

Universidad de Panamá
Facultad de Medicina
Vice Rectoría de Postgrados

*“Caracterización Fenotípica, Genotípica, y Susceptibilidad Antifúngica de
Candida spp aisladas de Hemocultivos en el Hospital del Niño del 2009 al 2010”*

AUTOR

Julio Nieto Ramos

Cédula: 6-79-4

Director de Tesis.

Dra. Nora de Moreno

**Trabajo de Graduación para optar por el título de Máster en Ciencias Biomédicas
con Especialización en Microbiología.**

PANAMÁ, CIUDAD DE PANAMÁ, 2013

ST

16 FEBR 2014

16

D.A.

DEDICATORIA.

“Deseo dedicar esta obra en primer lugar a Dios, quien es el que pone el querer como el hacer por su buena voluntad. A mi esposa e hijas por su comprensión, por el tiempo que no les he dedicado durante el desarrollo de esta investigación. A mis familiares y amigos por todo el tiempo dispensado.”

AGRADECIMIENTO.

Ante todo doy gracias a Dios por su bondad y misericordia, definitivamente sin El nada podría ser posible. Quiero agradecer profundamente a la Doctora Nora de Moreno por el tiempo dedicado en la dirección y asesoría de este proyecto, y como de forma magistral pudo controlar mi ímpetu en los momentos de crisis cuando el afán por terminar me abrumaba, gracias por su paciencia. A la Doctora Evelia Quiroz y a la Magister Carmen Espino por su tiempo y dedicación como jurados, en verdad las aprecio.

A la Licenciada Evelyn Delgado quien me ha colaborado sin restricciones y a mis compañeros del Hospital de Niño por toda la colaboración brindada, muy en especial al grupo de microbiología. Agradezco el apoyo que me brindaron el Doctor Ivan Landires y la Doctora Virginia Sánchez en momentos donde la investigación no avanzaba. Y a todas las personas que de una forma u otra han contribuido al desarrollo de esta investigación. Quiero agradecer a la Doctora Zilka Terrientes por la celeridad aplicada en estos últimos meses, lo cual me ha permitido cristalizar esta meta.

No puedo terminar sin antes agradecer a mi benefactor principal, la Secretaria Nacional de Ciencias y Tecnología e Innovación (SENACYT), quien por medio de la convocatoria de nuevos investigadores aportó los recursos necesarios para realizar este proyecto de investigación. Al Hospital del Niño que a través del Director Médico Alberto Bissot, permitió el uso de las instalaciones del Laboratorio Clínico para el desarrollo de una parte de este proyecto. Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá quienes me brindaron todo su apoyo en el desarrollo de las pruebas moleculares, gracias por su confianza.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MAPCO TEÓRICO	5
1 Antecedentes y Justificación	5
2 Generalidades de las especies de <i>Candida</i> y organismos semejantes	9
3 Epidemiología de <i>Candida spp</i>	14
4 Hemocultivos	19
5 Sepsis neonatal	21
6 Agentes antifungicos aprobados de uso sistémico y mecanismos de resistencia	24
a) Polienos	25
b) Azoles	26
c) Flucitosina	31
d) Equinocandinas	32
7 Prueba molecular PCR Fingerpnter	35
METODOLOGÍA	37
1 Objetivo general	37
a) Objetivos específicos	37
2 Tipo de estudio	38
3 Universo y tamaño de la muestra	38
4 Cnteros de inclusión	38
5 Lista de equipos	39

6. Lista de reactivos y materiales.	39
7. Procedimientos.	41
a) Aislamiento de las cepas.	41
b) Procedimiento para la identificación de levaduras usando las tarjetas Vitek YST de Biomeriux, Francia.	41
c) Procedimiento para la prueba de susceptibilidad en agar Muller Hinton usando tabletas Neosensitabs.	42
d) Procedimiento para realizar la prueba de agar Harina de Maíz con tween 80, para identificar especies de <i>Candida</i> .	42
e) Procedimiento para la extracción de ADN MasterPure Yeast DNA Purification Kit.	43
f) Procedimiento para realizar la PCR al azar Fingerprinter.	45
g) Procedimiento para realizar la detección de productos de PCR.	46
RESULTADOS.	47
DISCUSIÓN.	58
CONCLUSIONES.	65
RECOMENDACIONES.	66
BIBLIOGRAFIA.	67
ANEXOS.	79

INDICE DE CUADROS.

CUADRO I. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS HONGOS Y LEVADURAS.	10
CUADRO II. CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS Y ORGANISMOS SEMEJANTES ENCONTRADOS CLINICAMENTE.	13
CUADRO III. PORCENTAJE DE ORGANISMOS AISLADOS DE PACIENTES CON CULTIVO DE SANGRE POSITIVO ($n=262$).	14
CUADRO IV. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE <i>Candida</i> AISLADAS POR REGIÓN GEOGRAFICA.	15
CUADRO V. REPORTE DE CANDIDEMIA NEONATAL DESDE 1991 AL 2010, EN 7 PAISES DISTINTOS.	18
CUADRO VI: ORGANISMOS Y TASA DE MORTALIDAD ASOCIADA CON INFECCIONES DEL TORRENTE SANGUÍNEO EN NEONATOS CON MBPN (< 1,500 g).	22
CUADRO VII. DROGAS ANTIFÚNGICAS BLANCOS Y POSIBLES MECANISMOS DE RESISTENCIA.	25
CUADRO IX. PUNTOS DE CORTE PARA LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTI FÚNGICA, MÉTODO DE DIFUSIÓN SEGÚN LA CLSI (DOCUMENTO M44-2).	81
CUADRO X: DIAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA, MÉTODO DE DIFUSIÓN SEGÚN LA CLSI (DOCUMENTO M44-2).	81

INDICE DE FIGURAS.

- FIGURA 1. Tiempo de aparición de sepsis bacteriana y fungemia en infantes con MBPN. 23
- FIGURA 2. Mecanismos de acción de la anfotericina B. 27
- FIGURA 3. Mecanismo de acción de los azoles. 30
- FIGURA 4. Bomba de eflujo Transportador MFS. 31
- FIGURA 5. Bomba de eflujo Transportador ABC. 31
- FIGURA 6. Modelo esquemático de la PCR Fingerprinter. 36
- FIGURA 7. Ejemplo de Cepas de *Candida spp* sensibles a anfotericina B. 80
- FIGURA 8. Ejemplo de Cepas de *Candida spp* resistentes a anfotericina B. 80
- FIGURA 9. Ejemplo de Cepas de *Candida spp* sensibles a fluconazol. 80
- FIGURA 10. Ejemplo de Cepas de *Candida spp* resistentes a fluconazol. 80

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS.

- **TABLA 1. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *Candida spp* Y OTRAS LEVADURAS AISLADAS EN HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010 (n=55).** 51
- **TABLA 2. COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL VITEK 2, PCR FINGERPRINTER Y LA PRUEBA DE AGAR HARINA DE MAÍZ (n=55).** 52
- **GRÁFICO 1: PORCENTAJE DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010.** 53
- **GRÁFICO 2: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE LAS ESPCEIES DE *Candida A* LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).** 56
- **GRÁFICO 3: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *Candida parapsilosis* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).** 56
- **GRÁFICO 4: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *Candida albicans* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).** 57
- **GRÁFICO 5: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *Candida tropicalis* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).** 57
- **TABLA 3A. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS EN HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010.** 83
- **TABLA 3B. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010.** 84

INDICE DE IMÁGENES.

- **IMAGEN 1. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE REFERENCIA Y DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida spp.*** 54
- **IMAGEN 2. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE *Candida spp* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO *C.parapsilosis* y *C.famata*.** 54
- **IMAGEN 3. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE *Candida spp* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO *C.albicans*, *C.gulliermondii* y *C.haemulonii*.** 55
- **IMAGEN 4. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE *Candida spp* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO *C.tropicalis*.** 55
- **IMAGEN 5. CEPA CONTROL DE *C. albicans* 90028.** 82
- **IMAGEN 6. AISLADO CLÍNICO DE *C.albicans* CON RESISTENCIA A CASPOFUNGINA, FLUCONAZOL e ITRACONAZOL.** 82

Resumen:

El incremento en los últimos 10 años de los episodios de candidemia y la identificación de especies inusuales de *Candida*, nos obliga a realizar identificaciones con mayor exactitud y conocer los perfiles de susceptibilidad a los distintos anti fúngicos. Se realizó una caracterización de los aislados clínicos de levaduras procedentes de muestras de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño del período 2009 al 2010. Se evaluaron 55 de estas cepas, las cuales fueron identificadas usando el sistema Vitek2, la prueba agar Harina de Maíz y el método de PCR fingerprinter. Los patrones de bandas de los aislados clínicos fueron comparados con cepas de referencia para confirmar las identificaciones fenotípicas. Se realizaron pruebas de susceptibilidad para 6 anti fúngicos de uso sistémico. La distribución final de los aislados fue la siguiente: complejo *C.parapsilosis* (40%), *C.tropicalis* (29.1%), *C.albicans* (20%), *C.guilliermondii* (3.64%), *S.salmonicolor* (1.81%), *S.cerevisiae* (1.81%), y complejo *C.haemulonii* (3.64%). Las especies del complejo *C.parapsilosis* presentaron 77.3% de resistencia a caspofungina y 4.3% a itraconazol; *C.tropicalis* presentó 6.3% de resistencia a caspofungina y a itraconazol, mientras que *C.albicans* resultó con 18.2% de resistencia a caspofungina y anfotericina B, y 9.1% de resistencia a fluconazol, itraconazol y voriconazol. Algunas cepas de *C. albicans* fueron resistentes a varios anti fúngicos. No se encontraron cepas con resistencia a posaconazol. Las especies del complejo *C.parapsilosis* fueron las más aisladas en el hospital y en la sala de neonatología con una alta prevalencia de resistencia a caspofungina.

Abstract.

A characterization of clinical isolates of yeasts from blood cultures in patients at the Children's Hospital from 2009 to 2010. The increase in the last 10 years of candidemia episodes, identification of unusual species of *Candida*, is require to make high confidence identification and to know the susceptibility profiles of different anti-fungal. Evaluated 55 of these strains, which were identified using the Vitek2 system, corn meal agar and fingerprinter PCR method. The banding patterns from the isolates were compared with reference strains to confirm phenotypic identifications. The susceptibility testing to six systemic anti fungal were made. The final frequency of isolates were as follows: *C.parapsilosis complex* (40%), *C.tropicalis* (29.1%), *C. albicans* (20%), *C.guilliermondii* (3.64%), *S.salmonicolor* (1.81%), *S.cerevisiae* (1.81%) and *C.haemulonii complex* (3.64%). *C.parapsilosis complex* members were 77.3% resistance to caspofungin and 4.3% to itraconazole, *C.tropicalis* was 6.3% resistance to caspofungin and itraconazole, whereas *C.albicans* was 18.2% resistance to caspofungin and amphotericin B, and 9.1% resistance to fluconazole, itraconazole and voriconazole. *C.albicans* strains with several anti-fungal resistance were detected. The resistance to posaconazole was not found. *C.parapsilosis complex* members were the most isolated at the hospital and in the neonatology unit with a high prevalence of resistance to caspofungin.

INTRODUCCION.

La invasión de microorganismos en la sangre causa un considerable aumento de la morbi-mortalidad, representando asimismo una de las más graves causas de infección. Los hemocultivos son fundamentales para el diagnóstico de las bacteriemias y fungemias. El problema es de considerable magnitud, cerca de 200,000 pacientes desarrollan bacteriemias o fungemias anualmente en los Estados Unidos con una mortalidad atribuible del 20 a 50% (*Morales et al, 2011*).

El desarrollo de bacteriemia o fungemia entre los pacientes hospitalizados es un problema frecuente, representando un 15% de las infecciones asociadas a atención en salud (IAAS), y afectando al 1% de los pacientes hospitalizados en general. Las infecciones del torrente sanguíneo están asociadas a consecuencias desfavorables como: el aumento de la tasa de mortalidad atribuible, prolongación de la permanencia intrahospitalaria, y generación de costos extra substanciales (*Chang et al, 2008*).

La fungemia se define como la presencia de hongos o levaduras en la sangre, y son en la mayoría de los casos de origen nosocomial con una mortalidad de 35.8%. Es vista en pacientes inmunocomprometidos con severa neutropenia, pacientes oncológicos y con catéter intravenoso (*Weinstein et al, 1997*). En la sala de neonatología del Hospital del Niño la mortalidad de pacientes con candidemia es del 67%, y 50% de los pacientes desarrollan bolas fúngicas lo que dificulta el tratamiento (*Rueda et al, 2010*).

Los patógenos más comunes son *C.albicans* causando el 70% de las fungemias, seguido de *C.glabrata* con 10%, *Aspergillus spp* con 1% y *Saccharomyces spp* como el

cuarto más común. Sin embargo, la frecuencia de infección por *C.glabrata*, *S.cerevisiae*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, y *C.parapsilosis* está incrementando, debido al uso de terapia profiláctica con fluconazol o de antibióticos de amplio espectro (**Pfaller et al, 2007**).

La identificación de las especies de *Candida* aisladas de especímenes estériles con sus respectivos perfiles de susceptibilidad a los distintos anti fúngicos es de suma importancia clínica y epidemiológica para el manejo de los pacientes con fungemia (**Cavling et al, 2011**).

Se utilizó el método de polimorfismo genómico especie específico conocido como PCR fingerprinter para la identificación de 55 aislados clínicos de *Candida* de muestras de hemocultivo y cepas de referencia. Esta técnica de ADN polimórfico amplificado es un método sencillo, fácil de usar; y útil para biotipificar y analizar patrones epidemiológicos de los aislados clínicos de *Candida spp* y otros hongos (**Soll, 2000, Muñoz et al, 2005**). La identificación fenotípica se realizó con el sistema Vitek 2 y la prueba agar Harina de Maíz (método de Dalmau). Se utilizó el método de difusión para las pruebas de susceptibilidad anti fúngicas recomendado por la CLSI, documento M44-P.

La distribución final de las especies de *Cándida* aisladas de hemocultivos fueron los miembros del complejo *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.albicans*, *C.guilliermondii*, complejo *C.haemulonii*, *S.cerevisiae* y *S.salmonicolor*. El porcentaje de resistencia a los distintos anti fúngicos no excedió el 10%, excepto por caspofungina. Las especies del complejo *C.parapsilosis* fueron las más aisladas en el Hospital del Niño y en la sala de neonatología, con una alta prevalencia de resistencia a caspofungina.

MARCO TEÓRICO.

MARCO TEÓRICO

1. Antecedentes y Justificación.

El género *Candida* incluye muchas especies patógenas que causan una variedad de síndromes clínicos en humanos, desde infecciones superficiales a invasivas en pacientes inmunocomprometidos. Para tener un pronóstico, epidemiología y estrategia terapéutica adecuada, es esencial realizar una identificación exacta a nivel de especie de los aislados clínicos de *Candida*.

En el Hospital del Niño, *C.albicans* (41.3%) fue la especie más aislada en el período 2004 al 2005, seguido de *C.parapsilosis* (15.9%) y *C.tropicalis* (15.3%). Se aisló igualmente *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.lusitaniae*, *C.zeylanoides* y otras especies de levaduras como *Torulopsis glabrata* y *Torulopsis candida* (**Cisternas, 2006**).

Desde enero de 2007 a diciembre de 2009 se aisló de cultivos de sangre 2,427 microorganismos, 64% de aislamientos correspondieron a *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN), 10% a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (siendo *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* los aislados más frecuentes), 6% a *Staphylococcus aureus*, 6% de bacilos Gram negativos no fermentadores (*Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp* y otros), 6% de otros cocos Gram positivos (*Enterococcus spp*, *Streptococcus spp* y otros). El 6% de los aislamientos correspondió a especies de *Cándida*, siendo *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* y *C.albicans* las especies más frecuentes. El 1.19% de los aislados no fueron clasificados a nivel de especie y se reportan como *Cándida spp no albicans*. Otras cepas de levaduras como *C.guilliermondii*, *C.famata*,

C.glabrata, *C.zeylanoides* y *Pichia ohmeri* fueron aisladas con menos frecuencia (Datos estadísticos del Departamento de Laboratorio Clínico, sección de microbiología, 2007 a 2009).

Actualmente, la identificación de especies de *Candida* se hace usando el sistema Vitek 2. Este sistema permite la identificación bioquímica de especies de levaduras y los resultados obtenidos son comparables con el sistema API 20C AUX, el cual es considerado como el método de referencia para la identificación fenotípica de levaduras (**Hata et al, 2007**).

Los métodos basados en la detección de ADN son usados actualmente para la identificación de especies del género *Candida* de cultivos de especímenes clínicos (**Soll, 2000, Chaves et al, 2012**). Los aislados clínicos han sido identificados por métodos moleculares de tipificación como Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE) (**Lin et al, 2007**), análisis de fragmentos largos polimórficos de restricción (**Tavanti et al, 2007**), hibridación Southern con sondas específicas de ADN (**Lasker et al, 2006, Ning et al, 2007**), análisis de pirosecuenciación (**Broman et al, 2009**) y la tipificación por secuenciación de múltiples locus (**Tavanti et al, 2005**). Sin embargo, algunos de los métodos antes mencionados para la caracterización de aislados de *Candida spp* son muy laboriosos y costosos. El método de fingerprinter es una técnica de polimorfismo genómico especie específico sencillo y fácil de usar. Esta técnica de ADN polimórfico amplificado al azar conocida también como PCR random fingerprinter, es útil para biotipificar y analizar patrones epidemiológicos de aislados clínicos de *C.albicans* y otros hongos (**Soll, 2000, Muñoz et al, 2005**). Los perfiles de bandas consisten en varios productos de amplificación específicos para cada especie de *Candida*. Los

perfiles derivados de los aislados clínicos son comparados con los patrones generados por las cepas de referencia (**Thanos M et al, 1996, Correia et al, 2004**).

Las pruebas de susceptibilidad deben ser realizadas en todas las especies de *Candida* aisladas de sitios estériles, como es el caso de los hemocultivos. En el Hospital del Niño los anti fúngicos como anfotericina B, fluconazol, y caspofungina son utilizados para el tratamiento de candidemias. El método utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad anti fúngica previo al período de estudio fue el método de ATB Fungus. Este sistema sólo incluye los anti fúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol y 5 fluorocitosina. Un reporte de **Cisternas** en el 2006 encontró elevadas tasas de resistencia a fluconazol en los aislados de *Candida*. Los porcentajes de resistencia para *C.albicans* a los anti fúngicos fueron de 33.7% a fluconazol, 51.2% a itraconazol y 2.3% a anfotericina B. Para *C.parapsilosis* 12.1% de resistencia a anfotericina B, 9.1% de resistencia a fluconazol y 15.2% a itraconazol. No se encontró resistencia de *C.tropicalis* a anfotericina B, pero 33.7% y 59.4% de las cepas fueron resistentes a fluconazol y a itraconazol respectivamente.

Desde junio de 2008 en el Hospital del Niño a los pacientes con peso al nacer menor de 1,250 g se les administra fluconazol como profiláctico en su tercer día de vida. La frecuencia de *Candida spp* en pacientes que no recibieron fluconazol como profiláctico fue *C.parapsilosis* (43%), *C.albicans* (43%), *C.tropicalis* (9%) y *C.famata* (4%), mientras que en los pacientes recibiendo fluconazol fue la siguiente *C.albicans* (33%), *C.parapsilosis* (33%), y *C.tropicalis* (33%). La profilaxis con fluconazol disminuyó la frecuencia de infección por *Candida spp* de 7.7% a 1.2%. Los catéteres venosos centrales fueron un hallazgo común en los neonatos infectados y 50% de los pacientes infectados presentaron bolas fúngicas (**Rueda et al, 2010**).

Con la sobrevivencia de los infantes pre término, la incidencia de infecciones por hongos ha aumentado en las unidades de cuidados de neonatología (**Kaufman, 2004**). Las infecciones por *Candida* están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad; en la sala de neonatología del Hospital del Niño la mortalidad en neonatos con candidemia es de aproximadamente 67% (**Rueda et al, 2010**).

En el Hospital del Niño no se conocía la exacta frecuencia de especies de *Candida* aisladas de pacientes con candidemias. Los estudios previamente publicados y los datos estadísticos en nuestro hospital presentan distintas frecuencias de aislamiento en diferentes períodos. El 97% de las candidemias son producidas por *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* y *C.krusei* (**Kaufman et al, 2004**). En nuestro laboratorio hemos aislado especies inusuales de *Candida* y otras levaduras como *C.zeylanoides*, *C.famata*, *C.lusitaniae*, *Pichia ohmeri* y *Trichosporum spp*. En la Clínica Mayo, se han aislado por ejemplo 3 cepas de *C.zeylanoides*, 3 cepas de *C.famata*, 1 cepa de *Pichia bourtonii*, y 13 cepas de *Trichosporum spp* en un período de 20 años (**Betty et al, 1998**). Esto nos hace plantear varias interrogantes, Han sido nuestros aislamientos identificados correctamente?, la frecuencia de aislamientos de *Candida* reportada es veraz o simplemente tenemos errores de identificación?.

Los porcentajes de resistencia a los azoles reportados por **Cisternas** en el 2006, no coinciden con los reportados en la literatura donde las cepas con mayor resistencia a fluconazol son *C.glabrata* con un 30% y *C.Krusei* hasta un 60% (**Kaufman et al, 2004**). El éxito logrado en la reducción de candidemias en pacientes neonatos recibiendo terapia profiláctica con fluconazol, nos permite cuestionar los altos porcentajes de resistencia que han sido reportados para este anti fúngico. Adicionalmente, la introducción del uso de caspofungina para el tratamiento de candidemias en la sala de

neonatología de nuestro hospital (**Saez-Llorens et al, 2006**), hace necesario utilizar métodos que nos permitan conocer la susceptibilidad de nuestros aislamientos frente a los nuevos anti fúngicos como las equinocandinas. No se conoce el impacto que ha tenido la implementación de las nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas en la frecuencia de aislamiento de especies de *Candida*; y aun no se conoce cuáles son los actuales perfiles de susceptibilidad de nuestros aislados de *Candida spp.* Preocupa el hecho que el uso frecuente de fluconazol como profiláctico genere una emergencia a largo plazo de nuevas cepas de levaduras con resistencia o la selección de cepas resistentes preexistentes. Estos argumentos soportan el hecho de plantear nuevas metodologías diagnósticas seguras y confiables que nos permitan contestar estas interrogantes, y a la vez establecer nuevos fundamentos epidemiológicos que nos ayuden a tomar mejores decisiones.

2. Generalidades de las especies de levaduras y organismos semejantes.

Las levaduras son células eucariotas unicelulares que se reproducen por gemación. Generalmente son redondas u ovals, menos frecuente de forma elongada o irregular. Ellas se multiplican principalmente por la producción de blastoconidias, la cual está compuesta de una célula progenitora con una o más progenies unidas. Cuando la blastoconidia es producida una al lado de la otra sin separarse, se forma una estructura denominada pseudohifa. Las levaduras en cultivo forman colonias húmedas, cremosas o de textura glabrosa a membranosa; algunas producen cápsulas las cuales forman colonias mucoides. Las colonias pueden ser blancas o ligeramente coloreadas. En la

mayoría de los casos las levaduras patógenas son encontradas dentro del Filum *Deuteromycotas* (Hongos Imperfectos) que son hongos que no exhiben un estadio sexual o teleomórfico en cultivo. La mayoría de las levaduras crecen bien en medios bacteriológicos y micológicos comunes, el crecimiento es usualmente detectado dentro de las 48 a 72 horas de incubación. Algunos pigmentos pudieran ser observados inicialmente o pueden intensificarse con la edad del cultivo. Las especies de levaduras patógenas crecen de 25° a 37°C, mientras que las saprófitas usualmente no crecen a estas temperaturas. En el **Cuadro I y II** se presenta la clasificación taxonómica y algunas características de las hongos filamentosos y organismos levaduriformes (*Murray P et al, 2008*).

CUADRO I. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS HONGOS Y LEVADURAS.

División	Clase	Subclase	Orden	Familia	Genero
<i>Zygomycotina</i>	<i>Zygomycetes</i>		<i>Mucorales</i> <i>Entomophthorales</i> <i>Endomycetales</i>		
<i>Ascomycotina</i>	<i>Ascomycetes</i>		<i>Onygenales</i> <i>Eurotiales</i> <i>Sphaeriales</i> <i>Pneumocystidales</i>		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces</i> • <i>Pichia</i>
<i>Basidiomycotina</i>	<i>Basidiomycetes</i>		<i>Agaricales</i> <i>Filobasidiales</i> <i>Cryptococcales</i>	<i>Cryptococcaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida</i> • <i>Cryptococcus</i> • <i>Hansenula</i> • <i>Malassezia</i> • <i>Rhodotorula</i> • <i>Trichosporon</i>
<i>Deuteromycotina</i>	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Blastomycetes</i>			
		<i>Hyphomycetes</i>	<i>Moniliales</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Moniliaceae</i> • <i>Dematiaceae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Histoplasma</i>
		<i>Coelomycetes</i>	<i>Sphaeropsidales</i>		

Murray P et al, 2008.

El género *Cándida* pertenece a la familia *Cryptococcaceae*, dentro del Filum *Deuteromycota* y contiene aproximadamente 200 especies. Los géneros Teleomorfos

han sido demostrados para diferentes especies de *Candida* e incluyen: *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Yarrowia*. Este gran número de formas teleomorfas relacionadas demuestran que *Candida spp* es una mezcla de especies no relacionadas. Las especies de *Cándida* son levaduras ubicuas, siendo encontradas en plantas y como miembros de la flora normal del tracto digestivo de mamíferos y membranas mucocutáneas de los humanos. La mayoría de las especies aisladas del tracto gastrointestinal de humanos (50 a 70%) son *C. albicans*, seguido de *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* y *C.glabrata*.

Otras especies de *Candida* medicamente importantes son: *C.catenulata*, *C.ciferrii*, *C.guilliermondii*, *C.haemulonii*, *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.lipolytica*, *C.lusitaniae*, *C.norvegensis*, *C.pulcherrima*, *C.rugosa*, *C.utilis*, *C.viswanathii* y *C.zeylanoides*. Especies que aparecen como patógenos emergentes incluyeron a *C. lipolytica*, *C. lusitaniae* (con resistencia a anfotericina B) y *C.krusei* (con resistencia a fluconazol), aisladas de pacientes con fungemia. Otras dos especies resistentes a fluconazol que raramente producen candidiasis son *C.inconspicua* y *C.norvengensis*, y finalmente *C. glabrata* que ha emergido como un patógeno importante desde los años 80 (**Murray P et al, 2008**).

Los laboratorios deben realizar una completa identificación de todas las especies de levaduras en las siguientes circunstancias (**Betty et al, 1998**):

- Todas las levaduras aisladas de fluidos estériles del cuerpo, incluyendo fluido cerebroespinal, sangre, orina, paracentesis, y otros fluidos.
- Aislados de levaduras de pacientes seriamente enfermos, pacientes inmunocomprometidos o aquellos donde la infección micótica es sospechada.

- Las levaduras de secreciones respiratorias no deben ser identificadas de rutina, con excepción de *Cryptococcus neoformans*.
- Levaduras aisladas en grandes cantidades de una fuente clínica.
- Levaduras aisladas de múltiples especímenes sucesivos, excepto de secreciones respiratorias.

CUADRO II. CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS Y ORGANISMOS SEMEJANTES ENCONTRADOS CLINICAMENTE.

Organismos	Agar Harina de Maíz con Tween 80 a 25° C					Asco-Esporas	Esporangio	Capsula	Ureasa	Crecimiento		
	Pseudo-Hifas	Hifas	Blasto-conidia	Arthro-conidia	Anelo-conidia					Ciclohexamida (25° C)	SDA (37° C)	Caldo Sabouraud
<i>Candida</i>	+	Pocas	+	0	0	0	0	0	0v	V	+v	CS
<i>Rhodotorula</i>	OR	0	0	0	0	0	0	V	+	0v	+v	NCS
<i>Cryptococcus</i>	OR	0	0	0	0	0	0	+	+	0	V	NCS
<i>Saccharomyces</i>	V	0	0	0	0	+	0	0	0	0	+	NCS
<i>Hansenula</i>	0v	0	0	0	0	+	0	0	0	0	V	NCS
<i>Malassezia</i>	OR	OR	0	0	0	0	0	0	+	+w.v	+v	NCS
<i>Prototheca</i>	0	0	0	0	0	0	+	0v	0	0	+v	CS
<i>Geotrichum</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0w	Película
<i>Trichosporon</i>	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+v	+v	Película
<i>Blastoschizomyces</i>	+	+	+	0v	+	0	0	0	0	+	+	Película

Abreviaturas: SDA, Sabouraud dextrosa agar; + (Positivo); 0 (Negativo); V (Variación de cepas o especies); W (Débil); R (Raramente formas rudimentarias); NCS (No crece en la Superficie); CS (Crece en la Superficie).

Murray P et al, 2008.

3. Epidemiología de *Candida spp.*

Las infecciones por especies de *Candida* están asociadas a la presencia de factores de riesgo como catéter venoso central, nutrición parenteral y exposición a antibióticos de amplio espectro (*Rueda et al, 2010*). *Candida spp* es un patógeno oportunista y la colonización e infección depende de su habilidad de adherirse a la piel, mucosas, y superficies de catéteres como organismos comensales. Los organismos colonizando pueden entrar al torrente sanguíneo por la rotura de la piel y mucosas, por translocación gastrointestinal o puede ser introducida a través de dispositivos médicos como catéter venoso central, tubo endotraqueal o tubos de alimentación. Alternativamente, las IAAS pueden ser el resultado de la infusión de soluciones contaminadas o de fórmulas contaminadas (*Kaufman et al, 2004*). En el Cuadro III se muestra el porcentaje de los microorganismos más frecuentes en estudios de hemocultivos donde *Candida spp* representa el 4.4% de todos los aislados (*Gonsalves et al, 2009*).

CUADRO III. PORCENTAJE DE ORGANISMOS AISLADOS DE PACIENTES CON CULTIVO DE SANGRE POSITIVO (n=262).

Microorganismos	No. (%) de Casos	No. (%) de Contaminantes
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 (4.7)	
<i>MRSA</i>	12 (4.4)	
<i>Staphylococcus cog neg</i>	123 (44.9)	83 (67)
<i>Enterococcus spp</i>	9 (3.3)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7 (2.6)	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4 (1.5)	
<i>Streptococcus spp</i>	18 (6.6)	2 (11)
<i>Corynebacterium spp</i>	6 (2.2)	4 (67)
<i>Bacillus spp</i>	20 (7.3)	2 (10)
<i>Micrococcus spp</i>	4 (1.5)	4 (100)
<i>Escherichia coli</i>	12 (4.4)	
<i>Klebsiella spp</i>	7 (2.6)	
<i>Ps. Aeruginosa</i>	4 (1.5)	
<i>Enterobacter spp</i>	8 (2.9)	
<i>Salmonella spp</i>	3 (1.1)	
<i>Citrobacter spp</i>	2 (0.7)	
<i>Haemophilus spp</i>	2 (0.7)	
<i>Roseomonas spp</i>	2 (0.7)	
Otros	5 (1.8)	
<i>Clostridium spp</i>	1 (0.4)	
<i>Candida spp</i>	12 (4.4)	3 (25)

Gonsalves et al, 2009

Las especies de *Candida* se ubican como la cuarta causa de infección del torrente sanguíneo en los Estados Unidos (EUA). Cinco especies de *Candida* (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, y *C.krusei*) representan más del 95% de los casos de Candidiasis invasiva. Especies menos comunes han emergido como causa de candidiasis nosocomial con 95% de susceptibilidad a los anti fúngicos viables, con una variada actividad droga-especie específica (*C.rugosa* y *C.guilliermondii* con susceptibilidad reducida a fluconazol y equinocandinas) (**Diekema et al, 2009**). Aunque *C.albicans* permanece como la especie más aislada, la incidencia de fungemia por especies de *Candida no albicans* se está incrementando (**Pasquale et al, 2008**, **Axner-Elings et al, 2011**). En los Estados Unidos, *C. albicans* es la principal causa de fungemia seguido de *C.glabrata* (la cual representa el 16% de las fungemias en el mundo), *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, y *C.krusei* (prevalente en ancianos), ver **Cuadro IV**. Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) se están convirtiendo en una causa de mortalidad asociada a infecciones en pacientes con cáncer, neutropenia prolongada y trasplantes de médula ósea (**Pfaller et al. 2008**).

CUADRO IV. DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS POR REGIÓN GEOGRAFICA.

<i>Candida spp</i>	% de Aislados				
	APAC (n=958)	LAM (n=1,112)	EU (n=1,787)	NAM (n=1,489)	Total (n=5,346)
<i>C.albicans</i>	57.10	47.93	58.42	50.03	53.67
<i>C.parapsilosis</i>	15.97	18.62	10.63	14.04	14.20
<i>C.glabrata</i>	8.46	5.67	13.93	23.77	13.97
<i>C.tropicalis</i>	14.20	19.96	8.56	7.66	11.69
<i>C.krusei</i>	0.94	1.62	4.87	1.48	2.54
<i>C.guilliermondii</i>	0.73	3.60	0.50	0.34	1.14
<i>C.lusitaniae</i>	0.63	0.63	1.29	1.48	1.08
<i>C.kefyr</i>	0.10	0.63	1.23	0.47	0.69
<i>C.famata</i>	0.84	0.72	0.22	0.27	0.45
<i>Candida spp</i>	1.04	0.63	0.34	0.47	0.56

APAC= Asia Pacífico, LAM= Latino América, EU= Europa, NAM= Norte América.
Pfaller et al. 2008.

La patogénesis de la candidiasis invasiva es facilitada por un número de factores de virulencia como la adherencia, la formación de biopelículas y la secreción de enzimas hidrolíticas entre las cuales podemos mencionar proteasas, fosfolipasas y lipasas. Desde 1979 la incidencia anual de sepsis fúngica ha aumentado sobre 200 por ciento en los EUA. Las especies *Candida spp* son responsables del 8 al 15 % de todas las infecciones adquiridas en los hospitales (**Trofa et al, 2008**).

La distribución de especies de *Candida* varía con la edad, tratamiento antifúngico previo y especialidad clínica, por ejemplo es común el aislamiento de *C.krusei* en los servicios de hematología oncológica (**Pfaller et al, 2007**). Recientes datos indican que la ocurrencia de *C.glabrata*, *S.cerevisiae*, o *C.krusei* en pacientes con terapia anti fúngica previa es mayor que en pacientes sin ésta. Existe un 61% de ocurrencia de *C.glabrata* o *C.krusei* en salas de hematología versus un 27% de ocurrencia en otras salas.

Los pacientes susceptibles a presentar una fungemia son aquellos que han tenido una cirugía, los internados en la unidad de terapia intensiva y aquellos con enfermedades malignas. La tasa de mortalidad varía con la edad, con la especie de *Candida* produciendo la fungemia (36% para *C.krusei*, 25% para *C.parapsilosis* y 14% otras especies de *Candida*), la severidad de la enfermedad de base y la elección de la terapia inicial (**Cavling et al, 2011**).

Existe una emergencia de *C.glabrata* como un importante patógeno oportunista en los EUA, mientras que otras especies como *C.parapsilosis* y *C.tropicalis* causan infecciones en otras regiones (por ejemplo el incremento de *C.parapsilosis* es notable en América Latina). El tipo de paciente y hospital también va a influenciar el tipo de hongo aislado. Por ejemplo los pacientes pediátricos son infectados principalmente por *C.albicans* y *C.parapsilosis*, y los pacientes con leucemia con *C.albicans* y *C.tropicalis*, mientras que los pacientes con trasplantes de médula ósea son infectados con especies que tienen resistencia natural a los azoles como *C.krusei*, *C.glabrata*, o *C.lusitaniae*. La exposición previa a los anti fúngicos o el uso de azoles como profilácticos fungistáticos (incluyendo el fluconazol y voriconazol) han sido asociados con un incremento de la frecuencia de nuevos aislados clínicos drogo resistentes (**Magill et al, 2006**). La resistencia a los

azoles se debe principalmente a una resistencia adquirida en hongos patógenos oportunistas, o a la selección de cepas con resistencia innata durante el tratamiento con estos antimicóticos. El 30% de los aislados clínicos de *C.glabrata* muestran moderada resistencia innata a los azoles (**Pfaller et al. 2008.**). Sin embargo, mientras la frecuencia de *C.glabrata* aumenta en pacientes mayores de 80 años, la tasa de resistencia a fluconazol disminuye (**Pfaller et al, 2009**).

Generalmente *C.krusei* tiene resistencia innata a fluconazol, y 80 % de las cepas tienen susceptibilidad dosis dependiente a itraconazol. *C. krusei* es susceptible a los nuevos azoles como voriconazol y posaconazol. El fenotipo de resistencia innata de *C.krusei* a los azoles (fluconazol) se debe principalmente a la reducida afinidad de la droga a su blanco, el sitio *Erg11p*. La resistencia también puede ser explicada por bombas de eflujo que pueden contribuir a la resistencia de *C.krusei* al fluconazol (**Pfaller et al. 2008.**). Los brotes de *C.krusei* en pacientes internados en salas de hematología han sido resueltos con profilaxis anti fúngica y la aplicación de medidas de control de infecciones (**Vos et al, 2006**).

La incidencia de *C.parapsilosis* ha incrementado dramáticamente, y en algunos reportes es la segunda especie de *Candida spp* aislada de hemocultivos. La infección por la introducción exógena de *C.parapsilosis* con instrumentación médica y soluciones de hiperalimentación es frecuente. *C.parapsilosis* es un comensal de piel y su patogenicidad es limitada por un tegumento intacto. Esta especie de *Candida* tiene la capacidad de crecer en las soluciones de nutrición parenteral y formar biopelículas en los catéteres venosos centrales y otros dispositivos médicos que han sido implantados. La dispersión nosocomial por el transporte en las manos y por la persistencia en el ambiente hospitalario es también un factor de riesgo importante. Esta especie de *Candida* es especialmente crítica en neonatos enfermos, causando más de una cuarta parte de todas las IFI en infantes con bajo peso al nacer en el Reino Unido y un tercio de los neonatos en unidades de cuidados intensivos de neonatología en Norte América (**Trofa D et al, 2008**).

La enfermedad invasiva por *C.albicans* y *C.tropicalis* es normalmente precedida por previa colonización, estos agentes son transmitidos verticalmente de la madre al hijo durante el

nacimiento. En contraste, la enfermedad invasiva por *C.parapsilosis* puede ocurrir sin previa colonización, y es frecuentemente transmitida por vía horizontal de fuentes externas como dispositivos y fluidos médicos contaminados, las manos contaminadas de los trabajadores de la salud, o de catéteres colonizados. El prolongado uso de un catéter venoso central para la administración de antibióticos ha sido asociado también con infección por *C.parapsilosis*. La fungemia por *C.parapsilosis* puede producir infecciones en los tejidos y tiene una mortalidad que varía entre el 4 al 45%. Estudios revelan que la tasa de mortalidad promedio para *C.parapsilosis* y *C.albicans* es de 28.5% y 44.8% respectivamente para cada organismo (*Trofa D et al, 2008*). En un análisis de fungemia en Barcelona durante los años 2002 y 2003, se encontró que el 23% de los casos eran por *C.parapsilosis*, y el 51% de estos fue asociado a catéter venoso central (*Almirante et al, 2006*).

C.parapsilosis ha sido descrito como el principal agente causando enfermedad en neonatos. La infección cruzada durante el contacto entre pacientes y los trabajadores de la salud ha sido una causa significativa de transmisión en brotes de IAAS por *C.parapsilosis*. Entre los años 1988 y 2000 en un hospital de tercer nivel de atención, *C.parapsilosis* fue la especie de *Candida* más aislada en la unidad de cuidados intensivos de pediatría. Esto se debió a 4 brotes de *C.parapsilosis* ocurridos durante el periodo de estudio. En el **Cuadro V** se comparan los aislamientos de pacientes con candidemia neonatal en 7 países distintos.

CUADRO V. REPORTE DE CANDIDEMIA NEONATAL DESDE 1991 AL 2010, EN 7 PAÍSES DISTINTOS.

Periodo	País	Total	No. (%) Especies de Candida				
			<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.tropicalis</i>	Otras
1991-2002	Finlandia	43	28 (65.1)	15 (34.9)			
1994-1997	Taiwán	46	22 (47.8)	24 (52.2)			
1994-2000	Grecia	58	9 (15.5)	38 (65.5)	1 (1.7)	9 (15.5)	1 (1.7)
1995-1998	EUA	37	19 (51.3)	15 (40.5)	1 (2.7)	2 (5.4)	
1995-2004	EUA	1,997	674 (33.7)	1,157 (57.9)	40 (2.0)	76 (3.8)	50 (2.5)
1996-2000	Israel	60	16 (26.7)	40 (66.7)	3 (5.0)	1 (1.7)	

Nota: otros aislados incluye C.lusitaniae, C.krusei, C.guilliermondii, C.dublinsiensis, C.rugosa. Trofa D et al, 2008.

4. Hemocultivos.

El diagnóstico definitivo de la bacteriemia y de la fungemia se establece cuando se aísla el microorganismo causal en la sangre del enfermo mediante un hemocultivo. El aislamiento del agente responsable es trascendente para conocer su sensibilidad a los antimicrobianos e instaurar el tratamiento o las modificaciones necesarias a la terapia empírica ya establecida.

Más del 50% de todos los cultivos de sangre positivos pueden ser debido a la presencia de microorganismos contaminantes (tasa de contaminación permitida de 2-3%). Se ha determinado que el 12.4% de los SCN aislados de cultivos de sangre representan bacteriemia significativa. Cerca del 50% de los pacientes con cultivos de sangre falsos positivos por SCN reciben terapia antimicrobiana (**Calfee et al. 2002**).

Muchos factores influyen el alcance de los cultivos de sangre, pero el más importante es el volumen de sangre. Muchos estudios han demostrado que el porcentaje de aislamiento de patógenos en hemocultivos incrementa con el volumen de sangre recolectado. Un volumen inadecuado de sangre incrementa el porcentaje de cultivos contaminados (**Gonsalves et al, 2009**).

La limpieza de la piel en el sitio de punción es usada para prevenir la contaminación al disminuir la carga de la flora bacteriana residente. Esta práctica no puede prevenir completamente la contaminación, porque el 20% de las bacterias de la piel están localizadas en láminas profundas de la piel o dentro de otras estructuras donde las soluciones antisépticas no pueden penetrar (**Calfee et al. 2002**). Se ha realizado la comparación de distintos antisépticos comerciales para la limpieza de la piel (iodina, tintura de iodo, alcohol isopropílico, y iodina povidona con alcohol), y las tasas de contaminación obtenidas para cada antiséptico no tienen diferencias estadísticas significativas (2.46 a 2.93%). La aplicación simple de alcohol isopropílico es suficiente y clínicamente factible para reducir la tasa de contaminación (**Kiyoyama et al, 2009**). También el uso de flebotomistas entrenados para toma de hemocultivos reduce la tasa de contaminación durante la recolección de la muestra de hemocultivo (**Gander et al, 2009**).

La cantidad de hemocultivos que son enviados al laboratorio de microbiología también tiene un impacto en la recuperación de microorganismos. Es necesario ordenar más de cuatro cultivos de sangre para exceder el 99% de detección de bacteriemia o fungemia. El número de cultivos necesarios para detectar patógenos comunes en las infecciones del torrente sanguíneo dependerá del tipo de microorganismo. Por ejemplo, solamente el 60% de los episodios de fungemias por *C.albicans* fueron detectados con el primer cultivo de sangre y entre 95 a 100% con 3 hemocultivos dependiendo de la especie de *Candida* (**Lee et al, 2007**).

La infección relacionada a catéter sigue siendo un problema en la práctica clínica y su incidencia varía desde 4 a 16% (**González et al, 2004**). La incidencia de infección del torrente sanguíneo asociada a líneas centrales y umbilicales es de 11.3 por 1000 catéteres-día por neonato con peso al nacer de menos de 1,000 gramos y de 6.9 por 1000 catéteres-día por neonato con peso al nacer entre 1,000 y 1,500 gramos (**Kaufman et al, 2004**).

La remoción del catéter por sospecha clínica de contaminación ha mostrado que hasta el 85% de los cultivos de las puntas de cateter son negativos, haciendo de esto una práctica inútil. Para evitar un retiro injustificado y el riesgo asociado con la colocación de un nuevo catéter en otro sitio, se ha propuesto la toma simultánea de muestras de sangre a través del catéter y de una vena periférica para cultivo. Los resultados permiten establecer el diagnóstico de infección relacionada a catéter sin el retiro del mismo y así anticipar su tratamiento. La combinación de hemocultivo transcatéter positivo y cultivo periférico negativo o ambos positivos pueden ser suficiente para establecer el diagnóstico de infección relacionado a catéter, aún antes de tener que retirar el catéter y se justifica al momento de tomar conductas de tratamiento específicas. Las especies de *Candida* representan el 18.7% de todos los gérmenes causantes de infección asociadas a catéter (**González et al, 2004**).

5. Sepsis neonatal.

La bacteriemia puede indicar la presencia de un foco de enfermedad como una infección intravascular o extravascular como neumonía, o abscesos hepáticos con una liberación intermitente de bacterias dentro del torrente sanguíneo. La septicemia o sepsis indica una situación en la cual la bacteria o sus productos causan daño al huésped. Los síntomas y signos de una septicemia pueden incluir fiebre o hipotermia, escalofríos, hiperventilación, lesiones en piel, cambio en el estatus mental, y diarrea. Manifestaciones más serias incluyen hipotensión o shock, coagulación intravascular diseminada y falla multiorgánica. El síndrome de shock séptico se caracteriza por fiebre, falla respiratoria aguda, falla renal, coagulación intravascular y destrucción de tejidos, que puede ser iniciado por exotoxinas y/o endotoxinas (*Betty et al, 1998*).

La sepsis neonatal se define como el aislamiento de un organismo de un cultivo de sangre de un neonato con síntomas clínicos de infección. Muchos neonatos con fuertes indicadores de sepsis como apnea severa, letargo, hipotensión y anormalidades de laboratorio como neutropenia, bacteriemia, y elevadas concentraciones de proteína C reactiva (Pcr), tienen un cultivo de sangre negativo. Una clasificación oficial ha sido adoptada para pacientes pediátricos y adultos con cuatro categorías: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis, choque séptico, sepsis severa (*Kaufman et al, 2004*).

Aproximadamente el 20% de los infantes pre término con muy bajo peso al nacer (MBPN) (peso al nacer < de 1,500 g) experimentan serias infecciones sistémicas durante su estadía en el hospital. La sepsis es la causa de aproximadamente la mitad de las muertes en infantes con MBPN. Es bien conocido que la incidencia de sepsis neonatal es inversamente proporcional al peso al nacer y a la edad gestacional. La sepsis en neonatos con MBPN es clasificada como sepsis neonatal de aparición temprana (<72 horas), sepsis neonatal de aparición tardía (> de tres días), sepsis neonatal muy tardía (> de tres meses). Los reportes de la incidencia de la sepsis

neonatal temprana y la tardía en infantes con MBPN oscilan entre el 2 y el 21%, respectivamente. Esta clasificación es muy importante pues nos ayuda a conocer cuáles son los microorganismos aislados con mayor frecuencia en cada condición clínica, ver el **Cuadro VI**. En el caso de las fungemias sólo se ha detectado *C. albicans* en sepsis neonatal de aparición temprana, mientras que en la sepsis neonatal de aparición tardía se ha aislado *C. albicans*, *C. parapsilosis* y otras especies de *Candida* (**Kaufman et al, 2004**).

CUADRO VI: ORGANISMOS Y TASA DE MORTALIDAD ASOCIADA CON INFECCIONES DEL TORRENTE SANGUÍNEO EN NEONATOS CON MBPN (< 1,500 g).

Organismos	Sepsis neonatal de aparición temprana		Sepsis neonatal de aparición tardía	
	No. (%) de Infecciones	% de Mortalidad	No. (%) de Infecciones	% de Mortalidad
Gram positivos	31(36.9)	26	922 (70.2)	11.2
<i>S.agalactiae</i>	9 (10.7)		30 (2.3)	21.9
<i>S. viridans</i>	3 (3.6)			
<i>Streptococcus spp</i>	4 (4.8)			
<i>L.monocytogenes</i>	2 (2.4)			
<i>Staphylococcus spp</i>	9 (10.7)		629 (47.9)	9.1
<i>S.aureus</i>	1 (1.2)		103 (7.8)	17.2
<i>Enterococcus spp</i>			43 (3.3)	
Otros	3 (3.6)		117 (8.9)	
Gram negativos	51 (60.7)	41	231 (17.6)	36.2
<i>E.coli</i>	37 (44.0)		64 (4.9)	34
<i>H.influenzae</i>	7 (8.3)			
<i>Citrobacter spp</i>	2 (2.4)			
<i>Bacteroides spp</i>	2 (2.4)			
<i>Klebsiella spp</i>	1 (1.2)		52 (4.0)	22.6
<i>Ps. Aeruginosa</i>			35 (2.7)	74.4
<i>Enterobacter spp</i>			33 (2.5)	26.8
<i>Serratia spp</i>			29 (2.2)	35.9
Otros	2 (2.4)		18 (1.4)	
Hongos	2 (2.4)		160 (12.2)	31.8
<i>C.albicans</i>	2 (2.4)		76 (5.8)	43.9
<i>C.parapsilosis</i>			54 (4.1)	15.9
<i>Candida spp</i>			30 (2.3)	

Kaufman et al, 2004.

La **Figura 1**, muestra el tiempo de aparición de sepsis bacteriana o fúngica en infantes con MBPN, y el porcentaje indica la cantidad de infantes con septicemia. La sepsis neonatal temprana ocurre por vía ascendente de los organismos desde el canal del parto al líquido amniótico, con o sin ruptura de membranas. La sepsis neonatal de aparición tardía ocurre por dispersión horizontal y vertical de los organismos. La colonización de piel y mucosas con patógenos potenciales puede ser adquirida por las manos de los trabajadores de la salud o miembros de la familia, por el agua

usada en las incubadoras o sistemas de humidificación de ventiladores, por estetoscopios contaminados con fómites, y cualquier otro medio que pueda transportar organismos directamente de un paciente a otro (*Kaufman et al, 2004*).

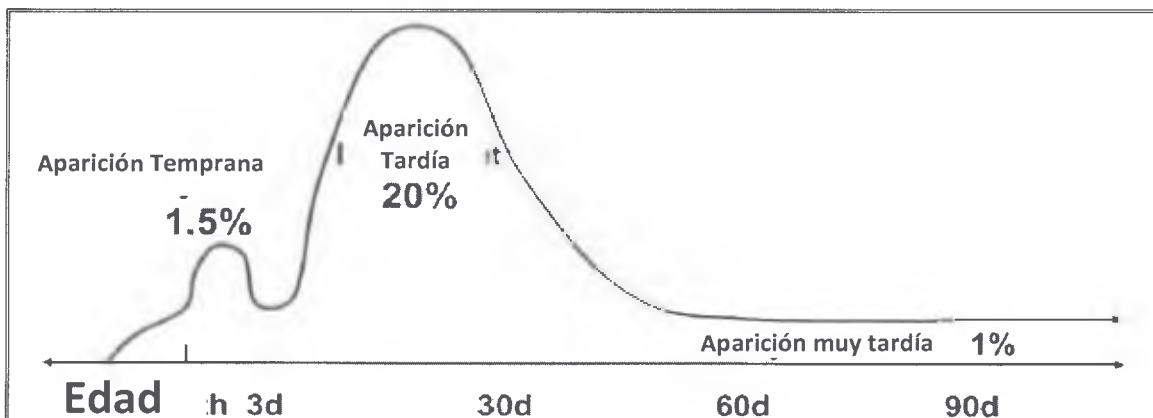


Fig. 1 Tiempo de aparición de sepsis bacteriana y fungemia en infantes con MBPN.

Las infecciones relacionadas a los distintos tipos de accesos vasculares constituyen una de las principales causas de la presencia de microorganismos viables en sangre. Por lo que la epidemiología de las bacteriemias y fungemias en pacientes recibiendo hemodiálisis, es similar a las bacteriemias relacionadas a catéteres en pacientes no expuestos a este procedimiento. Las bacteriemias y fungemias constituyen la segunda causa de muerte en pacientes con hemodiálisis crónica (HDC) y el conocimiento de su epidemiología es útil para establecer terapias empíricas apropiadas. En Argentina pacientes con HDC, el 68% de los aislamientos clínicamente significativos fueron cocos Gram positivos y el 22% bacilos Gram negativos. *Candida spp* ocupa el cuarto lugar de la frecuencia (9%), las especies aisladas fueron *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii* (*Zarate et al, 2005*).

6. Agentes antifúngicos aprobados para uso sistémico y mecanismos de resistencia.

Existe limitada resistencia a los polienos, alilaminas, y equinocandinas, mientras que la resistencia a 5 fluorocitosina, imidazoles y triazoles es más común. La rara ocurrencia de resistencia a los polienos puede ser causada por la reducción en la cantidad de ergosterol en la membrana plasmática. Se ha encontrado resistencia primaria a los polienos en *C.lusitaniae*, *C.lipolytica*, *C.guilliermondii*, *A. terreus*, y *A. flavus*. La mutación del gen *ERG3* en *C.albicans* que codifica para la desaturasa esterol C-5, afecta la biosíntesis de ergosterol y disminuye la concentración de ergosterol en la membrana y causa resistencia a anfotericina B. Este mecanismo también confiere resistencia cruzada con los azoles (**Murray P et al, 2008**). Estudios de vigilancia indican que el 90.2% y 95% de los aislados de *Candida spp* son susceptibles a fluconazol y voriconazol respectivamente. Alrededor del 30% de los aislados resistentes a fluconazol permanecen sensibles a voriconazol. Un incremento de la resistencia a fluconazol en el tiempo se ha encontrado en *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae*, *C.sake* y *C.pelliculosa* (**Pfaller et al, 2010**).

La resistencia a equinocandinas parece ser rara, esto pudiera ser por su limitado uso a la fecha. Los aislados clínicos de *Candida spp* con resistencia a equinocandinas tienen mutaciones puntuales en el gen *Fks1p* que codifica la enzima 1,3-β-Glucano Sintetasa (**García et al, 2008**).

La alta resistencia intrínseca y adquirida en las cepas de *Aspergillus spp* y de *Candida spp* a 5-Fluorocitosina (5-FC) ha limitado su uso. La resistencia de aislados clínicos de *C.albicans* a 5-FC se debe a mutaciones en la enzima uracil fosforibosiltransferasa que previene la conversión de 5-fluorouracilo a monofosfato de 5-fluorouridina. El **Cuadro VII**, describe de forma general los mecanismos de acción y de resistencia de las especies de *Candida* a los distintos anti fúngicos (**Cannon et al, 2009**).

CUADRO VII. DROGAS ANTIFÚNGICAS BLANCOS Y POSIBLES MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Miembro y clase de antifúngico	Blanco Primario (modo de acción)	Mecanismos de resistencia
Análogos de pirimidinas fluorinadas: 5-FC	Síntesis de RNA y DNA (Incorporación errada del 5-fluorouracilo)	Mutación en Fur1p (uracilfosforibosiltransferasa).
Polienos: Nistatina y AFB.	Ergosterol de MC (↑ de la permeabilidad y daño oxidativo)	Inducción de membranas con bajo contenido de ergosterol.
Allylaminas: Terbinafine y naftifine.	Biosíntesis de ergosterol (Inhibición de la escualeno epoxidasa, acumulación de intermediarios de los esteroides tóxicos).	Mutaciones en Erg1p, eflujo vía transportadores ABC, inducción de tolerancia por estrés e inducción por detoxificación.
Imidazoles: Miconazol y ketoconazol	Biosíntesis de ergosterol (Inhibición de Erg11p, conversión de sustrato en esteroides metilados tóxicos)	Mutaciones en Erg11p, induce sobre producción de Erg11p, eflujo vía transportadores ABC y MFS, tolerancia a esteroides metilados por mutación de ERG3, LOH para mutantes ERG11 y TAC1, aneuploida (cromosoma 5, <i>C.albicans</i>), inducción de tolerancia por estrés, importación de colesterol desde huésped (<i>C.glabrata</i>).
Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol.		
Equinocandinas: Caspofungina, micafungina, anidulafungina.	Biosíntesis de pared celular (Inhibición de la 1,3-β-Glucan sintetasa)	Mutación en la 1,3-β-Glucan sintetasa, LOH para 1,3-β-Glucan sintetasa en <i>C.albicans</i> .

Cannon et al, 2009.

a) Polienos.

Este grupo de antifúngico incluye la anfotericina B y la nistatina. La anfotericina B posee una cadena polihidroxil hidrofílica a un lado y una cadena de hidrocarburos polieno lipofílica del otro lado. Este antimicótico destruye las células fúngicas uniéndose primariamente al ergosterol que es el principal esteroide encontrado en la membrana celular de los hongos. Esta unión destruye la integridad osmótica de la membrana, seguido de la pérdida de metabolitos y electrolitos intracelulares (Potasio, magnesio, azúcares) promoviendo la muerte celular. La anfotericina B es activa contra una muy amplia variedad de hongos patogénicos, incluyendo: *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp*, *Mucor spp*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*. La reducida susceptibilidad o

resistencia a los polienos está asociada a cepas de *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae*, *C.krusei*, *Fonsecaea pedrosoi* y *Aspergillus terreus*. La susceptibilidad de *Trichosporon spp*, *Fusarium spp*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii* a anfotericina B varia. La administración de anfotericina B es por vía intravenosa y su penetración en el fluido cerebroespinal es pobre. El principal efecto adverso es la nefrotoxicidad.

Desde 1950 hasta el descubrimiento de los azoles, los polienos como la anfotericina B representaron la terapia estándar para el tratamiento de las micosis sistémicas. La anfotericina B interactúa con los esteroides de la membrana plasmática formando poros acuosos que consisten en anillos de 8 moléculas de anfotericina B unidas hidrofóticamente a los esteroides de membrana. Este fenómeno permite la alteración de la permeabilidad de la membrana con la subsiguiente pérdida de componentes citoplasmáticos vitales y la muerte celular, ver **figura 2 y 3**. La anfotericina B es la droga anti fúngica más efectiva viable, pero su estrecho índice terapéutico limita su uso clínico (**Ghannoum et al, 1999**).

A pesar de más de 30 años de uso clínico de la anfotericina B, la prevalencia de resistencia es rara. Se ha encontrado resistencia a anfotericina B en *C.lusitaniae*, *C.guilliermondii*, *C.glabrata*. La aparición de cepas resistentes se da por la selección natural de cepas con baja afinidad a los polienos, debido a la presencia de esteroides modificados o la disminución del contenido de ergosterol en la membrana. Estas cepas están presentes en pequeñas poblaciones.

b) **Azoles:**

Incluye los agentes anti fúngicos imidazoles y triazoles, los cuales difieren en su estructura química. Los azoles son fungistáticos en general y causan parcial inhibición del crecimiento de las células fúngicas. Todos los azoles inhiben el citocromo P-450 14 α -dimetilasa produciendo la inhibición de la síntesis de ergosterol a partir del lanosterol, lo cual resulta en la terminación de la síntesis de la membrana celular del hongo. Los triazoles tienen tres átomos de nitrógeno en su estructura y su principal representante es el fluconazol, el cual es extensivamente usado en el

tratamiento de candidiasis. El fluconazol es activo contra la mayoría de las especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, excepto *C.krusei* que es intrínsecamente resistente al fluconazol. Algunas cepas de *C.glabrata* tienen susceptibilidad dosis dependiente al fluconazol, y sólo el 15 al 30% de las cepas pueden tener una resistencia verdadera. Las cepas de *C.tropicalis*, *C.norvegensis*, *C.dublinskiensis*, y *C.inconspicua* ocasionalmente generan concentraciones inhibitorias mínimas elevadas a fluconazol. La resistencia adquirida a fluconazol en los aislados de *C.albicans* puede ocurrir seguido de la profilaxis por largo tiempo con fluconazol, particularmente en pacientes con SIDA. El fluconazol tiene limitada actividad contra *B. dermatitidis* y la resistencia puede desarrollarse cuando este es usado para el tratamiento de histoplasmosis, y prácticamente no tiene actividad contra hongos filamentosos. El fluconazol penetra al fluido cerebroespinal con facilidad por su alta solubilidad en agua, y es usado en el tratamiento de candidiasis, cryptococcosis y coccidomycosis. Los efectos adversos y reacciones de toxicidad debido al uso de fluconazol son raros.

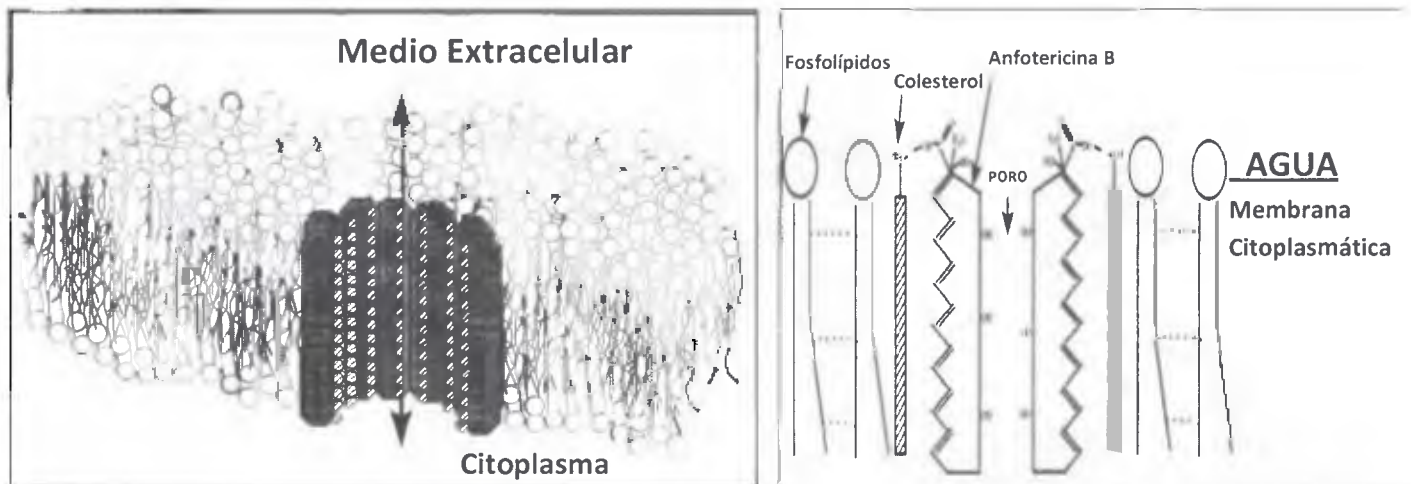


Fig 2. Mecanismos de acción de la anfotericina B (Ghannoum et al, 1999).

El itraconazol es activo contra las especies de *Candida* pero no a todas, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp*, *Dermatofitos*, *Pseudallescheria boydii*, *Paecilomyces spp*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marnefei*. La actividad del itraconazol contra *Aspergillus spp* es la más significativa ventaja sobre el fluconazol.

El voriconazol se utiliza en casos de aspergilosis invasiva y candidemia en pacientes no neutropénicos. El posaconazol ha demostrado efectividad clínica frente a cepas de *Aspergillus spp* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ustus*). *Candida spp* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*), *Fonsecaea pedrosoi* y *Fusarium spp*. También se ha demostrado la actividad *in vitro* del posaconazol frente a *Rhizomucor spp*, *Mucor spp* y *Rhizopus spp*, pero sin confirmación clínica de la misma. Existen múltiples mecanismos que pueden dar elevada resistencia a los azoles y diferentes combinaciones de estos mecanismos operan en diferentes hongos (**Murray et al, 2008**).

Los azoles inhiben la síntesis de ergosterol. El sitio blanco de los azoles es la enzima lanosterol demetilasa (*Erg11p*) codificada por el gen *Erg11*, este gen puede ser sobre expresado o puede desarrollar mutaciones puntuales que reducen la unión del fluconazol a la enzima. La inhibición del crecimiento de *C.albicans* inducida por los azoles es causada por la reducción del contenido de ergosterol en la membrana citoplasmática y también por la acumulación de precursores de esteroides tóxicos en el citoplasma. La resistencia de alto nivel a los azoles se relaciona con la sobre expresión en la membrana plasmática de proteínas que bombean la droga fuera de la célula, reduciendo de esta manera la concentración intracelular de la droga a niveles que *Erg11p* no puede ser inhibida ver **figura 4 (Ghannoum et al, 1999)**. Las cepas resistentes exhiben una modificación en la calidad y cantidad de las enzimas blanco, lo cual reduce el acceso de los azoles, ver **Cuadro VIII**.

La evidencia existente implica una modificación en la cantidad y calidad de la 14 α -Demetilasa como la causa de la expresión de la resistencia de los hongos a los azoles. Los estudios revelan

que las cepas de *C.krusei* acumulan 60% menos cantidad de fluconazol en el citoplasma si se compara con las cepas de *C. albicans*, lo que implica un posible mecanismo de bomba de eflujo.

CUADRO VIII. BASES BIOQUÍMICAS DE LA RESISTENCIA A LOS AZOLES.

Mecanismos	Causado por	Comentarios
Alteración del sitio blanco (14 α desmetilasa).	Mutación que altera la unión a la droga, pero no la unión de los substratos endógenos.	El blanco es activo, pero tiene reducida afinidad a los azoles.
Alteración en la biosíntesis de esteroides.	Lesión en la $\Delta^{5(6)}$ -desaturasa	Resulta en la acumulación de la 14 α -metil fecosterol en vez de ergosterol.
Reducción de la concentración intracelular del blanco enzimático.	Cambio en los lípidos de membrana y esteroides; sobreproducción en las bombas de eflujo a drogas.	Pobre penetración a través de la membrana fúngica, eflujo de drogas activas.
Sobreproducción de los blancos de drogas anti fúngicas.	Incremento del número de copias de la enzima blanco.	Incremento de la síntesis de ergosterol, contribuye a la resistencia cruzada entre FC e ITR.

Ghannoum et al, 1999.

Las concentraciones de fluconazol requeridas para inhibir el 50% de la síntesis de ergosterol en *C.krusei* son 24 a 46 veces más alta que las requeridas para inhibir las cepas de *C.albicans*, sugiriendo que la afinidad del blanco enzimático en ambas especies es diferente. Otros estudios indican que una 14 α -Demetilasa alterada es la causante de la resistencia a los azoles. La sobreproducción de la 14 α -Demetilasa y la enzima microsomal P-450 también han sido implicadas en la resistencia a los azoles (*Ghannoum et al, 1999*).

Considerable evidencia sugiere que las bombas de eflujo activas son un importante mecanismo de resistencia contra los azoles. El principal mecanismo de resistencia de alto nivel a los azoles en aislados clínicos de *Candida spp* es la sobreproducción de bombas de eflujo en la membrana plasmática. Existen dos familias de bombas de eflujo tipo proteicas descritas en levaduras, las bombas de eflujo ligadas al ATP (ABC) y los Transportadores de la Super Familia de Facilitadores (MFS), ver **figura 5** y **6**. Las bombas de eflujo MFS tiene un limitado rango de substratos, mientras que las bombas ABC tienen una amplia especificidad y gran significancia clínica (*Ghannoum et al, 1999*).

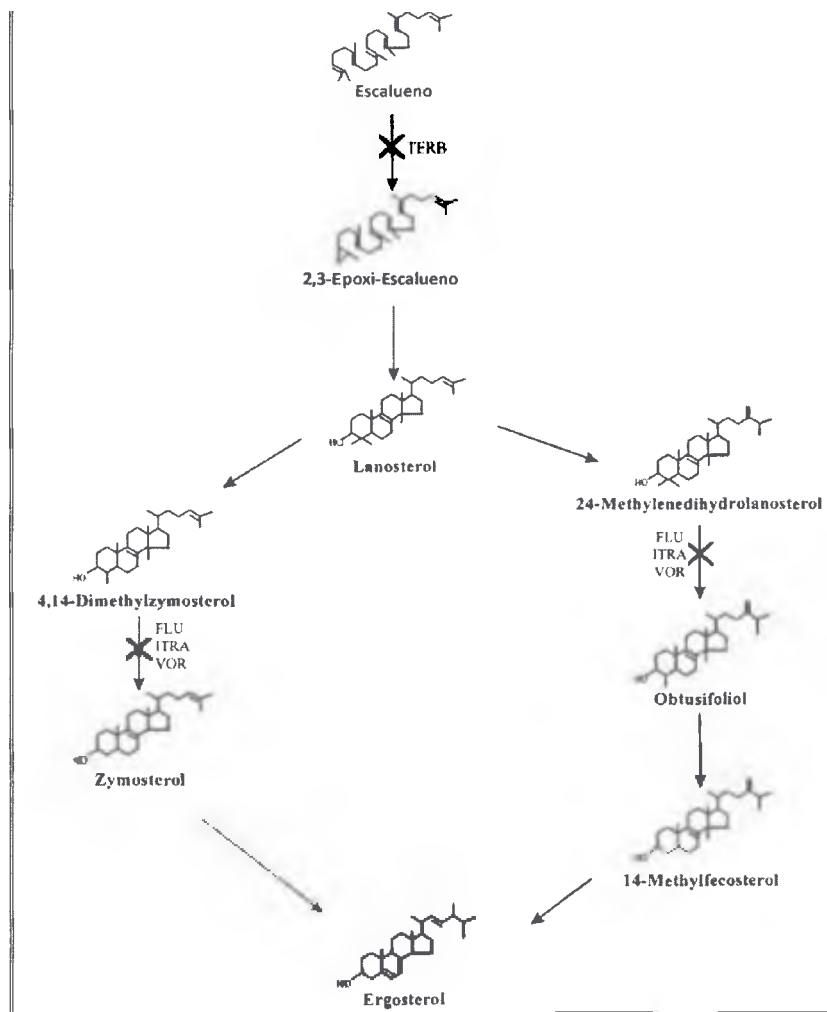


Fig 3. Mecanismo de acción de los azoles inhibiendo la síntesis de ergosterol
(Ghannoum et al, 1999).

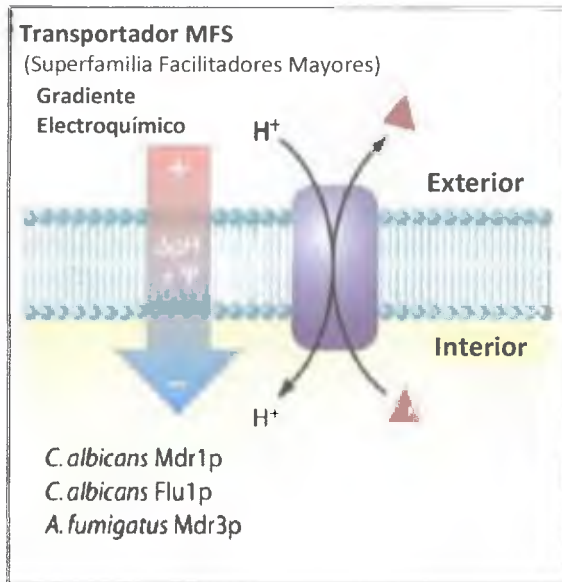


Fig 4. Bomba de eflujo Transportador MFS
(Cannon et al, 2009).

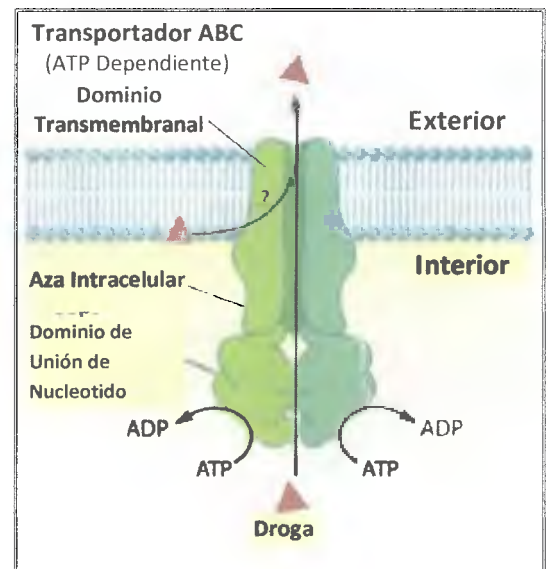


Fig 5. Bomba de eflujo Transportador ABC
(Cannon et al, 2009).

c) Flucitosina.

La flucitosina es una pirimidina fluoronada y solamente es viable como agente antifúngico actuando como antimetabolito bloqueando el metabolismo de la pirimidina, por lo cual se inhibe la síntesis de ADN, ARN, y de proteínas de la célula micótica. La flucitosina tiene un estrecho espectro de actividad, incluyendo *Candida spp*, *C.neoformans*, y los hongos dematiaceos causando cromoblastomicosis. La resistencia primaria o disminución de la susceptibilidad a la flucitosina no es común. La monoterapia con flucitosina debe ser evitada para disminuir el desarrollo de resistencia primaria. Entre los efectos adversos más frecuentes se presenta depresión de la médula ósea, hepatotoxicidad e intolerancia gastrointestinal (Murray et al, 2008).

La 5-FC tiene una alta prevalencia de resistencia primaria en medio de muchas especies de hongos. La 5-FC, es usada en combinación con otros anti fúngicos como la anfotericina B y fluconazol. La 5-FC entra al interior de las células con la ayuda de la enzima permeasa. Una vez dentro de la célula es convertida en 5-FU por la enzima citosina desaminasa. El 5-FU es convertido por la UMP pirofosfórica en ácido 5-fluorouridílico (FUMP), el cual es fosforado e incorporado dentro del ARN, resultando en la interrupción de la síntesis de proteínas. La 5-FC también es convertida a 5-fluorodeoxyuridina monofosfato, que es un potente inhibidor de la timidilato sintetasa, una enzima involucrada en la síntesis de ADN y división nuclear (**Ghannoum et al, 1999**). La resistencia puede ser el resultado de la disminución de la concentración del anti fúngico citoplasmático o pérdida de la actividad enzimática responsable de la conversión a FUMP.

d) **Equinocandinas:**

Las equinocandinas anidulafungina, micafungina y la caspofungina son lipopéptidos con amplio espectro de actividad anti fúngica. Las equinocandinas son en general activas contra varias especies de *Candida* y de *Aspergillus*. Su actividad es más limitada contra cepas de *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, y *Trichosporum spp*. Las equinocandinas tienen muy limitada actividad contra *Cryptococcus neoformans* y *Fusarium spp* (**Murray et al, 2008**).

Las equinocandinas son inhibidores de la síntesis de β -glucanos y actúan como inhibidores específicos no competitivos de la 1,3-glucano sintetasa. El resultado de la inhibición es un cambio citológico y ultraestructural en la pared celular de los hongos, caracterizado por un crecimiento como pseudohifas, una pared celular gruesa y la gemación fallida al separarse de la célula madre. Estas células son osmóticamente sensibles, con la lisis restringida a las células en gemación (**Ghannoum et al, 1999**).

Los mecanismos de resistencia a caspofungina son (i) Las mutaciones específicas en el *gen FSK1*, el cual codifica componentes esenciales del complejo de enzimas que participan en la síntesis de glucanos de la pared celular y (ii) la sobreproducción de la *proteína Golgi Sbe2p*,

envuelta en el transporte de componentes de la pared. Sólo las mutaciones en los genes que codifican la enzima β -glucano sintetasa (*gen FKS1*) confieren alto nivel de resistencia In Vitro a los lipopéptidos, y han sido implicados en la resistencia clínica. Bajo niveles de resistencia se deben a mutaciones en otros genes de la síntesis de pared celular que codifican genes envueltos en la elongación de ácidos grasos (*Ghannoum et al, 1999*).

En un estudio realizado por *Pfaller* y colaboradores, los datos clínicos sólo incluyeron 3 aislados de pacientes tratados con caspofungina con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mayores de 2 $\mu\text{g/ml}$ (2 *C.parapsilosis* con CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$ y una *C.rugosa* con CIM de 8 $\mu\text{g/ml}$). Basados en estos datos, el subcomité de la CLSI decidió recomendar como punto de corte para cepas susceptibles un CIM de < 2 $\mu\text{g/ml}$, debido a la insuficiencia de resistencia a equinocandinas en las poblaciones de *Candida spp* aisladas. Para las cepas de *Candida spp* con resistencia a caspofungina (CIM > de 2 $\mu\text{g/ml}$), los resultados de la identificación y las pruebas de susceptibilidad deben ser confirmados (*Pfaller et al. 2008*). *Garcia-Effron* y colaboradores, demostrarán que los aislados de *C.albicans* y *C. glabrata* con el fenotipo de reducida susceptibilidad a caspofungina contenían sustituciones en el aminoácido prolina distal conservado en la proteína *Fsk1p hot spot 1*. A pesar de esto, los ensayos clínicos y de laboratorio demuestran la potente y amplia actividad anti fungicida de caspofungina contra *Candida spp*, lo que ha permitido el uso extenso de la caspofungina para el tratamiento de todas las formas de infecciones de candidiasis serías.

La resistencia cruzada entre caspofunginas y otras equinocandinas con el fluconazol no existe. La caspofungina y las otras equinocandinas son substratos pobres para la mayoría de los transportadores de eflujo multidrogas. Los resultados de cepas de *C.albicans* con resistencia de alto nivel a fluconazol mediada por bombas de eflujo han demostrado susceptibilidad completa a caspofungina. Se ha encontrado que el 100 % de las especies de *Candida* con resistencia a fluconazol son susceptibles a caspofungina con un CIM \leq de 2 $\mu\text{g/ml}$ (CIM₉₀, 0.25 $\mu\text{g/ml}$). La concordancia entre los CIM (+/- 2 diluciones) de caspofungina versus micafungina y caspofungina

versus anidulafungina fue de 93% y 97% respectivamente. Las especies de *Candida* con mutaciones del *gen FKS1* que expresan resistencia a caspofungina, también son resistentes a micafungina y anidulafungina (**Pfaller et al. 2008**). Sin embargo, recientes datos de vigilancia antimicrobiana documenta la emergencia de coresistencia en el tiempo de los azoles y las equinocandinas en aislados clínicos de *C.glabrata* (**Pfaller et al, 2012**). Los actuales puntos de corte de la CLSI para las equinocandinas pueden clasificar los aislados clínicos con mutaciones que confieren resistencia adquirida como susceptibles. Es probable que estos puntos de corte sean poco sensitivos para detectar cepas emergentes con resistencia a caspofungina (**Pfaller et al, 2010**).

Las infecciones de *Candida* estan entre los problemas más importantes en las Unidades de Terapia Intensiva (UTI), especialmente en infantes con muy bajo peso al nacer (< 1,500 g). El desarrollo de sepsis de aparición repentina tardía ocurre en aproximadamente el 20% de los neonatos críticamente enfermos e infantes con bajo peso al nacer. Las especies de *Candida* son responsables del 10% de estas infecciones. Muchos reportes sugieren que Caspofungina es un tratamiento útil para la Candidiasis en neonatos. Un ensayo clínico para evaluar las concentraciones plasmáticas, seguridad, y tolerabilidad de simple y múltiples dosis de Caspofungina, fue realizado en el Hospital de Niño en Neonatos/infantes (< de 3 meses de edad) con resultados satisfactorios (**Sáez-Llorens et al, 2009**).

7. Prueba molecular: PCR Fingerprinter.

Es un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en donde no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como las zonas hipervariables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento (o fragmentos) que se esperan. Éste método se utiliza para determinar el polimorfismo genómico, los más comunes son los *fingerprint*. Este método es sencillo para obtener datos (un gel de agarosa después de la PCR es suficiente), se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para el análisis de la genética de poblaciones. En general este tipo de PCR utiliza un solo oligonucleótido con 2 características importantes: que sea de pequeño a mediano tamaño (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia esté presente muchas veces en el ADN del organismo que estudiamos. Existen zonas repetidas hipervariables del ADN que pueden amplificarse de esta manera, por ejemplo los sitios que sirven para iniciar la síntesis de ADN en los cromosomas, conocidas como microsatélites. En el primer ciclo de reacción lo que sucederá es que el oligonucleótido utilizado hibridará en distintas zonas del ADN, y primero comenzarán a sintetizarse fragmentos de tamaños variables e indefinidos (hasta donde la polimerasa logre copiarlos). En el segundo ciclo las cadenas sintetizadas a partir de las primeras copias formadas serán del tamaño que existe entre dos oligonucleótidos que no estén muy alejados entre sí. Estos fragmentos se copiarán una y otra vez, y de esta manera al final obtendremos muchos fragmentos de tamaños diferentes. En la **figura 7**, se explica con más detalle un PCR de este tipo.

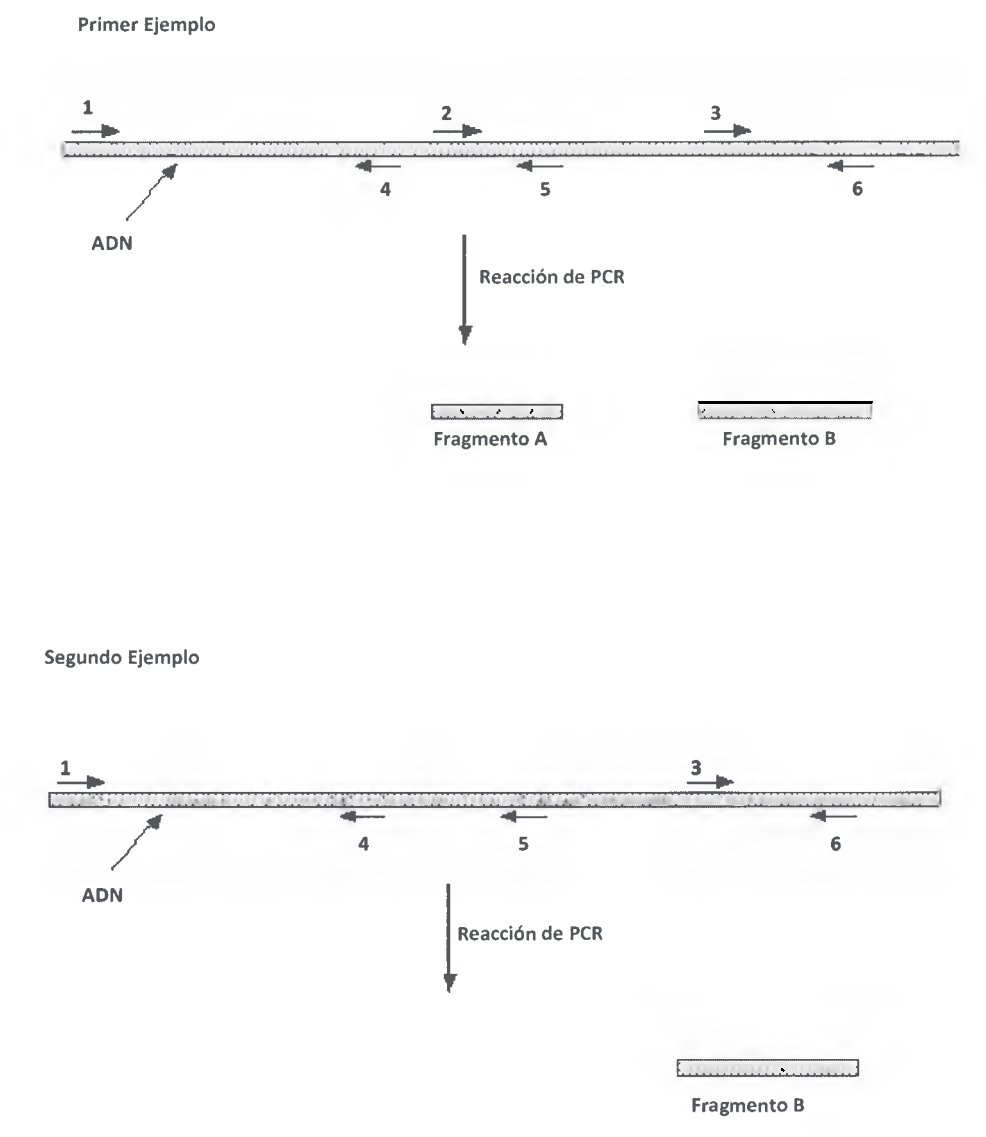
Supongamos que hacemos una reacción de PCR con un individuo hipotético utilizando un oligo para microsatélites. En este primer ejemplo el oligo ha hibridado en el ADN en 6 sitios diferentes, y al amplificar se generan 2 fragmentos:

- a) Fragmento A es sintetizado a partir de la secuencia de ADN que se encuentra entre los oligos que se han unido en las posiciones 2 y 5.
- b) El fragmento B es sintetizado a partir de los oligos unidos en las posiciones 3 y 6.

c) No hay productos de PCR entre las posiciones 1 y 4 ya que están muy lejos entre sí como para permitir que ocurra la reacción de PCR. Los oligos unidos a las posiciones 4 y 2 o 5 y 3 tampoco amplifican ya que no está orientado uno hacia el otro.

En el segundo ejemplo hay que suponer que es un individuo que tiene un cambio en el segundo sitio, y el oligo no se ha unido en la segunda posición, por lo tanto sólo se genera el fragmento B.

Fig 6. Modelo esquemático de la PCR Fingerprinter (Harlocker et al, 2003).



METODOLOGÍA.

METODOLOGÍA.

1. **Objetivo General:** Caracterizar fenotípica y genotípicamente las especies de levaduras aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño en el período 2009-10.

a) **Objetivos específicos:**

- Realizar y evaluar la identificación fenotípica de los aislados de *Candida spp* usando el sistema Vitek 2.
- Hacer una caracterización genotípica de todas las especies de levaduras aisladas usando el método de PCR random fingerprinter.
- Comparar los patrones electroforético generados de los aislados clínicos con las cepas de referencia ATCC.
- Conocer los perfiles de susceptibilidad anti fúngica a fluconazol, anfotericina B, itraconazol, voriconazol, posaconazol y caspofungina en los aislados de *Candida spp*.
- Analizar los resultados para determinar la relación existente entre los patrones electroforético de cada cepa y sus respectivos perfiles de susceptibilidad a los anti fúngicos.
- Comparar los resultados de la tipificación molecular versus la tipificación fenotípica.
- Determinar si las cepas aisladas en las distintas salas del hospital presentan patrones electroforéticos similares.
- Evaluar la utilidad del PCR random fingerprinter como una herramienta de investigación epidemiológica de IAAS.
- Conocer la frecuencia de aislamiento de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos en el Hospital del Niño.

2. Tipo de estudio.

Se realizó un estudio descriptivo usando técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de las especies de levaduras.

3. Universo y tamaño de la muestra.

Se recolectaron 55 cepas de *Candida spp* y levaduras relacionadas, aisladas en muestras de hemocultivos de pacientes hospitalizados en las salas de Hematooncología, Neonatología, Quemados, Medicina 6 y la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital del Niño. El periodo de recolección se inició en enero de 2009 a mayo de 2010.

4. Criterios de Inclusión.

Sólo se incluirán pacientes con hemocultivos positivos y cuyo agente etiológico sea levaduras.

5. Lista de equipos.

- **Balanza.**
- **pH metro.**
- **Micro pipetas de 0.5-10 µl, 10-50 µl y de 100-1000 µl.**

- **Termociclador.**
- **Baño maria.**
- **Dispensador de discos.**
- **Vortex.**
- **Cabinas de bioseguridad nivel II.**
- **Microcentrifuga.**
- **Equipo Vitek 2.**
- **Incubador bacteriológico.**
- **Camara de electroforesis.**
- **Fuente de poder.**
- **Densitometro.**

6. Lista de reactivos y materiales.

- **Tubos de tapa rosca estéril.**
- **Agar sabouraud.**
- **Agar Muller Hinton.**
- **Caldo YPD.**
- **Agua destilada.**

- Dextrosa.
- Tabletas Neosensitabs.
- Platos Petri.
- Tarjetas YST para Vitek 2.
- Buffer TE.
- Etanol al 70 %.
- Etanol absoluto.
- Isopropanol.
- Cloruro de magnesio.
- Dinucleotidos (DNTP's).
- Oligonucleótido T3B.
- ADN polimerasa.
- Gel de agarosa.
- Buffer de carga.
- Bromuro de ethidium.
- Agua grado molecular.
- Cepas ATCC de *Candida spp*, ver anexo 6.
- Tubos de eppendorf de 2.0 ml.
- Tubos de PCR de 0.5 ml.

- Puntas con filtro de 10 µl, 100 µl, 1000 µl.
- Kit de extracción de ADN, MasterPure Yeast DNA Purification Kit.

7. Métodos.

a) Aislamiento de las cepas:

Las cepas de *Candida spp* aisladas de las botellas de hemocultivo Bact/Alert fueron cultivadas en agar sabouraud e incubadas a 37° C durante 24 horas.

b) Procedimiento para la identificación de levaduras usando las tarjetas Vitek YST de Biomeriux, Francia:

- Se preparó una suspensión de levaduras con salina a una concentración de 2 Mac Farland usando un densitómetro.
- Se rotuló las tarjetas YST con el correspondiente número de muestra.
- Se colocó las tarjetas en la cámara de vacío.
- Se verificó que cada pocillo estuviera lleno y sin burbujas.
- Las tarjetas fueron selladas y cargadas en el sistema Vitek2 para su incubación a 37° C hasta el reporte final automático.

c) **Procedimiento para la prueba de susceptibilidad en agar Muller Hinton usando tabletas Neosensitabs. Se le adiciona 5 µg de azul de metileno y 2% de dextrosa:**

- Se preparó una suspensión de levaduras en salina fisiológica a una concentración de 0.5 Macfarland.
- Se introdujo un palillo con algodón estéril en la suspensión.
- Se inoculó de forma completa la superficie de un plato de agar Muller Hinton suplementado con 5 µg de azul de metileno y dextrosa al 2%.
- Se colocó las tabletas de anfotericina B, fluconazol, itraconazol, posaconazol, caspofungina en la superficie del agar.
- Se incubó los platos por 24 horas a 37° C.
- Se realizó la lectura de los diámetros de los halos de inhibición para anti fúngico.
- Se Interpretó los resultados usando los criterios de la CLSI descritos en el documento M44, ver el **Anexo 1**.

d) **Procedimiento para realizar la prueba de Agar Harina de Maíz con Tween 80, para identificar especies de *Candida*, ver Anexo 5 (Método de Dalmau).**

Este medio es utilizado para distinguir los diferentes géneros de levaduras y diferenciar varias especies de *Candida*. Puede ser también útil en cultivo en placa para estimular la esporulación de muchos hongos. Para el estudio de la morfología de levaduras, el método de Dalmau es el recomendado. Este se ejecutó usando una cuarta o una tercera parte del agar para cada microorganismo.

- Se realizó un estriado vertical de una colonia fresca de levadura haciendo una raya vertical sin cortar el agar; se hizo luego tres estriados horizontales a través del primer estriado para diluir el inóculo.

- Se colocó un cubre objeto de 22x22 mm sobre el estriado.
- Se incubó a temperatura ambiente, en la oscuridad, por tres días.
- Se examinó al microscopio usando objetivo de 10x y 40x.
- Y se observó las morfologías características encontradas cerca del margen del cubre objeto.
- La estructura morfológica de los aislados clínicos se compararon con las estructuras morfológicas de las cepas de referencia.

e) Procedimiento para la extracción de ADN usando MasterPure Yeast DNA Purification Kit.

- Se inoculó cada cepa de levadura en 5 ml de caldo YPD (ver preparación en Anexo 3) y luego se incubó por 24 horas a 37 ° C.
- Se tomó 1.5 ml del caldo YPD saturado de células de levadura y se transfirió a un tubo cónico con tapa de 1.5 ml estéril.
- Se obtuvo un precipitado de levaduras centrifugando el tubo cónico a más de 10,000 rpm por 5 minutos.
- Se removió el sobrenadante con mucho cuidado.
- Se agregó 300 µl de solución de lisis de levaduras y 1 µl de RNasa de 5 µg/L a cada tubo, se re suspendió las células usando un agitador.
- Se incubó la suspensión de células por 15 minutos a 65 grados Celsius.

- Se Colocó las muestras en hielo por 5 minutos.
- Se Agregó 150 μ l de solución de precipitación de proteínas MPC y se mezcló con un agitador por 10 segundos.
- Se eliminó los artefactos celulares por centrifugación por 10 minutos a más de 10,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
- Se agregó 500 μ l de isopropanol y luego se mezcló por inversión suavemente.
- Se centrifugó por 10 minutos a más de 10.000 rpm para obtención de un precipitado de ADN.
- Se removió el sobrenadante con una pipeta y se descartó.
- Se lavó el precipitado de ADN con 500 μ l de etanol al 70 % y se centrifugo a más de 10,000 rpm brevemente para compactar el precipitado.
- El etanol fue removido y descartado.
- Se resuspendió el ADN en 35 μ l de tampón TBE y se almacenó a 4° C.
- El promedio de ADN obtenido de 1.5 ml de cultivo es de 3-4 μ g para *Saccharomyces spp* y de 6-8 μ g para *Candida spp*.

METODOLOGÍA.

g) Procedimientos para realizar la detección de productos de PCR:

- Se preparó un gel de agarosa al 1.2 % pesando 1.2 gramos de agarosa en 100 ml de agua de buffer TBE 10 X.
- Se calentó por 3 minutos en el microondas hasta que toda la agarosa se disolviera y la solución fuera totalmente transparente.
- Se agregaron 2 μ l de bromuro de ethidium a la solución de gel de agarosa y se mezcló suavemente.
- La agarosa se vertió en la rejilla para geles (5mm X 25 cm X 20 cm) y se colocó un peine para hacer los orificios para cargar las muestras, se dejó secar a temperatura ambiente.
- Una vez solidificada la agarosa se colocó la rejilla en la cámara de electroforesis y se agregó buffer TAES 0.5X hasta cubrir el gel completamente y luego se retiró el peine cuidadosamente.
- Se mezclaron 10 μ l de productos de PCR de cada tubo con 2 μ l de buffer de carga.
- Se colocó en el primer pocillo un marcador de peso molecular de 100 a 1400 pares de base.
- Se colocó en los siguientes pocillos los productos de PCR de los aislados clínicos y las cepas de referencia.
- Se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder programada por 1 hora a 100 voltios.
- Terminada la corrida se observaron los geles en el transluminador en un cuarto oscuro.
- Se fotografió el gel para examinar los patrones de bandas y se comparó los aislados clínicos con las cepas de referencia.

RESULTADOS.

RESULTADOS.

Se procesaron 55 cepas de *Candida spp* aisladas de los hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, distribuidas en las siguientes salas: 22 cepas (40%) de la sala de Neonatología (RN2), 22 cepas (40%) de la sala Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y 11 cepas de otras salas (20%), incluyendo Hematooncología (HO), Medicina 2 (M2), Quemados (Que), Medicina 6 (M6), Corta estancia Respiratoria (CER).

De las 55 cepas analizadas en el **sistema Vitek 2**, 9/55 (16.4%) fueron identificadas de forma definitiva como *C.famata*, 7/55 (12.8%) como *C.parapsilosis*, 7/55 (12.8%) como *C.tropicalis*, 3/55 (5.5%) como *C.guilliermondii*, 3/55 (5.5%) como *C.haemulonii* y 2/55 (3.6%) como *C.albicans*. El resto, 40% (22/55) de las cepas presentaron un bajo poder de discriminación entre dos o más especies de *Candida*, razón por la cual no fueron identificadas de forma definitiva y se reportaron como *Candida spp*. Ver **Tabla 1**.

En la **Tabla 2**, se comparan los resultados fenotípicos obtenidos en el sistema Vitek 2 y los resultados moleculares por el método de PCR fingerprinter. En algunos casos los resultados de ambas pruebas no fueron concluyentes y fue necesario complementarlos con la prueba de agar Harina de Maíz. Se encontró que de las 7 cepas identificadas inicialmente como *C.parapsilosis*, 6 fueron confirmadas molecularmente como la misma especie, y una cepa cuyo patrón de bandas fue diferente a la cepa de referencia de *C.parapsilosis sensu stricto* fue confirmada fenotípicamente como *C.parapsilosis* usando la prueba de agar Harina de Maíz. De las 9 cepas previamente identificadas por el Vitek 2 como *C.famata*, una fue identificada como *C.parapsilosis* (compatible con la cepa de referencia de *C.parapsilosis sensu stricto*), 3 fueron confirmadas como *C.albicans* (compatible con la cepa de referencia de *C.albicans*), 3 fueron confirmadas como *C.tropicalis* (compatible con la cepa de referencia de *C.tropicalis*) y 2 cepas fueron confirmadas como *C.guilliermondii* (compatible con la cepa de referencia de *C.guilliermondii*). En otro contexto,

de las 3 cepas identificadas como *C.haemulonii*: una cepa fue identificada por métodos moleculares como *C.albicans*, y las 2 restantes tenían un patrón de bandas idéntico entre ellas, pero diferente a todas las cepas de referencia usadas, no pudieron ser identificadas usando el método de agar Harina de Maíz. De las 2 cepas identificadas fenotípicamente como *C.albicans*, una cepa fue confirmada molecularmente mientras que la otra fue identificada como *C.tropicalis*. Por otro lado, de las 7 cepas identificadas fenotípicamente como *C.tropicalis*, 3 fueron confirmadas molecularmente y una fue identificada como *C.albicans*. Las otras 3 cepas identificadas como *C.tropicalis* el patrón de bandas no resultó compatible con la cepa de referencia, pero con la prueba de agar harina de maíz se clasificó como *C.tropicalis*. Finalmente, de las 23 cepas que no fueron identificadas de forma definitiva por su bajo poder de discriminación entre dos o más especies de *Candida*, 3 fueron confirmadas molecularmente como *C.parapsilosis* y 5 usando la prueba de agar harina de maíz como la misma especie (los patrones de bandas de estas cepas no coincidieron con la cepa de referencia *C.parapsilosis sensu stricto*). Así mismo se confirmaron molecularmente tres cepas como *C.albicans*, 4 como *C.tropicalis* y una como *S.cerevisiae*. La cepa de *S.salmonicolor* a pesar de que no generó patrones de bandas, sus colonias presentaron un color salmón en agar Sabouraud el cual es característico de esta levadura.

La distribución final de las especies de *Candida* aisladas de especímenes de hemocultivos después de la validación fenotípica y molecular se presenta en el **Gráfico 1**. Un total de 22/55 (40%) de las cepas fueron designadas como parte del complejo *C.parapsilosis*, de las cuales sólo 15/22 (68%) resultaron compatibles con el patrón de bandas de la cepa de referencia *C.parapsilosis sensu stricto*. El resto, 7/22 (32%) presentaron dos patrones electroforéticos distintos (el patrón 1 con una banda de 110 pares de bases (pb) y el patrón 2 con una banda en 110 pb y 3 bandas adicionales entre 1,100, 1,300 y 1,400 pb). Adicionalmente, 16/55 (29.1%) de las cepas fueron designadas como *C.tropicalis*, 11/55 (20%) como *C.albicans*, 2/55 (3.64%) como *C.guilliermondii*, 2/55 (3.64%) como *Candida spp* (fenotípicamente identificadas como *C.haemulonii*), 1/55 (1.81%) como *S.cerevisiae* y 1/55 (1.81%) como *S.salmonicolor*.

El método de PCR al azar fue discriminatorio entre las cepas de referencia y la mayoría de los aislados clínicos. En la **Imagen 1**, tenemos de izquierda a derecha en la posición 4 la cepa de referencia de *S.cerevisiae* ATCC 4550 (con una banda de 210 pb), posición 5 *C.lusitaniae* ATCC 34449 (con bandas de 900 y 1,090 pb), posición 6 *C.kefyr* ATCC 66028 (con bandas de 300 y 1,010 pb), posición 7 *C.krusei* (con bandas de 300 y 400 pb), posición 8 *C.glabrata* (una banda de 390 pb), posición 9 *C.guilliermondii* ATCC 6260 (con bandas de 800 y 1,000 pb), posición 15 *C.tropicalis* ATCC 750 (con bandas de 500, 550, 600, 650 y 800 pb) , posición 16 *C.albicans* ATCC 90028 (con bandas en 800 y 1,050 pb), posición 17 *C.parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019 (con bandas en 300 y 1,000 pb) y *S.salmonicolor* ATCC 2601 en la posición 3 que no amplificó. En la posición 10 tenemos una cepa cuyo perfil genómico (210 y 400 pb) no corresponde a ninguna de las cepas de referencia, pero fue identificada como *C.tropicalis* usando la prueba de agar Harina de maíz. En las posiciones 11, 12, 13 y 18 se observan 4 aislados clínicos cuyo perfil genómico corresponde a la cepa de referencia de *C.parapsilosis sensu stricto*. En la posición 14 tenemos un aislado clínico que corresponde a la cepa de referencia de *C.tropicalis*.

En la **Imagen 2**, podemos observar en posición 17 la cepa de referencia ATCC 221019 de *C.parapsilosis sensu stricto* (con bandas de 300 y 1,000 pb), en las posiciones 3, 5, 7, 10, 11, 14, 15 y 16 se observan aislados clínicos con patrones de bandas que corresponden al patrón de bandas de la cepa de referencia. En la posición 9 y 12 se observaron aislados clínicos con un patrón de bandas de aproximadamente (110, 1,100, 1,200 y 1,300 pb) el cual no corresponde a ninguna de las cepas de referencia, pero fueron identificadas con la prueba de agar Harina de Maíz como *C. parapsilosis*. En la posición 2 tenemos un aislado clínico que fue identificado por el sistema Vitek 2 como *C.famata/C.parapsilosis*, pero su patrón de banda (210 pb) corresponde al patrón de bandas de *S.cerevisiae*.

En la **Imagen 3** en la posición 1 y 2 se observan dos aislados clínicos cuyos patrones de bandas (190, 300, 500, 700, 900, 1,000 y 1,020 pb) son idénticos, pero no corresponde a ninguna de las cepas de referencia. Ambas cepas fueron identificadas por el sistema Vitek 2 como

C. haemulonii. En la posición 19 tenemos la cepa ATCC 90028 de *Candida albicans* (con bandas de 800 y 1,090 pb), en la posición 18 tenemos una cepa de *C. parapsilosis* (previamente identificada como *C. albicans*), en las posiciones 10, 11, 13, 14, 15, 16 y 17 tenemos 7 aislados clínicos con patrones de bandas compatibles con el patrón de bandas de la cepa de referencia de *C. albicans*. Algunas de estos aislados clínicos presentaron bandas adicionales a las que aparecen en la cepa de referencia indicando variación intraespecie o la existencia de cepas de *C. albicans* distintas. En la posición 9 se observa el patrón de bandas de la cepa de referencia de *C. guilliermondii* ATCC 6260 (800 y 1,000 pb), en la posición 6 y 8 se observan dos aislados clínicos con patrones de bandas compatibles a la cepa de referencia de *C. guilliermondii*. En la posición 5 tenemos un aislado de *C. parapsilosis*.

En la **Imagen 4**, en la posición 18 se observa la cepa de referencia de *C. tropicalis* ATCC 750 (con bandas de 500, 550, 600, 650 y 800). En la posición 1, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 19 se observan 10 aislados clínicos con un patrón de bandas comparable con el de la cepa de referencia. En la posición 5 tenemos una cepa de *C. albicans*, previamente identificada como *C. tropicalis*.

Las pruebas de susceptibilidad fueron aplicadas a todos los aislados clínicos y se encontraron cepas de *Candida* resistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol y caspofungina. No se encontró ninguna cepa con resistencia a posaconazol. En general se encontró una resistencia global de 9.3% a anfotericina B, 5.6% a fluconazol, 3.7% a itraconazol, 3.7% a voriconazol y 38.9% a caspofungina, ver **Gráfico 2**. A nivel de especie, los aislados del Complejo *C. parapsilosis* presentaron un alto porcentaje de resistencia a caspofungina (77.3%), ver **Gráfico 3** y *C. albicans* presentó resistencia a diferentes anti fúngicos incluyendo caspofungina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol y voriconazol, ver **Gráfico 4**. Solo una cepa de *C. albicans* presentó resistencia a anfotericina B, fluconazol, voriconazol, y susceptibilidad intermedia a itraconazol. Una cepa de *C. haemulonii*, presentó resistencia a anfotericina B, fluconazol y voriconazol. Las cepas de *C. tropicalis* solo presentaron resistencia a caspofungina y a anfotericina B, ver **Gráfico 5**.

TABLA 1. FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *Candida spp* Y OTRAS LEVADURAS AISLADAS EN HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010 (n=55).

Organismo	Frecuencia de Aislamiento % (n)
<i>Candida famata</i>	16.4 % (9)
<i>Candida parapsilosis</i>	12.8 % (7)
<i>Candida tropicalis</i>	12.8 % (7)
<i>Candida guilliermondii</i>	5.5 % (3)
<i>Candida haemulonii</i>	5.5 % (3)
<i>Candida albicans</i>	3.6 % (2)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.7 % (1)
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	1.7 % (1)
<i>Candida spp</i>	40.0 % (22)

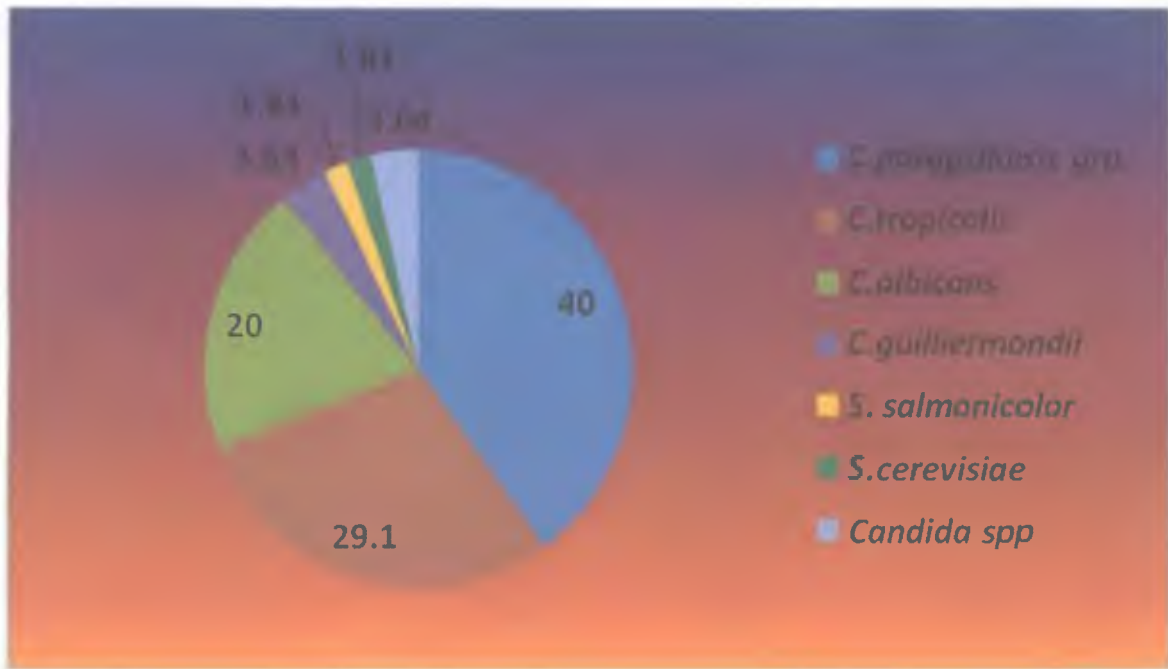
Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivo de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10.

TABLA 2. COMPARACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL VITEK 2, PCR FINGERPRINTER Y LA PRUEBA DE AGAR HARINA DE MAÍZ (n=55).

No. Cepas	Identificación por Vitek 2 (% de identidad)	PCR-Fingerprinter	Agar Harina de Maíz
6	<i>C.parapsilosis</i> (96-99%)	<i>C.parapsilosis</i>	
1	<i>C.parapsilosis</i> (96%)	<i>Candida spp</i>	<i>C. parapsilosis</i>
1	<i>C.famata</i> (99%)	<i>C.parapsilosis</i>	
3	<i>C.famata</i> (99%)	<i>C.albicans</i>	
3	<i>C.famata</i> (99%)	<i>C.tropicalis</i>	
2	<i>C.famata</i> (99%)	<i>C.guilliermondii</i>	
1	<i>C.haemulonii</i> (98%)	<i>C.albicans</i>	
2	<i>C.haemulonii</i> (95-99%)	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp.</i>
1	<i>C.albicans</i> (99%)	<i>C.albicans</i>	
1	<i>C.albicans</i> (99%)	<i>C.tropicalis</i>	
3	<i>C.tropicalis</i> (99%)	<i>C.tropicalis</i>	
3	<i>C.tropicalis</i> (96-99%)	<i>Candida spp</i>	<i>C.tropicalis</i>
1	<i>C.tropicalis</i> (99%)	<i>C.albicans</i>	
6	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.parapsilosis</i> (50%)	<i>C.parapsilosis</i>	
2	<i>C.famata</i> (49%) y <i>C.parapsilosis</i> (51%)	<i>C.parapsilosis</i>	
1	<i>C.tropicalis</i> (49%) y <i>C.parapsilosis</i> (51%)	<i>Candida spp</i>	<i>C.parapsilosis</i>
1	<i>C.famata</i> (51%) y <i>C.parapsilosis</i> (49%)	<i>Candida spp</i>	<i>C.parapsilosis</i>
1	<i>C.famata</i> (33%), <i>C.tropicalis</i> (33%) y <i>C.parapsilosis</i> (34%)	<i>Candida spp</i>	<i>C.parapsilosis</i>
1	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.guilliermondii</i> (50%)	<i>C.parapsilosis</i>	
2	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.guilliermondii</i> (50%)	<i>C.albicans</i>	
1	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.parapsilosis</i> (50%)	<i>Candida spp</i>	<i>C.parapsilosis*</i>
2	<i>C.famata</i> (49%) y <i>C.parapsilosis</i> (51%)	<i>Candida spp</i>	<i>C.parapsilosis*</i>
1	<i>C.albicans</i> (50%) y <i>C.tropicalis</i> (50%)	<i>C.tropicalis</i>	
1	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.tropicalis</i> (50%)	<i>C.tropicalis</i>	
2	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.guilliermondii</i> (50%)	<i>C.tropicalis</i>	
1	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.parapsilosis</i> (50%)	<i>C.albicans</i>	
2	<i>C.famata</i> (49%) y <i>C.guilliermondii</i> (51%)	<i>C.albicans</i>	
1	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.parapsilosis</i> (50%)	<i>S.cerevisiae</i>	
1	<i>C.famata</i> (50%) y <i>C.guilliermondii</i> (50%)	<i>C.tropicalis</i>	
1	<i>S.salmonicolor</i> (97%)	<i>No amplifico</i>	<i>S.salmonicolor*</i>

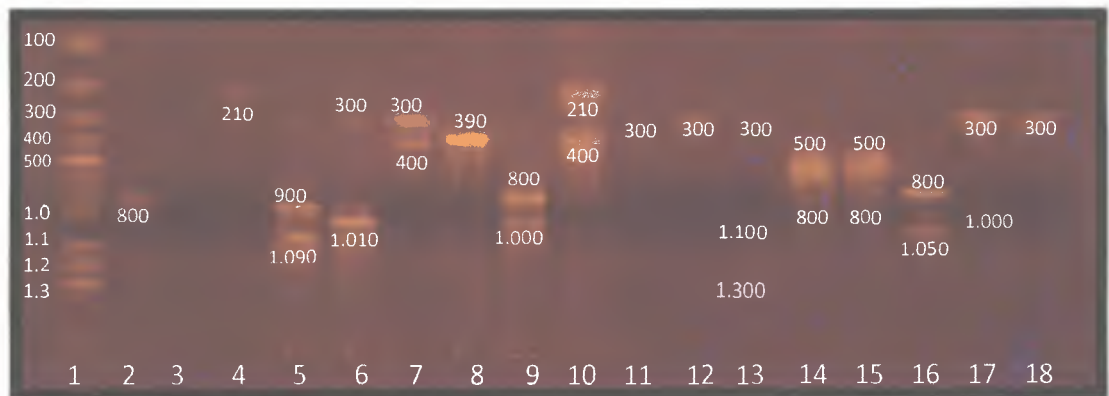
Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivo de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10

GRÁFICO 1: DISTRIBUCIÓN DEFINITIVA DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010.



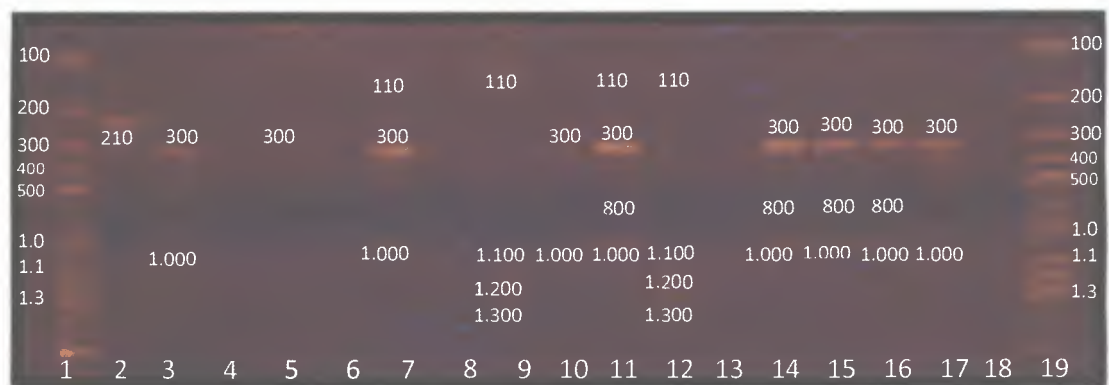
Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10

IMAGEN 1. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE REFERENCIA Y DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida spp.*



Posición	Organismo	Posición	Organismo
1	Marcador molecular 100 a 1300 pb	11	<i>C.parapsilosis</i>
2	<i>Candida spp</i>	12	<i>C.parapsilosis</i>
3	<i>S.salmonicolor</i> ATCC: 2601	13	<i>C.parapsilosis</i>
4	<i>S.cerevisiae</i> ATCC: 4550	14	<i>C.tropicalis</i>
5	<i>C.lusitaniae</i> ATCC: 34449	15	<i>C.tropicalis</i> ATCC: 750
6	<i>C.kyfer</i> ATCC: 66028	16	<i>C.albicans</i> ATCC: 90028
7	<i>C.krusei</i> ATCC: 34135	17	<i>C.parapsilosis</i> ATCC: 221019
8	<i>C.glabrata</i> ATCC: 2001	18	<i>C.parapsilosis</i>
9	<i>C.guilliermondii</i> ATCC: 620		
10	<i>Candida tropicalis.</i>		

IMAGEN 2. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE *Candida spp* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO *C.parapsilosis* y *C.famata*.



Posición	Organismo	Posición	Organismo
1	Marcador	11	<i>C.parapsilosis</i>
2	<i>S.cerevisiae</i>	12	<i>C.parapsilosis</i>
3	<i>C. parapsilosis</i>	13	No amplifico
4	No amplifico	14	<i>C.parapsilosis</i>
5	No amplifico	15	<i>C.parapsilosis</i>
6	No amplifico	16	<i>C.parapsilosis</i>
7	<i>C.parapsilosis</i>	17	<i>C.parapsilosis</i> ATCC: 221019
8	No amplifico	18	Control negativo
9	<i>C.parapsilosis</i>	19	Marcador.
10	<i>C.parapsilosis</i>		

IMAGEN 3. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE *Candida spp* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO *C.albicans*, *C.gulliermondii* y *C.haemulonii*.

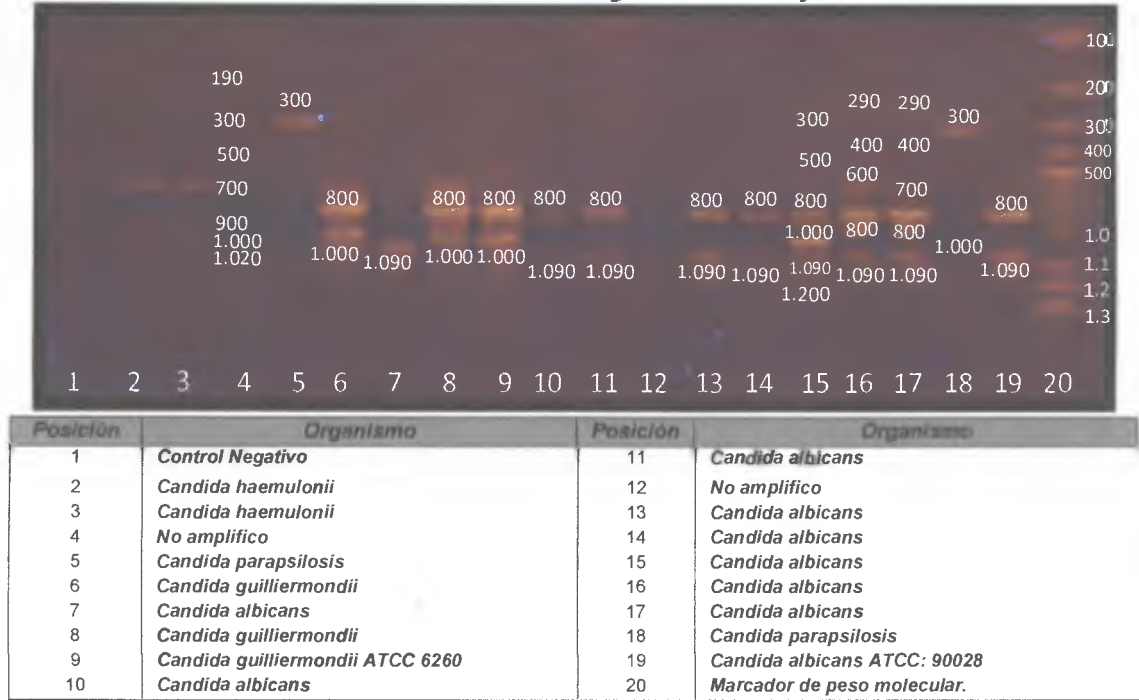


IMAGEN 4. PERFIL MOLECULAR DE CEPAS DE *Candida spp* IDENTIFICADAS FENOTÍPICAMENTE COMO *C.tropicalis*.

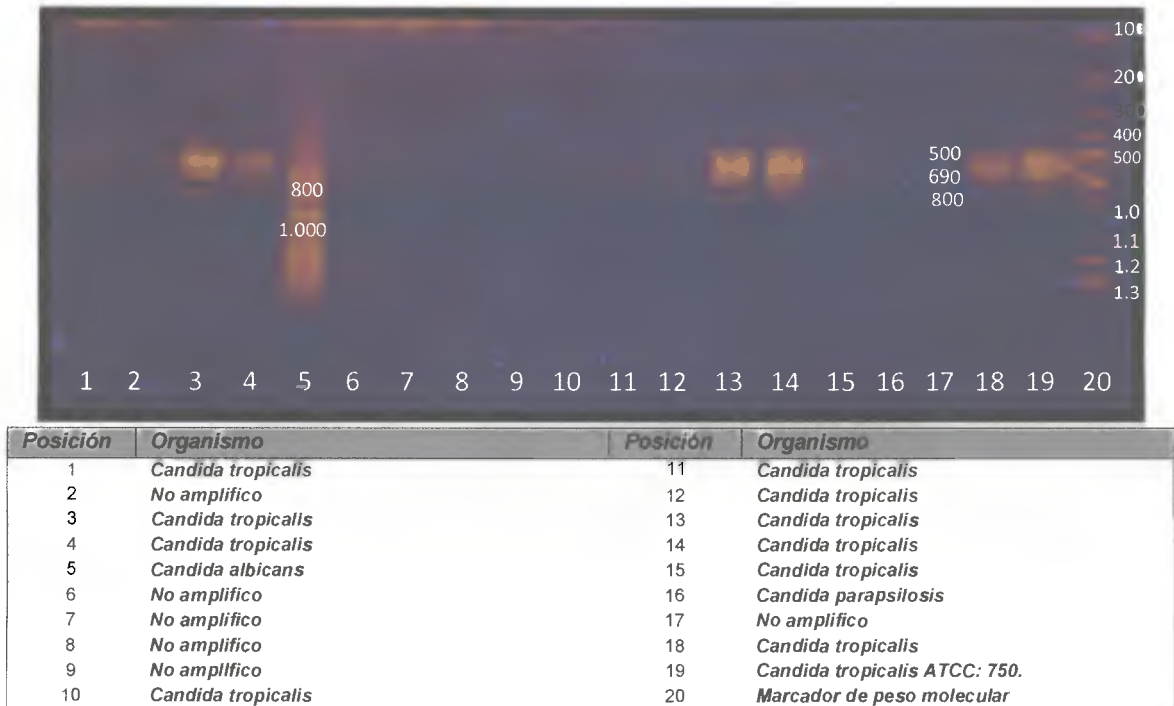
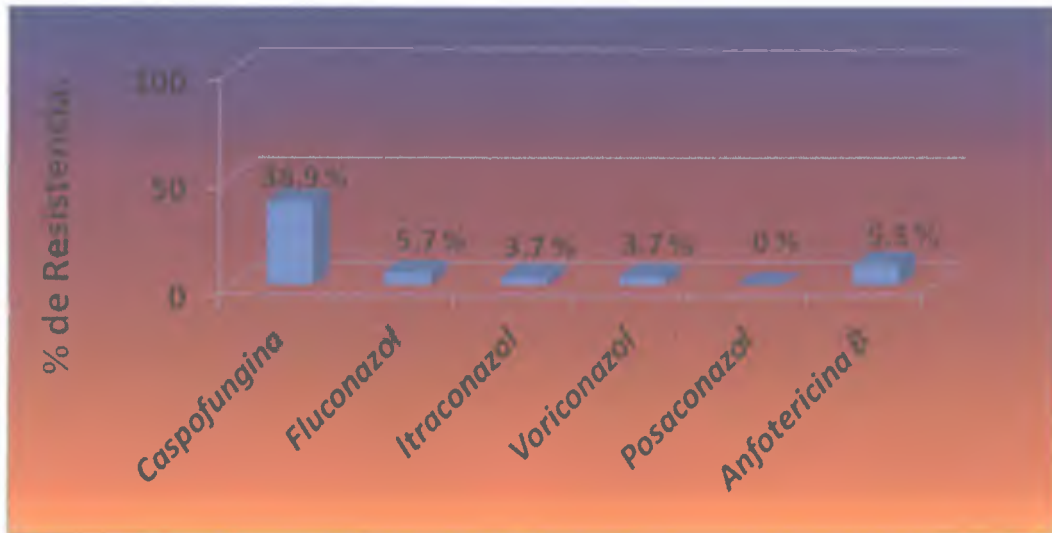
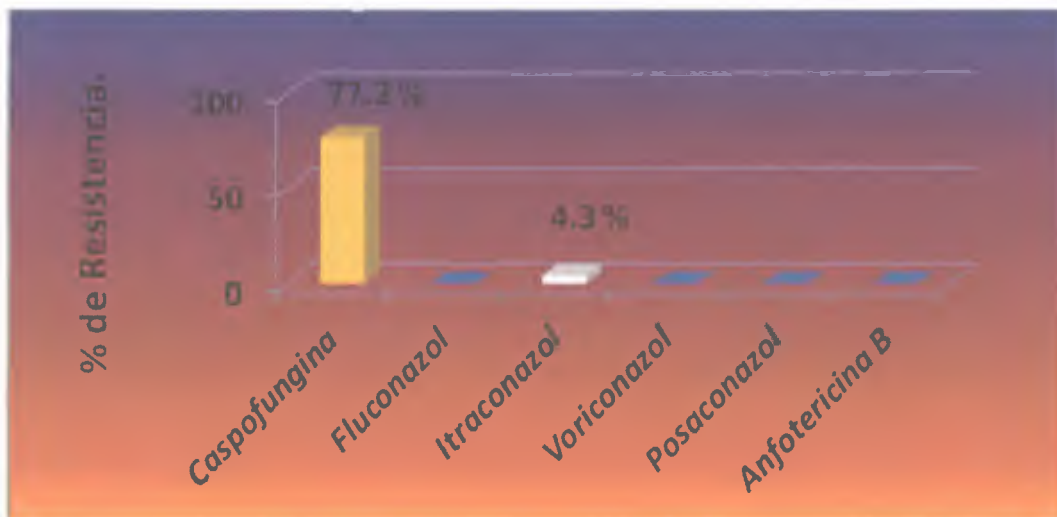


GRÁFICO 2: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE LAS ESPECIES DE *Candida* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).



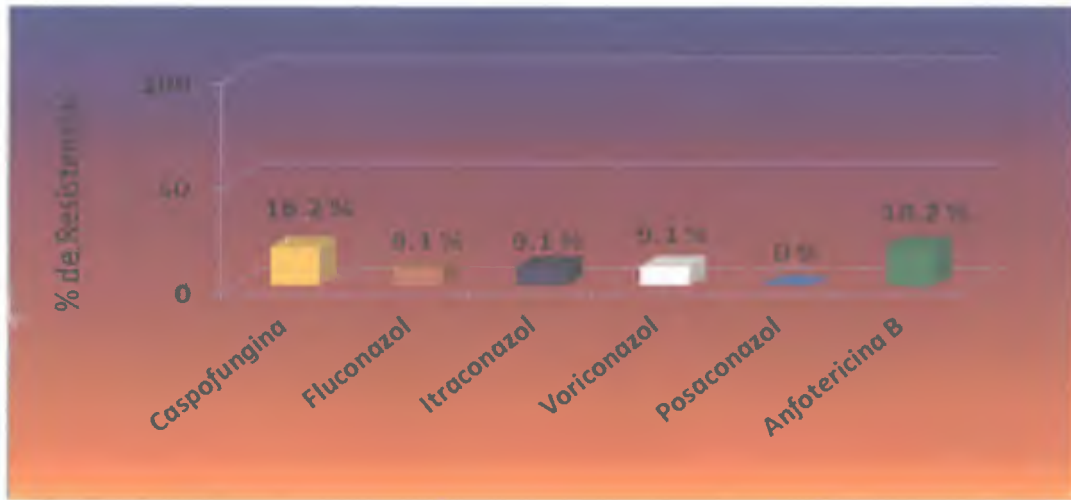
Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10

GRÁFICO 3: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *Candida parapsilosis* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).



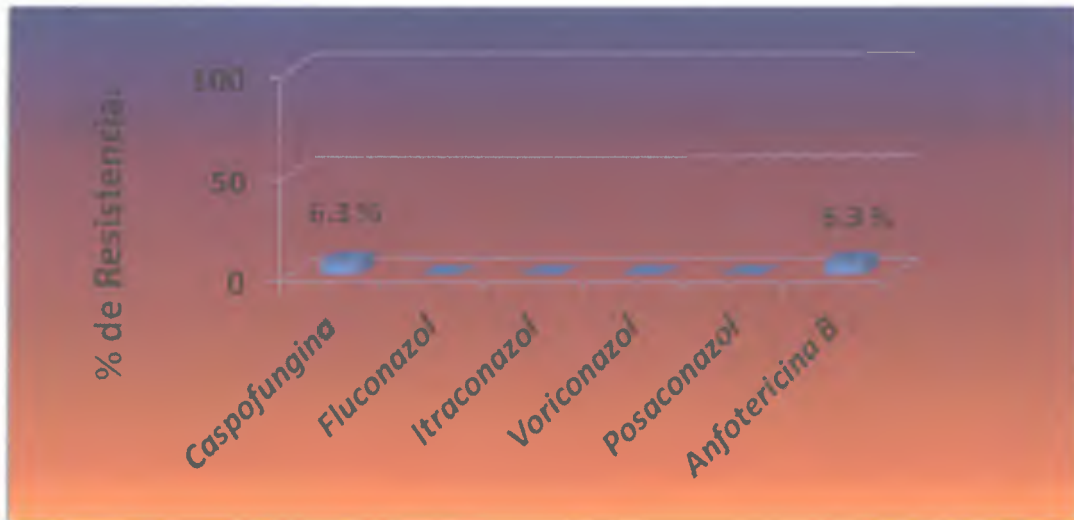
Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10

GRÁFICO 4: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *Candida albicans* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).



Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10

GRÁFICO 5: PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE *Candida tropicalis* A LOS ANTIFÚNGICOS EN EL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-10 (n=54).



Fuente: Caracterización fenotípica y genotípica, y susceptibilidad anti fúngica de especies de *Candida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño, período 2009-10

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las especies de *Candida* en el Hospital del Niño constituyen la primera causa de infecciones del torrente sanguíneo después de las *Enterobacterias* (**Nieto et al, 2012**). De manera que el tiempo y la sensibilidad diagnóstica son claves en el manejo de las fungemias. El entendimiento de las características diagnósticas, grupos de riesgo, y la epidemiología son de suma importancia para los pacientes con fungemia que pudieran beneficiarse de la selección de una adecuada terapia anti fúngica temprana antes que la identificación de la especie esté disponible (**Cavling et al, 2011**). Más del 80% de los pacientes con candidiasis invasiva están internados en sala de neonatología, unidad de terapia intensiva, hematooncología y la sala de quemados, y reúnen los factores que predisponen para esta condición clínica, que está directamente relacionada al estado inmunológico del paciente.

En base a los resultados fenotípicos es importante resaltar que el sistema Vitek 2 presenta dos limitaciones importantes, no todas las identificaciones definitivas a nivel de género y especie concordaron con la identificación molecular y en segundo lugar gran parte de las cepas fueron identificadas con bajo poder de discriminación entre dos o más especies de *Candida*.

A pesar de las limitaciones y errores de identificación, el sistema Vitek 2 es una herramienta útil para la identificación de especies de *Candida*. Este método fenotípico presentó problemas para la identificación y diferenciación entre *C.famata* y otras especies de *Candida*. En recientes reportes se encontró que las identificaciones realizadas en el sistema Vitek 2 con alta confianza de ser *C.famata* y otros con baja confianza entre *C.famata* y *C.guilliermondii* o *C.parapsilosis*, desplegaron solamente 56% de concordancia con los resultados de secuenciación de ADN. Esto sugiere que la ocurrencia de *C.famata* en las infecciones fúngicas es mucho más baja de lo reportado previamente y que los sistemas comerciales fenotípicos no ofrecen identificaciones

exactas, excepto el equipo MALDI-TOF (**Castanheira et al, 2013**). No se identificó ningún aislado como *C.famata*, y fue necesario utilizar métodos moleculares y pruebas fenotípicas complementarios para validar los resultados con bajo porcentaje de discriminación.

Los resultados finales indican que la primera causa de fungemia en el Hospital del Niño es *C.parapsilosis*, seguido de *C.tropicalis* y *C.albicans*. En los Estados Unidos, Europa y Asia *C.parapsilosis* representa la segunda especie de *Candida* más prevalente en sepsis neonatal en infantes con bajo peso al nacer (**Kaufman et al, 2004, Trofa et al, 2008**). La distribución de especies ha cambiado a través del tiempo, encontrando una disminución en la proporción de *C.albicans* y un incremento en la proporción de aislados de *C.glabrata*, mientras que la proporción de aislados de *C.parapsilosis* también se ha incrementado (**Lockhart et al, 2012**). Los resultados indican que un fenómeno semejante está ocurriendo en el Hospital del Niño.

Considerado un agente emergente de IAAS, *C.parapsilosis* ha sido actualmente descrito como un complejo de varios grupos genéticamente distintos y ha sido reasignado en tres especies distintas: *C.parapsilosis sensu stricto*, *C.orthopsilosis*, y *C.metapsilosis* (**Tavanti et al, 2005, Borman et al, 2009**). La primera es la especie más aislada en muestras clínicas y ambientales con un 91.4% (**Silva et al, 2009**).

Se encontraron tres patrones genéticos en medio de los aislados clínicos identificados como *C.parapsilosis*, de los cuales la mayoría correspondió a *C.parapsilosis sensu stricto*. Estos aislados fueron morfológica y fisiológicamente indistinguibles, pero genéticamente distintos y probablemente correspondan a diferentes especies del *Complejo C.parapsilosis*. *C. parapsilosis sensu stricto* es a menudo asociada con la contaminación de dispositivos médicos, soluciones y catéteres (**Brent et al, 2006**). También existe evidencia que *C.orthopsilosis* sea responsable de 4.5% de las infecciones y colonizaciones atribuidas a *C.parapsilosis* (**Tavanti et al, 2007**).

Gran parte de los aislados del *Complejo C.parapsilosis* en este estudio fueron resistentes a caspofungina y sensibles a fluconazol y anfotericina B. Otros reportes han detectado resistencia a

fluconazol y resistencia anfotericina B para *C.parapsilosis sensu stricto*, mientras que todos los aislados de *C.orthopsilosis* y *C.metapsilosis* han sido susceptibles (**Silva et al, 2009**). Además, se encontró que un gran número de cepas no eran susceptibles a las equinocandinas al igual que en nuestro estudio.

Este fenotipo de reducida susceptibilidad a las equinocandinas ocurre naturalmente en el complejo *C.parapsilosis* por una sustitución del aminoácido prolina por alanina en la posición 660 en la enzima *Fks 1p* (**García et al, 2008**). Estudios multicéntricos recientes llevados a cabo en distintas regiones geográficas encontraron que caspofungina tiene una excelente actividad in vitro contra los aislados clínicos invasivos de *Candida spp.* Estos datos no revelaron evidencia de emergencia de resistencia a caspofungina (**Pfaller et al, 2008**), mientras que nuestros resultados revelan una alta prevalencia de resistencia.

Existe una correlación significativa entre el incremento del uso de caspofungina para el tratamiento de candidemia y el incremento de la incidencia de candidemia por *C.parapsilosis* y la disminución de la frecuencia de *C.tropicalis* (**Forrest et al, 2008**). Desde el año 2006 la caspofungina ha sido utilizada en el Hospital del Niño en el tratamiento de candidemia (**Sáez-Llorens et al, 2009**). Esto podría explicar la razón por la cual en la sala de neonatología donde inicialmente se utilizó la caspofungina para el tratamiento de fungemias, el 50% de las cepas aisladas son *C.parapsilosis* y sólo cuatro fueron de *C.tropicalis*. El uso previo de equinocandinas puede predisponer al paciente a una infección por *C.parapsilosis* (**Axner-Elings et al, 2011**).

C.tropicalis fue la segunda especie más aislada, sin embargo en los meses posteriores al período de estudio no se realizaron aislamientos de *C.tropicalis* en pacientes con candidemia (datos del Laboratorio Clínico, 2011-12). Esto nos indica que probablemente los casos de candidemia por *C.tropicalis* en el período de estudio, fueron producto de un brote infeccioso en la sala de UTI donde se aislaron la mitad de todas las cepas. De estos tres aislados presentaron patrones de bandas que no concordaban con el patrón bandas de la cepa de referencia. La

variación genética en medio de los aislados de *C.tropicalis* ya ha sido reportada utilizando como método de análisis la secuencia múltiple de locus (**Chaves et al, 2013**).

Se encontró una cepa de *C.tropicalis* resistente a caspofungina y anfotericina B, pero sensible a todos los azoles. La emergencia de resistencia a caspofungina en estas especies de *Candida* ya ha sido reportada, y sugiere que todas las especies de *Candida* son capaces de desarrollar resistencia a equinocandinas (**Pasquale et al, 2008, Axner et al, 2011, Garcia et al, 2008**).

La tercera especie más aislada fue *C.albicans*, a pesar de que reportes de sepsis neonatal en los Estados Unidos y estudios multicéntricos en distintas áreas geográficas establecen que es la primera especie más aislada (**Kaufman et al, 2004, Trofa et al, 2008**). Sin embargo, después del periodo de estudio *C.albicans* resultó ser la especie más aislada después de *C.parapsilosis*, luego de la desaparición del brote de *C.tropicalis* en el periodo de estudio (datos del Laboratorio Clínico, 2011-12).

Se detectó 1 cepa de *C.albicans* con resistencia a múltiples anti fúngicos como anfotericina B, fluconazol, voriconazol y susceptibilidad intermedia a itraconazol, pero sensible a posaconazol y caspofungina. También, se encontró una cepa con resistencia a anfotericina B y caspofungina, y otra con resistencia sólo a caspofungina. El desarrollo de resistencia durante el tratamiento con caspofungina y otras equinocandinas en aislados clínicos de *C.albicans* ya han sido documentadas (**Laverdière et al, 2006, Baixench et al, 2007**).

Entre las cepas aisladas hubo dos cepas de *C.guilliermondii* susceptibles a todos los anti fúngicos. Esta cepa raramente causa candidiasis invasiva. En estudios multicéntricos se han aislado con mayor frecuencia de países de Latinoamérica, presentando una reducida susceptibilidad a fluconazol y la mayoría de las cepas son susceptibles a caspofungina (**Pfaller et al, 2006**).

No se pudo confirmar genótipicamente las identificaciones fenotípicas correspondientes a *C.haemulonii*. Estas cepas pertenecen al complejo *C.haemulonii* que fue previamente conocido

como *C.haemulonii* grupo I y II. Estudios recientes han propuesto la división de este complejo en tres especies distintas *C.haemulonii*, *C.duobushaemulonii sp. nov.*, y *C.haemulonii var. Vulnera* (**Cendejas et al, 2012**). Estas especies de *Candida* no pueden ser diferenciadas por métodos fenotípicos que identifican levaduras como el usado en este estudio.

Con respecto a los dos aislados de *C.haemulonii*, se encontró resistencia a anfotericina B, fluconazol, voriconazol, pero con sensibilidad a caspofungina. Las especies del complejo *C.haemulonii* son considerados patógenos emergentes con alto nivel de resistencia anfotericina B y resistencia cruzada a los azoles (**Hee et al, 2012**). Actualmente se han aislado especies del complejo *C.haemulonii* de muestras de hemocultivos de pacientes pediátricos con resistencia a equinocandinas y fluconazol (**Domínguez et al, 2012**).

En la sala de neonatología se aisló una cepa de *S.cerevisiae* y fue resistente a caspofungina y sensible a todos los azoles. La incidencia de fungemia por *S.cerevisiae* es desconocida. aunque algunos datos sugieren que es responsable de 0.1 a 3.6% de todos los episodios de fungemia. Un factor de riesgo identificado en brotes de fungemia por *S.cerevisiae* fue el tratamiento con probióticos conteniendo este agente. Este probiótico es usado en Europa para el tratamiento y prevención de diarrea asociada a *Clostridium difficile* (**Cassone et al, 2003, Muñoz et al, 2005**). La administración de *S.cerevisiae subtipo boulardii* en preparaciones de probióticos son usadas en las unidades de cuidados intensivos desde 1991, y esta cepa para uso terapéutico ha estado asociada a fungemias en pacientes hospitalizados. El uso de probióticos con *S.cerevisiae* debe ser evaluado con precaución, particularmente en pacientes inmunosuprimidos o críticamente enfermos (**Muñoz et al, 2005**).

Estudios previos demostraron que *C.albicans*, *C.parapsilosis* y *C.tropicalis* fueron las especies más aisladas en el Hospital del Niño con resistencia a fluconazol de hasta 37.5% en algunas especies (**Cisternas 2006**). La prueba de susceptibilidad que se utilizó antes del presente estudio sólo incluía fluconazol, itraconazol, voriconazol y anfotericina B, y la lectura de los resultados no

fueron concluyentes por la difícil interpretación. La evidencia clínica indica que el uso de fluconazol como estrategia profiláctica para disminuir la ocurrencia de IFI ha sido un éxito en nuestro hospital, indicando que la prevalencia de cepas con resistencia a los azoles sigue siendo baja. En este estudio se recomendó realizar pruebas de susceptibilidad (*Rueda et al, 2010*).

Uno de los resultados más significativos en el presente estudio fue la implementación de una prueba de susceptibilidad que permitió aclarar los datos obtenidos por *Cisternas* en el año 2006, donde se encontró alta resistencia a los azoles. Otros estudios de vigilancia indican que más del 90% de los aislados de *Candida spp* han sido susceptibles al fluconazol (*Lyon et al, 2010, Pfaller et al, 2010*). Nuestros resultados concuerdan con lo reportados en la literatura, donde sólo 5.7% de los aislados de *Candida* fueron resistentes a fluconazol. La sobrestimación de resistencia a fluconazol puede ser producto del fenómeno de barrido típico observado en la lectura de las pruebas de susceptibilidad a los azoles, para evitar estos errores se debe tener mucho cuidado en la interpretación de los resultados. Los resultados obtenidos para anfotericina B fueron similares a los nuestros

La completa identificación de las especies de *Candida*, sólo fue posible utilizando pruebas moleculares. La prueba de fingerprinter permitió confirmar la mayoría de las identificaciones fenotípicas con alto porcentaje de discriminación y clasificar los aislados clínicos identificados con bajo poder de discriminación por el sistema Vitek 2. Con el uso de la técnica de fingerprinter se pudo determinar la gran variabilidad interespecie en medio de los aislados de *C.albicans*, lo cual demuestra que diferentes cepas de *C.albicans* están asociadas a los episodios de candidemia en nuestro hospital. Finalmente es conveniente mencionar que los métodos fenotípicos no están programados aun para identificar nuevas especies de *Candida* como: *C. pseudorugosa*, *C.rugosa*, *C. tunisiensis*, *C.neorugosa*, *C.auris*, *C.africana*, *C.bracarensis* y *C. mengyuniae*, las cuales han sido asociadas a fungemia nosocomial y con resistencia a distintos anti fúngicos. La adecuada identificación de las especies previamente citadas sólo fue posible con el uso de herramientas

moleculares (*Eddouzi et al, 2013, Florez et al, 2011, Gyo et al, 2011, Paredes et al, 2012, Pfaller et al, 2006, Romeo et al, 2011, Taverna et al, 2012, Warren et al, 2010.*).

El presente estudio nos ha permitido conocer la frecuencia real de especies de *Candida spp* aisladas de muestras de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño. La caracterización genotípica demostró que existe variación intraespecie y que especies miembros de distintos complejos están circulando en nuestro hospital. El estudio de la susceptibilidad a los anti fúngicos disipa las dudas preexistentes en cuanto a los porcentajes de resistencia previamente reportados. Este trabajo establece fundamentos claros sobre la epidemiología de la fungemias en nuestro hospital y aporta nuevas herramientas para el manejo de los pacientes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

CONCLUSIONES.

1. La mayoría de los aislados clínicos de levaduras de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño del período 2009-2010 fueron caracterizados.
2. A pesar de las limitaciones el sistema bioquímico automatizado Vitek 2 resulta una herramienta útil para la identificación de los aislados clínicos de *Candida spp*.
3. Las pruebas de susceptibilidad usando el método de difusión con agar Muller Hinton dosificado resultó altamente confiable y reproducible.
4. *Candida parapsilosis* es la principal causa de fungemia en el Hospital del Niño.
5. La resistencia a los distintos anti fúngicos de los aislados clínicos de *Candida spp* no excedió el 10%, excepto caspofungina.
6. El PCR fingerprinter permitió discriminar correctamente las diferentes cepas de referencia de *Candida* e identificar correctamente la mayoría de los aislados clínicos.
7. El PCR fingerprinter permitió detectar diferencias en aislados que fueron fenotípicamente idénticos pero genotípicamente diferentes y detectar variación intraespecie en los aislados de *C. albicans*.

RECOMENDACIONES.

1. Probar otro método de caracterización molecular diferente al PCR al azar, con el propósito de comparar los resultados obtenidos por el método de fingerprinter y evaluar su utilidad como herramienta epidemiológica en el control de IAAS.
2. Validar los resultados de las pruebas de susceptibilidad a caspofungina para los aislados clínicos de *C.parapsilosis* utilizando el método de referencia de dilución en caldo o agar RPMI recomendado por la CLSI.
3. Determinar la presencia del *gen Fsk1* mutado, en medio de los aislados clínicos con resistencia a caspofungina.
4. Las especies de *Candida* aisladas de especímenes clínicos identificadas como *C.parapsilosis* deben ser reportados como *complejo C.parapsilosis*.
5. El sistema Vitek 2, debe ser complementada con la prueba de agar Harina de Maíz para definir resultados con bajo poder de discriminación.
6. Desarrollar puntos de corte epidemiológicos a nivel local para los distintos anti fúngicos frente a los aislados clínicos de *Candida*.
7. Realizar una adecuada identificación y pruebas de susceptibilidad a todos los aislados de *Candida* procedentes de sitios estériles.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

1. *Alcoba-Florez J et al.* (2011). First reported case of catheter related fungemia due to *Candida mengyuniaie*. **J. Clin. Microbiol**, 49(9): 3429-31.
2. *Almirante B et al.* (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. Clin. Microbiol**, 43(4):1829-35.
3. *Axner-Elings M et al.* (2011). Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during a 1-year period in Sweden. **J. Clin. Microbiol**, 49(7): 2516-21.
4. *Baixench M et al.* (2007). Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report review. **J. Antimicrob. Chemother**, 59(6):1076-83.
5. *Betty F et al.* (1998). **Diagnostic Microbiology**: Bloodstream Infections. Chapter 20:284-303.
6. *Bidarth T.* (2004). Rol de voriconazol y caspofungina en terapia anti fúngica. **Rev. Chil. Infec**; 21(supl): 13-19.
7. *Borman A et al.* (2009). Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. **J. Clin. Microbiol**, 47(7): 2307-10.
8. *Brown S y Traczweski M.* (2007). Quality Control Limits for Posaconazole Disk Susceptibility Tests on Mueller-Hinton Agar with Glucose and Methylene Blue. **J. Clin. Microbiol**, 45(1): 222–23.

9. Cabib E et al. (2001). The Yeast Cell Wall and Septum as Paradigms of Cell Growth and Morphogenesis. **The J. Biol. Chem**, 276(23): 19679-82.
10. Calfee D y Farr B. (2002). Comparison of four antiseptic preparations for skins in the prevention of contamination of percutaneously draw blood cultures: Randomized trial. **J. Clin. Microbiol**, 40 (5): 1660-65.
11. Calving M et al. (2011). Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. **J. Clin. Microbiol**, 49(9): 3300-08.
12. Cannon R et al. (2009). Efflux- Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clin. Microbiol. Rev**, 22(2): 291-321.
13. Cassone M et al. (2003). Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of organism. **J. Clin. Microbiol**, 41(11): 5340-43.
14. Castanheira M et al. (2013). *Candida guilliermondii* and other species of *Candida* misidentified as *Candida famata*: Assessment the Vitek 2, DNA-sequencing analysis and MALDI-TOF MS in two global antifungal surveillance programs. **J. Clin. Microbiol**, 51(1): 117-24.
15. Cendejas E et al. (2012). Reclassification of *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C.haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp.nov. (*C.haemulonii* group II), and *C.haemulonii* var. *vulnera* var.nov. Three multiresistant human pathogenic yeasts. **J.Clin. Microbiol**, 50(11): 3641-51.
16. Chang D et al. (2008). Perfil de resistencia de las bacterias aisladas de hemocultivos en Hospital General. **Rev. Soc. Peru. Med. Interna**, 21 (2): 62-65.

17. *Chaves M et al.* (2013). Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows the presence of different clonal clusters and fluconazole susceptibility profile in sequential candidemia patients in Sao Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol**, 51(1): 268-77.
18. *Chi-Chung L et al.* (2011). Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Caspofungin in Pediatric Patients. **Antimicro. Agents. Chemother**, 5(5): 2098–2105.
19. *Cisternas O.* (2006). Patrones de resistencia de las levaduras y su importancia clínica. **Revista del Hospital del Niño**, 22(2): 12-19.
20. *Correia A et al.* (2004). Study of Molecular Epidemiology of Candidiasis in Portugal by PCR Fingerprinting of *Candida* Clinical Isolates. **J. Clin. Microbiol**, 42(12): 5899-5903.
21. *Desnos-Olivier M et al.* (2008). *Debaryomyces hansenii* (*C.famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). **J. Clin. Microbiol**, 46(10): 3237-42.
22. *Desnos-Ollivier M et al.* (2008). Detection of Caspofungin Resistance *Candida* spp. By E-Test. **J. Clin. Microbiol**, 46(7): 2389-92.
23. *Desnos-Ollivier M et al.* (2011). Development of Echinocandin Resistance in *Clavispora lusitaniae* during Caspofungin Treatment. **J. Clin. Microbiol**, 49(6): 2304–06.
24. *Diekema D et al.* (2009). In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol**, 47(2009): 3170-77.
25. *Dominguez M et al.* (2012). Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatric patients. **J. Clin. Microbiol**, 50(11): 3783-85.

26. Eddouzi J et al. (2013). Characterization of new clinical yeast species, *Candida tunisiensis* sp. nov, isolated from a strain collection of Tunisian hospitals. **J. Clin. Microbiol**, 51(1): 31-39.
27. Forrest GN et al. (2008). Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. **J. Infect**, 56(2):126-9.
28. Gander R et al. (2009). Impact of the blood culture draw by phlebotomy on contamination rates and health care cost in a hospital emergency department. **J. Clin. Microbiol**, 47 (4): 1021-24.
29. Garcia-Effron et al. (2008). Caspofungin resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematology malignancies. **Antimicrob. Agents. Chemother**, 52(11): 4181-83.
30. Garcia-Effron G et al. (9). Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis* sensu lato species. **J. Clin. Microbiol**, 49(9): 3257-61.
31. Ghannoum M y Rice L. (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clin. Microbiol. Rev**, 12(4): 501-17.
32. Gonsalves W et al. (2009). Effects of volume and site of blood draw on blood culture results. **J. Clin. Microbiol**, 47(11): 3482-85.
33. González G y Bello H. (2004). Hemocultivos simultáneos y diagnóstico de sepsis relacionada a catéter. **Nutr. Hosp**, XIX (5): 259-62.
34. GraciaEffron G et al. (2008). A naturally occurring proline to alanine amino acid change in FKs1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. **J. Clin. Microbiol**, 52(7): 2305-12.

35. Graf B et al. (2000). Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Yeast and Yeast –Like Organisms. **J. Clin.I Microbiol**, 38(5): 1782-85.
36. Hata D et al. (2007). Multicenter evaluation of the new Vitek 2 advanced colorimetric yeast identification card. **J. Clin.Microbiol**, 45(4): 1087-92.
37. Hazen K. (1995). New and Emerging Yeast Pathogens. **Clin. Microbiol. Rev**, 8(4): 462-78.
38. Hee Shin J et al. (2012). Detecttion of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **J. Clin. Microbiol**, 50(6): 1852-55.
39. Katiyar M et al. (2006). *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrob. Agents. Chemother**, 50(8):2892-94.
40. Kaufman D y Fairchild K. (2004). Clinical Microbiology of Bacterial and Fungal Sepsis in Very Low Birth Weigth Infants. **Clin. Microbiol. Rev**, 17(3):638-80.
41. Kellogg J et al. (1998). Limitations of the Current Microbial Identification System for Identification of Clinical Yeast Isolates. **J. Clin. Microbiol**, 36(5):1197-1200.
42. Kirkpatrick W et al. (2011). Caspofungin Dose Escalation for Invasive Candidiasis Due to Resistant *Candida albicans*. **Antimicro. Agents. Chemother**, 55(7): 3254–60.
43. Kiyoyama T et al. (2009). Isopropyl alcohol compared with isopropyl alcohol plus povidone-iodine as skin preparation for prevention of blood culture contamination. **J. Clin. Microbiol**, 47 (1): 54-58.
44. Kojic E y Darouiche R. (2004). *Candida* Infections of Medical Divices. **Clin. Microbiol.Rev.** 17(2): 255-67.
45. Larone D. (2002). Medically Important Fungi: **Yeast and Yeastlike Organisms**. Detailed Descriptions: 113-33.

46. Lasker B et al. (2006). Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. **J. Clin. Microbiol**, 44(3): 750-59.
47. Lau A et al. (2008). Multiplex Tandem PCR: a Novel Platform for Rapid Detection and Identification of Fungal Pathogens from Blood Culture Specimens. **J. Clin. Microbiol**, 46(9): 3021-27.
48. Laverdiere M et al. (2006). Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. **J. Clin. Microbiol**, 57(4):705-08.
49. Lee A et al. (2007). Detection of bloodstream infections in adults: How many blood cultures are needed? **J. Clin. Microbiol**, 45(11): 3546-48.
50. Lee W et al. (2011). First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. **J. Clin. Microbiol**, 49(9): 3139-42.
51. Lin et al. (2007). Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. **J. Clin. Microbiol**, 45(8): 2452-59.
52. Lockhart S et al. (2008). Identification and susceptibility profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol**, 47(1): 242-44.
53. Lockhart S et al. (2012). Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. **J. Clin. Microbiol**, 50(): 3435-42.
54. Louie A et al. (2005). Pharmacodynamics of Caspofungin in a Murine Model of Systemic Candidiasis: Importance of Persistence of Caspofungin in Tissues to Understanding Drug Activity. **Antimicro. Agents. Chemother**, 49(12): 5058-68.

55. Lyon M et al. (2010). Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. **J. Clin. Microbiol**, 48(4): 1270-75.
56. Magill S et al. (2006). Triazole cross resistance among *Candida spp*: Case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. **J. Clin. Microbiol**, 44(2): 529-35.
57. Mancini N et al. (2010). The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. **Clin. Microbiol. Rev**, 23(1): 235-51.
58. McClelland M y Welsh J. (1994). DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. **Genome Res**, 4: 59-65.
59. Morales C et al. (2011). Protocolo para la extracción de hemocultivos. Hospital Universitario de Valme. Pag: 1-20.
60. Muñoz P et al. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: An emerging infectious disease. **CID**, 40 (1): 1625-34.
61. Murray P et al. (2008a). **Manual of Clinical Microbiology**: Antifungal Agents and Susceptibility Test Method. Chapter IX: 1859-93.
62. Murray P et al. (2008b). **Manual of Clinical Microbiology**: *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeast of Medical Importance. Chapter VIII: 1693-1711.
63. Nieto J et al. (2012). Frecuencia de microorganismos aislados de muestras de hemocultivos en pacientes hospitalizados en el Hospital del Niño. Revista panameña de Laboratorio Clínico e Investigación, 3: 43-46.
64. Ning Leaw S et al. (2006). Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. **J. Clin. Microbiol**, 44(3): 639-99.

65. Paredes K et al. (2012). Molecular identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates of the *Candida rugosa* species complex and proposal of the new species *Candida neorugosa*. **J. Clin. Microbiol**, 50(7):2397-2403.
66. Pasquale T et al. (2008). Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. **J. Antimicrob. Chemother**, 61(1):219.
67. Pfaller M et al. (2006). *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol**, 44(10): 3551-56.
68. Pfaller M et al. (2006). *Candida rugosa*, emerging fungal pathogen with resistant to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol**, 44(10): 3578-82.
69. Pfaller M et al. (2006). In Vitro Susceptibilities of *Candida spp.* to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. **J. Clin. Microbiol**, 44(3): 760-63.
70. Pfaller M et al. (2007). *Candida krusei*, a multidrug resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. **J. Clin. Microbiol**, 46(2): 515-21.
71. Pfaller M et al. (2008). Correlation of MIC with Outcome for *Candida* species tested against Caspofungin, Anidulafungin, and Miconazole: Analysis, and Proposal for Interpretive MIC Breakpoints. **J. Clin. Microbiol**, 46(8): 2620-29.
72. Pfaller M et al. (2008). In Vitro Susceptibilities of Invasive Isolates of *Candida spp.* To Anidulafungin, Caspofungin and Miconazole: Six Years of Global Surveillance. **J. Clin. Microbiol**, 46(1): 150-56.

73. *Pfaller M et al.* (2009). Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. **J. Clin. Microbiol**, 47(10): 3185-90.
74. *Pfaller M et al.* (2009). Wild type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the echinocandins and *Candida spp.* **J. Clin. Microbiol**, 48(1):52-56.
75. *Pfaller M et al.* (2010). Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **J. Clin. Microbiol**, 48(4): 1366-77.
76. *Pfaller M et al.* (2010). Wild type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida spp.* as Determined by 24 hour CLSI broth microdilution. **J. Clin. Microbiol**, 49(2): 630-37.
77. *Pfaller M et al.* (2011). Use of Epidemiological cutoff values to examine 9-year trends in susceptibility of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. **J. Clin. Microbiol**, 49(2):624-29.
78. *Pfaller M et al.* (2012). Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol**, 50(4):1199-1203.
79. *Pfaller M et al.* (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida spp.* by use of clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **J. Clin. Microbiol**, 50 (9): 2846-56.
80. *Pfaller M y Deikema D.J.* (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clin. Microbiol. Rev**, 20(1): 133-63.

81. Rex J et al. (2001). Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. **Clin. Microbiol. Rev**, 14(4): 643-58.
82. Romeo O and Criseo G. (2008). Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeast *Candida dubliniensis* and *Candida Africana*. **J. Clin. Microbiol**, 47(1):212-14.
83. Rueda et al, (2010). Impact of Routine Fluconazole Prophylaxis for Premature Infants With Birth Weights of Less Than 1250 Grams in A Developing Country. *Ped Infect Dis*, 29(11):1050-52.
84. Sáez-Llorens X et al. (2009). Pharmacokinetics and Safety of Caspofungin in Neonates and Infants Less than 3 months of Age. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar 53(3), 869-875. Selvarangan R, Bui U, Limaye A, Cookson B. 2003. Rapid Identification of Commonly Encountered *Candida* Species Directly from Blood Culture Bottles. **J. Clin. Microbiol**, 41(12): 5660-64.
85. Sánchez R et al. (2010). Frecuencia de microorganismos aislados de hemocultivos en el hospital de tercer nivel en el estado de Chiapas. **Enf Inf Microbiol**, 30(2): 53-58.
86. Silva A et al. (2009). Prevalence, Distribution, and Antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C.orthopsilosis*, and *C.metapsilosis* in a tertiary care hospital. **J. Clin. Microbiol**, 47(8): 2392-97.
87. Soll D. (2000). The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. **Clin. Microbiol. Rev**, 13(2): 332-70.
88. Souza A et al. (2012). Accurate identification of *Candida parapsilosis* (Sensu lato) by use of mitochondrial and Real-Time PCR. **J. Clin. Microbiol**, 50(7): 2310-14.
89. Sydnor E y Perl T. (2011). Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute Settings. **Clin. Microbiol. Rev**, 4(1): 141-73.

90. Tavanti A et al. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J. Clin. Microbiol**, 43(1): 284-92.
91. Tavanti A et al. (2007). Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. **J. Clin. Microbiol**, 45(5): 1455-62.
92. Taverna C et al. (2012). First case report of bloodstream infection due to a *Candida* species closely related to the novel species *Candida pseudorugosa*. **J. Clin. Microbiol**, 50(6): 2165-69.
93. Thanos M et al. (1996). Rapid Identification of *Candida* species by DNA Fingerprinting with PCR. **J. Clin. Microbiol**, 34(3): 615-21.
94. Trofa D et al. (2008). *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.** 21(4): 606-25.
95. Vos M et al. (2006). *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. **J. Clin. Microbiol**, 44(3): 1111-14.
96. Walsh T et al. (2005). Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Caspofungin in Children and Adolescents. **Antimicro. Agents. Chemother**, 49(11): 4536–45.
97. Warren T et al. (2010). *Candida bracarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. **J. Clin. Microbiol**, 48(12): 4677-79.
98. Weinbaun et al. (1997). Doing it right the first time: Quality improvement and the contaminate blood culture. **J. Clin. Microbiol**, 35 (3): 563-65.

99. *Weinstein et al.* (1997). The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. **Clin Infect Dis**, 24(4): 584-602.
100. *Willinger B et al.* (2001). Performance of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of *Candida* Species, in Comparison to CHROMagar *Candida*. **J. Clin. Microbiol**, 39(10): 3793-95.
101. *Zarate M.S et al.* (2005). Estudio microbiológico de bacteriemias y fungemias en pacientes en hemodiálisis crónica. **Rev. Arg. Microbiol**, 37:145-49.

ANEXOS.

ANEXOS.

1. Anexo No. 1: Guía Propuesta para Realizar Pruebas de Susceptibilidad Usando el Método de Discos de Difusión en Agar para Levaduras. Documento de la CLSI M44-P.

Lectura e Interpretación: Para una mejor lectura de los platos colocarlos sobre un fondo negro, que no refleje la luz. Mida los diámetros de las zonas de inhibición utilizando una regla graduada en milímetros:

Polienos (anfotericina B y nistatina): Se debe medir la zona clara sin crecimientos visibles (100% de inhibición del crecimiento). Para estos anti fúngicos las colonias dentro de la zona de inhibición se deben considerar como mutantes resistentes. (Ver **Figura 7** y **Figura 8**).

5-Fluorocitosina se debe medir la zona hasta alcanzar las colonias de tamaño normal. Las colonias individuales dentro de esta zona suelen ser mutantes resistentes (se deberán aislar y analizar de nuevo).

Azoles (Fluconazol, itraconazol, Voriconazol, ketoconazol), y terbinafina: las zonas se deben medir hasta llegar a las colonias de tamaño normal (Ver **Figura 9** y **10**). A menudo se pueden observar colonias parcialmente inhibidas con tamaños pequeños cercanas al disco, los cuales no representan el margen real de la zona. Estas colonias de tamaños medianos y pequeños no son mutantes resistentes.



Fig 8. *Candida spp* sensible a anfotericina B.



Fig 9. *Candida spp* resistente a anfotericina B.

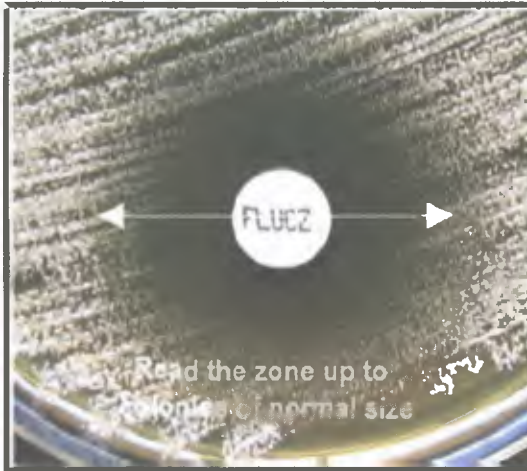


Fig 10. *Candida spp* sensible fluconazol.



Fig 11. *Candida sp* resistente a fluconazol.

CUADRO IX. PUNTOS DE CORTE PARA LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA, MÉTODO DE DIFUSIÓN SEGÚN LA CLSI (DOCUMENTO M44-2).

Antifúngico	Potencia (µg)	Zonas de Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)	
		Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Resistente
Anfotericina B	10	≥ 15	14-10	< 10	≤ 1.0	≥ 2.0
Caspofungina	5	≥ 11		≤ 10	≤ 2.0	>2.0
Fluconazol*	25	≥ 19	18-15 (DD)	≤ 14	≤ 8.0	≥ 64
Itraconazol	8	≥ 23	22-14 (DD)	≤ 13	≤ 0.12	≥ 1.0
Posaconazol	5	≥ 17	16-14	≤ 13	≤ 1.0	≥ 4.0
Voriconazol	1	≥ 17	16-14	≤ 13	≤ 1.0	≥ 4.0

DD= Dosis dependiente.

**C.krusei* debe ser siempre reportado resistente a fluconazol.

CUADRO X: DIAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD PARA LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIFÚNGICA, MÉTODO DE DIFUSIÓN SEGÚN LA CLSI (DOCUMENTO M44-2).

Antifúngico	Zonas de Diámetro (mm)		
	<i>C.albicans</i> ATCC 90028	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C.krusei</i> ATCC 8258
Anfotericina B	18-23	20-26	17-23
Caspofungina	15-22	13-23	16-22
Fluconazol*	28-39	22-33	
Itraconazol	21-30	19-26	16-22
Posaconazol	24-34	25-36	23-31
Voriconazol	31-42	25-36	23-31.

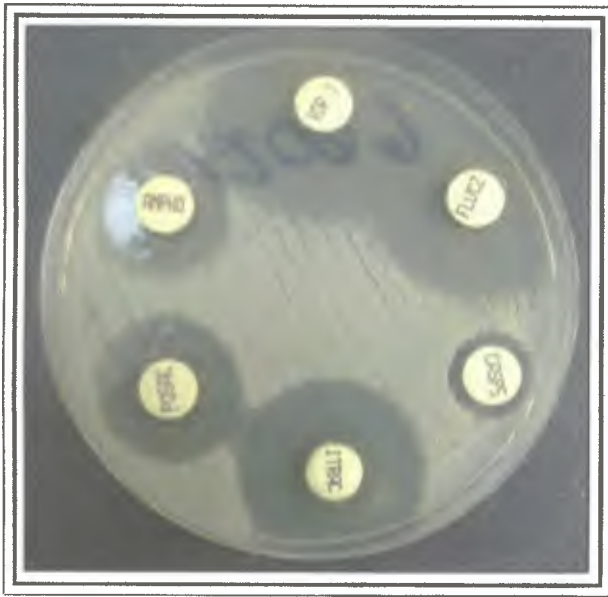


IMAGEN 5. CEPA CONTROL DE *C. albicans* 90028.

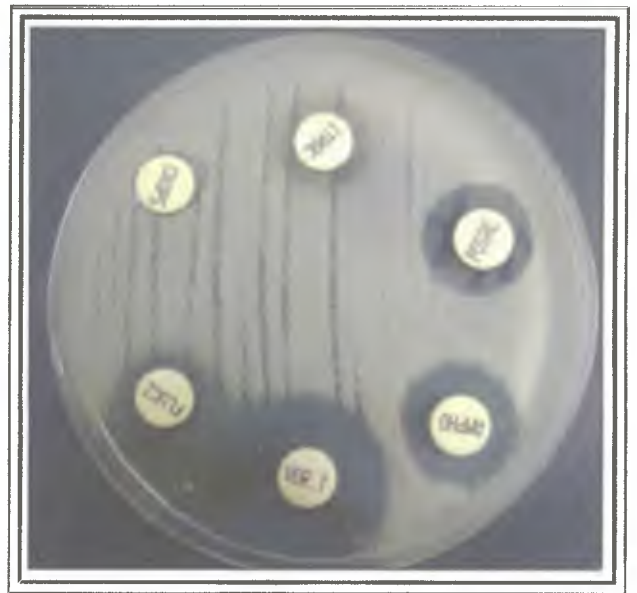


IMAGEN 6. AISLADO CLINICO DE *C. albicans* CON RESISTENCIA A CASPOFUNGINA, FLUCONAZOL e ITRACONAZOL.

TABLA 3A. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010.

CODIGO		MICROORGANISMOS	Sala	Anfotericina B			Itraconazol			fluconazol			Voriconazol			Posaconazol			Caspofungina		
				R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
1	46000	<i>Candida parapsilosis</i>	UTI			X			X			X			X			X	X		
2	46880	<i>Candida albicans</i>	M2			X			X			X			X			X			X
3	55576	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
4	65050	<i>Candida albicans</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
5	67379	<i>Candida albicans</i>	QM			X	X				X			X			X				X
6	62140	<i>Candida albicans</i>	RN2			X			X			X			X			X			X
7	62025	<i>Candida albicans</i>	RN2			X			X			X			X			X			X
8	59811	<i>Candida albicans</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
9	52816	<i>Candida albicans*</i>	HO			X			X			X			X			X			X
10	69023	<i>Candida albicans</i>	RN2			X			X			X			X			X			X
11	77928	<i>Candida tropicalis*</i>	QM			X			X			X			X			X			X
12	73199	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
13	73557	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X			X			X			X			X			X
14	72054	<i>Candida tropicalis</i>	RN2			X		X			X			X			X				X
15	66827	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X			X			X			X			X			X
16	66649	<i>Candida albicans</i>	UTI			X		X			X			X			X	X			
17	61526	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X			X			X			X			X			X
18	60477	<i>Candida tropicalis*</i>	UTI			X			X			X			X			X			X
19	55494	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X			X			X			X			X			X
20	53790	<i>Candida tropicalis</i>	HO			X		X			X			X			X				X
21	52324	<i>Candida tropicalis*</i>	RN2			X		X			X			X			X				X
22	51424	<i>Candida tropicalis</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
23	50719	<i>Candida tropicalis</i>	RN2			X		X			X			X			X				X
24	46841	<i>Candida tropicalis</i>	RN2	X				X			X			X			X	X			
25	53484	<i>Candida parapsilosis</i>	UTI			X			X			X			X			X	X		
26	46843	<i>Candida parapsilosis</i>	UTI			X			X			X			X			X	X		
27	49316	<i>Candida tropicalis</i>	M6			X			X			X			X			X			X

TABLA 3B. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *Candida* AISLADAS DE HEMOCULTIVOS DE PACIENTES DEL HOSPITAL DEL NIÑO, PERÍODO 2009-2010.

CODIGO		MICROORGANIMOS	Sala	Anfotericina B			Itraconazol			fluconazol			Voriconazol			Posaconazol			Caspofungina		
				R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
28	73640	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X			X		X			X			X	X			
29	50043	<i>Candida parapsilosis</i>	UTI			X			X		X			X			X	X			
30	78349	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
31	77617	<i>Candida parapsilosis</i>	UTI			X		X			X			X			X	X			
32	77434	<i>Candida parapsilosis*</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
33	63698	<i>Candida parapsilosis*</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
34	52437	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
35	67372	<i>Candida parapsilosis*</i>	UTI			X		X			X			X			X	X			
36	61639	<i>Candida parapsilosis*</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
37	52206	<i>Candida parapsilosis</i>	CER			X	X				X			X			X	X			
38	67797	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
39	54451	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X			X		X			X			X	X			
40	71948	<i>Candida parapsilosis</i>	M6			X		X			X			X			X				X
41	72160	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
42	58919	<i>Candida guilliermondii</i>	RN2			X		X			X			X		X					X
43	77714	<i>Candida albicans*</i>	RN2	X					X		X			X			X	X			
44	60107	<i>Candida guilliermondii*</i>	UTI			X		X			X			X			X				X
45	60275	<i>S.cerevisiae*</i>	RN2			X		X			X			X			X	X			
46	66548	<i>Candida parapsilosis*</i>	UTI			X		X			X			X			X	X			
47	49212	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X		X			X			X			X				X
48	49431	<i>Candida haemulonii</i>	RN2	X				X		X				X			X				X
49	54981	<i>Candida haemulonii*</i>	UTI	X				X		X			X				X				X
50	61818	<i>Candida albicans*</i>	UTI	X				X		X			X				X				X
51	46162	<i>Candida tropicalis*</i>	CN			X		X			X			X			X				X
52	61715	<i>Candida parapsilosis*</i>	RN2			X		X			X			X			X				X
53	66281	<i>Candii</i>																			X
54	47845	<i>Candida parapsilosis</i>	RN2			X			X		X			X			X	X			

2. Anexo No. 2: Procedimiento para la preparación del Caldo YPD.

Caldo YPD: Para el mantenimiento y desarrollo de levaduras en procedimientos de microbiología molecular.

Formula por gramo por litro.

Componente	Concentración (gramos)
Tryptona	20
Extracto de levadura	10
Dextrosa	20
Final pH 6.5 ± 0.2 at 25°C	

Preparación del Medio: Suspender 50 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar con agitación hasta su completa disolución. No caliente demasiado para evitar la intensificación del color de la solución. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Almacenar a 4 ° C. El color del medio preparado es de color ámbar.

Uso: Caldo YPD se utiliza para el mantenimiento y desarrollo de la levadura en los procedimientos de microbiología molecular. Para uso en métodos generales de genética de levadura mediante el uso del medio de extracto de levadura-peptona-glucosa (YPD) para el cultivo de *S.cerevisiae* y otras levaduras. Levaduras crecen bien en un medio mínimo que contiene glucosa y sales solamente. La adición de proteína y extracto de levadura permite un crecimiento más rápido.

Almacenamiento del Medio Deshidratado: Guarde el frasco sellado que contiene el medio deshidratado de 2 a 25 ° C. Una vez abierto y volver a tapar, coloque el recipiente a la misma temperatura de almacenamiento protegido de la humedad y la luz. El medio deshidratado debe ser homogéneo, fluido y de color beige. Si hay algún cambio físico, se elimina el medio.

3. Anexo No. 3: Preparación del medio Agar harina de maíz:

Componentes	Cantidad
Cornmeal	40 g
Agar	20 g
Tween 80	10 ml
Agua destilada	1,000 ml

- Mezcle bien el cornmeal con 500 ml de agua; caliente a 65° centígrados por 1 hora.
- Filtre la solución en una gaza hasta alcanzar claridad; restaure el volumen original.
- Ajuste el pH 6.6-6.8; agregue agar disuélvalo en los 500 ml de la solución.
- Agregue Tween 80; autoclave (15 lb/in²) por 15 minutos.
- Dispense el medio en platos Petri.

4. Anexo No. 4: Lista de cepas ATCC y aplicación en el estudio.

Cuadro X: LISTA DE CEPAS DE REFERENCIA Y SU USO EN LA INVESTIGACIÓN.

Organismos	Número de Cepa	Aplicación
<i>C.guilliermondii</i>	6260	Identificación, PCR.
<i>C.glabrata</i>	2001	Identificación, PCR.
<i>C.krusei</i>	34135	Identificación, PCR.
<i>C.kefyr</i>	66028	Identificación, PCR.
<i>C.lusitaniae</i>	34449	Identificación, PCR.
<i>S. cerevisiae</i>	4550	Identificación, PCR.
<i>S.Salmonicolor</i>	2601	Identificación, PCR.
<i>C.parapsilosis</i>	221019	Identificación, PCR y Pruebas de Susceptibilidad.
<i>C.albicans</i>	950028	Identificación, PCR y Pruebas de Susceptibilidad.
<i>C.tropicalis</i>	750	Identificación, PCR.