



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
FACULTAD DE MEDICINA

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR  
EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN  
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

**Frecuencia de *Candida spp* colonizantes  
resistentes a Azoles aisladas de pacientes  
hospitalizados en una Unidad de Cuidados  
Críticos, Lima, Perú**

**AUTOR:**

**JAIME JOSE FIGUEROA TATAJE**

**LIMA – PERÚ**

**2019**

**ASESOR:**

MSc. TM STEEV LOYOLA SOSA

## **DEDICATORIA:**

Este trabajo va dedicado a todos aquellos que me han apoyado desde que inicie este camino, gracias por siempre tenerme fe.

Al Tecnólogo Médico (TM) Norka Luarte Saldaña por haberme impulsado a seguir en el campo de la investigación microbiológica. Con el único fin de generar conocimiento en nuestro ámbito profesional.

Al Magíster TM Steev Orlando Loyola Sosa por su paciencia e ímpetu que me permitió concretar este proyecto.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

El proyecto será autofinanciado. Los autores declaramos no tener conflictos de interés.

## **DECLARACION DEL AUTOR:**

Este proyecto es original y para su planteamiento se han seguido los lineamientos respectivos, respetando la ética en investigación. Este proyecto será presentado para obtener un Título de Segunda Especialidad de Tecnología Médica en Microbiología Clínica, en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

	<u>PAG</u>
INTRODUCCION Y JUSTIFICACION.....	1
OBJETIVOS.....	5
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	6
POBLACION.....	6
MUESTRA.....	7
PROCEDIMIENTOS Y TECNICAS.....	13
ASPECTOS ETICOS.....	14
PLAN DE ANALISIS.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	15
PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA.....	17
ANEXOS.....	18

## RESUMEN

**Antecedentes:** La detección y caracterización de patógenos en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados críticos es de vital importancia para un correcto abordaje. En lo que respecta a levaduras del género de *Candida spp.*, se requiere de una caracterización completa para evitar el desarrollo de una fungemia diseminada. La información sobre resistencia a Fluconazol, Voriconazol, o ambos, en aislamientos clínicos de *Candida spp.*, de forma particular en cepas procedentes de pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidado Intensivo y de Cuidado Intermedio, es escasa.

**Objetivo:** Estimar la frecuencia de *Candida spp.* colonizantes y resistentes a Fluconazol y Voriconazol, en aislamientos procedentes de pacientes hospitalizados en dos unidades de cuidados críticos

**Material y métodos:** Estudio transversal analítico desarrollado entre Abril y Diciembre 2019. Todos los aislamientos de cepas de *Candida spp.* encontrados por el servicio de Microbiología del Hospital de Emergencias José Casimiro Ulloa serán incluidos en el estudio. Se realizarán exámenes de identificación a nivel de especie, así como ensayos para evaluar la susceptibilidad a Fluconazol y Voriconazol por métodos estandarizados.

**Palabras clave:**

Candida, candidemia, colonization, patient, critical, fluconazole, voriconazole

## INTRODUCCION Y JUSTIFICACION

El término levadura se refiere al grupo de hongos unicelulares, donde las hifas, pseudohifas, o ambos, pueden o no estar presentes <sup>(1)</sup>. Las levaduras poseen una fase sexual o telomorfa, y aquellas que carecen de fase sexual, tienen una fase anamorfa que les permite reproducirse por gemación <sup>(1)</sup>. La clasificación taxonómica de las levaduras de fase anamorfa corresponde a la división *Deuteromycota*, clase *Blastomycetes* <sup>(1)</sup>. *Candida spp* es una levadura que frecuentemente causa infecciones en humanos y es un patógeno emergente en ambientes nosocomiales que afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos <sup>(1)</sup>. Asimismo, *Candida spp* es frecuentemente encontrada como parte de la microbiota en diferentes partes del cuerpo, por lo cual su aislamiento en secreciones respiratorias o en muestras de orina podría ser considerado como un evento colonizante y no necesariamente infeccioso <sup>(2,3)</sup>. No obstante, el aislamiento de *Candida spp* en secreciones vaginales o en muestras de sangre, acompañado de signos y síntomas sugestivos de infección, es considerado como un signo de alarma que puede asociarse a complicación clínica e incluso a muerte <sup>(4)</sup>.

*Candida albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia en secreción bronquial o vaginal, muestras de heridas, sangre y otros fluidos <sup>(5)</sup>. Sin embargo, especies como, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* también han tomado relevancia epidemiológica e importancia clínica debido al incremento de su incidencia, pudiendo incluso duplicar o triplicar el número de aislamientos de *Candida albicans* <sup>(6)</sup>.

Los factores de riesgo asociados a infección por *Candida spp* en pacientes en estado crítico son diversos y han sido ampliamente descritos en la literatura científica <sup>(6)</sup>. Los factores más frecuentes a nivel global son; alteraciones intrínsecas del sistema inmunológico, tales como la depresión medular con neutropenia o traumatismo mayor; procedimientos invasivos relacionados a líneas centrales, ventilación mecánica, cateterismo vesical, sonda nasogástrica, entre otros, tiempo de hospitalización prolongado, nutrición parenteral, administración de esteroides o antibióticos de amplio espectro, transfusiones sanguíneas, hemodiálisis, diálisis peritoneal, quimioterapia y radioterapia <sup>(7,8)</sup>. La colonización por *Candida spp*, frecuentemente multifocal, es el primer estadio para la mayoría de los casos de candidiasis invasivas que afectan al paciente en estado crítico <sup>(7,8)</sup>.

El diagnóstico de candidiasis invasiva basándose únicamente en manifestaciones clínicas es complicado de ejecutar <sup>(8)</sup>. Un escenario frecuente es la colonización por especies de *Candida spp* en lugares no estériles <sup>(9)</sup>. El evento de colonización no necesariamente implica infección, por lo cual el tratamiento antifúngico podría no ser adecuado. No obstante, debe ser considerado como un signo de alarma para una candidiasis diseminada, la cual sí podría suponer que el clínico indique tratamiento. El tratamiento farmacológico anticipado debe sustentarse en herramientas que ayuden a determinar la mejor opción terapéutica para disminuir la probabilidad de desarrollar una candidiasis invasiva, falla al tratamiento, o ambos <sup>(9)</sup>.

El diagnóstico clínico de candidiasis es complicado de ejecutar debido a la ausencia de signos y síntomas específicos, presentación insidiosa, complejidad del paciente crítico y su asociación con otros procesos infecciosos concurrentes, baja

sensibilidad de los hemocultivos para detectar *Candida spp* y a la dificultad o al limitado acceso de muestras tisulares usando métodos invasivos <sup>(10)</sup>. Algunos autores han propuesto puntuaciones o reglas de predicción, como el índice de colonización, haciendo referencia a la densidad de colonización que tiene el paciente. El índice correlaciona con el número de sitios en los cuales se aisló la levadura, sin considerar el aislamiento en muestras de sangre, y con el aumento de probabilidad para desarrollar candidiasis invasiva <sup>(10)</sup>.

Los antimicóticos son compuestos, naturales o sintéticos, que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad <sup>(9,10)</sup>. Las primeras medicaciones antimicóticas surgieron en los años cincuenta con la aparición de los polienos, seguido por el uso de los azoles en los años setenta, como el fluconazol. Los antimicóticos son efectivos para el tratamiento de infecciones causadas por las especies de *Candida spp*, siendo una de las familias de elección los Azoles. El mecanismo de acción se basa en inhibir la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol-desmetilasa, la cual se asocia con la biosíntesis de ergosterol de la membrana plasmática fúngica <sup>(11)</sup>.

La resistencia a los azoles se asocia a mutaciones puntuales y a bombas de flujo. El gen *ERG11* codifica la 14 $\alpha$ -lanosterol-desmetilasa, el cual, debido a una mutación resulta en alteraciones de la membrana y en falta de unión al antifúngico. Los genes *MDR* o *CDR* codifican para bombas de flujo. El mecanismo de acción de estas bombas es bajar concentraciones intracelulares de los Azoles y por lo tanto se unen en menor cantidad a la enzima blanco, lo cual favorece que algunas enzimas queden libres y puedan continuar su actividad <sup>(12)</sup>.



Los métodos frecuentemente usados para la detección de la resistencia antifúngica en levaduras son variados. La micro y macro dilución en caldo son métodos usados para determinar la concentración mínima inhibitoria del antifúngico mediante diluciones seriadas del mismo <sup>(12)</sup>. El método de disco difusión en agar es usado para determinar la susceptibilidad en levaduras usando un medio sólido como el agar Müller Hinton <sup>(12)</sup>. No obstante, es muy frecuente que dichas metodologías no estén implementadas en los laboratorios de diagnóstico clínico de centros de salud debido a su costo, escasa solicitud, falta de recursos para su desarrollo, entre otros.

Este proyecto de investigación plantea describir el nivel de resistencia a los Azoles; Fluconazol y Voriconazol, en cepas colonizantes aisladas de secreciones bronquiales y de muestras de orina provenientes de pacientes hospitalizados en las unidades de cuidados críticos del Hospital de Emergencias José Casimiro Ulloa. Si bien es cierto existen otros azoles con presentación de disco de sensibilidad, se toma en cuenta estos dos debido a que tienen rangos de referencia para su control de calidad en la guía CLSI M44-A. Los resultados de este estudio podrían ser utilizados como una línea basal de investigación que permita conocer el estado actual de resistencia. Del mismo modo, los datos podrían ser usados como referencia basal de intervenciones diseñadas para controlar y mitigar la emergencia de resistencia a antifúngicos.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general

- Determinar la frecuencia de resistencia a azoles en cepas *Candida spp* aisladas de secreciones bronquiales y de muestras de orina provenientes de pacientes de Unidades de Cuidado Critico (UCI y UCIN) del Hospital de Emergencias José Casimiro Ulloa durante Abril a Diciembre del 2019

### Objetivos secundarios

- Determinar la proporción de resistencia a Fluconazol y Voriconazol de forma estratificada para cada especie de *Candida spp*
- Explorar asociaciones entre la resistencia a Azoles de acuerdo a características del paciente, procedencia, patología pre existente y días de estancia hospitalaria

## **METODOLOGIA**

### Diseño del Estudio

Observacional, del tipo transversal analítico. Esto debido a que se observan los fenómenos de resistencia o sensibilidad a los Azoles mencionados mediante el método de disco difusión en la población de cepas de *Candida spp* aislados de pacientes de unidades críticas (UCI, UCIN) durante el periodo de Abril a Diciembre 2019 en el servicio de Microbiología del Departamento de Patología Clínica del Hospital de Emergencias José Casimiro Ulloa.

### Población

Este proyecto propone trabajar con todas cepas de *Candida spp* aisladas de secreción bronquiales y urocultivos de pacientes de unidades críticas (UCI, UCIN) durante el periodo de Abril a Diciembre 2019 en el servicio de Microbiología del Departamento de Patología Clínica del Hospital de Emergencias José Casimiro Ulloa. Esto debido a que el número de aislamientos obtenido en el año 2018 fue de alrededor de 70 aislamientos, y ya que se busca que el estudio tenga una población significativa se decide tomar en cuenta todos los aislamientos.

#### Criterios de Inclusión:

- Cepa de *Candida spp* aislada de una secreción bronquial o de una muestra de orina procedente de una unidad de cuidado crítico (UCI o UCIN)

#### Criterios de Exclusión:

- Aislamientos del mismo paciente con un tiempo menor de 1 mes entre muestras del mismo tipo

## Muestra

### *Unidad de Análisis*

La unidad de análisis es la cepa de *Candida spp* aislada de secreción bronquial o de orina, aislada de un paciente atendido en las unidades de cuidado crítico (UCI y UCIN) y aisladas en el servicio de Microbiología del Departamento de Patología Clínica del Hospital de Emergencias José Casimiro Ulloa entre los meses de Abril a Diciembre del 2019.

### *Tamaño Muestral*

Este estudio propone trabajar con todas las cepas recolectadas durante Abril a Diciembre del 2019, por lo cual no se realizó un cálculo de tamaño de muestra.

### *Definición Operacional de Variables*

- Variables Principales:
  - Especie de Candida
    - Tipo: Categórica politómica
    - Valores Finales: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kruzei*, *Candida parapsilosis*, Otras especies de *Candida*,
    - Escala de medición: Identificación mediante tubo Germinativo, microcultivo en Agar Arroz, color obtenido en el crecimiento en CHROM Agar para Candida e identificación mediante panel para Levaduras del equipo BD Phoenix M50.
    - Definición operacional: Identificación de acuerdo a lo obtenido en cada una de las pruebas.

- Registro: El valor obtenido se registrará en el formato de registro indicando medida del halo y su interpretación (Anexo 1)

○ Resistencia a Fluconazol

- Tipo: Categórica politómica
- Valores Finales: Sensible (S), Sensible Dependiente de Dosis (SDD) o Resistente (R)
- Escala de medición: Intervalo de milímetros de halo de sensibilidad en el caso de Fluconazol es el siguiente:

FLUCONAZOL			
	SENSIBLE	SENSIBLE DOSIS DEPENDIENTE (SDD)	RESISTENTE
Medida en mm	≤ 14	15 - 18	≥ 19

- Definición operacional: El halo de inhibición será expresado en milímetros y posteriormente interpretado de acuerdo a la guía CLSI M44-A2.
- Registro: El valor obtenido se registrará en el formato de registro indicando medida del halo y su interpretación (Anexo 1)

○ Resistencia a Voriconazol

- Tipo: Categórica politómica
- Valores Finales: Sensible (S), Sensible Dependiente de Dosis (SDD) o Resistente (R)
- Escala de medición: Intervalo de milímetros de halo de sensibilidad en el caso de Voriconazol es el siguiente:

VORICONAZOL			
	SENSIBLE	SENSIBLE DOSIS DEPENDIENTE (SDD)	RESISTENTE
Medida en mm	$\leq 13$	14 - 16	$\geq 17$

- Definición operacional: El halo de inhibición será expresado en milímetros y posteriormente interpretado de acuerdo a la guía CLSI M44-A2.
    - Registro: El valor obtenido se registrará en el formato de registro indicando medida del halo y su interpretación (Anexo 1)
  
- Variables Secundarias:
  - Edad
    - Tipo: Numérica, continua de escala de razón
    - Definición operacional: Años de vida del paciente. Se expresará en números arábigos que son obtenidos de la orden médica y/o la historia del paciente.
    - Registro: El valor obtenido se registrará en el formato de registro indicando la edad en números arábigos (Anexo 1)
  
  - Género
    - Tipo: Categórica dicotómica de escala nominal
    - Definición operacional: Género biológico del paciente. Se expresara como Masculino o Femenino según la orden médica y/o la historia del paciente.
    - Registro: Se registrará en el formato de registro indicando F si es Femenino o M si es Masculino (Anexo 1)

- Procedencia
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal
  - Definición operacional: Servicio de procedencia del paciente; Unidad de Cuidados Intensivos o Unidad de Cuidados Intermedios.
  - Registro: Se apuntará en el formato de registro indicando cual de ambas opciones es el servicio de procedencia (Anexo 1)
  
- Patología pre existente
  - Tipo: Categórica politómica nominal
  - Definición operacional: Se expresará como las patologías pre existentes que pueda tener el paciente en el momento que llega su muestra al laboratorio, entre ellas tenemos Diabetes Mellitus, Infección de Tracto Urinario, Neumonía Asociada a Ventilador, Otras Patologías y Ninguna Patología Asociada
  - Registro: Se indicará en el formato de registro que patología o patologías tiene o ha tenido el paciente en el momento que llega su muestra al laboratorio (Anexo 1)
  
- Tratamiento con Antimicrobianos
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal
  - Definición operacional: Se expresará si existe o no algún tratamiento con antimicrobianos en el momento de recepción de la muestra
  - Registro: Se indicará en el formato de registro si el paciente recibe tratamiento antimicrobiano en el momento de la

recepción de la muestra en el laboratorio indicando “SI”, en caso de recibirlo, o “NO”, en caso de no recibir dicho tratamiento. (Anexo 1)

- Tratamiento previo con Fluconazol
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal
  - Definición operacional: Presencia o ausencia de tratamiento previo con Fluconazol al momento de recepción de la muestra
  - Registro: Se indicará en el formato de registro si el paciente recibe tratamiento antifúngico al momento de la recepción de la muestra en el laboratorio indicando “SI”, en caso de recibirlo, o “NO”, en caso de no recibirlo. (Anexo 1)
- Tratamiento previo con Voriconazol
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal
  - Definición operacional: Presencia o ausencia de tratamiento previo con Voriconazol al momento de recepción de la muestra
  - Registro: Se indicará en el formato de registro si el paciente recibe tratamiento antifúngico al momento de la recepción de la muestra en el laboratorio indicando “SI”, en caso de recibirlo, o “NO”, en caso de no recibirlo. (Anexo 1)
- Tratamiento previo con otros Antifungicos
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal



- Definición operacional: Presencia o ausencia de tratamiento previo diferente a Fluconazol o Voriconazol al momento de recepción de la muestra
  - Registro: Se indicará en el formato de registro si el paciente recibe tratamiento antifúngico al momento de la recepción de la muestra en el laboratorio indicando “SI”, en caso de recibirlo, o “NO”, en caso de no recibirlo. (Anexo 1)
- Días de Estancia hospitalaria
  - Tipo: Numérica continua de escala de razón
  - Definición operacional: Se expresa como el número de días que estuvo internado el paciente en el servicio de cuidado crítico sea Unidad de Cuidados Intensivos o Unidad de Cuidados Intermedios.
  - Registro: El valor obtenido se registrará en el formato de registro indicando los días de estancia hospitalaria que tuvo dicho paciente en números arábigos (Anexo 1)
- Tipo de Muestra
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal
  - Definición operacional: Se expresa haciendo referencia a el tipo de muestra fue aislada cada especie de *Candida spp*
  - Registro: Se indicará en el formato de registro de qué tipo de muestra fue aislada cada cepa de *Candida spp*, indicando “SB” si fue de Secreción Bronquial o “U” si fue de Orina.
- Candidemia Comprobada
  - Tipo: Categórica dicotómica nominal

- Definición operacional: Se expresa como la presencia o no de Candidemia como diagnóstico final emitido por el médico tratante.
- Registro: Se indicará en el formato de registro si el paciente fue diagnosticado con Candidemia como diagnóstico final. Se registrará “SI” o “NO” dependiendo del caso. (Anexo 1)

### *Procedimientos y Técnicas*

#### Aislamiento e Identificación de las Cepas de *Candida sp*

Las levaduras aisladas serán inoculadas en 500 uL de suero humano, e incubadas a 35°C por 2 horas. Posterior al tiempo de incubación se procederá a corroborar microscópicamente la formación del tubo Germinativo, el cual facilita la diferenciación entre *Candida albicans* de otras especies. De forma simultánea, se realizará una siembra en Agar CHROM Cándida BBL para poder caracterizar de acuerdo al color del aislamiento entre *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kruzei* u otra especie. Posterior al aislamiento, se realizará una identificación adicional usando el microcultivo en Agar Arroz para la búsqueda microscópica de clamidosporas o blastosporas para la confirmación de las especies de *Candida spp* y finalmente se realizará una identificación mediante el sistema automatizado Phoenix M50<sup>(13)</sup>.

#### Detección de la Susceptibilidad a Azoles

Para determinar la resistencia a Azoles se usará el método de disco difusión en agar Müller Hinton. La preparación del medio, la determinación de la susceptibilidad y la interpretación de los resultados serán realizadas de acuerdo a las especificaciones

de la CLSI M44-A2. La incubación se realizará por 48 horas y luego se procederá a leer los halos de inhibición <sup>(9)</sup>. (Anexo 2 y 3)

#### *Aspectos Éticos*

El proyecto será enviado para revisión y aprobación por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT)/Comité de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Al no trabajar directamente con humanos, este estudio no representa riesgo para los pacientes. Los datos a recolectar serán codificados y no se revelará información que permita correlacionar los aislamientos con el paciente. Los datos serán exclusivamente manejados por los investigadores.

#### *Plan de Análisis*

Las variables categóricas serán descritas usando frecuencias absolutas y relativas. Las variables numéricas serán descritas de acuerdo a la distribución de sus datos mediante el uso de medidas de tendencia central y dispersión. El análisis bivariado exploratorio será ejecutado considerando la naturaleza de la variable y su distribución. Se explorará las razones de prevalencia usando modelos lineales generalizados para aquellas variables que resulten significativas en el análisis bivariado. El nivel de significancia del valor de p estará establecido en  $p < 0.05$  y el nivel de confianza en 95%. El análisis será realizado usando el paquete estadístico Stata v14.0.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mendoza M., Importancia de la identificación de levaduras, Rev. Soc. Ven. Microbiología, 25(1), 15-23, 2005
2. Aguilar-García Cesar Raúl, Colonización por *Candida* en pacientes no neutropénicos en la unidad de cuidados intensivos, Medicina Interna de México, 29, 595-599, 2013
3. Alfonso C. et al, Identificación presuntiva de *Candida spp* y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Cándida Agar, Rev. Iberoam. De Micología, 27(2), 90–93, 2010
4. Romero Cabello R., Microbiología y Parasitología Humana Bases Etiológicas de las Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, México: Editorial Medica Panamericana, 2007
5. Tapia C., Actualización en pruebas de susceptibilidad anti fúngica, Rev. Chilena de Infectología, 26 (2), 144-150, 2009
6. Garnacho-Montero José et al, Infección fúngica invasiva en los pacientes ingresados en las áreas de críticos, Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica, 30(6), 338–343, 2012
7. Fuentes M. et al, Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*, Rev Chilena de Infectología, 31 (5), 511-517, 2014
8. Berkow E. et al, Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in *Candida parapsilosis*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(10), 5942-5950, 2015

9. Gomez Quintero C., Resistencia de levaduras del género *Candida* a Fluconazol, *Infectio*, 14(S2), S172-S180, 2010
10. Olea Barrionuevo D, Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH, España: Editorial de la Universidad de Granada,1995
11. Ponton J, Quindos G, Mecanismos de resistencia a la terapéutica anti fúngica, *Medicina Clinica*, 126(Supl 1), 56-60, 2006
12. Canton E. et al, Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los anti fúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A), *Rev Iberoamericana de Micología*, 15(a), a1-15 a17, 2007
13. Diomedi A., Nuevos anti fúngicos: Las Equinocandinas, *Rev Chilena de Infectologia*,21 (2), 89-101, 2004
14. Pfaller M., Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment, *The American Journal of Medicine* , 125(1 a). S3-S13, 2012
15. Instituto Nacional de Salud, MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANAS, Series de Normas Técnicas N°44, Lima, 2007
16. Zurita Macalupu S., SITUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIFÚNGICA DE ESPECIES DEL GÉNERO *Candida* EN PERÚ, *Rev Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1),1-6, 2018
17. Bustamante B. *et al*, Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru, *Journal of Medical Microbiology*, 63, 855–860, 2014

## PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

### PREUPUESTO

ITEM	CANTIDAD	PRECIO
<b>AGARES</b>		
MÜLLER HINTON X 500 G	1	S/. 270.00
CHROM CANDIDA X 500 G	1	S/. 400.00
AGAR AGAR X 500 G	1	S/. 250.00
<b>MATERIALES</b>		
HISOPOS ESTERILES X 100 UNIDADES	1	S/. 20.00
TUBO DE DISCOS DE SENSIBILIDAD FLUCONAZOL 25 ug x 50 UNIDADES	2	S/. 70.00
TUBO DE DISCOS DE SENSIBILIDAD VORICONAZOL 25 ug x 50 UNIDADES	2	S/. 70.00
PANELES DE LEVADURAS PHOENIX X 25 UNIDADES	3	S/. 300.00
ASA DE SIEMBRA EN PUNTA	1	S/. 2.00
LAMINILLAS CAJA X 100 UNIDADES	1	S/. 3.50
AZUL DE METILENO EN POLVO	1	S/. 20.00
GLUCOSA ANHIDRA	1	S/. 15.00
TUBOS DE VIDRIO 13X100 MM X 100 UNIDADES	1	S/. 20.00
AGUA DESTILADA X LITRO	5	S/. 40.00
ARROZ X KG	1	S/. 3.50
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	1	S/ 150.00
<b>TOTAL</b>		S/ 1,634.00

### CRONOGRAMA

	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	MES 11	MES 12
ESTRUCTURACION DE PROYECTO												
PRESENTACION DE PROYECTO												
RECOLECCION DE DATOS DE PACIENTES												
RECOLECCION Y AISLAMIENTO DE CEPAS												
ANALISIS MICROBIOLOGICO DE CEPAS												
ANALISIS ESTADISTICO												
ELABORACION DE INFORME FINAL												
PRESENTACION DE INFORME FINAL												

**ANEXOS**  
**ANEXO 1**

**FORMATO DE REGISTRO DE CEPAS**

<b>PACIENTE</b>											
NUMERO	NOMBRE	EDAD	SEXO <sup>(a)</sup>	PROCEDENCIA <sup>(b)</sup>	PATOLOGIA PRE EXISTENTE	DIAS DE ESTANCIA HOSPITALARIA	TTO CON ANTIMICROBIANOS <sup>(c)</sup>	TTO PREVIO CON FLUCONAZOL <sup>(c)</sup>	TTO PREVIO CON VORICONAZOL <sup>(c)</sup>	TTO PREVIO CON OTRO ANTIFUNGICO <sup>(c)</sup>	CANDIDEMIA COMPROBADA <sup>(c)</sup>
	(a) = F (Femenino), M (Masculino)										
	(b) = UCI o UCIN										
	(c) = SI o NO										

**FORMATO DE REGISTRO DE CEPAS**

<b>MUESTRA</b>		<b>CEPA</b>				
<b>NUMERO</b>	<b>TIPO DE MUESTRA<sup>(a)</sup></b>	<b>TUBO GERMINAL<sup>(b)</sup></b>	<b>MICROCULTIVO<sup>(c)</sup></b>	<b>COLOR EN CHROM AGAR</b>	<b>ID EN PHOENIX M50<sup>(c)</sup></b>	<b>CONCLUSION<sup>(c)</sup></b>
<b>(a) = SB(Secrecion Bronquial), U (Orina)</b>						
<b>(b) = Positivo (+), Negativo (-)</b>						
<b>(c) = CA (Candida albicans), CT (Candida tropicalis), CK (Candida kruzei), CP (Candida parapsilosis), OC (Otras especies de Candida)</b>						





## ANEXO 2

### ANTIFUNGIGRAMA POR EL METODO DE DISCO DIFUSION

#### Preparación del Inoculo

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias de 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de Sabouraud Dextrosa Agar que se resuspenden en un tubo de solución salina (CINa 0,85%). Se agita bien y, con ayuda de un espectrofotómetro o turbidímetro (longitud de onda: 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

#### Inoculación de Placas

1. Sumergir una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0.5 McFarland.
2. Retirar el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
3. Sembrar la placa uniformemente.
4. Dejar secar 3-5 min y dejar la placa entreabierta.
5. Aplicar los discos.
6. Incubar a 35°C de 20 a 24 horas

#### Lectura

1. Si no hay suficiente crecimiento a las 24 h reincubar y leer a las 48 h.
2. Medir el halo de inhibición donde se produce una reducción importante del crecimiento.
3. La lectura es subjetiva y se requiere experiencia para dar medidas exactas.
4. La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo deben ser ignoradas.
5. *C. glabrata* y *C. krusei*, pueden necesitar 48 h de incubación

#### Puntos de Corte

ANTIFUNGICO	CARGA DEL DISCO	DIAMETRO (MM)		
		R	SDD	S
FLUCONAZOL	25 ug	≤14	15 – 18	≥19
VORICONAZOL	1 ug	≤13	14 – 16	≥17

Referencia: Canton E. et al, Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los anti fúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A), Rev Iberoamericana de Micología. 2007;15(a):15 a1-15 a17

### ANEXO 3

#### PREPARACION DE MEDIO DE CULTIVO PARA ANTIFUNGIGRAMA POR DISCO DIFUSION

Müller Hinton agar (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno (pH 7,2 - 7,4). Se puede incorporar los suplementos cuando se prepara el medio o bien incorporar los suplementos a las placas de MHA ya preparadas. La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición. Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas S y R a fluconazol, presentando buena correlación con el método M27-A3 y con los datos in vivo. Aunque hay poca diferencia entre la lectura a las 24 y 48 h, se recomienda realizarla a las 24.

##### Preparación

1. Preparar el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.
2. Añadir 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Dejar enfriar el medio a 45-50 °C y llenar las placas a razón de 28-30 ml de medio para placas de 9-10 cm de diámetro y 67-70 ml si son de 15 cm (altura de la capa de agar 4 mm).
5. Dejar enfriar y guardar en nevera.
6. Una vez preparadas las placas se pueden almacenar durante 7 días a menos que se tomen precauciones adicionales que eviten el secado de las placas

##### Control de Calidad

En cada ensayo debe incluirse al menos una cepa control de calidad para poder detectar cualquier anomalía o desactivación del antifúngico. El CLSI aconseja utilizar las siguientes cepas:

- *C. parapsilosis* ATCC 22019
- *C. krusei* ATCC 6258
- *C. albicans* ATCC 90028
- *C. tropicalis* ATCC 750

Los puntos de corte para cada cepa son los siguientes:

ANTIFUNGICO	CARGA DEL DISCO	C.KRUZEI ATCC 6258	C. PARAPSILOSIS ATCC 22019	C. ALBICANS ATCC 90028	C. TROPICALIS ATCC 750
FLUCONAZOL	25 ug		22 - 33	28 - 39	26 - 37
VORICONAZOL	1 ug	16 - 25	28 - 37	31 - 42	

Referencia: Canton E. et al, Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los anti fúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A), Rev Iberoamericana de Micología. 2007;15(a):15 a1-15 a17