005). Las ITU (13,4 %) ocuparon el tercer lugar; 64,7 % se asociaron a catéter urinario; y 87,5 % de los episodios tuvieron confirmación microbiológica y la mayor prevalencia fue de bacilos Gram negativos (68,7 %) (17).

La candiduria, definida por la presencia de levaduras del género *Candida* en orina, es la ITU de origen fúngico que se observa con mayor frecuencia en las instituciones hospitalarias y constituye hasta un 5% de los urocultivos positivos (1,21,23).

La mayoría de los estudios coinciden en que *C. albicans* representa entre el 50 al 70 % de los aislamientos de levaduras en orina, seguidos por *C. glabrata* y *C. tropicalis*. *C. parapsilosis* se relaciona principalmente con candiduria en pacientes neonatos (8,9, 21,23-30). Sin embargo, muchos centros asistenciales no identifican a nivel de especie los aislamientos de orina y/o no realizan pruebas de sensibilidad frente a los antifúngicos y además, no publican sus hallazgos. Por consiguiente, existe un sub-registro y un desconocimiento de la epidemiología de la candiduria en distintas regiones del mundo.

En un estudio realizado por Kauffman *et al.* (23) sobre 861 pacientes, hallaron que *C. albicans* representó el 51,8 % de los aislados, seguido por *C. glabrata* (15,6 %), *C. tropicalis* (7,9 %) y *C. parapsilosis* (4,1 %). En el 2014, Garcia-Effron *et al.* (31), en un estudio multicéntrico sobre fungurias realizado en Argentina (datos no publicados) detectaron 240 casos en 15 centros hospitalarios, de los cuales el 79,6 % de los pacientes se encontraban internados en una UCI o en una unidad de cuidados

intermedios. El 86,2 % de las fungurias habían sido producidas por 4 especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la especie más frecuente con el 43,3 %, seguido por *C. tropicalis* (30 %), *C. glabrata* (8,3 %) y *C. parapsilosis* (4,6 %).

Según Kauffman *et al.* (23), el porcentaje de positividad de las candidurias en pacientes internados puede acrecentarse hasta en un 25% en los individuos sondados. Tal observación concuerda con numerosas investigaciones a nivel mundial (18-21,32). Es probable que, el incremento de cultivos de orina positivos provenientes de pacientes sondados, sea durante la colocación de la sonda vesical. En dicho procedimiento pueden arrastrarse levaduras al interior de la mucosa uretral; tal vez, por la mala higiene del paciente durante la manipulación. En contraste, Blumberg *et al.* (2), demostraron candidemia en pacientes internados en UCI producto de la transmisión cruzada por manos del personal. El 34 % de los adultos y el 30 % de los niños ingresados estaban colonizados durante su estancia en la UCI. Estos autores, en el mismo periodo aislaron especies de *Candida* en las manos del personal que los atendía. Los análisis epidemiológicos moleculares demostraron la transmisión cruzada a través de las manos del personal.

Por otro lado, durante la implantación de la sonda vesical se producen micro-traumas en el epitelio urinario y un vaciado deficiente de la orina, lo cual agravaría y comprometería la integridad del sistema genito-urinario, por lo que, estos eventos también promoverían la infección por especies de *Candida* (23).

Otros aportes indican que los factores de riesgo que determinarían la aparición de candiduria son: edades extremas (neonatos y adultos mayores), el sexo femenino, la hospitalización prolongada en las UCI, anormalidades del tracto urinario, inmunodepresión, diabetes, terapia con antibióticos de amplio espectro y la profilaxis antifúngica durante largos periodos (9,23,25,26,28,29,33-36).

Los pacientes sondados o no diagnosticados de candiduria, pueden sufrir complicaciones tales como: fiebre, abscesos renales y peri-renales, bolas fúngicas, candidiasis diseminada e incluso la muerte (9,21,23,32,34).

Existen numerosos debates en torno al diagnóstico de la candiduria, sobre todo aquellos relacionados con la interpretación de un cultivo positivo para *Candida*; este puede ser considerado como contaminación, colonización o infección. Por un lado, el problema relacionado con la contaminación de las muestras de orina puede subsanarse mediante la solicitud de un nuevo cultivo. En el caso de que este fuera negativo, se considera que la presencia de levaduras era una contaminación. Sin embargo, un nuevo resultado positivo puede ser interpretado como infección de vejiga o riñón, o bien, colonización de la vejiga o de la sonda urinaria. Esta última en general, no requiere tratamiento excepto en pacientes neonatos (37-40).

La decisión de retirar o no la sonda vesical es una problemática aún sin resolver, a pesar de que existen algunas evidencias que indicarían que el recambio de sonda vesical haría desaparecer la candiduria en el 20% de los casos y su retirada entre el 30 y 40% (21,23,34,39). En estos casos, la persistencia de especies de *Candida* en orina podría interpretarse como una infección por vía hematógena o ascendente, o bien, una colonización. Lo cual, podría derivar o no en diferentes complicaciones sino se aplica un tratamiento antifúngico oportuno y adecuado.

En contraste, la conducta médico-terapéutica frente al hallazgo de bacterias Gram negativas en orina se encuentra definida. Por ejemplo, la presencia de *E. coli* es considerada, casi siempre, una infección ascendente desde uretra hacia los riñones y en ocasiones, como una diseminación hematógena. El aislamiento de *Staphylococcus aureus* en muestras de orina hace sospechar y requiere la búsqueda de una bacteremia

o endocarditis. En algunos casos, la infección por *S. aureus* es atribuida a la instrumentación del sistema genitourinario de los pacientes (21).

Si bien se ha establecido y corroborado la asociación de las ITU por diseminación hematógena de especies de *Candida*, aún no existe documentación que respalde un fallo renal secundario a una pielonefritis. O bien, en casos de ausencia de obstrucción urinaria, no hay datos que sugieran una falla renal crónica por una ITU de vías altas por especies de *Candida*. Además, no está claro el mecanismo de adherencia y subsecuente crecimiento de las levaduras cuando realizan la infección por vía ascendente (21).

En la actualidad, los hallazgos del laboratorio no son concluyentes a la hora de identificar la candiduria significativa en los pacientes y en portadores de sonda vesical (9,21,23,32,34,37-40).

La decisión de realizar tratamiento es otro de los inconvenientes planteados y que aún no encuentra respuesta concluyente. En un estudio realizado por Ayeni *et al.* (41), expusieron que el 60,2 % de los profesionales médicos indicaban terapia con antifúngicos frente a un único resultado positivo para *Candida* en orina, sin tener en cuenta la confirmación de la infección. Estos datos se repiten en otras series (21,34,36,37,40).

Según las guías para el tratamiento de la candidiasis se recomienda el tratamiento solo para los siguientes pacientes: neonatos de bajo peso, con procedimientos genitourinarios, neutropénicos, trasplantados de riñón y sintomáticos (37-40). Sin embargo, esas recomendaciones tienen un nivel IIIB, lo que significa que tiene solamente un grado de evidencia moderado basado en la experiencia clínica, opiniones de expertos, estudios descriptivos o reportes de expertos.

La conducta terapéutica a seguir se complejiza debido a que la gran mayoría de los individuos con candiduria son asintomáticos. Solamente un 4 % de 530 pacientes con candiduria estudiados por Kauffman *et al.* (23), habían presentado síntomas sugerentes de ITU. Así como también, el 25 % los pacientes que presentaban síntomas y signos de infección urinaria baja (cistitis) o pielonefritis, tenían una infección mixta con candiduria y bacteriuria, lo que podría explicarla sintomatología y la piuria.

La suma de la no existencia de un método de referencia para el diagnóstico de la ITU por especies de *Candida*, la dificultad de definir el sitio y fuente de infección de la candiduria y si la presencia de las mismas en la orina reflejan una infección o colonización, terminan repercutiendo directamente en la terapéutica y en los gastos del sistema de salud. En 2004, Olaechea *et al.* (42), en un estudio sobre el impacto económico de la colonización o infección por *Candida* en pacientes críticos hospitalizados en UCI, demostraron que la colonización aumentaba la estadía 6,2 días con un costo estimado de 8.000 euros; mientras que, en la infección se prolongaba hasta los 12,7 días y el gasto se duplicaba.

A pesar de los numerosos interrogantes presentes sobre la candiduria, son escasos los reportes a nivel nacional e internacional, y aún más, aquellos relacionados con pacientes pediátricos que tienen portación de sonda vesical.

Por último, las cepas de *Candida* que son sometidas a estudios "*in vitro*" del tipo microbiológicos, fisiológicos y de patogénesis, se encuentran en estado planctónico (individuos únicos). Sin embargo, cuando se encuentran "*in vivo*", están adheridas a superficies constituyendo ecosistemas complejos conformados por uno o varios microorganismos asociados a una superficie, viva o inerte con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación ocurre cuando las

células planctónicas se adhieren irreversiblemente a una superficie o sustrato. Las células forman una comunidad, que se caracteriza por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora denominada biopelícula (43,44).

En la actualidad, existe un gran interés y un reconocimiento sobre el rol que juegan las biopelículas microbianas en la medicina humana. Se estima que aproximadamente entre un 65% de las infecciones en el ser humano estarían asociadas al fenómeno de adhesión y posterior liberación de matriz extracelular por parte de los microorganismos (45,46).

Una gran variedad de manifestaciones e infecciones causadas por *Candida*, particularmente *C. albicans*, han sido asociadas con la formación de biopelícula en dispositivos médicos implantables. Los dispositivos proveen de las superficies necesarias para la formación de biopelícula, lo cual trae aparejado un consecuente aumento en el porcentaje de candidiasis. Si bien se sabe que la infección se resuelve al remover estos sustratos que soportan la biopelícula formada "*in vivo*", en muchos casos su remoción es imposible debido a la condiciones del paciente, a la localización anatómica del dispositivo o a la enfermedad de base. Por lo tanto, la formación de biopelícula por *Candida* impacta directamente en la salud de los pacientes sujetos a tratamiento invasivos, con el consecuente incremento en la frecuencia, persistencia y severidad de las infecciones (47-53).

Además, la colonización de los dispositivos puede producirse antes o durante la implantación debido a una incorrecta manipulación de los mismos por parte del personal médico. O bien, se produce posteriormente a la implantación al encontrarse en contacto con el organismo, puesto que *Candida* es un comensal de la piel.

La adhesión inicial de las levaduras se ve afectada en un primer momento por las propiedades químicas, hidrofóbicas y la superficie rugosa de los biomateriales. Sin embargo, al momento de que estos son puestos en contacto con fluidos orgánicos (orina, sangre, saliva, entre otros), sus superficies quedan recubiertas con glicoproteínas. Lo cual, produce una modificación de las características químicas de los biomateriales estériles. Seguido de la adhesión de células de *Candida* a las superficies mediada por factores no específicos (hidrofobicidad a la superficie, fuerzas electrostáticas) y por adhesinas específicas que reconocen determinados ligandos. Por ejemplo, el fibrinógeno y fibronectina de la sangre. Luego de producida la adhesión, ocurren varios eventos que promueven a modificaciones estructurales, morfológicas y genéticas de las levaduras tales como: la reproducción celular, proliferación y formación de la biopelícula (53).

La biopelícula (madura) presenta una estructura compleja y tridimensional y una extensa heterogeneidad espacial confiriéndole, a la comunidad de levaduras allí involucradas, propiedades muy diferentes a cuando se encuentran en estado planctónico. Permite la restricción al acceso de determinadas moléculas, la remoción de productos tóxicos, el establecimiento de micro comunidades ecológicas a través de la biopelícula, la comunicación mediante canales según los requerimientos, etc. (53).

Los estudios demuestran que la biopelícula puede contener alrededor de un 15% de células y un 85% de matriz extracelular. Esta matriz en general está formada de exopolisacáridos que forman canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes y residuos. Allí las levaduras establecen relaciones y dependencias: viven, cooperan y se comunican a través de señales químicas (percepción de *quorum*). Dichas señales regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad, así como un tejido en un organismo multicelular (43,44,53).

Por lo expresado arriba, en el caso de los pacientes con sondaje vesical, la formación de la biopelícula proporcionaría un micro ambiente protector necesario para evadir el arrastre de la orina, la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador y sobre todo, evadir el tratamiento antifúngico suministrado o conferir resistencia a los antifúngicos que más se utilizan (fluconazol y anfotericina B) (32,53).

Diferentes mecanismos pueden ser los responsables de esta resistencia adquirida a los antifúngicos por *Candida* cuando forma la biopelícula. Estos incluyen el impedimento de penetración de las drogas en la matriz, la expresión de genes de resistencia particularmente aquellos que codifican para bombas de eflujo y la persistencia de células más resistentes. Sin embargo, la explicación sobre la resistencia adquirida no está mediada por un único factor, sino que es multifactorial y están involucrados diferentes mecanismos moleculares de resistencia cuando se compara con el de las células en estado planctónico (43,44,53).

## Justificación o problemática de tema:



A pesar de los avances sobre el conocimiento de la candiduria y de existir consensos a nivel nacional e internacional sobre su manejo, a la fecha, se continúan generando controversias sobre la interpretación de un cultivo positivo de orina para *Candida* (37-40). Estos inconvenientes surgen principalmente por la dificultad del laboratorio en poder diferenciar entre colonización e infección.

A diferencia de lo que acontece frente al aislamiento de bacterias en orina, los puntos de corte para determinar infección de las vías urinarias altas o bajas por *Candida* en muestras provenientes de sonda vesical aún no se encuentran establecidos y/o aceptados, principalmente porque se trata de un microorganismo oportunista y su hallazgo debe interpretarse en el contexto de cada paciente. A modo de poder suplir este problema algunos autores y expertos sugieren tener en cuenta valores superiores o iguales a  $10^3$  ó  $10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro de orina (UFC/mL). Sin embargo, aislados con recuentos inferiores a los propuestos en determinados pacientes producen sintomatología e incluso enfermedad. Por otro lado, la mayoría de las investigaciones a partir de las cuales se han determinado el cómo proceder frente a un cultivo positivo para *Candida* han sido realizadas en poblaciones de neonatos, adultos y adultos mayores. En los pacientes pediátricos, el criterio clínico, basado en las experiencias propias, continúa determinando las conductas médicas y/o terapéuticas a seguir, frente a un 1<sup>er</sup> cultivo positivo de *Candida*. Lo cual, termina elevando el costo sanitario y favoreciendo la aparición de cepas resistentes y/o fracasos en el tratamiento (1,5,21,23,32,34).

El entendimiento de la candiduria en la población pediátrica se dificulta aún más; debido a que no existen muchas publicaciones en las que se la relacione con la epidemiología de los pacientes, los aislados y la sensibilidad antifúngica de las cepas.

Durante las últimas décadas, se ha observado un aumento paulatino del número de casos de candiduria en los pacientes sondados de la UCI del Hospital del Niño Jesús de Tucumán (HNJT). Sin embargo, al día de hoy, no existe un protocolo a seguir. Según encuestas personales realizadas al cuerpo médico, la mayoría sugiere tratar con fluconazol o aumentar la dosis en casos de que el paciente se encontrara bajo profilaxis y/o tratamiento empírico y lo mantienen por dos semanas. Otros, valoran el estado clínico del paciente y solicitan nueva muestra, pero no solicitan recambio de sonda y algunos inician la medicación a la espera de nuevo cultivo previo recambio de sonda y, en caso de ser negativo, retiran la misma. Todas estas opciones terapéuticas podrían ser correctas o no. Es por ello que, antes de optar por alguno de estos regímenes sería necesario conocer: la epidemiología de las especies de *Candida* prevalentes en la orina provenientes de pacientes sondados, tasas de resistencia frente al fluconazol, antifúngico utilizado en los pacientes internados en la UCI con riesgo de padecer infecciones fúngicas y como tratamiento de elección en la candiduria.

Asimismo, en el HNJT se han planteado situaciones puntuales en las cuales los aislados eran sensibles *in vitro* al fluconazol pero, a pesar ser medicado con dicho antifúngico, los cultivos subsecuentes continuaban siendo positivos. Probablemente, la persistencia de *Candida* en la orina en pacientes sondados podría ser explicada por la capacidad de producir biopelícula de esos aislados. Sin embargo, estas son suposiciones ya que no se ha realizado estudios que confirmen, por un lado, que las cepas recuperadas de la orina de pacientes sondados del hospital son capaces de formar biopelícula y, por otro lado, si existe asociación con significancia estadística entre candiduria y formación de biopelícula.

Por lo expuesto, se considera que es necesario realizar un estudio que permita conocer: la epidemiología de los pacientes sondados , la prevalencia en este nosocomio de las especies circulantes de *Candida*, el perfil de sensibilidad frente al fluconazol de los aislados y si los mismos son capaces de formar de biopelícula.

El registro y el análisis de estos datos permitirán un mejor entendimiento de la candiduria y ayudará a establecer acciones correctivas al HNJT, con el objetivo final de establecer un protocolo frente a un hallazgo de *Candida* en orina proveniente de pacientes pediátricos sondados. Por otro lado, aportar nuevos conocimientos referente a la capacidad de formar biopelícula por especies de *Candida* aisladas de muestras de orina.

## Hipótesis:



Existe una alta prevalencia de candiduria en los pacientes pediátricos sondados e internados en la UCI del HNJT-Argentina.

*Candida albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia, seguida de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*.

La mayoría de las cepas aisladas de muestras de orina son sensibles al fluconazol y tienen la capacidad de formar biopelícula.

## Objetivos:



Determinar la frecuencia de especies de *Candida* aisladas de muestras de orina provenientes de pacientes pediátricos sondados internados en UCI del HNJT-Argentina y estudiar su sensibilidad al fluconazol y su capacidad de formar biopelícula.

## Específicos:

- ✓ Realizar una base de datos con las referencias epidemiológicas de pacientes sondados internados en UCI.
- ✓ Identificar a nivel de especie las levaduras aisladas de orina de estos pacientes.
- ✓ Estudiar la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol de estos aislados.
- ✓ Evaluar la capacidad de formación de biopelícula de las cepas de *Candida* aisladas.

## Materiales y métodos:



**Diseño:** se realizó un estudio prospectivo y descriptivo que incluyó a todos los casos de candiduria de pacientes pediátricos sondados admitidos en la UCI del HNJT-Argentina durante el período de Enero de 2010 a Septiembre de 2013.

**Población objeto de estudio:** pacientes sondados entre 0 a 14 años, de ambos sexos. En base a las historias clínicas se registraron los siguientes datos: edad, sexo, primer episodio de candiduria y subsecuentes, fiebre, enfermedad de base (diabetes, enfermedad renal, respiratoria, neutropenia, VIH), instrumentación médica-quirúrgica (ventilación mecánica, alimentación parenteral, cirugía previa, drenaje ventricular, diálisis, catéter implantable), tipo de tratamiento (antifúngico, antibiótico, corticoides, quimioterapia), micosis por *Candida* u otro hongo y sobrevida.

**Criterios de inclusión:** en el presente estudio, se incluyeron todos los pacientes pediátricos sondados que al momento de admisión en la UCI tenían cultivos de orina negativos para microorganismos y aquellos pacientes con cultivos de orina positivos para especies de *Candida* posterior a las 72 horas de inserción de la sonda urinaria. La inclusión fue independiente del recuento de leucocitos en el examen microscópico de las muestras y del recuento de UFC/mL de especies de *Candida*.

**Toma de muestra:** las muestras de orina fueron recolectadas por el equipo médico del Servicio de UCI, en forma estéril, por punción de sonda proximal. Para ello, la sonda se obturó hasta completar su llenado con orina y la misma se recolectó por punción con aguja y jeringa estéril (38). Cada vez que los pacientes presentaban un cultivo positivo para *Candida* se les realizaba un recambio de sonda vesical y se tomaba la muestra luego de las 3 horas de retención. La orina fue recogida en un frasco estéril y enviada al

laboratorio para su procesamiento. Las muestras que no fueron procesadas dentro de las 3 horas de recolectadas, fueron conservadas a 4°C por un período máximo de 24 horas. Las muestras remitidas al servicio de Microbiología del Hospital fueron procesadas de acuerdo a los protocolos de trabajo establecidos por el propio servicio.

**Observación microscópica:** 10 mL de la orina se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. El sedimento se examinó en fresco, entre portaobjetos y cubreobjetos, sin ningún agregado. La observación se llevó a cabo con óptica seca a 400 X. Cuando la muestra era escasa (menor a 2 mL) se realizó un examen en fresco de 1 gota, sin centrifugación. En la observación microscópica se consignaron: el número de leucocitos y la presencia o ausencia de levaduras y de pseudomicelio.

Criterio de informe de leucocitos: <1 o 0-1/campo (0-1); 2-5/campo (2-5); 6-10/campo (6-10); 11-15/campo (11-15); 16-30/campo (16-30) y > 30 (>30).

**Siembra:** las muestras se sembraron con ansa calibrada de 5 µL (factor de dilución 1/200) por estriado en mitad de placas de Agar Cisteina Lactosa Deficientes en Electrolito (CLED) ®Britania-Argentina y posterior incubación a 35°C durante 48 horas y en Sabouraud-Glucosa-Agar (SGA) ®Britania-Argentina con Cloranfenicol (250mg/L) e incubación a 28°C durante 24-48 horas, antes de proceder a la observación macroscópica y estudio del crecimiento. Transcurrido el tiempo, fueron informados como negativos los cultivos con ausencia de desarrollo de levaduras, o positivo, frente al desarrollo de especies de *Candida* de 100 UFC/mL o más. Las cepas aisladas se conservaron por duplicado en agua destilada estéril a temperatura ambiente.

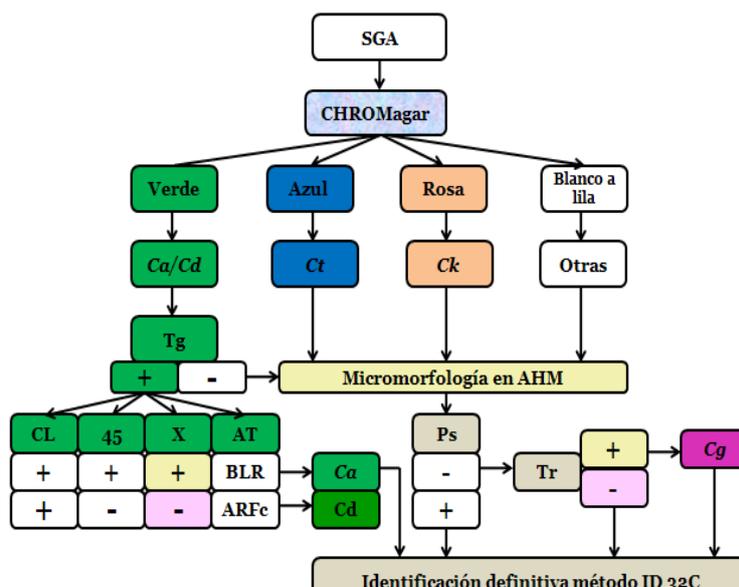
Criterios de informe de las UFC/mL:  $10^2-10^3=10^3$ ;  $10^3-10^4=10^4$ ;  $10^4-10^5=10^5$ ;  $>10^5=10^5$ .

**Activación de las cepas:** las cepas conservadas en agua fueron repicadas por estriado en placas de SGA e incubadas a 28°C por 48 horas, luego se realizó la observación macromorfológica y micromorfológica.

**Macromorfología:** con lupa estereoscópica se procedió a la observación directa de las colonias desarrolladas a 28°C, a fin de observar textura, aspecto, bordes y color.

**Micromorfología:** a partir de las colonias desarrolladas, se realizaron preparaciones por disociación en azul de lactofenol. Se observaron con óptica seca, con objetivos de 10 y 40 aumentos, para definir tamaño y forma de las levaduras y disposición de los brotes. Además, exámenes directos con tinta china con el fin de determinar la presencia o no de cápsula.

**Identificación de las levaduras:** en el Esquema 1 se presentala sistemática de trabajo seguida en el presente estudio para la identificación de las levaduras procedentes de las muestras clínicas.



**Esquema 1:** SGA: cultivo en Sabouraud durante 24 horas a 37°C; CHROMagar: medio cromogénico *Candida*® (CHROMagar Company, París, Francia); Ca/Cd: *Candida albicans* / *Candida dubliniensis*; Ct: *Candida tropicalis*; Ck: *Candida krusei*; Cg: *Candida glabrata*; Otras: resto de las especies de *Candida*; Tg: tubo germinativo; CL: clamidoconidio; 45: cultivo en SGA a 45°C; X: prueba de asimilación de D-xilosa; AT: desarrollo en medio agar Tabaco; BLR: colonias blancas, lisas, de bordes regulares y con escaso o nulo clamidoconidios; ARFc: colonias amarillas, rugosas de bordes festoneados y con abundantes clamidoconidios; AHM: medio agar harina de maíz; Ps: pseudomicelio; Tr: Prueba de asimilación de Trehalosa; ID32C: equipo comercial para identificación de levaduras; +: positivo; -: negativo.

**Siembra en medio cromogénico:** se realizó una suspensión de las levaduras a partir del SGA en solución salina estéril y se sembró por estriado la mitad de una placa con medio CHROMagar *Candida*® (CHROMagar Company, París, Francia). Se incubaron a 37°C durante 48 horas. Al cabo de ese lapso se consignó el color desarrollado y el aspecto de la colonia.

Lectura e interpretación: según las especificaciones del fabricante se identifica presuntivamente a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* cuando el desarrollo de las colonias era de color verde, azul y rosa seco, respectivamente. Por último, a partir de una colonia se repicó en medio de SGA sin antibióticos y se incubó a 37 °C durante 24 horas para continuar con la identificación por medio de estudios morfológicos y fisiológicos en condiciones estandarizadas.

**Formación de tubo germinativo (TG) y clamidoconidios (CL) en agar leche:** se preparó el agar leche de acuerdo con el método publicado por Jitsuron *et al.* (54) y se lo colocó sobre portaobjetos estériles en cámara húmeda. Se sembró una estría por incisión en el medio y se cubrió con un cubreobjetos estéril. Se incubó a 37°C durante 3 horas y se realizó la lectura microscópica a 400X para observar la presencia de TG, luego se procedió a incubar a la misma temperatura durante 48–72 horas para visualizar formación de CL (55).

**Desarrollo en Agar tabaco:** se utilizó tabaco de cigarrillos marca Philip Morris Exceter® (Nobleza-Piccardo S. R. L., Argentina) para la preparación del Agar tabaco. Se realizó una suspensión de las levaduras a partir del SGA en solución salina estéril se sembró las placas en forma de círculo de 1 cm de diámetro y se incubó a 37°C durante 72 horas (55,56).

**Desarrollo a 45°C:** se realizó una suspensión de las levaduras a partir del SGA en solución salina estéril, la misma se sembró en medio de SGA sin antibióticos y se incubó a 45°C durante 24 horas (55,57).

**Prueba de asimilación de D-xilosa:** a partir de un repique de 24 horas en SGA a 37°C se realizó una suspensión en 0,5 mL de solución salina estéril con una turbidez

equivalente al N° 2 de la escala de McFarland. Se agregó una tableta de D-xilosa Rosco® (Rosco, Dinamarca) y se incubó a 37°C durante 3 horas (55,58).

**Cultivo en lámina en medio Agar harina de maíz (AHM):** esta técnica se utilizó para orientar la identificación mediante la observación de las siguientes características micromorfológicas: formación de CL, producción de micelios, pseudomicelios, formación de células gigantes y disposición de blastoconidios. El medio AHM se colocó sobre portaobjetos estériles en cámara húmeda. Se sembró una estría del cultivo en crecimiento activo de 48 horas por incisión en el medio y se cubrió con un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar. Luego se incubó a  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 4 a 5 días y se realizó la observación microscópica a 400X (59).

**Prueba de asimilación de Trehalosa:** a partir de un repique de 24 horas en SGA a 37°C se realizó una suspensión en 0,5 mL de solución salina estéril con una turbidez equivalente al N° 2 de la escala de McFarland. Se agregó una tableta de Trehalosa Rosco® (Rosco, Dinamarca) y se incubó a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (60).

**Identificación definitiva con un equipo comercial:** se utilizó el equipo comercial ID 32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). El procedimiento se realizó según indicaciones del fabricante (61).

**Estudios de la sensibilidad frente al fluconazol:** se empleó el método de Difusión en agar de acuerdo al documento M44-A según el CLSI (62), con discos cargados con 25 µg de fluconazol. Los discos fueron provistos por el Departamento Micología de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud - Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán". Se usó el medio de cultivo agar Mueller Hinton + 2% glucosa + azul de metileno (MHM), de acuerdo a las recomendaciones de Rodero *et al.* (63).

Preparación del inóculo: a partir de un repique del aislado puro en SGA, incubado a 37°C durante 24 horas, se preparó un inóculo de turbidez 0,5 McFarland en solución 0,15 M de cloruro de sodio estéril (solución salina 0,85%) a modo de obtener una suspensión del inóculo de  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL.

Siembra: se colocó un hisopo dentro del tubo que contenía la suspensión del inóculo; se embebió y rotó contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. Luego, se sembró cuidadosamente, sin presionar el hisopo, sobre la placa de MHM en tres direcciones, para obtener crecimiento uniforme en toda la superficie de la misma. Las placas se incubaron con la tapa hacia arriba a 37°C durante 10 - 15 minutos, para la absorción de la humedad.

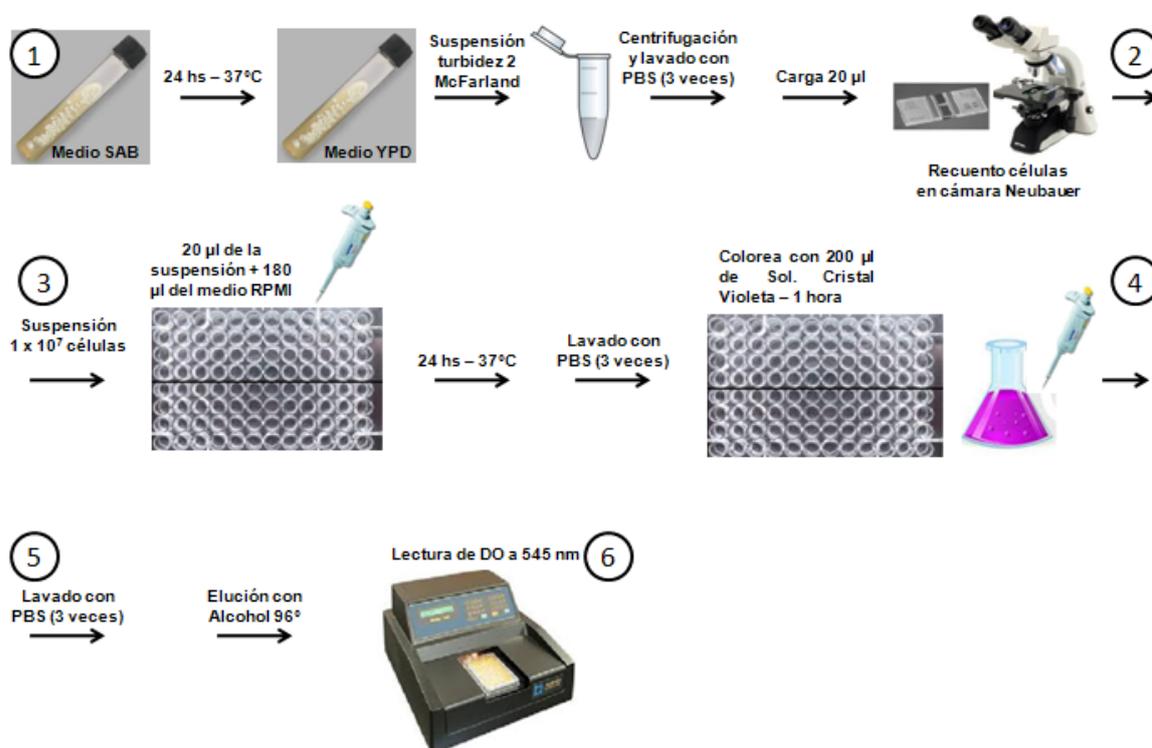
Colocación de los discos e incubación: transcurrido el tiempo, se retiró la placa de la estufa de incubación y se colocaron los discos de fluconazol, a 20 milímetros del borde de la placa en la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril. Por último, se colocó la placa invertida en la estufa a 37°C y se incubó durante 24-48 horas.

Lectura e interpretación de los halos de inhibición: la lectura del diámetro de la zona de inhibición se realizó visualmente y se midió en milímetros con una regla, desde la zona en la cual estaba definido un desarrollo confluyente de colonias, hasta otra zona similar.

Se procedió a realizar dos lecturas a las 24 y 48 horas de incubación para permitir el desarrollo de especies más lentas, tales como *C. parapsilosis*. La interpretación se basó en los criterios establecidos por Rodero *et al.* (63). Se consideraron cepas sensibles aquellas que presentaron halos mayores o iguales a 16 mm, sensibles dosis dependientes (SDD) aquellas que tuvieron halos entre 9 y 15 mm, y resistentes cuando el halo de inhibición era menor o igual a 8 mm.

**Control de calidad:** se utilizaron las cepas ATCC *Candida parapsilosis* 22019 y *Candida krusei* 6258 como control de calidad. Los valores de halo de inhibición fueron: para *C. parapsilosis* ATCC 22019 entre 25-32 mm y para *C. krusei* ATCC 6258 entre 8-12 mm.

**Estudios de la formación de biopelículas en placa:** la formación de biopelículas se evaluó en placas de poliestireno de 96 pocillos fondo plano (Thermo Scientific™) en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina), por la técnica del Cristal Violeta según O'Toole y Kolter, con algunas modificaciones (64). Ver Esquema 2.



**Esquema 2:** secuencia de pasos necesarios para el estudio de formación de biopelículas de cepas de *Candida*.

**Preparación del inóculo (pasos 1-2):** las cepas que se encontraban en medio SAB se activaron mediante inoculación en medio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) e incubación a 37°C durante 24 horas y, a partir del cultivo, se preparó un inóculo de turbidez 2 McFarland en 10 mL de buffer fosfato, se centrifugó y descartó el sobrenadante. La operación se repitió 2 veces más

para eliminar los remanentes del medio de cultivo. El sobrenadante se resuspendió en 1 mL de buffer fosfato. A continuación, se cargaron 20  $\mu$ L en una cámara de Neubauer y se realizó el recuento de levaduras. Por último, la suspensión de levaduras fue preparada y ajustada a la concentración de  $1 \times 10^7$  células mediante el agregado de buffer fosfato.

Fase de adhesión (paso 3): se inocularon 20  $\mu$ L de la suspensión de  $1 \times 10^7$  cél/mL de cada levadura en los pocillos de la placa de microdilución de poliestireno y se le adicionó 180  $\mu$ L del medio RPMI. Luego, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se procedió a descartar el contenido de los pocillos por inversión de la placa y descarga del líquido en un recipiente. Luego, se lavó cada pocillo, mediante el agregado de 200  $\mu$ L de buffer fosfato (PBS) y descarte. La operación se repitió 2 veces más para eliminar las levaduras que no se adhirieron a la superficie de la placa.

Coloración (paso 4): a cada pocillo de la microplaca se le inoculó 200  $\mu$ L de una solución de cristal violeta y se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo, se procedió a descartar el contenido de los pocillos por inversión de la placa y descarga del líquido en un recipiente.

Lectura de la biopelícula (paso 5-6): al concluir el paso 4, se lavó cada pocillo, mediante el agregado de 200  $\mu$ L de PBS y descarte. La operación se repitió 2 veces más para eliminar los restos del colorante. Posteriormente se eluyó con alcohol 96°, por último, se midió la densidad óptica a 545 nm en un lector de Elisa Versamax®. El experimento fue realizado por cuadruplicado. Como cepa control de procedimiento se utilizó *C. albicans* ATCC 90028.

### **Análisis estadístico:**

Para describir variables cuantitativas y cualitativas se calcularon los promedios y porcentajes respectivamente. Para analizar las relaciones de interdependencia entre variables se realizó el Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple (AFCM) presentados en forma de tabla de contingencia, tanto de frecuencias como de valores medios. La información recabada se almacenó en una base de datos creada en Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA), y se analizaron utilizando el paquete estadístico Statistica 7 para el procesamiento de la información. [STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. StatSoft, Inc. (2005). <http://www.statsoft.com/>]. Las variables estadísticamente significativas fueron definidas con un valor de  $p < 0.05$ .

## Resultados:

Se documentaron 46 casos de candiduria de 771 pacientes admitidos en la UCI del HNJT entre Enero 2010 a Septiembre de 2013. La prevalencia de candiduria fue del 5,9 % y la incidencia anual fue de 14,3 cada 1000 pacientes ingresados. Durante este tiempo se solicitó al Servicio de Microbiología del Hospital la búsqueda de hongos en 354 muestras de orina obtenidas de 126 pacientes. En el 53,9 % (n=68) de los pacientes se aislaron levaduras de diferentes especies del género *Candida* y se procedió a tomarles nueva muestra mediante recambio de sonda vesical.

La segunda muestra permitió confirmar candiduria en un 36,5 % del total de pacientes analizados; el 65,2 % pertenecían al sexo masculino y el 34,8 % restantes al sexo femenino (**Tabla 1**). Las edades estaban comprendidas entre los 4 meses y 13 años con una media de 3,34 y un desvío estándar  $\pm 3,00$ ; aproximadamente el 60 % de los niños tenían edades por debajo de la media. Del total de pacientes, el 37 % eran menores de 1 año, el 41,3 % tenían entre 2 a 5 años y el 21,7 % eran mayores de 5 años. Las muestras de orina con cultivos negativos tras el recambio se consideraron como contaminadas. Del total de pacientes en los cuales se confirmó candiduria, el 17,4 % (n=8) tuvieron un tercer cultivo positivo para *Candida* y en la mitad (n=4) se recuperó *Candida* por cuarta vez.

**Tabla 1. Distribución de cultivos de orina que confirmaron o no candiduria a partir del recambio de sonda según el sexo de los pacientes internados en el HNJT (2010-2013).**

Cultivo de orina	Masculino n(%)	Femenino n(%)	Total n(%)
Positivos	30(65,2)	16(34,8)	46(100)
Negativos	11(50,0)	11(50,0)	22(100)

n: número; %: porcentaje

Con respecto a las enfermedades de base que cursaban los pacientes al momento de confirmar candiduria se observó que aproximadamente el 70 % se encontraban con afecciones respiratorias producto de diferentes patologías de base.

De los pacientes que padecían neutropenia, tres tenían fiebre sin foco; uno tenía diagnóstico de leucemia linfocítica aguda (LLA) bifenotípica; otro padecía un síndrome genético (Aicardi) complicado con distress respiratorio por una neumonía adquirida y uno estaba infectado con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) asociado con una histoplasmosis diseminada. Del total de pacientes con enfermedad genitourinaria, a uno le habían detectado un absceso renal y a dos, insuficiencia renal. Otros dos niños habían sido diagnosticados con diabetes del tipo 1.

En cuanto a los procedimientos médico-quirúrgicos a los que estaban expuestos los pacientes, 34 ( $\approx 70\%$ ) se encontraban con ventilación respiratoria mecánica.

Del total de pacientes, 42 ( $\approx 90\%$ ) recibía tratamiento con antibióticos de amplio espectro, la mayoría en forma empírica (85 %) y el resto debido a infecciones bacterianas. Un 60,0 % se encontraba con terapia antifúngica de profilaxis con fluconazol con dosis entre 10-15 mg/Kg/día, a excepción del paciente VIH positivo que era tratado con anfotericina B. Un 30,0 % de los niños eran tratados con corticoides de amplio rango de dosis intravenosa de metilprednisona o dexametasona, de los cuales, el 100 % recibían al mismo tiempo fluconazol. Por último, el paciente con LLA estaba bajo tratamiento de consolidación con quimioterápicos. ([Tabla 2](#))

**Tabla 2. Distribución de frecuencia de los factores de riesgo y co-morbilidad de pacientes sondados internados en la UCI del HNJT con y sin candiduria (2010-2013)**

	<b>Colonización/Infección</b>	<b>Contaminados</b>	
<b>Variables</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>P value</b>
EB*			
Renal	3(6,5)	1(4,5)	0,7459
Respiratoria	34(73,9)	13(59,1)	0,2158
Diabetes	2(4,3)	1(4,5)	0,9704
VIH	1(2,2)	1(4,5)	0,5882
Oncohematológicas	6(13,0)	4(18,2)	0,5756
IMQ†			
Ventilación mecánica	34(73,9)	13(59,1)	0,2158
Alimentación parenteral	20(43,5)	9(40,9)	0,8412
Cirugía previa	8(17,4)	4(18,2)	0,9362
Derivación ventricular	3(6,5)	0	0,2205
Diálisis	3(6,5)	1(4,5)	0,7459
Catéter implantable	5(10,9)	5(22,7)	0,9362
Tratamiento			
Antifúngico profilaxis	27(58,7)	8(36,4)	0,0847
Antibióticos	42(91,3)	18(81,8)	0,2560
Glucocorticoides	14(30,4)	11(50,0)	0,1175
Quimioterápicos	1(2,2)	2(9,1)	0,1938

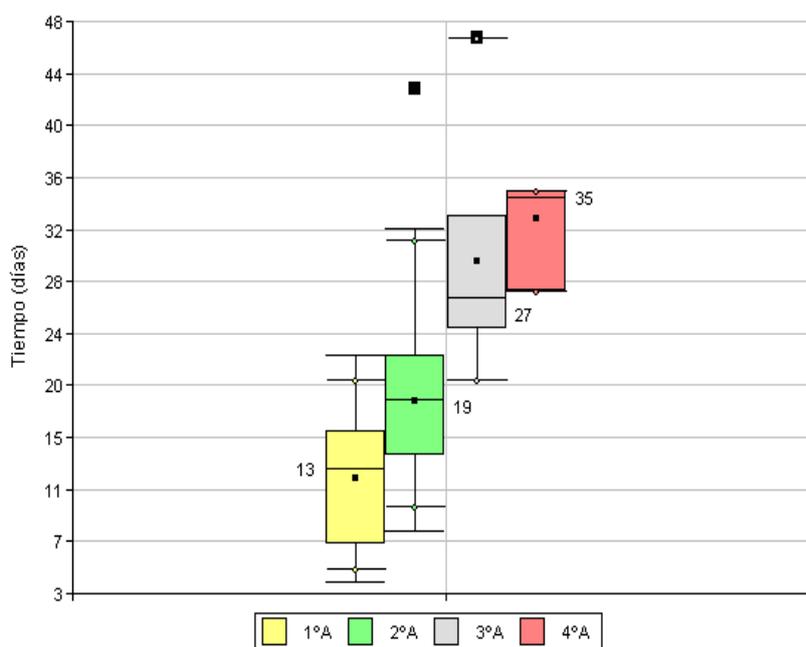
EB\*: Enfermedades de Base; IMQ†: Instrumentación médico-quirúrgica; n: número; %: porcentaje

Otro de los factores de riesgo analizado fue el tiempo de estadía en UCI, siendo el menor tiempo de internación registrado de 17 días y el máximo de 270 días, con una media de 59,4 días y un desvío estándar  $\pm 47,4$ . Los tiempos de aparición de cultivos positivos para *Candida* desde el día de internación se encuentran expresados en la **Tabla 3** y **Fig.5**.

**Tabla 3. Distribución del tiempo de aparición de cultivos positivos en los 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)**

Episodios	n	Tiempo (días)		Mo	DE	Min	Max	Q1	Q3	Asimetría
		$\mu$	m							
A1	46	12,2	13,0	14,0	5,2	4,0	22,0	7,0	16,0	0,05
A2	46	18,3	18,5	4,0	6,7	8,0	43,0	14,0	22,0	1,18
A3	8	29,3	26,5	11,0	8,4	20,0	47,0	24,0	33,0	1,45
A4	4	32,8	34,5	7,0	3,9	27,0	35,0	27,0	35,0	-1,91

A1: primer aislamiento; A2: segundo aislamiento; A3: tercer aislamiento; A4: cuarto aislamiento; n; número;  $\mu$ : media; m: mediana; Mo: moda; DE: desvío estándar; min: valor mínimo; max: valor máximo; Q1: cuartil 1; Q3: cuartil 3.



**Figura 5. Distribución del tiempo de aparición de la candiduria según muestras obtenidas de 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)**

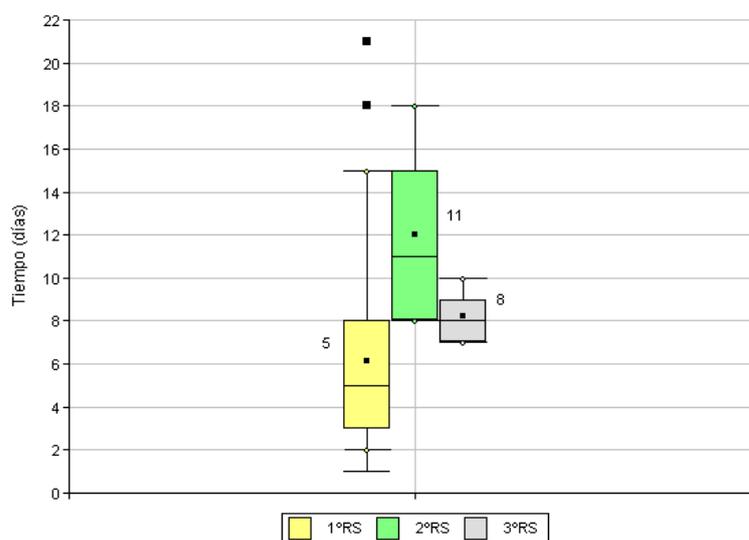
**1ºA:** primer aislamiento; **2ºA:** segundo aislamiento; **3ºA:** tercer aislamiento; **4ºA:** cuarto aislamiento

El análisis del tiempo transcurrido desde la colocación de la sonda hasta el primer aislamiento tuvo variaciones entre 4 a 22 días, con una media de 12,2 días y un desvío estándar  $\pm 5,22$ . Mientras que los días transcurridos hasta un primer, segundo y tercer recambio de sonda se encuentran expresados en la [Tabla 4](#) y [Fig.6](#).

**Tabla 4. Distribución del tiempo empleado para recambio de sonda de los pacientes con un primer cultivo positivo para *Candida* (2010-2013)**

Tiempo (días)									
Episodio	n	$\mu$	m	DE	Min	Max	Q1	Q3	Asimetría
RS1	46	6,15	5,00	4,41	1,00	21,00	3,00	8,00	1,52
RS2	8	12,00	11,00	6,63	8,00	18,00	8,00	15,00	0,53
RS3	4	8,25	8,00	1,50	7,00	10,00	7,00	9,00	0,37

RS1: recambio de sonda 1; RS2: recambio de sonda 2; RS3: recambio de sonda 3; n: número;  $\mu$ : media; m: mediana; DE: desvío estándar; Min: valor mínimo; Max: valor máximo; Q1: cuartil 1; Q3: cuartil 3.



**Figura 6. Distribución del tiempo empleado para recambio de sonda de los pacientes con un cultivo positivo para *Candida* (2010-2013)**

**1ºRS:** primer recambio de sonda; **2ºRS:** segundo recambio de sonda; **3ºRS:** tercer recambio de sonda

Cabe destacar que en la mayoría de los casos, el tiempo de espera entre una toma de muestra y otra, estuvo sujeto principalmente a la culminación de al menos 1 semana de tratamiento con antifúngicos. En el 20 % de los pacientes fue posible registrar erradicación microbiológica de la candiduria mediante la obtención de una muestra negativa. Mientras que en el 78,3 % restante no pudo confirmarse (Tabla 5)

**Tabla 5. Distribución de erradicación microbiológica de candiduria de 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)**

<b>Ausencia de Candiduria</b>	<b>n(%)</b>
Confirmación	10(21,7)
No se confirmó	36(78,3)
<b>Causas de no confirmación</b>	
Fallecimiento	4(11,1)
Dados de alta	15(32,6)
Decisión médica	17(58,7)

n: número; %: porcentaje

El registro de temperatura permitió discernir que el 71,7 % de los pacientes se encontraba con fiebre al momento de diagnosticar la candiduria y un 8,7 % tuvo un episodio de candidemia posterior al episodio de candiduria, recuperándose la misma especie que en orina.

Se realizó un análisis estadístico para buscar diferencias entre los pacientes del sexo masculino y femenino con respecto a los tiempos entre las muestras positivas, número de leucocitos encontrados en las muestras, presencia de levaduras y recuento de unidades formadoras de colonias. Al no encontrarse diferencias con significancia estadística, a excepción de los 4 pacientes con cuatro cultivos positivos, se decidió no analizar las variables por sexos separados.

En el examen en fresco de todas las muestras en que se aislaron levaduras del género *Candida* se observaron elementos levaduriformes brotantes y en el 26,1 % de esas muestras se observó la presencia de pseudomicelio.

Se observaron recuentos de leucocitos  $\leq 10$  en el 65,2 %, 54,4 %, 62,5 % y el 100 % de las 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> y hasta las 4<sup>o</sup> muestras de orina positivas respectivamente. Mientras que, el recuentos de UFC/mL fue superior a  $10^5$  en el 50% de las 1<sup>o</sup> muestras recolectadas,

luego del recambio de sonda cerca del 40 % presentó dicho valor y solo un 25 % de los pacientes con hasta un 3º cultivo positivo tuvieron idéntico recuento (**Tabla 6**).

**Tabla 6. Distribución de las variables presencia de levaduras, pseudomicelio, número de leucocitos y UFC/mL según las muestras positivas de 46 pacientes pediátricos sondados internados en el HNJT (2010-2013)**

<b>Cultivo positivo</b>	<b>1º</b>	<b>2º</b>	<b>3º</b>	<b>4º</b>
	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>
Presencia de levaduras	46(100,0)	46(100,0)	8(100,0)	4(100,0)
Presencia de pseudomicelio	12(26,1)	7(15,2)	1(12,5)	1(25,0)
<b>Nº Leucocitos</b>				
2 a 5	11(23,9)	9(19,6)	4(50,0)	2(50,0)
6 a 10	19(41,3)	16(34,8)	1(12,5)	2(50,0)
11 a 15	4(8,7)	8(17,4)	1(12,5)	-
16 a 30	6(13,0)	9(19,6)	2(25,0)	-
> 30	6(13,0)	4(8,7)	-	-
<b>Recuento de UFC/mL</b>				
10 <sup>2</sup> a 10 <sup>3</sup>	3(6,5)	5(10,9)	2(25,0)	1(25,0)
10 <sup>3</sup> a 10 <sup>4</sup>	9(19,6)	14(30,4)	2(25,0)	1(25,0)
10 <sup>4</sup> a 10 <sup>5</sup>	11(23,9)	9(19,6)	2(25,0)	2(50,0)
>10 <sup>5</sup>	23(50,0)	18(39,1)	2(25,0)	-

n; número; %: porcentaje; UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro

Con el fin de describir variables cuantitativas (edad, tiempo de internación, tiempo entre recambio de sonda, recuento de leucocitos y UFC/mL) de cada uno de los cultivos positivos se calcularon los promedios y porcentajes. (**Tabla 7**)

**Tabla 7. Análisis descriptivo de las variables cuantitativas en 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)**

Variable		n	Promedio	Mediana	Moda	Mínimo	Máximo	Desvío Estándar	Error Estándar
Edad (años)		46	3,34	2,00	2	0	13	3,00	0,44
Tiempo internación		46	59,43	46,00	Múltiple	17	270	47,43	6,99
A1	TPO	46	12,20	13,00	Múltiple	4	22	5,22	0,77
	LEU	46	3,50	3,00	3	2	6	1,35	0,20
	UFC	46	4,17	4,50	5	2	5	0,97	0,14
A2	TPO	46	6,15	5,00	4	1	21	4,41	0,65
	LEU	46	3,63	3,00	3	2	6	1,25	0,18
	UFC	46	3,87	4,00	5	2	5	1,07	0,16
A3	TPO	8	12,00	11,0	11	8	18	3,63	0,87
	LEU	8	3,13	2,50	2	2	5	1,36	0,48
	UFC	8	3,50	3,50	4	2	5	1,20	0,42
A4	TPO	4	8,14	8,00	7	7	10	1,50	0,50
	LEU	4	2,50	2,50	2	2	3	0,58	0,29
	UFC	4	3,25	3,50	4	2	4	0,96	0,48

A1: primer aislamiento; A2: segundo aislamiento; A3: tercer aislamiento; A4: cuarto aislamiento; n: número; TPO: tiempo (días); LEU: recuento de leucocitos por campo; UFC: recuento de unidades formadoras de colonia por mililitro.

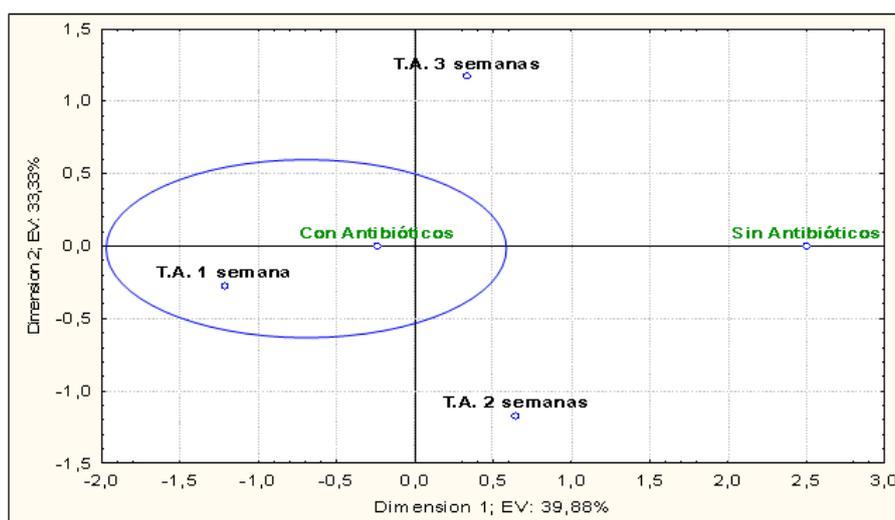
Luego, se analizaron las relaciones de interdependencia entre variables mediante el Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple (AFCM) para ver afinidad entre dos o más variables, presentados en forma de tabla de contingencia, tanto de frecuencias como de valores medios. (Tabla 8)

**Tabla 8. Análisis de Correlación entre las variables cuantitativas en 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)**

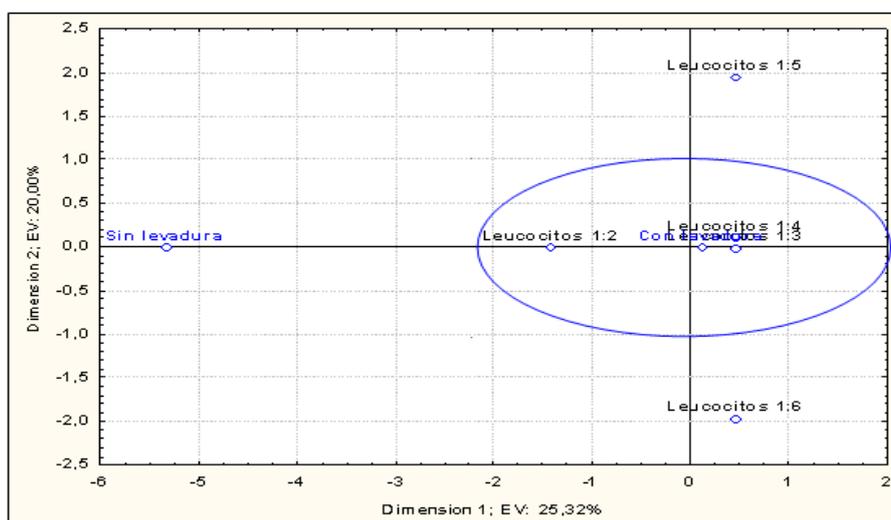
	Edad	TPI	A1			A2			A3			A4			
			TPO	LEU	UFC										
<b>Edad</b>	1	-0,02	0,06	-0,94	-0,11	-0,41	-0,84	0,8	-0,21	-0,8	0,8	-0,44	-0,85	0,78	
<b>TPI</b>	-0,02	1	-0,31	-0,32	0,98	-0,35	-0,26	0,5	0,98	-0,5	-0,51	0,3	-0,5	0,41	
<b>A1</b>	TPO	0,06	-0,31	1	0,03	-0,5	-0,71	0,48	-0,3	-0,32	0,3	-0,12	0,69	0,08	0,35
	LEU	-0,94	-0,32	0,03	1	-0,23	0,53	0,88	-0,9	-0,14	0,9	-0,57	0,3	0,98	-0,89
	UFC	-0,11	0,98	-0,5	-0,23	1	-0,14	-0,28	0,5	0,98	-0,5	-0,5	0,16	-0,41	0,25
<b>A2</b>	TPO	-0,41	-0,35	-0,71	0,53	-0,14	1	0,06	-0,3	-0,26	0,3	0,14	-0,64	0,57	-0,86
	LEU	-0,84	-0,26	0,48	0,88	-0,28	0,06	1	-0,9	-0,1	0,9	-0,69	0,68	0,85	-0,56
	UFC	0,82	0,51	-0,34	-0,94	0,47	-0,33	-0,94	1	0,34	-1	0,47	-0,41	-0,96	0,75
<b>A3</b>	TPO	-0,21	0,98	-0,32	-0,14	0,98	-0,26	-0,1	0,3	1	-0,3	-0,65	0,37	-0,33	0,26
	LEU	-0,82	-0,51	0,34	0,94	-0,47	0,33	0,94	-1	-0,34	1	-0,47	0,41	0,96	-0,75
	UFC	0,8	-0,51	-0,12	-0,57	-0,5	0,14	-0,69	0,5	-0,65	-0,5	1	-0,79	-0,41	0,25
<b>A4</b>	TPO	-0,44	0,3	0,69	0,3	0,16	-0,64	0,68	-0,4	0,37	0,4	-0,79	1	0,19	0,17
	LEU	-0,85	-0,5	0,08	0,98	-0,41	0,57	0,85	-1	-0,33	1	-0,41	0,19	1	-0,9
	UFC	0,78	0,41	0,35	-0,89	0,25	-0,86	-0,56	0,8	0,26	-0,8	0,25	0,17	-0,9	1

A1: primer aislamiento; A2: segundo aislamiento; A3: tercer aislamiento; A4: cuarto aislamiento; TPI: tiempo de internación en UCI (días); TPO: tiempo (días); LEU: recuento de leucocitos por campo; UFC: recuento de unidades formadoras de colonia por mililitro.

Se encontraron correlaciones significativas entre el tiempo de estadía de los pacientes en la UCI y el tiempo transcurrido hasta la obtención de un tercer cultivo positivo ( $r=0,98$ ;  $p=0,017$ ), así como también entre el tiempo de internación y el recuento de UFC/mL del primer aislamiento ( $r=0,98$ ;  $p=0,025$ ). Por otro lado, se representó gráficamente la asociación entre las variables analizadas (**Fig.7 y 8**)



**Figura 7. Tiempo de aparición de candiduria (en semanas) según tratamiento con antibióticos**



**Figura 8. Recuento de leucocitos según presencia o ausencia de levaduras en la primera muestra positiva.**

Leucocitos 2: 2 a 5 por campo; Leucocitos 3: 6 a 10 por campo; Leucocitos 4: 11 a 15 por campo; Leucocitos 5: 16 a 30 por campo y Leucocitos 6: más de 30 por campo.

Las gráficas se interpretan según la proximidad de 2 categorías, en cuanto más cerca estén, mayor asociación existe entre ambas. En la **Fig. 7**, se observa que el tratamiento con antibióticos presentó mayor asociación con el tiempo de aparición de la candiduria en pacientes sondados por más de 1 semana. En la **Fig. 8**, se aprecia que un recuento de 6-10 y 11-15 leucocitos por campo y en menor medida de 2-5 leucocitos por campo se encuentra asociado a la presencia de levaduras en muestras de orina de pacientes pediátricos sondados.

Se realizaron Test No Paramétricos (Anova de Friedman para variables dependientes) para detectar diferencias entre los días transcurridos entre las muestras positivas y no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de recambio ( $p=0,2746$ ) (**Tabla 9**). Mientras que si se encontraron diferencias significativas entre los conteos de leucocitos ( $p=0,01642$ ) (**Tabla 10**) (**Fig.9**)

**Tabla 9. Análisis estadístico del tiempo transcurrido entre las tomas de muestra de pacientes internados en el HNJT con confirmación de candiduria (2010-2013)**

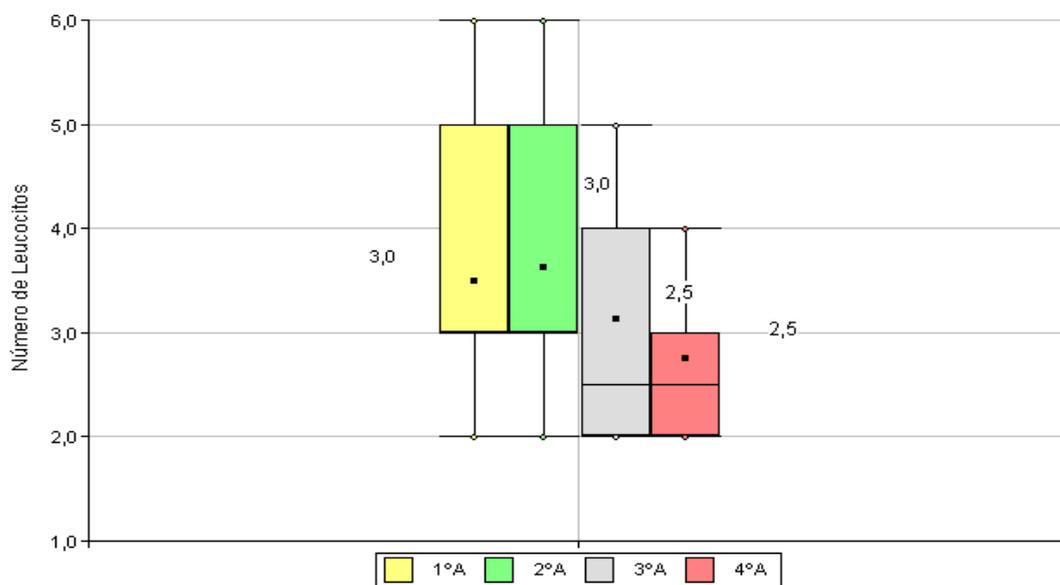
<b>ANOVA Chi Sqr. (N = 2, df = 3) = 3,000000 p = 0,2746</b>				
<b>Coefficiente de Concordancia = 0,50000 Aver. rank r = -,4E-7</b>				
<b>Recambio de sonda (días)</b>	<b>Rango medio</b>	<b>Suma de los rangos</b>	<b>Media</b>	<b>Desvío Estándar</b>
RS1	1,50	6,00	6,15	4,41
RS2	1,88	7,50	12,0	3,63
RS3	2,63	10,50	8,25	1,50

RS1: recambio de sonda 1; RS2: recambio de sonda 2; RS3: recambio de sonda 3

**Tabla 10. Análisis estadístico del recuento de leucocitos en las muestras de pacientes internados en el HNJT con confirmación de candiduria (2010-2013)**

ANOVA Chi Sqr. (N = 4, df = 3) = 7,961538. p = 0,01642				
Coeficiente de Concordancia = 0,66346 Aver. rank r = 0,55128				
	Rango medio	Suma de los rangos	Media	Desvío Estándar
A1	1,50	6,00	3,50	1,35
A2	2,13	8,50	3,63	1,25
A3	3,00	12,00	3,13	1,36
A4	3,38	13,50	2,75	0,96

A1: primer aislamiento; A2: segundo aislamiento; A3: tercer aislamiento; A4: cuarto aislamiento



**Figura 9. Distribución del número de leucocitos observados en las muestras de orina según los aislamientos obtenidos de los 46 pacientes sondados internados en el HNJT (2010-2013)**

A1: primer aislamiento; A2: segundo aislamiento; A3: tercer aislamiento; A4: cuarto aislamiento

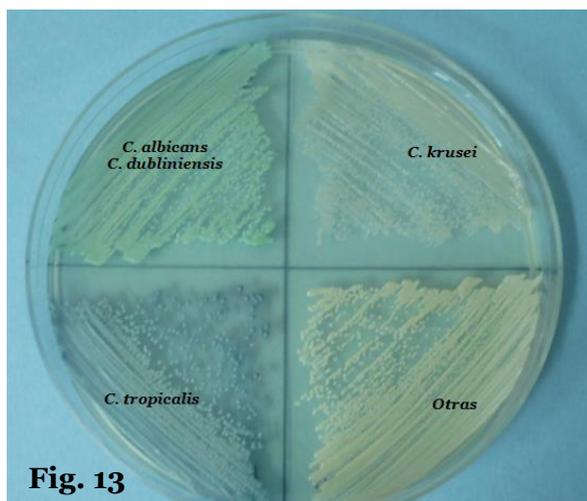
### Morfología de los cultivos

Se observaron colonias de color blanco o crema, brillante o mate, húmedas, generalmente en relieve y de rápido crecimiento en el medio SGA. En general, las mismas presentaron una textura lisa (**Fig.10**), aunque algunas tenían zonas rugosas (**Fig.11**). En la observación microscópica de las colonias solo se evidenció la presencia de levaduras brotantes (**Fig.12**).



**Fig.10 y Fig.11:** morfología macroscópica y coloración de levaduras del género *Candida* en el medio SGA; **Fig. 12:** morfología microscópica con óptica seca a 400X.

El cultivo en medio CHROMagar *Candida*® permitió identificar presuntivamente a *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* cuando el desarrollo de las colonias fue de color verde, azul y rosa seco, respectivamente (**Fig.13**). Mientras que la observación de otros colores (lila, magenta, blanco, etc) permitió evidenciar la presencia de otras levaduras. También, la utilización de este medio favoreció la visualización de cultivos mixtos.

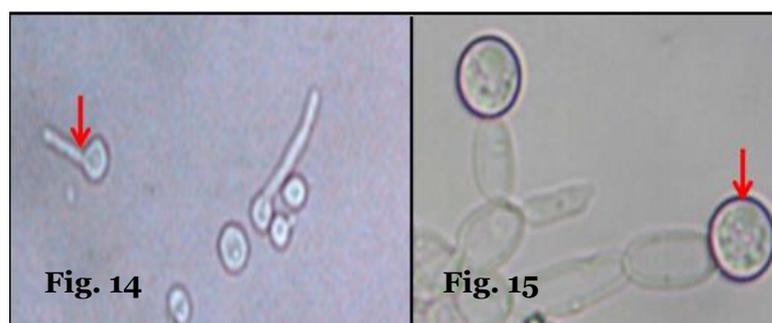


**Fig.13:** morfología macroscópica y coloración de las colonias de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y otras especies. en el medio cromogénico *Candida*® CHROMagar Company.

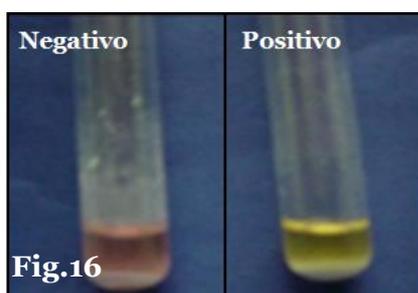
La mayoría de los aislados fueron capaces de formar pseudomicelio en el medio AHM. Observando e interpretando de manera presuntiva, que la presencia de pseudomicelio con blastoconidios agrupados y clamidoconidios resulta compatible con *C. albicans* y/o *C. dubliniensis*; la presencia de pseudomicelio largo y escasamente ramificados con blastoconidios únicos, en pares o pequeños grupos dispuestos a espacios regulares, presuntivo de *C. tropicalis*; la formación de elementos brotantes elipsoidales a cilíndricos con cicatrices planas y bien circunscriptas, y que en general presentaban pseudomicelio robusto y con células que se liberan y se organizan paralelo al eje principal compatible con *C. krusei*; y el desarrollo de pseudomicelio, ramificado compuesto por blastoconidios ovoides muy alargados compatible con *C. parapsilosis*.

Mientras que en 10 aislados se observó la presencia de blastoconidios muy pequeños sin formación de pseudomicelio. Al realizar la prueba de asimilación de trehalosa en este grupo, se evidenció que todos fueron capaces de asimilar ese azúcar. Por lo que se consideraron como presuntivos de *C. glabrata*.

Todos los aislados de color verde obtenidos en el medio cromogénico, formaron TG hasta las 3 horas (**Fig. 14**), y CL a las 48-72 horas (**Fig. 15**) en el medio leche y se consideraron presuntivamente como *C. albicans* y/o *C. dubliniensis*. Mientras que los mismos, formaron colonias de borde regular, de color blanco, de aspecto liso y presentaron escasa o nula formación de CL en Agar Tabaco; crecieron a 45°C en SGA y asimilaron D-xilosa (**Fig. 16**). Por lo tanto, se consideraron compatibles con *C. albicans*.



**Fig.14:** morfología microscópica de tubo germinativo (proyección filamentosa delgada que no presenta constricción en el punto de origen) a 1000X, flecha roja indica el punto de no constricción. **Fig.15:** morfología microscópica de clamidoconidios (estructuras redondas u ovales de 6-12  $\mu\text{m}$  de diámetro y pared gruesa, con aspecto de esporas laterales o terminales) a 1000X, la flecha roja indica la estructura.



**Fig.16:** visualización del control negativo y positivo con tabletas de D-xilosa en tubo.

La identificación definitiva con equipo comercial ID32C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) corroboró en un 100 % la identificación presuntiva de los aislados.

En relación a las especies aisladas entre el primer y el segundo cultivo existió un 100 % de concordancia entre las cepas recuperadas (Fig.17). *C. albicans* fue la especie más frecuente representando el 41,3 %. Sin embargo, la suma de los porcentajes de las *C. non-albicans* fue superior con un 58,7 %. En tres pacientes coexistieron *C. albicans* y *C. tropicalis* y en uno *C. tropicalis* y *C. lusitaniae*. En los pacientes que tuvieron 3 y hasta 4 aislamientos sucesivos se recuperaron las mismas especies de *Candida* en cada oportunidad (Fig.18) (Tabla 11).

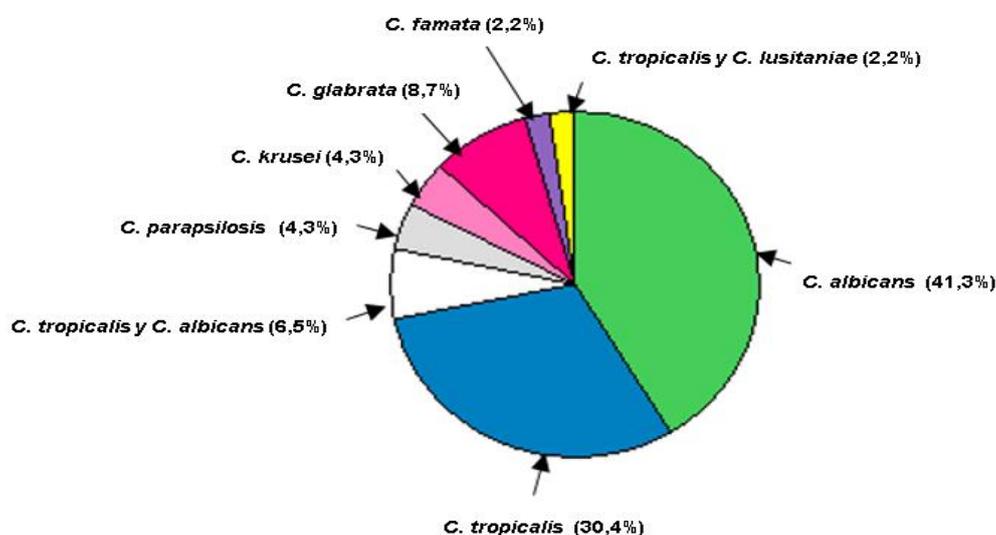


Figura 17. Porcentaje de especies de *Candida* aisladas en la segunda muestra que confirmó candiduria en 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)

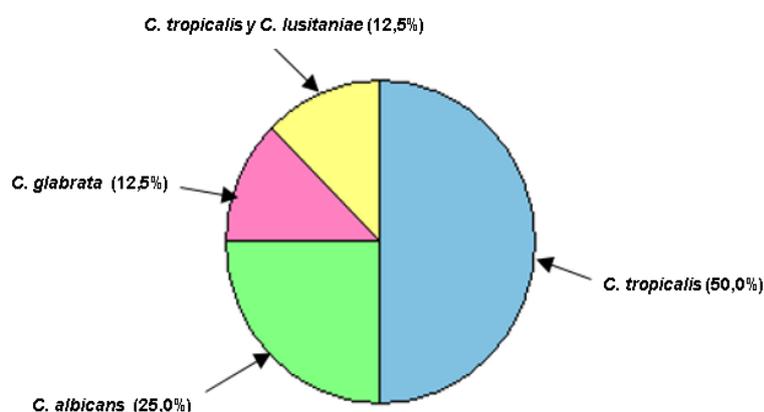


Figura 18. Porcentaje de especies de *Candida* aisladas en la tercera muestra de 8 pacientes internados en el HNJT (2010-2013).

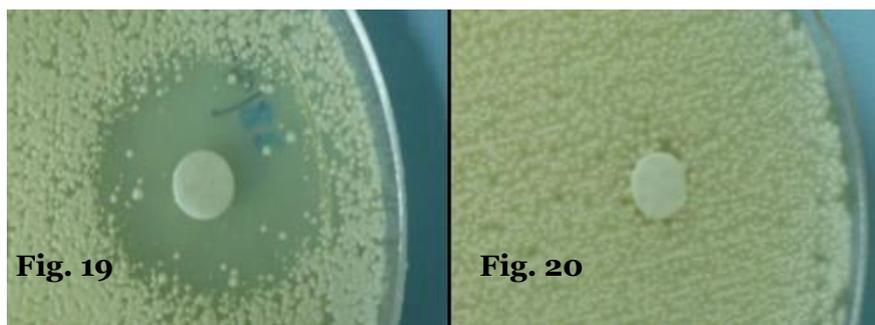
**Tabla 11: Distribución de las especies de *Candida* aisladas según los cultivos positivos obtenidos de 46 pacientes internados en el HNJ (2010-2013)**

<b>Cultivos</b>	<b>1º</b>	<b>2º</b>	<b>3º</b>	<b>4º</b>
<b>Especies aisladas</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>
<i>C. albicans</i>	19(41,3)	19(41,3)	3(37,5)	-
<i>C. no-albicans</i>	27(58,7)	27(58,7)	5(62,5)	4(100,0)
<i>C. tropicalis</i>	14(30,4)	14(30,4)	3(37,5)	1(25,0)
<i>C. parapsilosis</i>	2(4,3)	2(4,3)	-	-
<i>C. glabrata</i>	4(8,7)	4(8,7)	1(12,5)	1(25,0)
<i>C. krusei</i>	2(4,3)	2(4,3)	-	-
<i>C. famata</i>	1(2,2)	1(2,2)	-	-
<i>Cultivos mixtos</i>	4(8,7)	4(8,7)	1(12,5)	2(50,0)
<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	3(6,5)	3(6,5)	-	1(25,0)
<i>C. tropicalis</i> y <i>C. lusitaniae</i>	1(2,2)	1(2,2)	1(12,5)	1(25,0)

n: número; %: porcentaje

### **Sensibilidad *in vitro***

El estudio de la sensibilidad *in vitro* frente al fluconazol permitió determinar que el 98,3 % de los aislados obtenidos durante el estudio era sensible frente a este antifúngico (Fig. 19) y solo el 1,7 % fue resistente. El 100 % de los aislados resistentes se correspondían con cepas de *C.krusei* (Fig. 20).



**Fig.19:** visualización del halo de inhibición en un aislado de *Candida* sensible al fluconazol y **Fig.20:** visualización del halo de inhibición de *Candida krusei*.

### Formación de biopelículas

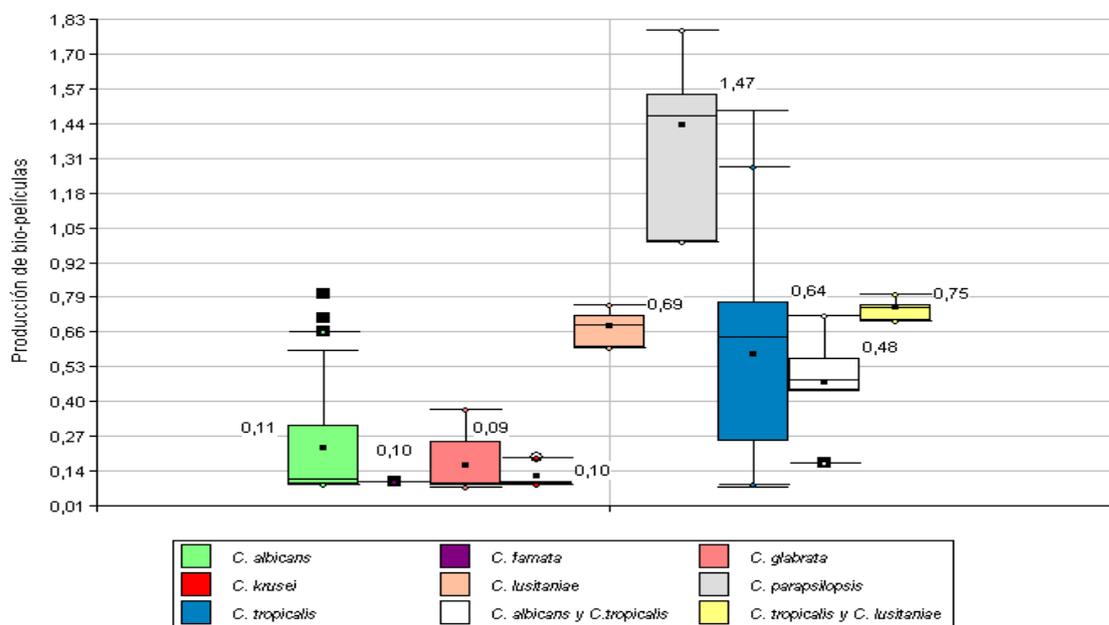
La cuantificación de la producción de biopelículas de las cepas de *Candida* aisladas, permitió determinar que el 100 % de las cepas era capaz de producirlo, con una media de concentración de 0,38 y un desvío estandar de  $\pm 0,39$ . La mínima concentración registrada fue de 0,08 y la máxima de 1,79. El 92,3 % de los aislados tuvieron valores entre 0,08 y 1,0 y el 7,7 % restante presentó concentraciones  $\geq 1,01$ .

Con el fin de describir la cuantificación de la formación biopelículas de cada una de las especies y de las mezclas se calcularon los promedios y porcentajes (**Tabla 12**)(**Fig.21**).

**Tabla 12. Análisis descriptivo de la producción de biopelículas según las especies de *Candida* aisladas de 46 pacientes internados en el HNJT (2010-2013)**

Especie	n	$\mu$	m	Moda	Mín	Máx	Q1	Q3	DE
<i>C. albicans</i>	47	0,23	0,11	0,09	0,09	0,80	0,09	0,31	0,20
<i>C. famata</i>	2	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
<i>C. glabrata</i>	10	0,16	0,09	0,09	0,08	0,37	0,09	0,25	0,10
<i>C. krusei</i>	4	0,12	0,10	0,10	0,09	0,19	0,09	0,10	0,05
<i>C. lusitaniae</i>	4	0,68	0,69	Múl	0,60	0,76	0,60	0,72	0,07
<i>C. parapsilosis</i>	4	1,43	1,47	Múl	1,00	1,79	1,00	1,55	0,33
<i>C. tropicalis</i>	44	0,58	0,64	0,65	0,08	1,49	0,25	0,77	0,36
<i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	7	0,47	0,48	0,44	0,17	0,72	0,44	0,56	0,16
<i>C. tropicalis</i> y <i>C. lusitaniae</i>	4	0,75	0,75	Múl	0,70	0,80	0,70	0,76	0,04

$\mu$ : media; m: mediana; Mín: mínimo; Máx: máximo; Q1: cuartil 1, Q3: cuartil 3; DE: desvío estándar



**Figura 21. Distribución de producción de biopelículas según las especies de *Candida* aisladas de los 46 pacientes sondados internados en el HNJT (2010-2013)**

En relación a la producción de biopelículas, se observó que las cepas de *C. parapsilosis* presentaron los valores de media más altos de formación de biopelículas seguido de *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*. El resto de las especies presentaron valores de media iguales o inferiores a 0,23. *C. tropicalis* seguido por *C. parapsilosis* y *C. albicans* mostraron la mayor dispersión en los resultados obtenidos. Mientras que, *C. famata*, *C. krusei* y *C. glabrata* fueron las especies que mostraron menor capacidad de formación de biopelículas y además presentaron los resultados más uniformes.

Los valores de la media de partes iguales de mezclas de *C. albicans* y *C. tropicalis*, mostraron concentraciones inferiores a 0,50, mientras que los valores de la mezcla de *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* fueron superiores a 0,70.

El análisis estadístico de la concentración de biopelícula producido entre las cepas aisladas de las diferentes muestras de cada uno de los 46 pacientes no presentaron significancia estadística.

## Discusión:

---

En las últimas décadas, los reportes de varios países indican un incremento paulatino de la candiduria, sobre todo en pacientes sondados internados en las UCI (2,23,26, 28,31,33,36,65,66). Sin embargo, a la fecha, el valor de la recuperación de levaduras del género *Candida* en orina es debatido por los expertos. Este contexto se produce debido a que aún existen dudas acerca de la importancia de dicho hallazgo.

¿El aislamiento de *Candida* en orina se debe interpretar como una infección o una colonización? ¿Qué recuentos de leucocitos o UFC/mL de orina son significativos y predictivos de infección de vías urinarias por *Candida*? ¿La presencia de candiduria *per se* produce complicaciones? ¿En qué casos es necesario realizar un tratamiento y en cuales no?. Estas y otras preguntas permanecen aún sin ser aclaradas. Esta investigación se llevó cabo con el fin de aportar más datos al respecto.

Se evidenció candiduria en 46 pacientes, el 80 % eran menores de 5 años. Asimismo, se registró una prevalencia del 5,96 % y una incidencia anual de 14,3 cada 1000 pacientes ingresados. Al comparar estos datos con los obtenidos en un hospital pediátrico de Irán, se encontraron valores similares al de este estudio (5,2 %) (30). En otra serie Iraní hallaron un 32,3 % (50/155) de casos de candiduria, de los cuales 36 % (18/50) correspondían a niños (26).

En EEUU, en investigaciones realizadas en las UCI de neonatos reportaron un 0,5 % de prevalencia (67). Mientras que en otra serie encontraron mayor porcentaje ( $\approx 40$  %) (68). En contraste, en Canadá, Robinson *et al.* (29), observaron durante 30 meses, 30 casos de candiduria en trece UCI de neonatos. Es necesario tener en cuenta que los valores encontrados en el HNJT fueron difíciles de comparar con estas y con otras series debido a que este estudio estuvo restringido a una sub-población con determinadas características, los mismos eran pacientes pediátricos sondados internados en la UCI y

además tenían co-morbilidades y factores de riesgo propios de sus enfermedades de base.

Varios autores aseveran que el uso de catéteres urinarios es un factor de riesgo que contribuye al crecimiento de especies de *Candida* en orina y por consiguiente al desarrollo de candiduria en pacientes internados en las UCI (8,23,26,28-31,33,36,65,66). En este estudio se observó que cerca del 67,6 % de casos de candiduria asociados al uso de sonda vesical. En contraste, Passos *et al.* (28), reportaron que el 92,6 % de los pacientes que habían desarrollado candiduria tenían catéteres urinarios insertos. Resultados similares, fueron publicados por Ghiasian *et al.* (26) con un 92% y por Richards *et al.* (66) con el 95%. A diferencia de los resultados en estas investigaciones, en la UCI del HNJT se observó un menor número de casos de candiduria relacionados al uso de sonda vesical, lo cual, podría atribuirse a una multiplicidad de factores tales como tiempo de permanencia de sonda, edad y enfermedad de base de los pacientes, tratamiento con fluconazol, cuidados en el manejo de los pacientes, etc.

Por otro lado, algunos autores encontraron asociación con significancia estadística entre el tratamiento previo con antibióticos y la aparición de candiduria, por lo que, la antibioticoterapia es considerada como un factor de riesgo que precede a la ITU por *Candida* (23,26,69). Alrededor del 90 % de los pacientes estudiados estaban recibiendo antibióticos antes del aislamiento de levaduras del género *Candida* en orina. Sin embargo, los análisis estadísticos realizados no pudieron demostrar diferencias significativas con este factor de riesgo y tampoco por sexo, edades y con ninguno de los factores predisponentes.

No obstante, se observó que aquellos pacientes que recibían antibiótico terapia presentaban mayor asociación con el tiempo de aparición de la candiduria en la primera

semana de internación. Este hallazgo quizá se deba a la inhibición de la biota bacteriana, con su consecuente disminución y sobrecrecimiento de levaduras, principalmente en el tracto colorectal y en el meato urinario y su posterior ingreso a través de la uretra, lo que conllevaría a la colonización y/o infección de la vejiga (23,33).

El incremento en la frecuencia en los casos de candiduria nosocomial también ha sido relacionado con el tratamiento con corticosteroides. Aunque existe muy poca información acerca de si existe o no una real asociación con el desarrollo de la candiduria. En este estudio, la corticoterapia fue el tercer tratamiento previo más usado y el quinto factor de riesgo más frecuente. Sin embargo, no se encontró significancia estadística. Mientras que Guler *et al.* (70), encontraron que el riesgo de padecer candiduria se incrementa 1,4 veces en pacientes que reciben administración de corticosteroides. Sería importante realizar más estudios con un mayor número de pacientes pediátricos para dilucidar si la corticoterapia es o no un factor de riesgo a tener en cuenta en esta población.

El tiempo de permanencia del sondaje vesical también es considerado como uno de los factores de riesgo para desarrollar candiduria. Según Bose *et al.* (71), el riesgo de infección asociada al uso de catéteres se incrementa aproximadamente un 10% cada día de internación. Cuando los pacientes se encuentran sondados por cortos períodos (<7 días), entre un 10 a un 50% pueden desarrollar una ITU, mientras que aquellos que tienen catéteres por períodos más largos (>28 días), en general, el 100% terminan desarrollando una ITU.

El tiempo que transcurrió entre que los pacientes analizados fueron sondados y tuvieron un 1º cultivo de *Candida* positivo tuvo una media de 12,2±5,22 días. Por lo tanto, se puede inferir que en el supuesto caso que la colocación de las sondas vesicales haya sido la puerta de entrada de las levaduras, estas debieron permanecer insertas

aproximadamente 2 semanas hasta producir infección. Otra posibilidad es que las sondas se pudieron haber colonizado a partir de la biota autóctona del meato urinario de los pacientes durante el tiempo que permaneció inserta la sonda, o quizás, las sondas se contaminaron por la manipulación del personal de salud durante la estadía del paciente en la UCI. Por otro lado, se encontró correlación significativa entre el tiempo de internación y el recuento de UFC/mL del primer aislamiento ( $r=0,98$ ; y  $p=0,025$ ). A pesar de no haberse determinado el modo en el que se produjo la infección o colonización, se deduce que la población estudiada tuvo mayor riesgo de desarrollar candiduria si permanecían internados más de una semana en la UCI.

Tal fue el caso de los 8/46 pacientes que tuvieron hasta 3 cultivos positivos, los mismos presentaron una media de 29,4 días de internación y los 4/46 niños con 4 cultivos consecutivos positivos fue de 32,8 días. Al contrastar estos datos con los aportados con el servicio de estadística del Hospital, se comprobó que los pacientes con candiduria permanecían mayor número de días en la UCI, en comparación con la media (8,85; DE  $\pm 1,49$  días) de los 771 pacientes ingresados en el mismo período.

Es comprensible que aquellos pacientes que no resolvieron la candiduria tras recibir un tratamiento y que tuvieron más de 2 cultivos positivos permanecieron mayor cantidad de tiempo internados ( $\approx 1$  mes). No obstante, según los registros médicos, la candiduria no fue la causa por la cual permanecían en la UCI, sino que se debía a que los mismos no mejoraban o no corregían su estado crítico producto de su enfermedad de base. De lo que se concluye que la candiduria podría ser una complicación sobre agregada al cuadro basal de estos pacientes.

Algunos autores sugieren que la candiduria por sí misma, en especial en pacientes internados en las UCI, es un marcador temprano e indicativo de infección sistémica (69). Mientras que otros refieren que el curso natural de la candiduria puede ser benigna y

con frecuencia se autolimita sobre todo si los factores predisponentes son corregidos, aún en pacientes con enfermedades de base, incluyendo los diabéticos (23,72). Sobel *et al.* (36), refuerzan estas aseveraciones, debido a que no encontraron casos de ITU complicadas, incluyendo pielonefritis, candidemia, candidiasis sistémica y/o muertes debidas a infección fúngica.

En el presente trabajo, la única posible complicación observada producto de la candiduria fue la fungemia en un 8,7 % de los casos, los mismos fueron detectados alrededor de las 2 semanas de haber aislado *Candida* en orina. Tal fue el caso de 4 pacientes, que además de encontrarse sondados e internados en UCI y bajo tratamiento con antibióticos de amplio espectro, tenían otros factores de riesgo, tales como ventilación respiratoria mecánica (4/4), alimentación parenteral (2/4) y cirugía previa o derivación ventricular (1/4). Sin embargo, para confirmar que la causa de la candidemia tuvo como punto de partida las vías urinarias, sería necesario realizar estudios moleculares para determinar si existe correlación filogenética entre los aislados. En contraste, Binelli *et al.* (24), realizaron un estudio de caso-control con el fin de verificar si la candiduria estaba asociada con la aparición de candidemia. En ese estudio, el análisis microbiológico de las especies aisladas en la orina de los pacientes que desarrollaron candidemia demostró que en el 43 % (10/24) de los casos, la especie aislada en orina fue diferente a la especie aislada en sangre y se encontraron diferencias inter y/o intra-especies en el 52 % de las muestras recogidas de sangre y de orina. De acuerdo con estos datos, se corroboraría el concepto de que la ITU baja es raramente fuente de fungemias. En oposición, en este estudio hubo una correlación del 100 % entre los aislados de orina y sangre, lo cual objetaría lo postulado por Binelli *et al.* (24), aunque como se mencionó anteriormente es necesario realizar estudios moleculares para corroborar que los aislados son idénticos.

También se registró 4 muertes, las cuales podrían ser atribuidas como una complicación de la ITU por *Candida*. Aunque, según las historias clínicas, ninguna de esas muertes estuvo asociada a la candiduria sino a las complicaciones de las enfermedades de base. Esto último es coincidente con algunos autores que sugieren que las ITU adquiridas en la UCI se asocian a un aumento de las tasas de morbilidad de los pacientes, aunque estas por sí solas, no parecen incrementar el riesgo de muerte (21,26). En contraste, en un estudio llevado a cabo en 70 hospitales de España por el grupo EPCAN, encontraron diferencias significativas en las tasas de mortalidad (33). Al igual que en otro estudio realizado en Argentina, en el cual se demostró un mayor riesgo de muerte relacionado al incremento de ITU en pacientes admitidos en la UCI (73).

El análisis del tiempo empleado entre un cultivo positivo y una nueva toma de muestra permitió comprobar que después que el laboratorio emitía por 1º vez un informe positivo para *Candida*, el cuerpo médico tardaba alrededor de 1 semana en realizar el pedido, retirar la sonda vesical y recolectar una nueva muestra de orina. No obstante, a pesar de haberse confirmado la presencia de *Candida* con un nuevo cultivo positivo, el segundo recambio tardó casi 2 semanas. Es posible que, el equipo médico sostuvo una conducta expectante para la resolución de la candiduria en los pacientes que iniciaron, en algunos casos, el tratamiento antifúngico, en otros aumentaron la dosis, o bien rotaron la medicación.

Uno de los mayores inconvenientes que se presentó en este trabajo fue la imposibilidad de confirmar la erradicación de la candiduria en la mayoría de los pacientes ( $\approx 80\%$ ). La negativización microbiológica de los cultivos se registró solo en un  $20\%$  de los casos. La principal causa de haber obtenido valores tan bajos, estuvo sujeta a la decisión médica de no solicitar un nuevo cultivo. Tal decisión fue debida a que la mayoría de los pacientes iban a ser dados de alta, mientras que  $\approx 30\%$  ya habían sido dados de alta y  $\approx 10\%$  habían fallecido. Situaciones similares fueron observadas por Kauffman *et al.*

(23), quienes encontraron un 38,4 % (331/869) de casos, en los que no se solicitó una 2º muestra para corroborar la candiduria.

Es necesario destacar que en este estudio se pudo comprobar que un 32,4 % (22/68) de las muestras de orina estaban contaminadas, lo mismo, pudo demostrarse mediante el recambio de sonda vesical antes de realizar una nueva toma de muestra. Un valor similar fue encontrado por Kauffman *et al.* (21,23), al igual que Bukhary *et al.* (34) y Pappas *et al.* (39). Esos autores encontraron que tal acción disminuye ( $\approx 20\%$ ) los falsos positivos. En base a estos resultados y cuando fuera posible, se sugiere retirar la sonda vesical, frente a un 1º cultivo positivo de levaduras del género *Candida* provenientes de muestras de orina de pacientes pediátricos sondados, con el fin de diferenciar una contaminación de una colonización y/o infección. De esta manera se evitaría un tratamiento antifúngico inadecuado, selección de cepas resistentes circulantes, y consiguiente disminución del costo sanitario.

En el análisis microscópico de los sedimentos de orina se observó un recuento de leucocitos  $\leq 10$  por campo en la mitad de las primeras y segundas muestras positivas. Asimismo, se observó que cerca del 60 % y el 100 % de los pacientes que tuvieron hasta un tercer y cuarto cultivo positivo respectivamente tuvieron idénticos valores. Se pudo demostrar que un recuento entre 6-10 y 11-15 leucocitos por campo y en menor medida de 2-5 leucocitos por campo se encuentra asociado a la presencia de levaduras en las muestras de orina de pacientes pediátricos sondados. Estos resultados son similares a los encontrados en 648 pacientes adultos por Kauffman *et al.* (23), en los que observaron que más de la mitad de las muestras tuvieron valores  $\geq 5$  leucocitos por campo y solo un 20 % tuvo valores  $> 50$ .

Por lo mencionado con anterioridad se puede concluir que el hallazgo de un recuento bajo o alto de leucocitos en muestras de orina provenientes de niños con catéter urinario,

no debería tomarse como un criterio excluyente de candiduria y tampoco elimina la posibilidad de infección fúngica. Por el contrario, si uno de los criterios para confirmar candiduria en esta población hubiese sido la presencia de >50 leucocitos por campo se hubiera realizado un sub-registro de candiduria en más de la mitad de los pacientes.

Por otro lado, el aislamiento de *Candida* en la orina puede aparecer en ausencia de enfermedad, por lo tanto, continúan las controversias sobre la valorización del recuento de la colonias obtenidas del cultivo. Algunos autores, tales como Ghiasian *et al.* (26) consideraron ITU por *Candida* en niños cuando los valores de UFC/mL eran  $\geq 10^5$ . Si se hubiese tenido en cuenta este criterio, solo se hubiera detectado la mitad de los casos de candiduria; y si le sumamos otro de los criterios usados como es el recuentos alto de leucocitos, solo se hubieran registrado un 8,7% (4/46) de los casos. Asimismo, el sub-registro de candiduria hubiera sido muy superior en las 2<sup>da</sup>, 3<sup>ra</sup> y 4<sup>ta</sup> muestras, ya que en las mismas, las UFC/mL no superaron valores  $\geq 10^5$  en el 60 %, 75 % y 100 % de los casos respectivamente.

Otros autores como Kauffman *et al.* (23) y Sobel *et al.* (36), sugieren que existe mayor relación entre candiduria e ITU cuando los recuentos son  $\geq 10^3$  UFC/mL. Sin embargo, se han encontrado recuentos inferiores en casos de pielonefritis adquirida por vía hematógena, donde los riñones funcionan como filtro y pueden reflejar recuentos bajos en la orina (74). Por ende, si el punto de corte utilizado en este trabajo hubiera sido  $\geq 10^3$  UFC/mL, en base a los resultados obtenidos de la 1<sup>o</sup> muestra, se hubieran detectado alrededor del 90 % de los casos. Pero, no se hubieran identificado 3 pacientes, 2 de ellos con hasta un cuarto cultivo positivo. En uno de ellos se observó un aumento de UFC a valores  $>10^5$  en la 2<sup>da</sup> muestra y esos valores se mantuvieron en los cultivos subsiguientes. Mientras que en el otro paciente siempre conservó valores entre  $10^2$  a  $10^3$  UFC/mL.

En base a estos datos, se puede teorizar que independientemente del número de leucocitos y UFC/mL observados, todas aquellas muestras de orina positivas para *Candida* provenientes de pacientes pediátricos sondados deben ser consideradas como compatibles con candiduria hasta confirmación con un nuevo cultivo positivo, previo recambio de sonda.

Por otro lado, la prevalencia de *C. albicans* sobre las otras especies encontrada en este trabajo, puede entenderse ya que esta especie es un reconocido comensal de la mucosa gastrointestinal, respiratoria y genital. Asimismo, está comprobado y establecido, que en hospedadores inmunodeprimidos sufre transformaciones morfológicas y bioquímicas tales como la adherencia a las células epiteliales, síntesis de enzimas hidrolíticas, formación de hifas o pseudomicelio, modulación antigénica que lleva a la invasión tisular y en definitiva, a una predominio de la misma (75, 76).

Las investigaciones a nivel mundial, muestran que *C. albicans* es la especie fúngica más frecuente aislada en orina, representando en la mayoría de los casos entre el 50 al 70 % de los aislamientos. Tal es el caso del estudio multicéntrico realizado por Kauffman *et al.* (23), los mismos confirmaron candiduria en 530 pacientes adultos; donde *C. albicans* ocupó el primer lugar con 52 %, seguido por un 16 %, 8 %, 4 % y 1 % de aislados correspondientes a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* respectivamente. Al igual que en las UCI de neonatos de Canadá, Robinson *et al.* (29), donde solo registraron un 13 % de casos de candiduria por *C. parapsilosis*, seguidos por *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* cada una con un 7 % y *C. glabrata* con 3 %. En Irán, a partir de 402 muestras de orina obtenida de niños, el 65,5 % de los casos fueron por *C. albicans*, seguido de *C. glabrata* (31 %) y *C. krusei* (3,5 %) (30). En contraste, en otro estudio realizado en el mismo país por Ghiasian *et al.* (26), encontraron 50 de casos de candiduria entre las UCI de un Hospital de Adultos y una de Niños, el 14 % del total de casos fueron atribuidos a *C. glabrata*, 12 % a *C. parapsilosis*, *C. krusei* 10 % y *C.*

*tropicalis* 4 %. En Argentina, Garcia-Effron *et al.* (datos no publicados) (31), llevaron a cabo un estudio multicéntrico en 2013, participaron 15 hospitales (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Chaco, Rosario, Santa Fe y Tucumán) incluido el HNJT. Se estudiaron 240 casos de candiduria correspondiente a pacientes de diferentes edades. *C. albicans* fue la especie más aislada (43,3 %), seguida de *C. tropicalis* (30 %), *C. glabrata* (8,3 %) y *C. parapsilosis* (4,6 %). Esta referencia bibliográfica es de gran importancia para la investigación ya que permite realizar una comparación con un gran número de pacientes de distintas regiones del mismo país. Si bien la población estudiada era en su mayoría adulta, el orden de frecuencia de las cuatro principales especies aisladas se correlaciona en un 100 % con los datos obtenidos en el presente estudio.

Teniendo en cuenta que en esta investigación *C. albicans* constituyó aproximadamente el 40 % de los aislados, la frecuencia fue entre un 10 y 30 % menor en comparación con lo expresado por otros autores. Por un lado, este porcentaje refuerza el hecho de que *C. albicans* es la especie de mayor prevalencia. Por otro, refleja que en la población demográfica estudiada hay un mayor número de especies de *C. no-albicans*, lo que concuerda con otros trabajos.

Tales prevalencias han sido observadas en India, Malled *et al.* (77), aislaron en 17 oportunidades *Candida* a partir de la orina de pacientes adultos. Las *C. no-albicans* representaron el 82,3 % de los casos, siendo el mayor porcentaje encontrado en la bibliografía revisada. La frecuencia fue de 41,1 %, 23,5 %, 11,7 % y 5,8 % de *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. glabrata* respectivamente. En Turkia, Ozhak-Baysan *et al.* (27) demostraron que el 56 % de los casos de candiduria fueron causadas por *C. tropicalis* (20 %), *C. glabrata* (18 %), *C. krusei* (6 %), *C. famata* (5 %), *C. parapsilosis* (4 %), *C. kefyr* (2 %) y *C. guilliermondii* (1 %). En Etiopia, de 35 muestras de orina provenientes de pacientes diabéticos, se recuperó un 58 % especies de *C. no-*

*albicans*, en este caso *C. glabrata* (34,2 %) desplazó al tercer lugar a *C. tropicalis* (15,8 %) y además aislaron *C. famata* (3,1 %) y *C. kefyr* (2,6 %) (78).

En Brasil existen diferencias de datos en la prevalencia de especies de *C. no-albicans*. Kobayashi *et al.* (79), encontraron que el 64,5 % de casos eran producidos por *C. tropicalis* (22,2 %), seguido por *C. parapsilosis* (11,1 %), *C. glabrata* (8,8 %) y *C. krusei* (6,6 %). Mientras que Passos *et al.* (28), aislaron solo un 30 % de especies de *C. no-albicans*, donde *C. glabrata* y *C. famata* se encontraron ambas en segundo lugar cada una con un 7 %, seguidas de *C. parapsilosis* y *C. kefyr* también con un 4,6 % cada una y por último *C. tropicalis* con un 2 %. En otra serie de Brasil, Binelli *et al.* (24), hallaron un 43,5 % de casos producidos por *C. tropicalis* y no encontraron ninguna de las otras especies de *Candida* a menudo aisladas. En contraste, en la investigación realizada por da Silva *et al.* (25), tuvieron un 44 % de casos producidos por: *C. tropicalis* (20,0 %), seguidos por *C. glabrata* (11,0 %), *C. parapsilosis* (4,0 %) y *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* (2,0 %). Mientras que, Almeida *et al.* (80), tuvieron un 64 % de casos causados por: *C. tropicalis* (42 %), *C. glabrata* (20 %) y *C. krusei* (2 %).

En otro estudio realizado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires por Cronistein *et al.* (en prensa) (8), el 67,2 % de las especies halladas fueron *C. no-albicans*. Siendo el orden de frecuencia de *C. tropicalis* (34,4 %), seguido por *C. glabrata* (11,5 %), *C. parapsilosis* (1,6 %), *C. krusei* (0,8 %) y *Candida spp* (19 %). Datos similares fueron obtenidos en otro trabajo realizado en Buenos Aires por Mujica *et al.* (9), observaron que de 145 aislamientos de orinas analizados, las *C. no-albicans* sumadas fueron prevalentes (57,2 %), siendo *C. tropicalis* (20 %) y *C. glabrata* (24,8 %) las de aislamiento más frecuente.

En el presente trabajo, *C. tropicalis* ocupó el primer lugar en frecuencia entre las especies de *C. no-albicans*. Es llamativo que la misma represente el segundo o tercer

lugar junto con *C. glabrata*, según las series de candiduria revisadas. Quizás podría deberse a una mejor adaptación de esta especie al medioambiente de las vías urinarias, sobre todo del perineo, lo que facilitaría la colonización y posterior infección por vía ascendente a la vejiga. O bien, es posible que la infección esté supeditada a la contaminación del catéter urinario por una mala manipulación del personal sanitario, lo que favorecería la posterior infección. Esto último aconteció en la UCI del Hospital de Corea del Sur, en esa unidad hubo un brote por *C. tropicalis*, registrándose 34 casos por la diseminación de un clon de *C. tropicalis* aislado a partir de distintas superficies inanimadas relacionadas con desechos médicos (65).

La prevalencia de *C. glabrata* en tercer lugar quizás se deba al uso de terapias con fluconazol, que es un factor determinante según los especialistas de la alta incidencia de candiduria y candidemia observada en ciertas regiones geográficas (5). La recuperación de *C. glabrata* debe tener especial atención, ya que tiene la capacidad de desarrollar resistencia secundaria a fluconazol después de una exposición prolongada con azoles. Cabe destacar que de los 46 pacientes incluidos en este trabajo, aproximadamente el 60,0 % se encontraba bajo tratamiento de profilaxis con este antifúngico. Por lo tanto, el hallazgo de esta especie en la orina de los pacientes de la UCI del HNJT puede atribuirse a una presión selectiva ejercida por el uso y/o abuso de fluconazol.

*C. parapsilosis* representó solo el 2 % de los casos de candiduria, ocupando el cuarto lugar junto con *C. krusei*. Se hace difícil interpretar el porcentaje obtenido para la primera especie, al tener en cuenta que en un estudio multicéntrico de fungemias realizado en Argentina, *C. parapsilosis* fue el segundo agente causal (5). Asimismo, las cepas de esta especie tienen marcada afinidad por los materiales sintéticos; forman parte de biota comensal de piel y son responsables de epidemias intrahospitalarias relacionadas con la contaminación de las soluciones de perfusión y el mal manejo de los catéteres

(45,81,82). Sin embargo, *C. parapsilosis* fue la especie más frecuentemente aislada como contaminante en las muestras de orina, lo cual, se subsanó con la retirada de la sonda vesical y toma de un nuevo cultivo. De cualquier modo, es de vital importancia respetar las medidas de control de las infecciones hospitalarias, para prevenir las infecciones locales o generales por esta especie en particular o cualquier otra levadura.

La prevalencia global de candiduria por *C. krusei* oscila aproximadamente entre el 1 %-10 % (8,23,25-27,30,31,36,77,79,80). En coincidencia, con este estudio, el porcentaje de *C. krusei* fue 4,3 % similar a lo comunicado en otras series. Los dos pacientes que padecieron candiduria por esta levadura se encontraban bajo tratamiento con antibióticos de amplio espectro debido a que presentaban cuadros de fiebre de origen desconocido. En ambos casos se inició tratamiento empírico con fluconazol al momento de indicar la presencia de levaduras en orina y valores  $>10^3$  UFC/mL. Luego se rotó a anfotericina B entre las 48-72 horas posteriores, resolviendo el cuadro de candiduria. El tiempo entre un tratamiento y otro estuvo supeditado al requerido para identificar a nivel de especie *C. krusei*.

Por otro lado, se registró una sola vez candiduria por *C. lusitaniae* y se recuperó en 4 ocasiones en conjunto con *C. tropicalis*. El caso correspondía a un paciente de 3 años de edad, con bajo peso, que había ingresado por un problema de origen respiratorio y se encontraba con alimentación parenteral. La primera vez que se aisló la levadura fue a la semana de colocarle la sonda vesical y estaba solo bajo tratamiento con antibióticos. Al principio, el paciente fue tratado durante 2 semanas con fluconazol dosis de 10 mg/Kg/día y luego se rotó a la tercera semana con anfotericina B resolviendo su cuadro. Si bien *C. lusitaniae* fue uno de los aislados menos frecuentes, al igual que en otras series, su hallazgo debe ser contemplado ya que ha sido identificada como un patógeno nosocomial emergente, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos y en algunas ocasiones se asocia con resistencia a la anfotericina B (25,29,36,83). Cabe destacar

que la anfotericina B, en la provincia de Tucumán-Argentina es la principal opción terapéutica frente a cepas resistentes al fluconazol en pacientes pediátricos.

El hallazgo de dos o más especies de *Candida* productoras de candiduria en un mismo paciente no es una situación infrecuente. En esta investigación se encontró un 10,9 % de coexistencia de dos especies de *Candida*. En contraste, en un estudio realizado por Seifi *et al.* (30), los cultivos mixtos representaron aproximadamente el 40 % del total de los cultivos siendo el 100 % combinaciones de *C. albicans* y *C. glabrata*. En EEUU, Sobel *et al.* (36), encontraron un 17,3 % de coexistencia de más de una especie de *Candida*. Mientras que, en otro estudio multicéntrico realizado en EEUU, el porcentaje hallado fue inferior (4,1 %) (23). Este valor fue idéntico al observado en Irán (26). En cambio, Cornistein *et al.* (8), encontraron solo un 2,45 % de casos de candiduria producidos por dos especies. En consecuencia, la coexistencia de más de una especie en muestras de orina debe ser tenido en cuenta. Remarcando la importancia de utilizar medios cromogénicos que permitan diferenciar distintas tonalidades entre las colonias, de modo de identificar presuntivamente a más de una especie, con la posterior identificación definitiva y realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro*.

Por consiguiente, en base a los datos obtenidos se puede afirmar que las especies de *C. no-albicans*, sobre todo *C. tropicalis* y *C. glabrata*, se encuentran en aumento y en algunas poblaciones tales como los pacientes de la UCI del HNJT con determinados factores de riesgo, incluso son más prevalentes que *C. albicans*.

El estudio de la sensibilidad *in vitro* permitió detectar dos aislados resistentes al fluconazol, ambos fueron por *C. krusei*. El resto de las especies de *Candida* aisladas, fueron sensibles. Por el contrario, en Irán, Seifi *et al.* (30), encontraron altas tasas de resistencia en distintas especies de *Candida* aisladas de orina de pacientes pediátricos, en las que hallaron un 100 % de resistencia para *C. albicans* y *C. krusei* y un 67 % para

*C. glabrata*. Mientras que, Mahmoudabadi *et al.* (84), hallaron 42 cepas resistentes al fluconazol: (32) *C. albicans*, (7) *C. glabrata*, (2) *C. tropicalis* y (1) *C. krusei*. Un total de 35 cepas eran sensibles dosis dependiente (SDD): (17) *C. albicans*, (16) *C. glabrata* y (2) *C. tropicalis*. Solo 11 cepas fueron sensibles: (9) *C. albicans* y (2) *C. glabrata*. Es llamativa la elevada tasa de resistencia registrada en Irán, sobre todo para *C. albicans*.

En Brasil, Ribeiro de Freitas *et al.* (85), evaluaron la sensibilidad al fluconazol de 95 cepas de *Candida* (*C. albicans* 42,1 %, *C. glabrata* 32,6 % y *C. tropicalis* 25,3 %) recuperadas de muestras de orina. Encontraron que un 19,35 %, 12,5 % y 4,2 % de los aislados de *C. glabrata*, *C. albicans* y *C. tropicalis* respectivamente eran SDD y solo el 8,3 % y 2,5 % de los aislados respectivos de *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron resistentes. A diferencia de este estudio en el que no encontramos resistencia en esas especies.

En contraste, en 2003, Godoy *et al.* (86) llevaron a cabo un estudio de la sensibilidad antifúngica de cepas de *Candida* aisladas de hemocultivos provenientes de diferentes países de Latinoamérica. Todas las cepas (43) *C. albicans*, (25) *C. tropicalis*, (22) *C. parapsilosis* y (8) *C. glabrata* fueron sensibles, lo cual es coincidente con los resultados obtenidos, independientemente se tratasen de aislados de sangre y orina. Mientras que en un estudio comparativo entre España y Argentina se analizaron 744 aislados provenientes de hemocultivos. Un 9,9 % (74) de cepas *Candida* tenían sensibilidad disminuida. Un 8,5 % (8/94) de los aislados de *C. albicans* de Argentina y el 1,9 % (3/155) de los de España fueron resistentes al fluconazol; solo el 6,3 % (3/47) de las cepas de *C. tropicalis* de Argentina presentaron resistencia al fluconazol; y el porcentaje de aislados SDD o resistentes de *C. glabrata* fue más significativo entre los aislados de España y Argentina (93,8% versus 66,6%,  $p=0,012$ ) (87).

En un estudio multicéntrico realizado en 2007-2008 en Argentina, se evaluó la sensibilidad *in vitro* al fluconazol de 420 levaduras recuperadas de hemocultivo, encontrándose una baja tasa de resistencia (5,4 %). Entre las especies resistentes, *C.*

*glabrata* (n=20) representó el mayor porcentaje (20 %), seguido por *C.tropicalis* (n=71) con un 4,2 %, *C. parapsilosis* (n=120) con un (2,5 %) y el 100 % de las cepas de *C. albicans* (n=177) testeadas fueron sensibles (5). Al comparar con los datos obtenidos de otros aislados clínicos en Argentina, se pone en evidencia las diferencias presentes en los patrones de sensibilidad al fluconazol, independientemente se trate de cepas recuperadas de procesos de candiduria o candidemia.

En base a lo expresado, antes de someter a un paciente a un tratamiento profiláctico o empírico con cualquier antifúngico es imprescindible conocer la epidemiología del hospital en relación con las infecciones por *Candida*. En este estudio, la mayoría de los cepas eran sensibles al fluconazol y como en general la sensibilidad se mantiene constante entre especies, el tratamiento con ese antifúngico es adecuado en un elevado porcentaje de casos en el HNJT. Sin embargo, es esencial identificar la levadura a nivel de especie y es imprescindible valorar el estado clínico del paciente y conocer si estaba recibiendo profilaxis con antifúngicos debido a existencia de resistencia secundaria, especialmente cuando se aísla *C. glabrata*.

Del mismo modo, el recurrir al tratamiento empírico con antifúngicos frente a un único resultado positivo de *Candida* en orina, ha generado para algunos expertos, la causa de la aparición de especies y de cepas multirresistentes (1,5,21,34,36-40). En este trabajo, en la población estudiada, un 60% recibía profilaxis con fluconazol. Por lo tanto, es probable que el uso de fluconazol sea uno de los factores desencadenantes de la epidemiología observada en el HNJT, al igual que en otras regiones del mundo, favoreciendo el aumento de infecciones debidas a *C. no-albicans*, en especial *C. krusei* (con resistencia intrínseca) y *C. glabrata* (resistencia adquirida), en las que el tratamiento con este azol no es el adecuado.

En la actualidad, existe información pertinente y disponible sobre diferentes géneros y especies de bacterias que producen biopelículas, no así, en lo que se refiere a los

hongos. Las escasas investigaciones existentes indican que la biopelícula formada por *Candida* favorecen las infecciones relacionadas con los dispositivos implantables, tales como las sondas urinarias. Así como también, la generación y producción de biopelículas; de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*; se asocia a altas tasas de mortalidad (43,50,51,85,88-92). En esta investigación se observó que el 100 % de las cepas testeadas fueron capaces de formar biopelículas *in vitro*.

Del total de 47 aislados de *C. albicans*, el 75 % presentaron concentraciones de producción de biopelícula igual o inferior a 0,35 y el 50 % tenían valores entre 0,09 y 0,31. Esos valores son bajos en comparación con el resto de las cepas testeadas. No existe una razón explicable para esta diferencias; sin embargo, puede deberse a que no existe una técnica estandarizada para medir la capacidad de producir biopelículas y/o a las variaciones realizadas por los investigadores en la técnica de cristal violeta tales como: el medio de cultivo utilizado para el desarrollo y formación de biopelícula, superficie sobre la cual se produjo el experimento (silicona, látex, poliestireno, polivinilo, poliuretano, etc), tiempos de incubación empleados, concentración de los inóculos. Estos y otros puntos críticos fueron también expresados en el trabajo realizado por Chandra *et al.* (51).

En 1994, Hawser y Douglas (92), observaron que *C. tropicalis* tenía la propiedad de producir gran cantidad de biopelícula y cubrir grandes extensiones sobre la superficie de catéteres de PVC. En el 2002, Shin *et al.* (93), también registraron esa propiedad, pero sobre poliestireno. En contraste, la media de producción de biopelícula de los 44 aislados analizados de *C. tropicalis* fue superior al de *C. albicans*. Esto explicaría la recidivas en tres pacientes con hasta 3 aislados y en un paciente con 4 cultivos positivos consecutivos para dicha especie. Aunque los valores registrados de las cepas aisladas en los cuatro casos no fueron superiores a los observados de las cepas de *C. albicans*. La explicación de la elevada frecuencia de aislados de *C. tropicalis* provenientes de la orina de pacientes sondados internados en la UCI del HNJT, no se debería a un único

factor de riesgo, sino a una multiplicidad de factores, algunos mencionados anteriormente y otros aún sin dilucidar.

En 2009, Hasan *et al.* (88), usaron dos métodos para evidenciar la formación de biopelícula en *C. glabrata*, los mismos concluyeron que no tenía la capacidad de formarla. Resultados similares fueron observados por Hawser *et al.* (92). En oposición, en 2009 y 2010, Silva *et al.* (94,95), reportaron que *C. glabrata*, en comparación con *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, era capaz de producir mayor número de UFC por área y también mayor adhesión sobre las superficies. Sin embargo, cuando cuantificaban la actividad metabólica de la biopelícula los resultados eran opuestos. Mientras que, en 2011, Estivill *et al.* (43), demostraron que *C. glabrata* era capaz de producir biopelícula. En el presente estudio se encontraron datos similares, cuando se analizaron las 10 cepas de *C. glabrata* recuperadas. Se comprobó que es capaz de producir y formar biopelícula. Además se observó uniformidad en los valores encontrados, y en general se registraron concentraciones inferiores en comparación con otras especies (media = $0,16 \pm 0,10$ ). Al igual que lo planteado por Estivill *et al.* (43), las concentraciones registradas podrían deberse al hecho que *C. glabrata* no es capaz de producir pseudomicelio.

En coincidencia con otros autores, las 4 cepas de *C. parapsilosis* analizadas produjeron concentraciones de biopelícula muy superior al resto de las especies y además se observó variabilidad entre las concentraciones encontradas (43, 88, 93).

Hasan *et al.* (88), observaron que *C. krusei* es capaz de producir mayor cantidad de biopelícula en comparación con *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Sin embargo, tal afirmación no pudo comprobarse. En su lugar, se detectaron las más bajas concentraciones y aunque su hallazgo en orina es infrecuente debe tenerse en cuenta

esta capacidad, sumada a la propiedad de *C. krusei* de presentar resistencia intrínseca al fluconazol, terminan por favorecer fallas en el tratamiento.

Asimismo, tanto las cepas *C. famata*, como las de *C. lusitaniae* fueron capaces de formar biopelícula. La primera mencionada en muy bajas concentraciones y la última con valores superiores a la media de todas las especies, a excepción de *C. parapsilosis*. En base a la bibliografía consultada, se puede afirmar que es el primer reporte de producción de biopelícula por dichas especies.

En cinco pacientes se aislaron cultivos mixtos de más de 2 especies de *Candida*, por lo que se probó determinar la concentración de biopelícula realizando una mezcla de partes iguales de cada especie aislada. En los 4 pacientes en los que se aisló al mismo tiempo *C. tropicalis* y *C. albicans* se evidenció que todos los valores obtenidos eran superiores al 75 % de las cepas de *C. albicans*. Mientras que la mezcla de *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* encontradas en un paciente, presentó concentraciones superiores a las medias de todas las cepas, a excepción de *C. parapsilosis*. En ambos casos, podría existir influencia en los datos obtenidos debido a la presencia de cepas de *C. tropicalis* que tuvieron valores altos cuando se las analizó por separado. No obstante, a pesar de que estos resultados demuestran lo expresado con anterioridad, es difícil realizar una real interpretación de los mismos. Debido a que en este experimento se parte de una mezcla en partes iguales de cada especie y no de la real concentración de UFC/mL presente en la orina, lo cual es no es posible de determinar con las técnicas actuales.

Por último, la formación de biopelícula por *Candida* podría explicar la duración de la infección en los pacientes, quienes tuvieron tres aislados sucesivos, así como en los pacientes, con hasta cuatro cultivos positivos. En todos ellos, se aislaron cepas sensibles al fluconazol. En algunos casos iniciaron tratamiento con fluconazol, mientras que a otros les aumentaron la dosis, ya que se encontraban bajo profilaxis con dicho antifúngico. Sin embargo, en estos pacientes el aislamiento de *Candida* se sostuvo en

el tiempo y en todos los casos fue necesario modificar el tratamiento antifúngico. Lo cual podría ser explicado por la poca o nula actividad del fluconazol sobre la biopelícula formada por *Candida*.

Varios mecanismos se han propuesto para explicar dicho fenómeno tales como: la reorganización estructural y funcional de cada célula, los cambios en el metabolismo, la reducción en la tasa de crecimiento, la expresión de genes de resistencia, la presencia de bombas de eflujos en la pared celular, entre otras modificaciones (47-49,51-53). Por lo tanto, quizás los aislados recuperados en varios cultivos consecutivos y que presentaban sensibilidad *in vitro* al fluconazol tendrían resistencia clínica debido a su capacidad de formar biopelícula.

Sin embargo, no es posible afirmar que la formación de biopelícula *per se* sea la única causa de recidivas o falla en el tratamiento de los pacientes estudiados. Evidentemente, el mantenimiento de la candiduria durante el tiempo es multifactorial. Depende de los factores de virulencia de la cepa aislada, de la sensibilidad *in vitro* frente a la droga con la que se tratará al paciente, de la capacidad de formar biopelícula, de los factores inherentes del propio individuo infectado y de otros mecanismos aún por dilucidar.

Por último, del total de pacientes sondados en los cuales se había detectado la presencia de *Candida* en orina, en el 32,4 % (n=22) se pudo corroborar que se trataba de muestras contaminadas por especies de *C. parapsilosis*, *C. albicans* y *C. tropicalis*, sensibles al fluconazol. Cabe destacar que dichos hallazgos fueron posibles con el simple hecho de remover la sonda vesical y reemplazarla por una nueva. Un dato a tener en cuenta, es que el número de leucocitos observados por campo no superó el valor de 10 en estas muestras, encontrando evidencia de significancia estadística (p=0.0001). Las limitaciones en la interpretación de este resultado, se encuentra condicionada, ya que el 65,2 % de los casos de candiduria confirmadas tenían valores similares.

Por otro lado, es llamativo que en algunas de las cepas de *C. parapsilosis* y *C. albicans*, provenientes de muestras contaminadas, la concentración de biopelículas duplicaron el máximo valor hallado en las mismas especies productoras de candiduria. Esto puede interpretarse como un hecho fortuito. Aunque, es necesario tenerlos en cuenta, ya que ponen en manifiesto el extremo cuidado que debe tener el equipo de salud en la manipulación de los catéteres urinarios para prevenir la contaminación horizontal, lo cual favorece la colonización y formación de biopelículas por parte de *Candida*.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia la necesidad de corroborar, si los cultivos positivos se tratan o no de una contaminación ya que pueden ser mal interpretados por el equipo médico quien podría iniciar un tratamiento inadecuado, con fluconazol, generando gastos innecesarios para el sistema sanitario, y al mismo tiempo se promovería a la selección de especies de *C. no-albicans* con resistencia intrínseca o adquirida al fluconazol. Durante el estudio; a excepción de los pacientes que ya se encontraban con profilaxis con fluconazol; el cuerpo médico esperó alrededor de 9,2 días para iniciar tratamiento, equivalente a la suma de la media del tiempo transcurrido entre el primer cultivo positivo y una segunda toma de muestra, en este caso 7,7 y el tiempo de demora del cultivo (48 horas).

Por lo antes expuesto, podemos decir que a pesar de los avances en los conocimientos sobre la candiduria, como la aparición de los nuevos antifúngicos, igual o más eficaces pero menos tóxicos que el fluconazol y el mejor manejo de los pacientes no se consigue disminuir la prevalencia de infección de las vías urinarias. Esto es debido posiblemente al excesivo uso de antibióticos, al aumento de los pacientes pediátricos sondados inmunosuprimidos, neutropénicos y a las múltiples manipulaciones que por un lado prolongan la vida de estos enfermos, pero que por otro lado, aumentan todo tipo de infecciones oportunistas, como las producidas por levaduras del tipo *Candida*.

Por lo tanto, es de gran interés, un mejor conocimiento de los patrones de cambio clínico-epidemiológico, un mejor control del uso adecuado y racional de los antibióticos y de los métodos diagnósticos y terapéuticos hospitalarios, junto con el desarrollo de métodos diagnósticos rápidos, que posibiliten una mejora en su diagnóstico precoz de la candiduria.

Por último, para detectar mejor los cambios, es preciso la monitorización de estos pacientes, así como estudiar la variaciones epidemiológicas y microbiológicas, las resistencias en especial al fluconazol, dentro del hospital o la zona de estudio. De tal forma podremos mejorar el conocimiento de las candidurias, su diagnóstico, control y prevención.

## Conclusiones:



La historia natural de la colonización o infección del tracto urinario en la población bajo estudio no pudo ser definida. Sin embargo, en base a los hallazgos se concluye que se debe realizar vigilancia de los cultivos de orina en aquellos pacientes pediátricos sondados internados por más de una semana y bajo tratamiento con antibioticoterapia. Asimismo, el recuento de leucocitos y/o UFC/mL no es un criterio excluyente de candiduria en estos pacientes, sino la realización de un nuevo cultivo positivo, previo recambio de sonda vesical. Lo cual permite diferenciar entre contaminación y evidenciar posibles aislamientos consecutivos.

*C. albicans* fue la especie que causo el mayor número de ITU. Sin embargo, la suma de los aislados de *C. no-albicans* superaron dicho valor, en especial *C. tropicalis* y *C. glabrata* y la coexistencia de más de una especies no es un hallazgo infrecuente, por lo que es necesario usar medios cromogénicos.

Los patrones de sensibilidad frente a fluconazol demostraron que la mayoría de las cepas aisladas eran sensibles por lo que el tratamiento profiláctico o empírico con fluconazol es de elección en el HNJT. Aunque no se debe desestimar la posibilidad de aislar especies con resistencia intrínseca a esta droga tales como *C. krusei*, o que pueden desencadenar una resistencia adquirida (*C. glabrata*).

Todos los aislados fueron capaces de producir biopelícula. Lo cual podría explicar la duración de la infección en los pacientes con aislados sucesivos. Aunque, no se puede aseverar que la producción *per se* sea la única causa de recidivas o falla en el tratamiento de los pacientes estudiados, sino a la multiplicidad de factores.

## Bibliografía:

- 
- 1-Voltan AR, Fusco-Almeida AM, Mendez-Giannini JS. Candiduria: Epidemiology, resistance, classical and alternative antifungal drugs. SOJ Microbiol Infect Dis 2014; 2 (2): 1-7.
  - 2- Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, et al. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: NEMIS prospective multicentre study. Clin Infect Dis 2001; 33: 177-86.
  - 3- Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. Am J Med 1991; 91 (2): 86-9.
  - 4- Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. 1(8):Issue3. e59373 (1 pag en pantalla) Disponible en: URL : <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0059373>.
  - 5- Córdoba S, Vivot W, Bosco Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeast isolated from blood cultures: Results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. Rev Arg Microbiol 2011; 43:176-185.
  - 6- Nucci M, Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut. Clin Infect Dis 2001; 33: 1959-67.
  - 7- Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates on *Candida* species. Diag Microbiol Infect Dis 1998; 31: 327-32.
  - 8- Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FK, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *albicans*. Enferm Inf Microbiol Clín. En imprenta 2012.

- 9- Mujica MT, Finquelievich JL, Jewtuchowicz V, Iovannitti CA. Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999-2001. Rev Arg Microbiol 2004; 36: 107-12.
- 10- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. CID 2010 ; 51: 561-70.
- 11- Bohekout T, Gueidan C, de Hoog S, Samson R, Varga J, Walther G. Fungal taxonomy: New developments in medically important fungi. Curr Fungal Infect Rep 2009; 3: 170-8.
- 12- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol 2005; 43: 284–92.
- 13- Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 2008; 46: 2659–64.
- 14- Alcoba-Flórez J, Méndez-Álvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, Arévalo MP. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. J Clin Microbiol 2005; 43: 4107–11.
- 15- Correia A, Sampaio P, James S, Pais C. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 313–7.
- 16- Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2012; 30 (1): 33–9.
- 17- Lossa GR, Giordano Lerena R, Fernández LE, Vairetti J, Díaz C, Arcidiácono D, et al. Prevalencia de infecciones nosocomiales en unidades de cuidados intensivos para adultos en Argentina. Rev Pan Sal Publ 2008; 24 (5): 324–30.

18- Eriksen HM, Iversen BG, Aavitslanda P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway 2002 and 2003. *J Hosp Infectol* 2005; 60 (1): 40-5.

19- Centers for Disease Control and Prevention. Catheter associated urinary tract infection (CAUTI) event. Enero 2012. [https://www.cdc.gov/hai/ca\\_uti.html](https://www.cdc.gov/hai/ca_uti.html). Acceso Marzo 21, 2012.

20- Gould C, Umscheid C, Agarwal R, et al. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for the prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 319-26.

21- Kauffman CA. Candiduria. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (6): 371-6.

22- Vincent JL, Bihari DJ, Sutter PM, Bruining HA, White j, Nicolas-Chanoin MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Result of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995; 274 (8): 639-44.

23- Kauffman CA, Vázquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 14-8.

24- Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, et al. Investigation of possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(6): 538-43.

25- Da Silva EH, Da Silva Ruiz L, Matsumoto FE, Auler ME, Giudice MC, Moreira D, et al. Candiduria in a Public Hospital of São Paulo (1999-2004): Characteristics of the yeast isolates. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 2007; 49(6): 349-53.

26- Ghiasian SA, Aghamirian MR, Eshghi GR. Nosocomial candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in Qazvin, Iran. *Avicenna J Clin Microbiol Infect* 2014; 1(2): e21622.

- 27- Ozhak-Baysan B, Ogunc D, Colak D, Onguc G, Dommez L et al. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. *Med Mycol* 2012; 50 (5): 529-32.
- 28- Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (8): 925-8.
- 29- Robinson J, Davies HD, Barton M, O'Brien K, Simpson K, Asztalos E, et al. Characteristics and outcome of infants with candiduria in neonatal intensive care - a Paediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 183-91.
- 30- Seifi Z, Azish M, Salehi Z, Mahmoudabadi AZ, Shamsizadeh A. Candiduria in children and susceptibility patterns of recovered *Candida* species to antifungal drugs in Ahvaz. *J Nephropathology* 2013; 2 (2): 122-8.
- 31- Garcia-Effron G, Córdoba S, Guelfand L, Maldonado I, Relloso S, Arechavala A, et al. Prospective multicenter observational study of funguria in hospitalized patients. XII INFOCUS - XII Forum on Fungal Infection in the Clinical Practice - Latin America / 2014, realizado del 16 al 18 de Octubre de 2014 en Curitiba – Paraná – Brazil.
- 32- Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17: 299–303.
- 33- Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, Leon C, Palomar M, Jorda R, Carrasco N, et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med* 2003; 29 (7): 1069-76.
- 34- Bukhary ZA. Candiduria: A Review of Clinical Significance and Management. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008; 19: 350-60.
- 35- Cantón E, Viudes A, Pemán J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 51–5.

36- Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervos M, Vazquez JA, Karchmer AW, et al. Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with Fluconazole and placebo. Clin Infect Dis 2000; 30: 19–24.

37- Hooton et al. Diagnosis, prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults. 2009 International Clinical Practice Guideline from the Infectious Diseases Society America. Urinary Catheter Guidelines. CID 2010;50 (1 March)

38- Levy Hara F, Lopardo H. Sociedades participantes: Soc. Argentina de Infectología (SADI), Soc. Argentina de Urología (SAU), Soc. Argentina de Medicina (SAM), Soc. Argentina de Bacteriología Clínica (SADEBAC), Soc. de Ginecología y Obstetricia de Buenos Aires (SOGIBA). Consenso Argentino Intersociedades para el Manejo de la Infección del Tracto Urinario – Parte III. Informe técnico. Rev Panam Infectol 2008; 10 (1): 48-57.

39- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009; 48: 1-35.

40- Tenke P, Kovacs B, Bjerklund-Johansen TE, Matsumoto T, Tambyah PA, Naber KG. European and Asian guidelines on management and prevention of catéter associated urinary infections. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 68-78.

41- Ayeni O, Riederer KM, Wilson FM, Khatib R. Clinician's reaction to positive urine cultura for *Candida* organisms. Mycoses 1999; 42(4): 285-9.

42- Olaechea PM, Palomar M, Leon-Gil C, Alvarez-Lerma F, Jorda R, Nolla-Salas J, et al. Economic impact of *Candida* colonization and *Candida* infection in the critically ill patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 323-30.

43- Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. J Microbiol Meth 2011; 86: 238-42.

- 44- Mohamed A, Fattani A, Douglas J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol 2006; 55: 999-1008.
- 45- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003; 11: 30-6.
- 46- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol 2002; 19: 139-43.
- 47- Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol 2006; 55: 999–1008.
- 48- Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2146–9.
- 49- Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal drugs. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 397–403.
- 50- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001; 183: 5385–94.
- 51- Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. Mycoses 2012; 55(1): 46–57.
- 52- Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 973–80.
- 53- Ramage G, Martinez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 2006; 6: 979-86.
- 54- Jitsuron S, Klamsini S, Pattararagron N. Milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida*. Mycopathologia 1993; 123: 95-98.

- 55- Pineda G, Scollo K, Santiso G, Lehmann E, Arechavala A. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en distintos materiales clínicos. Análisis de métodos fenotípicos de diferenciación con *Candida albicans*. Rev Arg Microbiol 2008; 40: 211-7.
- 56- Khan ZU, Ahmad S, Mocadas E, Chady R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2004; 42: 4796-8.
- 57- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1998; 36: 2093-5.
- 58- Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, et al. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xilose and alpha-methyl-D-glucoside as determined with the API 20CAUX and Vitek YBC systems. J Clin Microbiol 1999; 37: 3804-8.
- 59- Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Micología. En: Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Panamericana Ed Med 1999: 955-1037.
- 60- Lopez J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich AC, Pacot A, et al. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation Using Rosco Diagnostic Tablets. J Clin Microbiol 2001; 39(3):1172-4.
- 61- Michel-Nguyen A, Favel A, Chastin C, Selva M, Regli P. Comparative evaluation of a commercial system for identification of *Candida lusitanae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19 (5): 393-5.
- 62- Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing in yeasts. CLSI document M – 44 A, Wayne, PA; 2002.
- 63- Rodero L, Córdoba S, Vivot W, Campo M, Corfeld P, Olgúin C, et al. Disk diffusion method for fuconazole susceptibility testing of *Candida* spp. isolates. Rev Arg Microbiol 2006; 38: 155-63.

- 64- O'Toole G, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *P. aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998 ; 30 (2): 295-304.
- 65- Jang SJ, Han HL, Lee SH, Ryu SY, Chaulagain BP, Moon YL, et al. PFGE-Based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis*. *Candiduria: The importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection*. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 263-7.
- 66- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21 (8): 510-5.
- 67- Bryant K, Maxfield C, Rabalais G. Renal candididasis in neonates with candiduria. *J Pediatr Infect Dis* 1999; 18(11): 959-63.
- 68 Phillips JR, Karlowicz. Prevalence of *Candida* species in hospital-acquired urinary tract infections in a neonatal intensive care unit. *J Pediatric Infect Dis* 1997; 16 (2): 190-4.
- 69- Nassoura Z, Ivatury RR, Simon RJ, Jabbour N, Stahl WM. Candiduria as an early marker of disseminated infection in critically ill surgical patients: the role of fluconazole therapy. *J Trauma* 1993; 35: 290–5.
- 70- Guler S, Ural O, Findik D, Arslan U. Risk factors for nosocomial candiduria. *J Saudi Med* 2006; 27 (11): 1706-10.
- 71- Bose S, Ghosh AK, Barapatre R. The incidence of Candiduria in an ICU-A study. *J Clin Diag* 2011; 5(2): 227-30.
- 72- Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial candiduria: a review. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1602-7.
- 73- Rosenthal VD, Guzman S, Orellano PW. Nosocomial infections in medical-surgical intensive care units in Argentina: attributable mortality and length of stay. *Am J Infect Control* 2003; 31 (5): 291-5.
- 74- Sobel JD. Controversies in the diagnosis of candiduria: what is the critical colony count. *Current Treat Options Infect Dis* 2002; 4: 81-3.

- 75- Marcel-Senet J. Risk factors and physiopathology of candidiasis. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 6-13.
- 76- Sturtevant J, Calderone R. *Candida albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 90-7.
- 77- Malled RMD, Parandekar PK, Sajjan AG. Study of nosocomial urinary tract infections with special reference to candiduria at BLDEUs SHRI B.M. Patil Medical College and Hospital Bijapur, Karnataka. Int J Cur Res 2014; 6 (8): 42-51.
- 78- Yismaw G, Asrat D, Woldeamanuel Y, Unakal C. Prevalence of Candiduria in diabetic patients attending Gondar University Hospital, Gondar, Ethiopia. Iranian J Kidney Dis 2013; 7 (2): 102-7.
- 79- Kobayashi CC, Fernandez OF, Miranda KC, de Souza ED, Silva MD. Candiduria in hospital patients: a study prospective. Mycopathología 2004; 158 (1): 49-52.
- 80- Almeida AA; Mesquita CSS, Svidzinski TI, Olivera KM. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. Isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46 (3): 335-9.
- 81- Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. Clin Infect Dis 1996; 22 (2): 89-94.
- 82- Safdar A, Perlin DS, Armstrong D. Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemias patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44: 11-6.
- 83- Atkinson BJ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. Med Mycol 2008; 46: 541-546.
- 84- Mahmoundabadi AZ, Zarrin M, Fard MB. Antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candiduria. Jundishapur J Microbiol 2013; 6 (1): 24-8.

- 85- Ribeiro de Freitas A, Baeza LC, Iecher-Faria MG, Dalben-Dota KF, Godoy-Martínez P, Estivalet-Svidzinski TI. Yeast isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. Rev Iberoam Micol. En imprenta 2013.
- 86- Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, de Almeida LP, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. Bloodstream isolates from Latin American Hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 1-5.
- 87- Cuenca-Estrella M, Rodero L, García-Effrón G, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. Isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. J Antimicrob Chemotherapy 2002; 49: 981-7.
- 88- Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. Microbes infect 2009; 11: 753-761.
- 89- Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. Actividad de la micafungina contra biopelículas de *Candida*. Rev Iberoam Micol 2009; 26: 49-55.
- 90- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilospis*, an emerging fungal pathogen. Rev Clin Microbiol 2008; 21: 606-25.
- 91- Tumbarello M, Posterano B, Treccarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol 2008; 45: 1843-50.
- 92- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. Infect Immun 1994; 62: 915-21.
- 93- Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolated with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002; 40: 1244-8.
- 94- Silva S, Henriques M, Martins A, Olivera R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. J Med Microbiol 2009; 47: 681-9.

95- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Silicone colonisation by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. J Med Microbiol 2010; 59: 747–54.