

**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”  
GERENCIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN  
COORDINACIÓN DE POSTGRADO  
ESPECIALIZACIÓN EN MICOLOGÍA MÉDICA**

**ESTABLECER PUNTOS DE CORTES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA  
ACTIVIDAD *IN VITRO* DE AZOLES FRENTE A LOS AISLADOS  
DE *Candida* spp., POR EL MÉTODO DE ETEST Y MICRODILUCIÓN EN  
CALDO (CLSI).**

**AUTORA: YOAIRA DÍAZ  
TUTORA: MARIBEL DOLANDE**

**CARACAS, OCTUBRE 2014**

**República Bolivariana de Venezuela  
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”  
Gerencia de Docencia e Investigación  
Coordinación de Postgrado  
Especialización en Micología Médica**

**ESTABLECER PUNTOS DE CORTES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA  
ACTIVIDAD *IN VITRO* DE AZOLES FRENTE A LOS AISLADOS  
DE *Candida* spp., POR EL MÉTODO DE ETEST Y MICRODILUCIÓN EN  
CALDO (CLSI).**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORA: YOAIRA DÍAZ  
TUTORA: MARIBEL DOLANDE**

**CARACAS, OCTUBRE 2014**

## CONSTANCIA

En mi carácter de Tutora del Trabajo Especial de Grado titulado “**Establecer puntos de cortes epidemiológicos de la actividad *in vitro* de azoles frente a los aislados de *Candida* spp., por el método de Etest y microdilución en caldo (CLSI).**”, presentado por la ciudadana Yoaira Díaz para optar al Grado de Especialista en Micología Médica, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser evaluado por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Caracas, a los 10 días del mes de octubre de 2014.

---

Maribel Dolande  
C.I: 7.217.958

**República Bolivariana de Venezuela  
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”  
Gerencia de Docencia e Investigación  
Coordinación de Postgrado  
Especialización en Micología Médica**

**ESTABLECER PUNTOS DE CORTES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA  
ACTIVIDAD *IN VITRO* DE AZOLES FRENTE A LOS AISLADOS  
DE *Candida* spp., POR EL MÉTODO DE ETEST Y MICRODILUCIÓN EN  
CALDO (CLSI).**

**Autora: Yoaira Díaz**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN MICOLOGÍA MÉDICA  
Octubre, 2014**

**APROBADO**

---

**Xiomara Moreno**

---

**Giuseppe Ferrara**

---

**Maribel Dolande**

**ACEPTADO:**

---

**Gladys González**

## **Agradecimiento**

Al instituto Nacional de Higiene Dr. "Rafael Rangel" por la oportunidad de cursar la especialización de Micología clínica

Al departamento de Micología Clínica del Instituto Nacional "Rafael Rangel" por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones, reactivos, equipos y asesoramiento académico

Afortunada de conocer los profesores que integran la plantilla académica de la especialización de micología clínica, ya que son profesionales de trayectoria impecable y preparación académica de alto nivel, excelentes.

A mi tutora Maribel Dolande por su tiempo, paciencia y dedicación al trabajo de grado, privilegiada de ser tutorada por un profesional emblemático en nuestro país, por su mística y trayectoria de alto nivel.

A la Prof. María Mercedes Panizo por su excelente desempeño en la coordinación del Postgrado.

Al Prof. Giuseppe Ferrara por su excelente desempeño en la coordinación de pasantías profesionales y la comisión académica

## **Dedicatoria**

A dios por brindarme Salud

A mi madre por estar siempre en todos los momento de mi vida

A Pamella y Paola, son mi pilar de motivación para seguir mis metas

A Veronica y Valentina mis compañeras y familia por dos años, su apoyo

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
Título, Autor, Tutor	ii
Constancia de aprobación del tutor	iii
Aprobación por jurado	iv
Agradecimiento	v
Dedicatória	vi
Índice General	vii
Índice de Tablas	viii
Resumen	x
Summary	xi
Introducción	1
Marco teórico	4
Objetivos: General y Específicos	14
Metodología	15
Muestras	15
Métodos	15
1. Determinación de CMI por microdilución en caldo	17
2. Determinación de CMI por difusión E test	19
Análisis estadístico	20
Resultados	23
Discusión de Resultados	35
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Referencias Bibliográficas	43
Anexos	53

## ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1	Distribución por especie de <i>Candida.</i> , aisladas de sangre provenientes de la Red de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, periodo 2013-2014.	26
Tabla 2	Tendencia por especie y Distribución según el Grupo Etario, Genero de paciente y Centro de Procedencia de <i>Candida</i> , aisladas de sangre provenientes de la Red de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, periodo 2013-2014.	27
Tabla 3	Distribución por Servicio, Diagnóstico y Tratamiento de <i>Candida spp.</i> , aisladas de sangre, provenientes de la Red de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, periodo 2013-2014	28
Tabla 4	Distribución de las CMI (ug/ml) para Fluconazol de especies de <i>Candida.</i> , obtenidas por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm. Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad y Valores de CMI50, CMI90, PCE, Moda y Rango. N=102.	29
Tabla 5	Distribución de las CMI (ug/ml) para Voriconazol de especies de <i>Candida</i> , obtenidas por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm. Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad y Valores de CMI50, CMI90, PCE, Moda y Rango. N= 102	30



Tabla 6	Distribución de las CMI (ug/ml) para Posaconazol de especies de <i>Candida</i> , obtenidas por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm. Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad y Valores de CMI50, CMI90, PCE, Moda y Rango. N=102	31
Tabla 7	Distribución de Punto de Corte Epidemiológico (PCE) (µg/ml) de Fluconazol en porcentaje 62,5%, 95%, 99% por especies y por método. 2013-2014	32
Tabla 8	Distribución de Punto de Corte Epidemiológico (PCE) (µg/ml) de Posaconazol en porcentaje 62,5%, 95%, 99% por especies y por método. 2013-2014	33
Tabla 9	Distribución de Punto de Corte Epidemiológico (PCE) (µg/ml) de Voriconazol en porcentaje 62,5%, 95%, 99% por especies y por método. 2013-2014	34

**República Bolivariana de Venezuela  
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”  
Gerencia de Docencia e Investigación  
Coordinación de Postgrado  
Especialización en Micología Médica**

**ESTABLECER PUNTOS DE CORTES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA  
ACTIVIDAD *IN VITRO* DE AZOLES FRENTE A LOS AISLADOS  
DE *Candida* spp., POR EL MÉTODO DE ETEST Y MICRODILUCIÓN EN  
CALDO (CLSI).**

**Autora: Yoaira Díaz**

**RESUMEN**

Durante las últimas décadas, el aumento de la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, convirtiéndose en uno de los retos sanitarios actuales dado el incremento de morbilidad y de los costos asociados a Infecciones por *Candida*; la tasa de mortalidad es del 47% marcado por el cambio epidemiológico de las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans*; las cuales presentan resistencia a los antifúngicos; por lo que es necesario establecer puntos de corte epidemiológico que permitan la indicación del antifúngico adecuado y precoz para minimizar resistencia y morbi-mortalidad. Se analizaron 102 aislados, la especie más frecuente fue *Candida pelliculosa* (43%), seguida por *C. parapsilosis* (34%), *C. tropicalis* (9%), *C. albicans* (6%), *C. lipolytica* (4%) y con un 2% correspondiente para *C. guilliermondii* y *C. glabrata*. Los valores obtenidos por microdilución en caldo y difusión por Etest, como punto de corte epidemiológico (PCE en µg/mL) fueron en fluconazol, voriconazol y posaconazol 4, 0,25 y 1 respectivamente para *C. pelliculosa*; 2, 0,06 y 0,125 para *C. parapsilosis*; 2, 0,25 y 0,125 corresponde a *C. tropicalis*; 2, 0,125 y 0,25 para *C. albicans*. A *C. lipolytica*, *C. guilliermondii* y *C. glabrata* la cantidad de aislados no eran representativo para determinar el PCE. Se encontró una resistencia de 9,8%, a los triazoles. Ambos métodos presentaron una correlación de 0.99 se recomienda el uso de Etest para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria en el Laboratorio de Microbiología y detectar resistencia de forma precoz.

**Palabras claves:** candidemia, concentración mínima inhibitoria, azoles, punto de corte epidemiológico, susceptibilidad, resistencia

**República Bolivariana de Venezuela  
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”  
Gerencia de Docencia e Investigación  
Coordinación de Postgrado  
Especialización en Micología Médica**

**ESTABLISHMENT OF EPIDEMIOLOGICAL CUTOFF FOR TRIAZOLES  
FOR ISOLATES OF *Candida* spp., USING THE METHOD OF ETEST  
AND BROTH MICRODILUTION (CLSI).**

**Author: Diaz Yoaira**

**ABSTRACT**

During the last decades, there has been a constant increase of the prevalence of fungal infections, becoming one of the actual sanitary challenges given the increase of death rates and costs associated to infections caused by *Candida*., the mortality is 47% marked by the epidemiological change of the different from the *C. albicans* species of *Candida*., which present resistance to fungus treatments, that is why it is necessary to state epidemiological cuts that allow the indication of the proper antifungus treatment at an early moment to minimize resistance and high death rate., 102 strains were analyzed., the most common species was *Candida pelliculosa* (43%), followed by *C. parapsilosis*(34%), *C tropicalis*(9%), *C albicans* (6%), *C. lipolityca* (4%), and a 2% corresponds to *C. guilliermondii* and *C . glabrata*. The values obtained by microdilution in broth and Etest diffusion as an epidemiological cutoff values (EVC in µg/ml) were in fluconazole, voriconazol and posaconazole 4, 0.25 and 1 respectively for *C. pelliculosa*., 2, 0.06 and 0.125., *C parapsilosis*; 2, 0.25 and 0.125., it corresponds to *C. tropicalis*; 2, 0.125 and 0.25 for *C albicans*, *C lipolityca*, *C. guilliermondii* and *C. glabrata* the amount of isolates was not representative enough to determine the ECV. A resistance of 9.8% was found. Both methods presented a correlation of 0.99 and the Etest is recommended to determine the minimum inhibitory concentration in laboratory to detect resistance earlier

**Keywords:** candidemia, minimum inhibitory concentration, azoles, epidemiological cutoff values, susceptibility, resistance

## Introducción

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante y coexisten micosis invasoras oportunistas con otras causadas por hongos muy adaptados para la supervivencia en los tejidos infectados [1]. La importancia clínica de las infecciones por *Candida* es controversial, los estudios sobre la epidemiología de candidemia han sido conducidos para mejorar el conocimiento sobre reservorios, modos de transmisión y factores de riesgo, el principal reservorio endógeno de especies de *Candida* es el tracto gastrointestinal [2].

La candidemia es la presentación clínica más frecuente de la candidiasis invasora, aún cuando más del 30 % de estas infecciones no producen cultivos de sangre positivos. Por tanto, el uso de terapia empírica implica la exposición al antifúngico como un factor importante en el desarrollo y la aparición de cepas con fenotipos de resistencia. [4,5].

*Candida albicans* es el agente etiológico predominante, representando el 50 % de todos los casos. Sin embargo, existe un cambio epidemiológico en las últimas décadas, las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* se han convertido en una causa importante de fungemias graves por presentar resistencia a los antifúngicos; Por otra parte, hay una distribución diferente de las especies de *Candida* no *albicans* en relación a los pacientes y las características del hospital [6,7]. Entre las especies más prevalente, *Candida parapsilosis* se ha asociado a la candidemia en los recién nacidos y adultos jóvenes. Esta especie suele tener un origen exógeno y contamina los

dispositivos médicos, causando candidemias asociada al catéter venoso central. [6,7]. *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* son aislados en hemocultivos de pacientes de edad avanzada (> 65 años) con importantes factores de riesgo, tales como la cirugía abdominal mayor, tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas, trasplantes y/o el tratamiento prolongado con corticoides. La candidemia representa un 46,7% en estos pacientes y un 30% en pacientes ingresados en UCI. [8, 9].

En la actualidad, se ha informado de diferencias geográficas importantes en la distribución de las especies de *Candida* diferentes de *C. albicans* que causa la candidiasis invasora: *C. parapsilosis* predomina en Australia, América Latina y los países mediterráneos de África, Asia y Europa. Por el contrario, *C. glabrata* tiene un papel etiológico importante en EE.UU, Centro y Norte de Europa [10,11]. Por último, es preocupante que la mortalidad debida a la candidiasis invasora sigue siendo inaceptablemente alta 47%. [10, 11, 12].

Lo antes descrito tiene importancia en la elección de la terapia antifúngica, especialmente cuando se basa en el perfil de susceptibilidad de las diferentes especies de *Candida* para los distintos antifúngicos con el fin de indicar el tratamiento adecuado y oportuno, para alcanzar el éxito terapéutico [13, 14].

Por tal razón, esta investigación establecerá los puntos de corte epidemiológicos (PCE) a los azoles (fluconazol, voriconazol y posaconazol) de las especies de *Candida* como agente etiológico de candidiasis invasora mediante la obtención y distribución de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por los métodos de Etest y microdilución en caldo (CLSI) ambas técnicas son conocidas y aprobadas por el CLSI, los cuales se ejecutarán para conocer el perfil de susceptibilidad en las cepas autóctonas aisladas en los diversos centros de salud que integran la Red de Candidemia, el PCE se ajusta más a la realidad de las cepas que circulan en nuestro medio, ya que en estudios recientes se ha incorporado éste parámetro más confiable que el punto de corte clínico para detectar resistencia cuya correlación *in vivo* e *in vitro* es más acertado a lo reportado por el médico en la evolución clínica del paciente ya que se basa en el estudio de la epidemiología local [15,16,17].

## Marco teórico

El aislamiento de las especies de *Candida* es controversial ya que forman parte de la microbiota en humanos (fuente endógena), pero también existe la fuente exógena que es transmitida en la mayoría de los casos a través de las manos del personal de salud, de hecho se reportan con frecuencia brotes nosocomiales. Las especies de *Candida* se encuentran en el tracto gastrointestinal en 20-80% de adultos sanos; cuando se alteran las barreras físicas o existe alteración metabólica de la defensa del huésped pueden ser causa de micosis oportunistas y una de las principales causas de fungemia nosocomial. Actualmente las especies de *Candida albicans* son responsables de un amplio espectro de enfermedades que incluyen candidemia con o sin presentación de endoftalmitis; infección hematológica diseminada a órganos profundos y en pacientes hematológicos se describe con frecuencia candidiasis hepatoesplénica crónica [18].

Por otro lado, la alta frecuencia de *C. parapsilosis*, que normalmente coloniza la piel, en pacientes pediátricos y pacientes con insuficiencia renal crónica, puede estar asociada con el frecuente uso de catéteres centrales y nutrición parenteral [18].

En recién nacido se han descrito *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, previamente clasificados como *C. parapsilosis*, son responsables de un 28,3% de candidemia. La identificación de estas nuevas especies puede ser importante, ya que pueden variar en factores de virulencia, modo de

transmisión y susceptibilidad a los agentes antifúngicos. [19]. *Candida tropicalis* es una causa importante de fungemia en pacientes oncológicos y no oncológicos con catéteres venosos centrales y tratados con antibióticos de amplio espectro [20,21,22,23].

Con el transcurrir de los años se destaca la importancia del aislamiento e identificación de este hongo, ya que su comportamiento es poco uniforme frente a los antifúngicos y suele desarrollar resistencia secundaria a los azoles de forma rápida [24].

En Venezuela se han comenzado a realizar importantes estudios para lograr el control y vigilancia epidemiológica de la candidiasis y así conocer los patrones variantes tanto en la epidemiología como en la susceptibilidad, tal como lo reporta Panizo et al., en donde se evalúa el perfil de susceptibilidad de 145 cepas de *Candida* spp, recuperadas en un año (2006-2007), los aislamientos más frecuentes fueron *Candida* no *albicans* (72.4%) y *C. albicans* (27.6%) [25].

Dolande y cols., también reporta la distribución de *Candida* spp., y el bajo porcentaje de resistencia a fluconazol y voriconazol de la Red de candidemia y vigilancia de resistencia a los antifúngicos, los datos son similares a los publicados por Panizo et al. [26,27]. Actualmente en un estudio realizado por Perozo A y cols., determinaron la susceptibilidad a fluconazol y voriconazol por el método de difusión, de cepas de *Candida*, aisladas de hemocultivos en



Maracaibo, Venezuela. 2011; de 78 cepas estudiadas; 89,74% era *Candida no albicans* y *Candida albicans* representaba 10.26%, se detectó bajo porcentaje de resistencia a fluconazol y voriconazol [27].

### **Antifúngicos en estudio**

**Triazoles:** fluconazol, voriconazol y posaconazol, todas estas moléculas comparten el mismo mecanismo de acción es fungistático e inhiben la síntesis del ergosterol a través del bloqueo de la 14  $\alpha$  lanosterol desmetilasa citocromo P450 dependiente, alterando la membrana de la pared fúngica; son agentes antifúngicos seguros y eficaces en el tratamiento de candidiasis invasora. Los triazoles de espectro extendido (voriconazol y posaconazol), muestran una mayor potencia que el fluconazol frente a especies de *Candida*. El uso profiláctico y a veces indiscriminado de estos agentes, especialmente el fluconazol, favorece el desarrollo de resistencia secundaria a esta clase de antifúngicos [28].

La acumulación de 14  $\alpha$  metil esteroides en la superficie del hongo es potencialmente tóxica, lo que produce la ruptura de la unión de los fosfolípidos afectando funciones enzimáticas de la membrana e inhibe la transformación de levadura a micelio, lo que trae como consecuencia una disminución en la adhesión celular de los hongos [29].

Existen mecanismos de resistencia relacionada con los azoles; entre ellos las bombas de eflujo que se describe con *Candida glabrata*, invariablemente conducen a la resistencia cruzada. Las mutaciones en el gen ERG-11 y los

cambios en la orientación de la enzima 14- $\alpha$ -desmetilasa, se menciona en *Candida krusei* con fluconazol, los triazoles de segunda generación (voriconazol y posaconazol) tienen una mayor afección por la enzima. Debido a que los triazoles se eliminan a través del metabolismo hepático, existen muchas interacciones con otros medicamentos [28, 29].

**Fluconazol:** tiene un perfil de seguridad excelente, buena absorción en el tracto gastrointestinal y la distribución en diferentes compartimentos del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central y el sistema ocular con una penetración de 80%; tiene una excelente biodisponibilidad (> 90 %), con una vida media plasmática de aproximadamente 20 h en niños frente a 30 h en adultos. Fluconazol es eficaz en el tratamiento de infecciones superficiales y profundas por *Candida* spp; la administración parenteral (200mg) es soluble en agua y se dispone de capsulas orales (100 mg y 150 mg), los efectos secundarios son infrecuentes e incluyen molestias gastrointestinales (7,7 %) o erupción en la piel (1,2 %); la leucopenia y trombocitopenia son raros, hay algún bloqueo en la síntesis hormonal con fluconazol y la dosis debe ser reducida a pacientes con aclaramiento de creatinina <50 ml / min. [35]. La mayoría de los casos de toxicidad están relacionados con la hepatitis inducida por medicamentos y con frecuencia son asintomáticas. [29,30].

Fluconazol tiene buena actividad *in vitro* e *in vivo* en el género *Candida* a excepción *Candida krusei*, que tiene resistencia primaria, y *Candida*

*glabrata*, que tiene una menor susceptibilidad a fluconazol, en particular en pacientes con exposición previa a este antifúngico [29, 30].

**Voriconazol:** es un derivado de fluconazol, es un triazol de segunda generación con amplio espectro de actividad contra levaduras y mohos; en particular contra *Aspergillus*. Tiene una alta biodisponibilidad (90%), que es ampliamente metabolizado por el citocromo P450 2C19 del hígado y los polimorfismos genéticos de esta enzima juega un papel importante en la farmacocinética. En los adultos la farmacocinética no lineal saturables y acumulable con una vida media de 6 horas. En pediatría la farmacocinética es lineal, sin acumulación después de dosis múltiples. [31,32].

Este fármaco está disponible en comprimidos de 50 y 200 mg, la formulación oral tiene buena biodisponibilidad, permite una terapia secuencial segura y nivel terapéutico en diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, el uso de viales de 200 mg para la administración intravenosa cuyo excipiente es ciclodextrina debe ser evaluado en base la depuración de creatinina por debajo de 50 ml/min, ya que el excipiente (ciclodextrina) se puede acumular en el riñón. [31, 32].

Se requieren ajustes de dosis en casos de deterioro hepático moderado y los riesgos-beneficios deben medirse en formas graves de insuficiencia hepática, la eliminación renal del principio activo es mínima, sin necesidad de ajuste de la dosis cuando se usa la formulación oral [33,34].

Los principales efectos adversos son transitorios alteraciones visuales (hasta un 30% de los pacientes) reversible con discontinuación de la droga, las elevaciones de las transaminasas y bilirrubina, reacciones cutáneas y foto sensibilidad (hasta 25%); se recomienda evitar la exposición al sol y/o utilizar protector solar [34].

**Posaconazol:** está indicado para tratamiento profiláctico en pacientes inmunocomprometidos con sospecha de enfermedad fúngica posible o probable y aprobado para la candidiasis diseminada, candidiasis orofaríngea grave y aspergilosis refractaria por la Food and Drug Administration (FDA). Está disponible como una formulación oral y su espectro de acción más amplio incluyen actividad contra Zygomycetes, el uso en la población pediátrica es muy limitado [32,33].

Su estructura química ha sido modificada a partir de la molécula de itraconazol, tiene un amplio espectro antifúngico; tiene una vida media de 25 h, se alcanzan concentraciones plasmáticas en estado estacionarios los 7 a 10 días siguientes de dosis múltiples de administración, la exposición varía según el contenido de grasa de la dieta (es decir, de alta dietas ricas en grasas aumentan la exposición sistémica), el fármaco no es un sustrato para el sistema enzimático citocromo P - 450. [34].

La absorción puede disminuir en ciertas condiciones, cuando el paciente está recibiendo un inhibidor de la bomba de protones, su disponibilidad única

es una formulación en suspensión oral puede ser una limitación para los pacientes que están clínicamente inestables y/o con problemas para tragar, la formulación intravenosa están en desarrollo [34].

### **Pruebas de susceptibilidad**

En los últimos años se han estandarizado varias técnicas para la detección de resistencias *in vitro* que muestran cierta correlación con la evolución clínica de los pacientes. Es importante destacar que algunas prácticas terapéuticas, como el uso de la profilaxis antifúngica y de los tratamientos empíricos, han generado cambios epidemiológicos, entre los que destacan la aparición de hongos que han desarrollado resistencia secundaria a los antifúngicos y la sustitución de algunas especies sensibles por otras con resistencia intrínseca [34].

Por eso, es importante conocer el perfil de sensibilidad de las cepas clínicas y el espectro de acción de los antifúngicos. Desde la aparición de nuevas moléculas antifúngicas y de estrategias terapéuticas novedosas, la detección de la resistencia podría ser vital a la hora de elegir una alternativa terapéutica [35,36].

## **Métodos para el estudio de sensibilidad**

Existen varios métodos estandarizados para detectar resistencias *in vitro* en levaduras. Los comités internacionalmente reconocidos en esta área son Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Subcommittee for Antifungal Testing, y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) que han desarrollado la técnica de microdilución en caldo que se considera el método de referencia a nivel mundial, el cual es sensible, reproducible pero laborioso y requiere de gran cantidad de insumos y reactivos, así como la experticia y dedicación del operador.

Cabe destacar que se han desarrollado varios métodos de fácil ejecución e interpretación que pueden ser utilizados en los laboratorios de microbiología de forma rutinaria tales como las tabletas o discos de sensibilidad, las tiras de Etest, basadas en la técnica de difusión en agar, además de los sistemas automatizados como el ATB-Fungus, Sensititre Yeast One System y recientemente la incorporación del sistema VITEK 2 método automatizado de susceptibilidad antifúngica creado por Biomérieux, los cuáles comienzan a ser objeto de estudios y de investigación, a fin de contar con la técnica que se ajuste más a las necesidades de cada laboratorio de Microbiología.

El método de difusión en agar Etest ha sido validado y ampliamente estudiado en la determinación de la actividad antifúngica contra varios

géneros de hongos incluyendo especies de *Candida*, el cual permite determinar valores de CMI frente a diversos antifúngicos. Las tiras de Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia), están disponibles comercialmente para anfotericina B, fluconazol, itraconazol, fluocitosina, voriconazol, posaconazol, anidulafungina y caspofungina.

La ventaja más notable de esta técnica es su fácil ejecución y requiere de pocos insumos, ha resultado un método muy eficaz para detectar resistencia cuando se compara con la técnica de referencia de microdilución en caldo. El medio recomendado en su ejecución es el RPMI 1640, pero se han utilizado otros medios con buena reproducibilidad de los resultados entre los que cabe mencionar el agar Mueller Hinton suplementado con 2% de glucosa y azul de metileno él cual es el medio aprobado por el CLSI en su documento M44-A2 para la pruebas de disco difusión en agar. Se ha reportado en distintos estudios una concordancia aceptable entre Etest, CLSI y EUCAST, aproximado al 90% [35,36].

CLSI y EUCAST han establecido los puntos de corte clínico conocido por sus siglas en inglés (BPC) para los cuales se toman en consideración algunos parámetros como farmacocinética y farmacodinamia de la droga y relacionan la actividad *in vitro* e *in vivo* del fármaco con el paciente, por lo que proporcionan información útil y confiable en la escogencia del mismo de acuerdo al agente causal de la enfermedad fúngica invasora (EFI). En estudios recientes se ha incorporado un nuevo concepto o parámetro más

confiable que el BPC para detectar resistencia que es el punto de corte epidemiológico (PCE conocido por sus siglas en inglés como ECV) cuya correlación *in vivo* e *in vitro* es más acertado a lo reportado por el médico en la evolución clínica del paciente [32, 33,34, 35, 36].



## **Objetivo General**

Establecer puntos de corte epidemiológicos de la actividad *in vitro* de azoles frente a los aislados de *Candida* spp., por el método Etest y microdilución en caldo (CLSI).

## **Objetivos Específicos**

1. Obtener la Concentración Mínima Inhibitoria de *Candida* spp., a fluconazol, voriconazol y posaconazol, por el método de microdilución en caldo (CLSI) y el método Etest.
2. Establecer los puntos de corte epidemiológicos de la actividad *in vitro* de fluconazol, voriconazol y posaconazol, por ambos métodos frente a los aislados de *Candida* spp.
3. Calcular el coeficiente de correlación entre los métodos Etest y CLSI para la susceptibilidad de fluconazol, voriconazol y posaconazol.

## **Metodología**

### **Diseño de la Investigación**

Se diseñó un estudio descriptivo, comparativo y experimental, para evaluar el perfil antifúngico de *Candida* spp., frente a fluconazol, voriconazol y posaconazol determinando CMI por el método referencia microdilución en caldo del (CLSI) frente al método de difusión Etest®.

### **Muestras**

Se analizaron 102 cepas de *Candida* spp.; las cuales cumplían con datos demográficos completos, los aislados en sangre eran provenientes de distintos centros hospitalarios del país, que integran la Red de Candidemia y Vigilancia de la resistencia a los antifúngicos del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR).

### **Ética de la Investigación:**

El diseño de esta investigación no contempló procedimientos experimentales con seres humanos ni animales, ni con muestras biológicas derivadas directamente de éstos; se trabajó con cepas fúngicas. Sin embargo, por ser estas cepas provenientes de sangre, el desarrollo de este trabajo de grado se llevó a cabo respetando los lineamientos y siguiendo las normas de asesoría referentes al procesamiento de muestras biológicas de origen humano, estipuladas por el Comité de Bioética correspondiente;

habiendo realizado la solicitud para el consentimiento expreso y calificación por parte de éste.

### **Conservación de los aislados**

Los aislados de *Candida* spp., previamente identificados se preservaron por el método de Castellani hasta el momento de su procesamiento [43]

### **Control de calidad:**

Se llevó a cabo un Control de Calidad de los procedimientos, utilizando las cepas derivadas (ATCC 22019) *Candida parapsilosis*, y (ATCC 6258) *Candida krusei*, provenientes de la micoteca del Departamento de Micología del INHRR

### **Procedimientos**

Se realizó la evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos de las cepas de *Candida* spp., por los métodos CLSI y Etest®.

Para trabajar con las cepas se procedió a resuspenderlas del vial en donde se conservan, se hace un primer repique en Agar Sabouraud Dextrosa + cloranfenicol (ASD+C), una vez crecida la levadura, se realizó un segundo repique para ser utilizado en los distintos ensayos, según cada método. Previo a éste paso se verificó su pureza pasando las colonias levaduriformes por el medio agar cromogénico y corn meal agar (CMA). El inóculo para los ensayos de cada metodología se preparó a partir de cultivos en ASD no mayor de 24 horas de incubación a 30°C.

**Determinación de CMI a fluconazol, voriconazol y posaconazol  
por Microdilución en Caldo por CLSI**

En la realización de éste ensayo se siguió por el procedimiento descrito en el documento M27-A3/M27-S4 del CLSI. El ensayo se organizó y se realizó en el laboratorio del Departamento de Micología del INHRR.

Este método se compone de dos fases:

1.- Sensibilización de placas:

A partir de una solución madre del antifúngico se realizó nueve diluciones consecutivas iniciada 1:2 utilizando agua destilada estéril para fluconazol y DimetilSulfóxido (DMSO) para voriconazol y posaconazol, obteniendo los siguientes intervalos de concentración:

<b>Antifúngico</b>	<b>Máxima µg/ml</b>	<b>Mínima µg/ml</b>
Fluconazol	12.800	25
Voriconazol	1.600	3
Pozaconazol	1.600	3

Posteriormente se realizó una dilución 1/50 en medio de RPMI, a partir de la serie anterior (9.8ml RPM+0.2 ml de la dilución); obteniéndose el siguiente intervalo de concentraciones.

<b>Antifúngico</b>	<b>Máxima µg/ml</b>	<b>Mínima µg/ml</b>
Fluconazol	256	0.5
Voriconazol	32	0.06
Pozaconazol	32	0.06

Las distintas concentraciones fueron dispensadas en microplacas estériles de cultivo celular con 96 pocillos en forma de U a razón de 100µl en cada uno, desde las columnas 1 al 10. En las microplacas, se inocularon 100 µl de las distintas concentraciones desde los pocillos 1 al 10, quedando así las placas sensibilizadas con las siguientes concentraciones finales:

FLUCONAZOL: 128-64-32-16-8-4-2-1-0.5-0.25 (µg/ml).

VORICONAZOL: 16-8-4-2-1-0.5- 0.25- 0.13- 0.06-0.03 (µg/ml).

POZACONAZOL: 16-8-4-2-1-0.5- 0.25- 0.13- 0.06-0.03 (µg/ml).

Se sensibilizaron 52 placas de cada antifúngico y se congelaron a -70°C hasta su uso.

## 2.- Preparación de inóculo y determinación de la prueba de sensibilidad:

Para la obtención del inóculo se preparó una suspensión ajustada a la escala de turbiedad 0,5 McFarland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/ml) a partir de un cultivo de 24 h de incubación en agar Sabouraud y seguidamente se realizó una primera dilución 1/50 a partir de la suspensión 0.5 Mc Farland, en solución

salina estéril y posteriormente de esa suspensión ya diluida se realizó una segunda dilución 1/20 en medio de RPMI 1640 con el fin de obtener la concentración final del inóculo de  $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC/ml. Para la inoculación de las placas previamente sensibilizadas con el antifúngico, se dispensara 100 $\mu$ l del inóculo del pocillo 1 al 11; el pocillo 11 es el control de crecimiento y por lo tanto contiene sólo inóculo y RPMI; el pocillo 12 se inoculara con 200 $\mu$ l de RPMI porque se utiliza como control de esterilidad. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Las placas se incubaron a 35°C durante un periodo máximo de 24 horas y al término de la incubación se realizó la lectura visual.

Para la determinación del CMI, el punto de lectura de los azoles se tomó como la reducción significativa  $\geq 50\%$  con respecto al control de crecimiento

#### **Determinación de CMI a fluconazol, voriconazol y posaconazol por Etest®.**

Este método se ejecutó siguiendo las instrucciones del fabricante, el medio de cultivo utilizado fue el agar RPMI 1640 (Glutamina sin bicarbonato y rojo fenol como indicador de pH). Se preparó una suspensión del inóculo en solución salina al 0.85% ajustado a una turbidez de 0.5 McFarland y con un hisopo estéril, se dispense sobre el medio en tres direcciones. Se dejó secar por 15 minutos aproximadamente, al término de ese tiempo se colocaron las

tiras de Etest® (AB BIOMÉRIEUX) para fluconazol, voriconazol y posaconazol dejándolas caer sobre el agar en direcciones opuestas.

Las placas fueron incubadas a 35° C y leídas a las 24 horas, la concentración mínima inhibitoria se interpretó como la menor concentración de droga obtenida cuando el borde de la elipse de inhibición intercepta la escala de medición de las tiras. La lectura de CMI para los azoles se tomó como la reducción significativa de crecimiento aproximada del 50% de inhibición. [40,41]

### **Análisis de Datos**

Los resultados obtenidos se tabularon por el programa estadístico Stata 11.1 y SPSS 21.0 para calcular las medidas de tendencia central: media geométrica (MG), desviación estándar (DS), moda (M), y rangos de concentración para cada antifúngico. También se realizó histogramas para observar la distribución de las CMI de cada antifúngico. Para el análisis de la susceptibilidad a los antifúngicos se calcularan las CMI50 y CMI90, que representaran los valores que inhiben al 50 y 90% de los aislamientos, respectivamente. [43]

### **Puntos de corte epidemiológicos**

En el caso de los puntos de corte epidemiológicos (PCE) para fluconazol, voriconazol y posaconazol se realizó de manera visual, teniendo en cuenta la

distribución de la CMI de los aislados de *Candida*, la moda para cada distribución y la variabilidad inherente de la prueba (1 desviación estándar), lo que representa aproximadamente un 65% de los aislados como es su distribución normal y se excluyeron las cepas resistentes, es lo que determina la población salvaje.

El punto de corte epidemiológico es el valor de CMI obtenido después de tomar en consideración la moda + 1 dilución del antifúngico, verificando la reproducibilidad de las CMI; generalmente este valor corresponde a la CMI que define el límite superior de una población salvaje. La CMI de una población salvaje se encuentra a + 2 diluciones alrededor de la moda y se categoriza aplicando los puntos de corte epidemiológicos [35,36].

Fueron analizados e interpretados los valores de Concentración Mínima Inhibitoria para cada antifúngico, de acuerdo con los puntos de corte establecidos para cada técnica.

Se determinó la correlación entre los métodos a través de análisis de regresión lineal (coeficiente de correlación de Pearson).

### **Interpretación de los Resultados**

Para la interpretación de los datos se utilizaron los puntos de corte aprobados por el CLSI para fluconazol: susceptible  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$ , susceptible



dosis dependiente (SDD) 4 µg/ml, resistente  $\geq 8$  µg/ml para *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; *C. krusei* SDD  $\leq 32$  µg/ml y resistente  $\geq 64$  µg/mL, para las otras especies de *Candida* SDD  $\leq 32$  µg/ml, para voriconazol susceptible  $\leq 0,12$ µg/ml, SDD 0,25-0,5 µg/ml, resistente  $\geq 1$  µg/ml para *C.albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*; *C. krusei* y las demás especies de *Candida* susceptible  $\leq 0,5$  µg/ml SDD  $\leq 1$  µg/ml y resistente  $\geq 2$  µg/ml, pozaconazol no tiene punto de corte clínico establecidos, para su interpretación.

Debido a que la escala de medida de Etest tiene un gradiente continuo de concentración, los valores de CMI encontrados entre dos diluciones se ajustaron al siguiente nivel superior en la escala del método de referencia a fin de poder armonizar los resultados obtenidos con el método de referencia, lecturas de CMI por encima de los límites de la escala fueron llevados al límite máximo superior y los resultados por debajo del límite inferior fueron ajustados a la dilución más baja de la escala.

## Resultados

De un Total de 102 cepas de *Candida* spp., procedentes de la Red de Candidemia, del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, la distribución por especies mostró a *Candida pelliculosa* como la especie más frecuente con un 43%, seguida por *C. parapsilosis* (34%), *C. tropicalis* (9%), *C. albicans* (6%), *C. lipolytica* (4%) y con un 2% correspondiente para *C. guilliermondii* y *C. glabrata*. Estos resultados se muestran en la tabla 1.

La distribución de los datos demográficos por especies. Tablas 2 y 3.

La distribución de las CMI (ug/ml) para cada azol por especies de *Candida*, obtenidas por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm, y Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad y Valores de CMI50, CMI90, PCE, Moda y Rango. Tablas 4, 5 y 6

Distribución del punto de Corte Epidemiológico (PCE)  $\mu\text{g/ml}$  de cada azol en porcentaje 62,5%, 95% 99% por especies y por método. Se detalla en las tablas 7, 8 y 9.

**Tabla 1. Distribución por especie, de cepas *Candida* spp., aisladas de sangre provenientes de la Red de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, periodo 2013-2014.**

<b>Especie</b>	<b>Numero</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b><i>Candida pelliculosa</i></b>	44	43
<b><i>Candida parapsilosis</i></b>	35	34
<b><i>Candida tropicalis</i></b>	9	9
<b><i>Candida albicans</i></b>	6	6
<b><i>Candida lipolytica</i></b>	4	4
<b><i>C. guilliermondii</i></b>	2	2
<b><i>C. glabrata</i></b>	2	2
<b>Total</b>	102	100%

**Tabla 2. Tendencia por especie de *Candida* y Distribución según el Grupo Etario, Genero de paciente y Centro de Procedencia. Red de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, periodo 2013-2014. N=102**

Especie	<i>C. pelliculosa</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. lipolytica</i>		<i>C. guilliermondii</i>		<i>C. glabrata</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Grupo</b>														
0-1 mes	20	45	7	20	-	-	-	-	-	-	1	50	-	-
2 meses-1	13	30	5	14	3	33	-	-	-	-	1	50	-	-
2-5 años	7	16	3	9	-	-	1	17	-	-	-	-	-	-
6-20 años	4	9	5	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-50 años	-	-	7	20	2	22	1	17	1	25	-	-	-	-
> 50 años	-	-	8	23	4	45	4	66	3	75	-	-	2	100
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>100</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>9</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>
<b>Genero</b>	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Femenino	21	48	10	29	6	67	2	33	1	25	1	50	2	100
Masculino	23	52	25	71	3	33	4	67	3	75	1	50	-	-
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>100</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>9</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>
<b>Centro</b>	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CHET	41	93	19	54	5	56	3	50	-	-	2	100	-	-
HUAL	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSS	-	-	13	37	4	44	3	50	4	100	-	-	2	100
MSA	-	-	2	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HUC	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>100</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>9</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>	<b>4</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>100</b>

CHET: Ciudad Hospitalaria Dr. "Enrique Tejera"/ HUAL: Hospital Universitario Dr. "Ángel Larralde"/ CSS: Clínica Santa Sofía/HUC: Hospital Universitario Clínico

**Tabla 3. Distribución de *Candida* spp., por Servicio, Diagnóstico y Tratamiento. Red de Candidemia del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, periodo 2013-2014. N=102**

Servicio	Especie	<i>C. pelliculosa</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. lipolytica</i>		<i>C. guilliermondii</i>		<i>C. glabrata</i>		
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Servicio	UTI	-	-	4	11	1	11	5	83	2	50	-	-	1	50	
	UTIN	14	32	10	29	1	11	-	-	-	-	1	50	-	-	
	RET	11	25	4	11	-	-	-	-	-	-	1	50	-	-	
	UCI	-	-	13	37	3	34	-	-	2	50	-	-	1	50	
	HP	8	18	3	9	-	-	1	17	-	-	-	-	-	-	
	EP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	HIDRAT	11	25	-	-	2	22	-	-	-	-	-	-	-	-	
	OHM	-	-	1	3	2	22	-	-	-	-	-	-	-	-	
	MED INT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Total	44	100	35	100	9	100	6	100	4	100	2	100	2	-	
Diagnóstico y/o Enfermedad Base	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
	Sepsis	34	77	18	51	4	44	3	50	1	25	2	100	-	-	
	IDAS Convul.	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Oncológico	-	-	6	17	1	12	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Trasplantado	-	-	-	-	2	22	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cirugía	-	-	1	3	-	-	1	17	-	-	-	-	-	-	
	Neumonía	5	12	2	6	2	22	1	17	-	-	-	-	-	-	
	DMI	-	-	2	6	-	-	-	-	2	50	-	-	-	-	
	Pancreatitis	1	2	-	-	-	-	1	17	-	-	-	-	-	-	
	HIV	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Anast Intest	-	-	1	3	-	-	-	-	1	25	-	-	-	-	
	Valvulopatías	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50	
	Traumatismo	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LOE Cerebral	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LLA	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cardiopatía	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	DerramPleural	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SDR	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	N E Especifica	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50
	Total	44	100	35	100	9	100	6	100	4	100	2	100	2	100	
Tratamiento	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
	Antimicrobian	29	66	12	34	5	56	3	50	-	-	-	-	-		
	Antifungico	1	2	8	23	3	33	-	-	-	-	-	-	1	50	
	Ambos	14	32	15	43	1	11	3	50	4	100	2	100	1	50	
Total	44	100	35	100	9	100	6	100	4	100	2	100	2	100		

**Tabla 4. Distribución de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) para FLUCONAZOL de *Candida* spp., por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm. Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad y Valores de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, PCE, Moda y Rango. N=102**

Especie	Método	Valores de CMI obtenidas por Método										Interpretación %			Valores Estadísticos					
		0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	12	S	SDD	R	Rango	Moda	Media	CMI50	CMI90	PCE
<i>C. pelliculosa</i> (44)	Mic. Caldo	-	-	1	17	9	4	11	1	-	1	-	97,7	2,3	1-128	2	9,97	4	16	4
	ET RPMI	-	-	1	16	10	8	4	4	-	1	-	97,7	2,3	1-128	2	10,4	4	32	4
	ET MHm	-	-	4	8	9	5	8	7	2	1	-	93,2	6,8	1-256	4	18,2	8	32	8
<i>C. parapsilosis</i> (35)	Mic. Caldo	1	6	12	8	7	1	-	-	-	-	77	20	3	0,25-8	1	1,9	1	4	2
	ET RPMI	-	8	10	6	10	1	-	-	-	-	69	28	3	0,5-8	1	2,2	2	4	2
	ET MHm	1	2	12	10	4	5	1	-	-	-	72	11	17	0,03-16	1	3,2	2	8	2
<i>C. tropicalis</i> (9)	Mic. Caldo	-	2	-	-	2	-	-	1	-	4	22	22	56	0,5-128	128	61,4	32		8
	ET RPMI	1	1	1	1	-	-	-	-	2	3	44	-	56	0,25-256	64	85,8	64		4
	ET MHm	-	1	2	1	-	-	-	-	2	3	44	-	56	0,5-256	64	85,8	64		4
<i>C. albicans</i> (6)	Mic. Caldo	1	1	1	1	-	-	-	-	-	2	67	-	33	0,5-128	128	43,3	1,5		2
	ET RPMI	-	2	1	1	-	-	-	-	-	2	67	-	33	0,5-256	0,5	86	1,5		2
	ET MHm	-	2	2	-	-	-	-	-	-	2	67	-	33	0,5-256	0,5	65	1		2
<i>C. lipolytica</i> (4)	Mic. Caldo	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	100	-	1-2	2	1,8	2		4
	ET RPMI	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	100	-	2-2	2	2	2	2	4
	ET MHm	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	100	-	2-2	2	2	2		4
<i>C. guilliermondi</i> (2)	Mic. Caldo	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
	ET RPMI	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
	ET MHm	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> (2)	Mic. Caldo	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
	ET RPMI	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
	ET MHm	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-

Mic. Caldo: Microdilución en caldo

ET RPMI: Difusión por tiras Etest en agar RPMI

ET MHm: Difusión por tiras Etest en agar Mueller Hinton

**Tabla 5. Distribución de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) para VORICONAZOL de *Candida* spp., por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm y Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad.**

Especie	Método	Valores de CMI obtenidas por Método										Interpretación %			Valores Estadísticos					
		0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	S	I	R	Rango	Moda	Media	CMI50	CMI90	PCE
<i>C. pelliculosa</i> (44)	Mic. Caldo	1	14	12	7	7	1	2	-	-	-	93,2	2,3	4,5	0,03-2	0,06	0,28	0,125	0,5	0,25
	ET RPMI	2	11	14	7	7	1	2	-	-	-	93,2	2,3	4,5	0,03-2	0,125	0,33	0,125	1	0,25
	ET MHm	5	8	14	4	10	1	1	1	-	-	93,2	2,3	4,5	0,03-4	0,125	0,59	0,25	2	0,25
<i>C. parapsilosis</i> (35)	Mic. Caldo	20	13	1	1	-	-	-	-	-	-	97	3	-	0,03-0,25	0,03	0,05	0,03	0,03	0,06
	ET RPMI	21	10	4	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	0,03-125	0,03	0,04	0,03	0,13	0,06
	ET MHm	17	8	9	1	-	-	-	-	-	-	97	3	-	0,03-0,25	0,03	0,06	0,06	0,13	0,06
<i>C. tropicalis</i> (9)	Mic. Caldo	1	1	2	1	-	-	-	-	-	4	45	11	44	0,06-16	16	7,2	0,25		0,25
	ET RPMI	1	1	2	1	-	-	-	-	-	4	45	11	44	0,03-32	32	14,3	0,25		0,25
	ET MHm	-	3	1	1	-	-	-	-	1	3	45	11	44	0,06-32	32	11,6	0,25		0,125
<i>C. albicans</i> (6)	Mic. Caldo	2	3	-	-	-	-	-	-	-	1	83	-	17	0,03-16	0,06	2,7	0,06		0,125
	ET RPMI	4	-	1	-	-	-	-	-	-	1	83	-	17	0,03-32	0,03	5,4	0,03		0,06
	ET MHm	4	-	1	-	-	-	-	-	-	1	83	-	17	0,03-16	0,03	2,7	0,03		0,06
<i>C. lipolytica</i> (4)	Mic. Caldo	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	0,03-0,06	0,06	0,05	0,06		0,125
	ET RPMI	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	0,03-0,06	0,03	0,04	0,04		0,125
	ET MHm	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	0,03-0,125	0,06	0,06	0,06		0,125
<i>C. guilliermondii</i> (2)	Mic. Caldo	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET RPMI	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET MHm	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> (2)	Mic. Caldo	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET RPMI	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET MHm	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-

Mic. Caldo: Microdilución en caldo    ET RPMI: Difusión por tiras Etest en agar RPMI    ET MHm: Difusión por tiras Etest en agar Mueller hinton

**Tabla 6. Distribución de las CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) para POSACONAZOL de *Candida* spp., por Microdilución en Caldo y Difusión en Agar Etest con RPMI y MHm. Frecuencia de los aislados por categoría de Susceptibilidad.**

Especie	Método	Valores de CMI obtenidas por Método										Distribución		Datos estadísticos					
		0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	$\leq$ PCE %	> PCE %	Rango	Moda	Media	CMI 50	CMI 90	PCE
<i>C. pelliculosa</i> (44)	Mic. Caldo	-	2	3	8	25	6	-	-	-	-	100	-	0,06-1	0,5	0,47	0,5	1	1
	ET RPMI	2	4	5	7	15	10	1	-	-	-	98	2	0,03-1	0,5	0,50	0,5	1	1
	ET MHm	1	4	4	9	14	11	1	-	-	-	98	2	0,03-2	0,5	0,52	0,5	1	1
<i>C. parapsilosis</i> (35)	Mic. Caldo	3	20	8	4	-	-	-	-	-	-	89	11	0,03-0,25	0,06	0,09	0,03	0,25	0,125
	ET RPMI	23	6	5	-	1	-	-	-	-	-	83	17	0,03-0,5	0,03	0,06	0,06	0,125	0,06
	ET MHm	16	11	6	1	1	-	-	-	-	-	77	23	0,03-0,5	0,03	0,07	0,06	0,125	0,06
<i>C. tropicalis</i> (9)	Mic. Caldo	-	4	1	-	-	-	-	-	-	4	56	44	0,06-16	16	7,1	0,12		0,125
	ET RPMI	1	1	2	1	-	-	-	-	-	4	44	56	0,03-32	32	14,2	0,06		0,125
	ET MHm	-	3	1	1	-	-	-	-	1	3	56	44	0,03-32	32	14,2	0,06		0,125
<i>C. albicans</i> (6)	Mic. Caldo	1	1	3	-	-	-	-	-	-	1	67	33	0,03-16	0,125	2,7	0,125		0,25
	ET RPMI	3	2	-	-	-	-	-	-	-	1	83	17	0,03-32	0,03	5,4	0,04		0,06
	Agar Etest MH	2	3	-	-	-	-	-	-	-	1	83	17	0,03-32	0,06	5,4	0,06		0,125
<i>C. lipolytica</i> (4)	Mic. Caldo	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	100	-	0,03-0,25	0,25	0,2	0,18		0,5
	ET RPMI	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	75	25	0,125-0,5	0,125	0,2	0,125		0,25
	ET MHm	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	100	-	0,125-0,25	0,125	0,2	0,125		0,25
<i>C. guilliermondii</i> (2)	Mic. Caldo	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET RPMI	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET MHm	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i> (2)	Mic. Caldo	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET RPMI	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ET MHm	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Mic. Caldo:** Microdilución en caldo    **ET RPMI:** Difusión por tiras Etest en agar RPMI    **ET MHm:** Difusión por tiras Etest en agar Mueller hinton



Tabla 7. Distribución de Punto de Corte Epidemiológico (PCE) ( $\mu\text{g/ml}$ ) de Fluconazol en porcentaje 62,5%, 95%, 99% por método y por especies de *Candida*. 2013-2014.

N=102

ATF	Método	Rango CMI	Moda	PCE			PCC		
				62.5%	95%	99%	S	SDD	R
<i>Candida pelliculosa</i> (44)	Caldo	1-128	2	4	8	16		$\geq 32$	
	Agar RPMI	1-128	2	4	8	16		$\geq 32$	
	Agar MHm	1-256	4	8	16	32		$\geq 32$	
<i>Candida parapsilosis</i> (35)	Caldo	0,25-8	1	1	2	4	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Agar RPMI	0,5-8	1	1	2	4	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Agar MHm	0,03-16	1	1	2	4	$\leq 2$	4	$\geq 8$
<i>Candida tropicalis</i> (9)	Caldo	0,5-128	128	4	8	16	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Agar RPMI	0,25-256	64	4	8	16	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Agar MHm	0,5-256	64	4	8	16	$\leq 2$	4	$\geq 8$
<i>Candida albicans</i> (6)	Caldo	0,5-128	128	0,5	1	2	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Agar RPMI	0,5-256	0,5	0,5	1	2	$\leq 2$	4	$\geq 8$
	Agar MHm	0,5-256	0,5	0,5	1	2	$\leq 2$	4	$\geq 8$

Tabla 8. Distribución del punto de Corte Epidemiológico (PCE) µg/ml de voriconazol en porcentaje 62,5%, 95% 99% por método y por especies de *Candida*. 2013-2014.  
N=102

ATF	Método	Rango CMI	Moda	PCE			PCC		
				62.5%	95%	99%	S	SDD	R
<i>Candida pelliculosa</i> (44)	Caldo	0,03-2	0,06	0,06	0,125	0,25	≤0,5	1	≥2
	Agar RPMI	0,03-2	0,125	0,125	0,25	0,5	≤0,5	1	≥2
	Agar MHm	0,03-4	0,125	0,125	0,25	0,5	≤0,5	1	≥2
<i>Candida parapsilosis</i> (35)	Caldo	0,03-0,25	0,03	0,03	0,06	0,125	≤0,12	0,25-0,5	1
	Agar RPMI	0,03-125	0,03	0,03	0,06	0,125	≤0,12	0,25-0,5	1
	Agar MHm	0,03-125	0,03	0,03	0,06	0,125	≤0,12	0,25-0,5	1
<i>Candida tropicalis</i> (9)	Caldo	0,06-16	16	0,125	0,25	0,5	≤0,12	0,25-0,5	1
	Agar RPMI	0,03-32	32	0,125	0,25	0,5	≤0,12	0,25-0,5	1
	Agar MHm	0,03-32	32	0,06	0,125	0,25	≤0,12	0,25-0,5	1
<i>Candida albicans</i> (6)	Caldo	0,03-16	0,06	0,06	0,125	0,5	≤0,12	0,25-0,5	1
	Agar RPMI	0,03-32	0,03	0,03	0,06	0,125	≤0,12	0,25-0,5	1
	Agar MHm	0,03-16	0,03	0,03	0,06	0,125	≤0,12	0,25-0,5	1

Tabla 9. Distribución del punto de Corte Epidemiológico ( $\mu\text{g/ml}$ ) de Posaconazol en porcentaje 62,5%, 95% y 99% por método y especies de *Candida*. 2013-2014. N=102

ATF Especie	Método	Rango CMI	Moda	PCE		
				62.5%	95%	99%
<i>Candida pelliculosa</i> (44)	Caldo	0,03-1	0,5	0,5	1	2
	Agar RPMI	0,03-1	0,5	0,5	1	2
	Agar MHm	0,03-2	0,5	0,5	1	2
<i>Candida parapsilosis</i> (35)	Caldo	0,03-0,25	0,06	0,06	0,125	0,5
	Agar RPMI	0,03-0,5	0,03	0,03	0,06	0,125
	Agar MHm	0,03-0,5	0,03	0,03	0,06	0,125
<i>Candida tropicalis</i> (9)	Caldo	0,06-16	16	0,125	0,25	0,5
	Agar RPMI	0,03-32	32	0,06	0,125	0,25
	Agar MHm	0,03-32	32	0,03	0,06	0,125
<i>Candida albicans</i> (6)	Caldo	0,03-0,25	0,25	0,25	0,5	1
	Agar RPMI	0,03-0,5	0,125	0,125	0,25	0,5
	Agar MHm	0,03-0,5	0,125	0,125	0,25	0,5

## DISCUSIÓN

De las 102 cepas analizadas, *Candida no albicans* representa el 93,20%, este porcentaje es muy similar a una investigación publicada por Pereira et al., en Brasil, [38]. Perozo y col., reportó en su investigación que de 78 cepas estudiadas; 89,74% eran *Candida no albicans*, demuestra que en los últimos años, el aumento de las especies diferentes de *C.albicans* supera el 90%, en nuestra investigación la distribución, lo representa *Candida pelliculosa* con un 43%, seguida por *C. parapsilosis* (34%), *C. tropicalis* (9%), *C. lipolytica* (4%) y con un 2% correspondiente para *C. guilliermondii* y *C. glabrata*, se evidenció un cambio epidemiológico por la especie de *C.pelliculosa*, esto se debe a un posible brote nosocomial ya que el 93% de las cepas procedía de un solo centro hospitalario, la población susceptible era menor de un año representando el 75%, los servicios que procedían era UTIN(35%),Reten(25%) e hidratación (25%), el 75% del diagnóstico era sepsis y estos pacientes recibían antibiótico de amplio espectro. La posible infección pudiera derivar de los cuidados de salud en este hospital, se recomienda realizar estudios filogenéticos que confirmen la relación de estas cepas aisladas en sangre para confirmar la infección nosocomial. Kalkancı et al., [39] han informado que la fungemia por *C. pelliculosa* deriva de una transmisión horizontal en cuatro neonatos hospitalizado en la unidad de cuidados intensivos de un Hospital terciario en Turquía, describen que esta involucrado el personal de enfermería o pudiera deberse al aumento colonización de los neonatos, el aislamiento de esta especie aumenta la tasa de mortalidad de 30% a 60%[40]. En

segundo lugar la *C. parapsilosis* representó el 34%, en los datos demográficos se presentó ésta especie en todos los grupos etarios, en las áreas de UTIN (29%), RETEN (11%), UCIP (11%) y UCI (37%), la frecuencia de este germen por ruta exógena se asociada con catéter vasculares, nutrición parenteral y manos del personal en los centros de salud [41, 42]., y la ruta endógena deriva por la colonización en los neonatos la cual oscila entre 17,4 % a 39,4%, [43]. En un hospital terciario en Italia han reportado un 28,4% de *C. parapsilosis* [44]. En el trabajo de Nucci et al., reporta en segundo lugar a *C. parapsilosis* con un 26,5% en América latina, Venezuela representa el mayor porcentaje con 39%, seguido muy de cerca por Colombia con un 38,5%, Ecuador con 30,4%, Chile 28,9%, Brasil 25,8% y Argentina 23,9% [45], a pesar del cambio epidemiológico de las especies de *Candida* no *albicans* en Venezuela el porcentaje se mantiene y es parecido al obtenido en nuestra investigación. Cleveland et al., reporta que *C. parapsilosis* tiene mayor prevalencia en América latina [46]. Estudios previos en nuestro país realizado por Dolande y col., publicaron en su análisis epidemiológico que las especies más frecuente del grupo de *C. no albicans*, son *C. parapsilosis* 48%, *C.tropicalis* y *C. albicans* con 17%, *C glabrata* y *C. pelliculosa* 5%, *C krusei* 3%, *C guilliermondii*, *P. anómala* 2% y *C. utilis* [26], esto nos hace suponer que la incidencia de *C. parapsilosis* en Venezuela es mayor que la obtenida en la investigación.

Las cepas examinadas, fueron sensible a fluconazol entre el 33 % por los métodos evaluados, se obtuvieron cepas consideradas como SDD en un rango de 52% a 58,8 %, las cepas se distribuyeron para *C. pelliculosa* (43), *C. parapsilosis* (6) , *C. lipolytica* (4) y ( 2) para *C. guilliermondii* y *C. glabrata*. El porcentaje de resistencia va

desde 9,8 % a 16,7% entre las especies de *C. tropicalis* (5), *C. albicans* (2), *C. parapsilosis*(2) y *C. guilliermondii*(1).

El patrón antifúngico de voriconazol mostró ser sensible un 94% para las especies estudiadas, 2% de lecturas intermedias y resistencia 8% en *C. tropicalis* (4), *C. pelliculosa* (2) y *C. albicans*(1).

La resistencia detectada para los azoles fue 9,8%, lo representó *C.tropicalis* (5/102), *C. parapsilosis* (2/102) *C. albicans* (2/102), *C. pelliculosa* (1/102), la reducción del acceso de la droga a la diana, ya sea a través de MDR (resistencia a un solo fármaco) o CDR (resistencia a múltiples fármacos) [7], en nuestro estudio arrojó 8% por transportadores tipo MDR para *C. tropicalis* (4/102), *C. albicans* (1/102), *C. pelliculosa* (1/102) y por transportadores tipo CDR fue 1,8% *C. tropicalis* 1/102 y *C. parapsilosis* 2/102 , estos hallazgos fenotípicos se deben confirmar por estudios moleculares, la resistencia obtenida por nuestra investigación coincide con Oxman et al., donde reporta la resistencia por encima 10% en Norteamérica y este valor es similar en Venezuela, hallazgos obtenidos en esta investigación [47].

Cabe destacar, la detección de una resistencia mayor de un 6% por el método de difusión Etest con agar Mueller Hinton Modificado (MHm), concuerda con lo publicado por Cuenca et al. [6].

Con los datos obtenidos por microdilución de caldo y Etest en agar RPMI y Mueller Hinton modificado se obtuvo una correlación de 0.99 entre los métodos analizados en esta investigación, garantizando la reproducción de los resultados, tal concordancia se

destaca en trabajos por Ochiuzzi y col., [48,49,50], confirman la reproductibilidad de los resultados. Los CMI obtenidos por los aislados de *Candida*, el perfil antifúngico de fluconazol CMI50 4µg/mL y CMI90 16µg/mL, voriconazol CMI50 0,125µg/mL CMI90 0,5µg/mL para *C. pelliculosa*, el resultado es similar a lo publicado por Pfaller et al. [43] en *C. parapsilosis* para fluconazol CMI50 1µg/mL CMI90 4µg/mL, voriconazol CMI50 0,03µg/mL CMI90 0,03 µg/mL, posaconazol CMI50 0,03µg/mL CMI90 0,25µg/mL, datos parecidos a las investigaciones de Ruan et al.[51].

Los Puntos de Corte Epidemiológicos(PCE), descritos recientemente resultan más sensibles para detectar posible aparición de cepas resistentes y se obtienen considerando la distribución de los CMI de las cepas silvestres, las cuales se definen como una población de cepas que no alberga ningún tipo de mecanismo de resistencia adquirido, el CMI modal para cada distribución, y la variabilidad inherente de la prueba (por lo general dos dilución del CMI modal); el PCE abarca por lo menos 95% de los aislados en la distribución de tipo silvestre y el punto de Corte Epidemiológico puede utilizarse como la medida más sensible para detectar la aparición de cepas con una susceptibilidad reducida a un agente dado, cuyo valor de concentración se encuentra en el límite superior de la población de tipo silvestre[50,51,52], los datos obtenidos de PCE (µg/mL) por microdilución en caldo para fluconazol, voriconazol y posaconazol coincide con publicaciones de Cantón et al., Pfaller et al., Espinel-Ingroff et al [52,53,54]. El PCE por Difusión en Agar por Etest con RPMI para fluconazol, voriconazol y pozaconazol, fue 4 µg/mL, 0,25 µg/mL y 1 µg/mL para *C. pelliculosa*, 2 µg/mL, 0,06 µg/mL y 0,06 µg/mL corresponde *C. parapsilosis*, 4 µg/mL, 0,25 µg/mL y

0,125 µg/mL para *C. tropicalis*, 2 µg/mL; 0,06 µg/mL; 0,06 µg/mL detectados para *C. albicans*.

El PCE por Difusión en Agar por Etest con Mueller Hinton modificado; para fluconazol, voriconazol y pozaconazol, fue 8 µg/mL, 0,25 µg/mL y 1 µg/mL para *C. pelliculosa*, 2 µg/mL, 0,06 µg/mL y 0,06 µg/mL corresponde *C. parapsilosis*, 4 µg/mL, 0,125 µg/mL y 0,125 µg/mL para *C. tropicalis*, 2 µg/mL; 0,06 µg/mL; 0,125 µg/mL detectados para *C. albicans* y para *C. lipolytica* 4 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,25 µg/mL, no se determinó por ambas técnicas los puntos de corte epidemiológico de *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. lipolytica* porque el número de cepas no era representativo estadísticamente.

Los puntos de corte epidemiológico obtenido para *C. albicans*, con fluconazol es menor a el Punto de corte clínico (PCC), extendiendo dos diluciones del CMI modal para PCE, sigue siendo menor al PCC, lo que garantiza el éxito terapéutico de un 99%, caso contrario ocurre con *C. tropicalis*, el PCE fluconazol oscila entre 2 y 4 µg/mL, lo clasifica por PCC con SDD y si se extiende dos diluciones del CMI modal, se incorpora en la categoría de Resistente, reduciendo el porcentaje de éxito terapéutico, algunos autores han documentado la ocurrencia (generalmente <5%) de cepas resistentes a fluconazol, teniendo en cuenta que esta especie tiene un fuerte fenómeno de la inhibición parcial del crecimiento en pruebas *in vitro* (de arrastre), que posiblemente pudo haber interferido en la lectura; por tal razón hay algunas dudas en cuanto a si las tasas de resistencia *in vitro* a fluconazol se ha sobreestimado [54].



Es de hacer notar que *C. parapsilosis* posee valores altos de CMI frente a fluconazol principalmente por microdilución y Etest donde los mayoría de los valores se encuentran entre 2 y 4  $\mu\text{g/mL}$ , tomando en cuenta que los valores reportados internacionalmente están por debajo de 1  $\mu\text{g/mL}$  [26,35], esto indica que esta especie puede llegar a desarrollar una resistencia secundaria a fluconazol. Deben correlacionarse estos valores de CMI con el éxito terapéutico de estas infecciones para establecer puntos de corte epidemiológicos adecuados.

Es importante resaltar que este estudio fue realizado con un número significativo de cepas, de manera tal que permitió establecer los puntos de corte epidemiológico a fluconazol, voriconazol y posaconazol para 3 especies de *Candida* dos métodos de susceptibilidad antifúngica, el de referencia y uno comercial el Etest, siendo éste último de fácil ejecución y confiable para ser implementado en el laboratorio de microbiología en la detección y vigilancia de la resistencia a los antifúngicos.

## CONCLUSIONES

1. Se determinaron puntos de corte epidemiológicos locales para fluconazol, voriconazol y pozaconazol en las especies de *Candida* frecuentemente aisladas que representaron el 93,20% del total de los aislados.
2. Prevalencia de *Candida* no *albicans* 93,20%, es relevante respecto a lo reportado a nivel mundial.
3. El cambio epidemiológico de las especies de *Candida* no *albicans*, primer lugar ocupado por *C.pelliculosa* 43%, segundo lugar *C parapsilosis* 34% y tercer lugar *C. tropicalis* 9%, se debe a un posible brote nosocomial de un centro de salud.
4. El método Etest por agar RPMI y Mueller Hinton modificado, detectó resistencia a los antifúngicos mostrando una excelente correlación, con respecto al método de referencia microdilución en caldo CLSI.
5. Se detecto un 9,8% de resistencia para los azoles, el fenotipo exhibido fue bomba eflujo por CDR 5,8% y MDR 4%.

## RECOMENDACIONES

1. Implementar en los laboratorios de microbiología el uso del método de Etest porque representa una alternativa de fácil ejecución, menos laboriosa y sus resultados son confiable y reproducible.
2. Utilizar el medio de Mueller-Hinton modificado según el documento del CLSI M44-A2 para el método de Etest.
3. Vigilar la resistencia de *Candida tropicalis*, es el agente etiológico que ocupa el segundo o tercer lugar en pacientes con cáncer y en nuestra investigación representa el tercer lugar de los aislamientos.
4. Realizar estudios de biología molecular para detectar mecanismos de resistencia a las cepas que se ubiquen por encima del PCE.
5. Las cepas dosis dependientes de *Candida pelliculosa*, realizar secuenciación molecular para determinar algún mecanismo de resistencia.
6. Seguir identificando la especie de *Candida* aislada y su patrón antifúngico con el fin de vigilar la distribución epidemiológica, detectar resistencia y calcular el punto de corte epidemiológico en los distintos centros de salud que integran la Red de Candidemia.

## Bibliografía

1. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez-Tudela J. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(5): 336-340.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-163.
3. Garcia-Vidal C, Carratalà J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(3): 151-158.
4. Shah D, Yau R, Lasco T M, Weston J, Salazar M, Palmer H, Gareya K. Impact of Prior Inappropriate Fluconazole Dosing on Isolation of Fluconazole-Non susceptible *Candida* Species in Hospitalized Patients with Candidemia. *Rev Antimicrob. Agents Chemother* 2012; 56(6):3239
5. Quindós,G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 2014; 31(1): 42-48.
6. Pemán J, Zaragoza R, Salavert M. Control y prevención de las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios causadas por especies de *Candida* y otras levaduras. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26(4): 298-311.
7. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology* 2007; 23: 1-19.

8. Ballot D, Bosman N, Nana T, Ramdin T, Cooper P.A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. *J Trop Pediat* 2013; 59(6):460-464.
9. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 486-492.
10. Cleveland A, Farley M, Harrison H, Stein B, Hollick R, Lockhart S. R, Chiller, T. M. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin Infect Dis* 2012; 1-10.
11. Pemán J, Cantón E, Camarena Miñana J.J, Alcoba Florez J, Echeverria J, Navarro Ortega D, Gómez Nieto A. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol* 2011; 28(2):91-99.
12. Colombo A. L, Guimarães T, Camargo L.F, Richtmann R, de Queiroz-Telles F, Salles C, Nucci M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade de Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(3); 283-312.
13. Aguado JM, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vazquez L, Cuenca-Estrella, M. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y

Microbiología Clínica (SEIMC). Updated 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 2(5): 345-361

14. Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksall N, Ozkan H, Cetinkaya M, Ener B. Neonatal candidiasis: results of an 8 year study. *Pediatrics International* 2012; 54(3): 341-349.

15. Colombo A. L, Janini M, Salomão R, Medeiros E. A, Wey S. B, Pignatari A. C. Surveillance programs for detection and characterization of emergent pathogens and antimicrobial resistance: results from the Division of Infectious Diseases, UNIFESP. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2009; 81 (3): 571-587.

16. Auberger J, Lass-Flörl C, Aigner M, Clausen J, Gastl G, Nachbaur D. Invasive fungal breakthrough infections, fungal colonization and emergence of resistant strains in high-risk patients receiving antifungal prophylaxis with posaconazole: real-life data from a single-centre institutional retrospective observational study. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(9): 2268-2273.

17. Serrano R, Gimeno A, Plumed L, Pemán J, Álvarez B, Plazas J, Caturla J. Perfil epidemiológico y patrón de sensibilidad de aislamientos causantes de infección fúngica invasora frente a aislamientos fúngicos de colonización en pacientes críticos no neutropénicos. *Rev Ibero Micolog* 2013; 30(1): 14-20.

18. Cuenca-Estrella, M. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(5): 257-264.

19. Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Gómez López A, Monzón, A. Estudios de sensibilidad en levaduras. Updates and news. *Clinic microbiol infect dises* 2013; 31: 53-58.

20. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, & Dimopoulos G. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. *Molecules* 2014; 19(1): 1085-1119.
21. Pappas P.G, Kauffman C.A, Andes D, Benjamin D.K, Calandra T.F, Edwards J.E, Sobel J.D. Clinical practice guidelines for the management candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinic Infect disea* 2009; 48(5): 503-535.
22. Bonfietti L, Anjos Martins M, Szeszs M, Pukiskas S, Purisco S, Pimentel F, Melhem M. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 7): 1003-1008.
23. Vaz C, Sampaio P, Clemons K. V, Huang Y. C, Stevens D. A, Pais C. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagnostic Microbiology Infections Disease* 2011; 71(2): 159-162.
24. Ullmann A, Cornely O, Donnelly J, Akova M, Arendrup M, Arikan-Akdagli S, Cuenca-Estrella M. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(7): 1-8.
25. Panizo M, Reviákina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. *in vitro* susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Medical Mycology ISHAM* 2009; 47:37-43.

26. Dolande M, Panizo M, Reviákina V, Ferrara G, Moreno X, Macero C et al. Candidemia en Venezuela. Red de vigilancia a los Antifúngicos. Bol Venez Infectol Jul-Dic 2009; 20: 63.
27. Perozo A, Calvo B, Mesa L, Pineda M. Susceptibilidad a fluconazol y voriconazol por el método de difusión de cepas de *Candida*, aisladas de hemocultivos en Maracaibo, Venezuela. Kasma 2011; 39(2): 114-122.
28. Perfect J.R. Azoles: back to the future. Current Opinion Infect Dis 2011; 24: 41-58.
29. Pfaller M. A, Andes D, Arendrup M. C, Diekema D. J, Espinel-Ingroff A, Alexander B. D, Walsh T. J. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(3): 330-343.
30. Pfaller M A, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis R. J, Kroeger J, Messer S.A, Tendolkar S, Diekema J. Comparison of the Broth Microdilution (BMD) Method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-Hour CLSI BMD Method for Testing Susceptibility of *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole by Use of Epidemiological Cutoff Values. J Clin Microbiol 2011; 845–850.
31. Pfaller M. A, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema, D. J, Szesz M. W. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff



Values for Amphotericin B, Flucytosine, and Itraconazole and *Candida* spp. As Determined by CLSI Broth Microdilution. J Clin Microbiol 2012; 50(6):2040.

32. Kett D, Shorr A, Annette C Reboli A, Reisman A, Biswas P, Schlamm H. Anidulafungin compared with fluconazole in severely ill patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: Support for the 2009 IDSA treatment guidelines for candidiasis. Critical Care 2011; 15: 253.

33. Lyon M, Karatela S, Sunay S, Adiri Y. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates from the *Candida* Surveillance Study. J Clin Microbiol 2010; 1270–1275.

34. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones R, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). Int J Antimicrob Agents. 2011; 38(1):65-9

35. Ballot D. E, Bosman N, Nana T, Ramdin T, Cooper P. A. Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. J Trop Pediatr 2013; 59(6): 460-464.

36. Morace G, Borghi E, Latta R, Amato G, Andreoni S, Brigante G, Montagna M. T. Antifungal susceptibility of invasive yeast isolates in Italy: the GISIA3 study in critically ill patients. BMC Infect Dis 2011; 11(1): 130.

37. Clinical and Laboratory Standards Institute .Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. Approved Standard. CLSI Document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne. Pa, USA. 2012
38. Pereira G, Rady Müller P, Walderez Szeszs M, Levin A ,Márcia S, Melhem M. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. Medical Mycology. 2010, 48: 839–842.
- 39 Kalkancı A, Dizbay M, Turan O, Fidan I, Yalcın B, Hirfano B, Timur K, F Akta F, Nosocomial transmission of *Candida pelliculosa* fungemia in a pediatric intensive care unit and review of the literature Takashi Sugita. The Turkish Journal of Pediatrics January - February 2010, 52: 42-49
40. Madhavan A , Jayalakshmi V, Sobha B. A case report of *Candida pelliculosa* sepsis in newborn nursery ICU. Journal of The Academy of Clinical Microbiologists 2013, 15(1):32-32.
41. Clark T, Slavinski S, Morgan J, Lott, T, Arthington-Skaggs, B et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J Clin Microbiol 2006; 42: 4468–4472.
42. Delfino D, Scordino, F, Pernice, I, Lo Passo C, Galbo R, Romeo, O. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. Clin Microb and Infect 2014; 5:182-186.

43. Panackal, A. A. Optimizing Containment and Control of *Candida parapsilosis* Fungemia among Neonates in the Outbreak Setting Using a Mathematical Modeling Approach. *J of Mycolog* 2013; (2): 1-11.
44. Bassetti M, Taramasso L, Nicc E, Molinari M, Mussap M, Viscoli C. Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Susceptibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. *PLoS ONE*. 2011; 6:1-6.
45. Nucci M, Flavio Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi I, Cortes J, Zurita J, Guzman-Blanco R, Santolaya M, Thompson F, Sifuentes-Osornio J, Echevarri J, Arnaldo Colombo, A. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLOS ONE*, March 2013; 8; 1-10
46. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in atlanta and Baltimore 2008–2011. *Clin Infection Dis* 2012; 55: 1352–1361.
47. Oxman D, Chow J, Frendl G, Susan Hadley S, Shay HersHKovitz S, Peter Ireland P, McDermott L, KTsay K, Marty F, Kontoyiannis D, Golan Y . Candidaemia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern?. *J of Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1460–1465.
48. Ochiuzzi M, Santiso G, Arechavala A. Correlation of Etest and Neo-Sensitabs diffusion assayson Mueller-Hinton-methylene blue agar with broth microdilution reference method (CLSI-M27-A2) for testing susceptibilities of *Cryptococcus*

*neoformans* to amphotericin B and fluconazole. Medical Mycology 2010, Early Online, 1–4.

49. Kiraz N, Dag LL, Yamac M, Kiremitci A, Kas N, ifog̃lu Y, Akgun Y. Antifungal Activity of Caspofungin in Combination with Amphotericin B against *Candida glabrata*: Comparison of Disk Diffusion, Etest, and Time-Kill Methods. Antimicrob Agents Chemother 2009; 8: 788–790

50. Cona E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Magazine Chilena Infectious Diseases 2002; 19 (2): 77-81

51. Ruan S, Chen-Chen Chu, Hsueh P. In Vitro Susceptibilities of Invasive Isolates of *Candida* Species: Rapid Increase in Rates of Fluconazole Susceptible-Dose Dependent *Candida glabrata* Isolates. Antimicrob Agents and Chemother 2008, p. 2919–292

52. Cantón E, Iñiguez C, Pemán J, Hervás D, Lopez-Hontangas JL, Pina-Vaz C, Camarena JJ, Campos-Herrero I, García-García I, García-Tapia AM, Guna R, Merino P, Pérez del Molino L, Rubio C, Suarez A, FUNGEMYCA Study Group. 2013. Epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole for six *Candida* species as determined by the colorimetric sensitive YeastOne method. J Clin Microb 2013. 51:8 2691-2695.

53. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Bustamante B, Canton E, Diekema DJ, Fothergill A, Fuller J, Gonzalez GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Meis JF, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, St-Germain G, Turnidge J. Multicenter study of anidulafungin and micafungin MIC distributions and epidemiological cutoff values for eight species of *Candida* and the CLSI M27-A3 broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother. Feb 2014; 58(2): 916–922.

54. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, Gonzalez G, Lass-Flörl C, Lockhart S, Martin-Mazuelos E, Meis J, Melhem M, Ostrosky-Zeichner M, Pelaez T, Szeszs M, St-Germain G, Bonfietti L, Guarro J, Turnidge J. A multi-laboratory study of epidemiological cutoff values for azole-resistance detection of eight *Candida* spp. to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Americ Soc for Microbiolog* 2014; 53; 48- 798
55. Pfaller M A, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates* 2010; (3) 180–195.
56. Alp S, Sancak B, Hascelik G, Arikan S. Influence of different susceptibility testing methods and media on determination of the relevant fluconazole minimum inhibitory concentrations for heavy trailing *Candida* isolates with low-high phenotype. *Mycoses*. 2010; 53:475–80.
57. Sanabria R, Samudio M, Fariña N. Perfil de susceptibilidad a antifúngicos de aislados de *Candida* spp por el método de microdilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2014; 12(1), 33-40.

## **ANEXOS**

Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cepas control de calidad frente a fluconazol, voriconazol y posaconazol por microdilución en caldo, difusión por agar RPMI y MHm

<b>Fluconazol</b>				
Control de calidad	Caldo	RPMI	MHm	MIC $\mu$ g/ml
ATCC22019	2	2	2	0,5-4
ATCC6258	16	48	16	8-64
<b>Voriconazol</b>				
Control de calidad	Caldo	RPMI	MHm	MIC $\mu$ g/ml
ATCC22019	0,06	0,06	0,03	0,016-0,12
ATCC6258	0,25	0,25	0,25	0,06-0,5
<b>Posaconazol</b>				
Control de calidad	Caldo	RPMI	MHm	MIC $\mu$ g/ml
ATCC22019	0,125	0,06	0,06	0,03-0,25
ATCC6258	0,25	0,25	0,25	0,06-0,5

Coeficiente de Correlación de dispersión de Pearson por método de microdilución de caldo y difusión por Etest por agar RPMI y en MHm para fluconazol, voriconazol y posaconazol

Antifúngico	Microdilución en caldo	E-TEST por Difusión en agar RPMI	E-TEST por Difusión en agar MHm
Fluconazol	1.000	0.9189	0.8761
Voriconazol	1.000	0.9990	0.9155
Posaconazol	1.000	0.9998	0.9998