



ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO

**“PERFIL FENOTÍPICO Y PERFIL DE RESISTENCIA DE LEVADURAS DEL
GÉNERO CANDIDA, AISLADAS DE HEMOCULTIVOS EN EL HOSPITAL**

GUILLERMO ALMENARA, EN LOS AÑOS: 2014 A 2015”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN SALUD PÚBLICA

AUTOR:

DÍAZ TELLO JOSÉ ALBERTO

ASESOR:

DR. LEYVA ROJAS AMÉRICO FRANCISCO

JURADO:

DR. ARCE RODRIGUES ELIAS MELITON

DR. DIAZ DUMONT JORGE RAFAEL

DR. LOZANO ANELLY GLENN ALBERTO

LIMA – PERÚ

2019

Dedicatoria

A mi padre, José María Díaz Horna, por ese corto, pero maravilloso tiempo que compartió conmigo.

A mi madre, Telesvina Tello Cachay, quien, con su cariño, ayuda y consejos me motivó a seguir siempre adelante y a superarme.

A mi esposa, Justina Vega Cholón, por su afecto, amor y comprensión, por ayudarme a lograr mis objetivos.

A mis hijos, Roxanita, los Pepes, Cristhian y Melissita; la nueva generación, por la alegría y gratos momentos compartidos.

Al personal del servicio de Microbiología del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, tanto médicos, biólogos, tecnólogos, técnicos, auxiliares como digitadores; por su ayuda en la realización de esta investigación.

Índice

Resumen	ix
Summary	x
I. Introducción	1
1.1 Planteamiento del Problema	3
1.2 Descripción del Problema	4
1.3 Formulación del Problema	5
Problema general	5
Problemas específicos	6
1.4 Antecedentes	6
1.5 Justificación de la Investigación	10
1.6 Limitaciones de la Investigación	11
1.7 Objetivos	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
1.8 Hipótesis	13
Hipótesis general	13
Hipótesis específicas	13
II. Marco Teórico	15
2.1 Teorías Generales Relacionadas con el Tema	15
Flora fúngica levaduriforme	15
Levaduras	15

Candidiasis	16
Causas predisponentes	17
Candidiasis diseminada aguda	17
Candidiasis diseminada crónica	18
2.2 Bases Teóricas Especializadas	18
Levaduras del género Cándida	18
Hemocultivos	19
Candidemia	20
Antifúngicos	21
Importancia de la identificación de las levaduras a nivel de especie	23
Antifungigrama	24
Interpretación del CIM	24
Perfil de resistencia	25
2.3 Definición de Términos	26
Perfil Fenotípico	26
Perfil Genotípico	26
Identificación.....	26
Tratamiento	26
III. Método	27
3.1 Tipo de Investigación.....	27
Observacional.....	27

Prospectiva	27
Transversal	27
Pasos en el diseño de la investigación.....	27
3.2. Población y Muestra	28
Población.....	28
Muestra.....	28
Criterios de inclusión	29
Criterios de exclusión.....	29
3.3. Variables	29
Variables dependientes.....	29
Variables independientes	30
3.4 Operacionalización de Variables	31
3.5 Instrumentos.....	32
3.6 Procedimientos.....	33
Identificación de levaduras	33
Identificación presuntiva	34
3.7 Análisis de los Datos.....	35
IV. Resultados	36
4.1 Análisis e Interpretación	36
4.2. ntrastación de Hipótesis	36
4.3 Decisión	36

4.4 Perfil Fenotípico	37
4.5 Perfil de Resistencia.....	46
V. Discusión de Resultados.....	52
VI. Conclusiones.....	59
VII. Recomendaciones	61
VIII. Referencias Bibliográficas	62
IX. Anexos.....	68

Lista de Tablas

Tabla 1.	<i>Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según la Especie. Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	37
Tabla 2.	<i>Distribución de especies de Cándidas aisladas de Sangre y Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	38
Tabla 3.	<i>Distribución de Cándida albicans aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	39
Tabla 4.	<i>Distribución de Cándidas tropicales aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	40
Tabla 5.	<i>Distribución de Cándidas parasilopsis aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	41
Tabla 6.	<i>Distribución de Cándidas glabrata aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	41
Tabla 7.	<i>Distribución de Cándidas guillermundii aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	42
Tabla 8.	<i>Distribución de Cándidas lypolytica aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	43
Tabla 9.	<i>Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según el Sexo y Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	44
Tabla 10.	<i>Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según Sobrevivencia del Paciente: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	44
Tabla 11.	<i>Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según Servicio de Procedencia: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015.....</i>	45
Tabla 12.	<i>Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre a la Flucitosina: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	46

Tabla 13.	<i>Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre al Fluconazol: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	47
Tabla 14.	<i>Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre a la Anfotericina B: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	48
Tabla 15.	<i>Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre al Voriconazol: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	49
Tabla 16.	<i>Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre a la Caspofungina: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	50
Tabla 17.	<i>Susceptibilidad de la Cándida aislada de sangre al Fluconazol: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015</i>	51

Resumen

El objetivo de la investigación es determinar la relación entre el perfil fenotípico y el perfil de resistencia de especies de levaduras del género *Cándida*, aislada de hemocultivos de pacientes hospitalizados y de emergencia con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. En los años del 2014 al 2015, se examinaron prospectivamente 160 cepas de *Cándidas*, a las cuales se les realizó la identificación de especie por metodología convencional manual y por sistema automatizado, la susceptibilidad anti-fúngica se hizo por el Sistema Vitek 2, en el servicio de Microbiología de dicho hospital; el perfil fenotípico está formado *Cándida albicans* (31.88%), *C. tropicales* (25%), 32 *C. parasilopsis* (20%), *C. glabrata* (10%), *C. guillermondi* (7.5%), 07 *C. lyopolitica* (4.38%), *C. krusei* (0.63%) y *C. haemlone* (0.63%); el mayor porcentaje de *Cándidas* (48.75%) se aislaron de población mayor (> 65 años) y el menor porcentaje neonatos (10%); los servicios de mayor aislamientos de *Cándidas* son: UCI, (29.38%), cirugía (15.63%), emergencia (11.25%), medicina (10%), pediatría (6.88%), neonatología (5.63%) entre otros. No se observó resistencia de *Cándida albicans* a los anti-fúngicos probados, En *Cándida No Albicans* se encontró una resistencia del 12%; 03 cepas de *C. No albicans* fueron resistentes a la flucitocina, 03 cepas fluconazol, 01 cepa a la anfoterisina B y 02 cepas al Voriconazol; no hubo resistencia a la Capofungina. En esta investigación se concluye que en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen la *Cándida* que más se aísla en candidemias es *Cándida albicans* seguida de *C. tropicalis*, *C. parasilopsis* y *C. glabrata*; no hubo resistencia para los anti-fúngicos probados para *Candida albicans*, pero si para *Candida. No alibicans* de 12%.

Palabras Claves: *Cándidas*, candidiemia, fenotípico, resistencia, anti-fúngica.

Summary

The objective of the research is to determine the relationship between the phenotypic profile and the resistance profile of yeast species of the genus *Candida*, isolated from blood cultures of hospitalized and emergency patients diagnosed with candidemia at the Guillermo Almenara Irigoyen Hospital. In the years of 2014 to 2015, 160 strains of *Cándidas* were prospectively examined, to which the species identification was made by conventional manual methodology and by automated system, the anti-fungal susceptibility was made by the Vitek 2 System, in the Microbiology service of said hospital; The phenotypic profile is formed by *Candida albicans* (31.88%), *C. tropical* (25%), 32 *C. parasilopsis* (20%), *C. glabrata* (10%), *C. guillermondi* (7.5%), 07 *C. lyopolitica* (4.38%), *C. krusei* (0.63%) and *C. haemlone* (0.63%); the highest percentage of candidids (48.75%) were isolated from the largest population (> 65 years) and the lowest percentage of neonates (10%); the services of greater isolates of *Cándidas* are: ICU, (29.38%), surgery (15.63%), emergency (11.25%), medicine (10%), pediatrics (6.88%), neonatology (5.63%) among others. No resistance of *Candida albicans* was observed to the antifungal agents tested. In *Candida No Albicans* a resistance of 12% was found; 03 strains of *C. No albicans* were resistant to flucitocin, 03 strains fluconazole, 01 strain to amphotericin B and 02 strains to Voriconazole; there was no resistance to Capofungin. In this investigation it is concluded that in the Guillermo Almenara Irigoyen hospital the *Candida* that is most isolated in candidemias is *Candida albicans* followed by *C. tropicalis*, *C. parasilopsis* and *C. glabrata*; there was no resistance for the anti-fungal tested for *Candida albicans*, but for *Candida. No alibicans* of 12%.

Key words: candid, candidemia, phenotypic, resistance, anti-fungal.

I. Introducción

Las infecciones fúngicas invasivas en la actualidad se han incrementado y constituyen un problema de mucha importancia en Salud Pública (Liu et al., 2014), este incremento se explica por diferentes factores siendo los más importantes: el aumento de pacientes con alteraciones del sistema inmunológico, al desarrollo y avance de la medicina, mejoras en los esquemas de diagnóstico y tratamiento, al uso generalizado de antibióticos de amplio espectro en pacientes hospitalizados, avances en la trasplanta logia de órganos, a las políticas de salud de los países y al aumento de la esperanza de vida entre otros. (Colombo, 2008; Liu, 2014; Rodríguez; 2017).

Se reporta a levaduras del género *Candida* como unos de los patógenos nosocomiales más frecuentes que causan infección a nivel del torrente sanguíneo, (Colombo, 2008; Nucci, 2013; Rodríguez, 2017). En los últimos años la información sobre candidemia en los diferentes países del mundo se ha incrementado, estos estudios incluyen datos europeos, asiáticos, americanos, Latinoamérica e incluso peruanos estas investigaciones atribuyen a especies de *Candida* como causantes de candidemia, predominando *Candida albicans* entre ellas y lo relacionan con altas tasas de mortalidad (Nucci et al., 2013).

Las tasas de mortalidad de las candidemias varían entre los países de 29 a 50 % esta variación se debe principalmente a la geografía, clima, grado de desarrollo de los países, a los esquemas de tratamiento. (Beltrán, Calvo, Mesa, Perozo, & Pineda, 2010)

Las candidemias representan un importante problema clínico - epidemiológico en las unidades de cuidados intensivos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, neonatos, pediátricos; es la segunda causa de fallecimiento de los niños con sepsis (Meyer, Geffers, Gastmeier, & Schwab, 2013).

Varios estudios señalan que las tasas de candidemia en los países de Norte América son más bajas que las informadas en los países de América Latina (Colombo et al., 2006). Un

informe que incluye a cinco países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Colombia, México y Perú) determinó que la incidencia de complicaciones infecciosas asociadas a los dispositivos en UCI es alta, (Gastmeier et al., 2013), lo cual amerita que se debe identificar las *Cándidas* a nivel de especie, lo mismo se debe hacer pruebas de susceptibilidad anti-fúngica, con la finalidad de dar al paciente un tratamiento correcto, oportuno y evitar la resistencia anti-fúngica.

Cándida albicans es la levadura más común en infecciones superficiales e invasivas, alcanzando una prevalencia global mayor al 50%, según casuística mundial, (Colombo, A et al., 2006) pero en la actualidad se ha observa cambios etiológicos a nivel geográfico en los países, emergiendo especies de *Cánida no albicans* como los agentes etiológicos más frecuentes, destacando *Cándida glabrata*, *Cándida parasilopsis*, *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei*, *Cándida guilermontii* (Beltrán, 2010).

El uso de los antibióticos anti-fúngicos en la profilaxis y en el tratamiento clínico de los pacientes conllevó a cambios epidemiológicos y etiológicos de las especies de *Cándidas*, la aparición de cepas con resistencia secundaria y la sustitución de especies sensibles por otras con resistencia intrínseca, esto relacionado específicamente al uso de los triazoles (fluconazole, itraconazole) como terapia o profilaxis en pacientes inmunosuprimidos. (De La Torre & Gallego, 2001).

Se han estandarizado varias técnicas para la evaluación de la sensibilidad de las *Cándidas* a los antibióticos anti – fúngicos con el fin de detectar la resistencia in vitro y correlacionarlo con la clínica del paciente: la identificación correcta de las levaduras a nivel de especie y la respuesta a los antibióticos contribuye a la instauración de un tratamiento adecuado y efectivo. (Cercenado & Cantón, 2006).

En el Perú hay pocos reportes epidemiológicos y ecológicos de Candidemia, que permitan tomar decisiones terapéuticas o de control basados en la incidencia y en la distribución de

especies, en los factores de riesgo y en la respuesta a los antibióticos anti – fúngicos; este hecho consideré relevante para aislar levaduras del Género Cándida de pacientes hospitalizados y de emergencia del hospital Guillermo Almenara Irigoyen, caracterizarlos a nivel de especie y determinar su perfil de resistencia a los antibióticos anti fúngicos, con la finalidad de contribuir al diagnóstico correcto y al tratamiento eficaz de las Candidemia en pacientes hospitalizados y de emergencia y bajar los costos de salud y crear una data que guie y oriente al tratamiento empírico a nivel Perú.

1.1 Planteamiento del Problema

Las infecciones por especies de levaduras del género Cándida se han incrementado a nivel mundial, lo mismo sucede en nuestro país (Perú), varios factores contribuyen a este aumento tanto intrínseco como extrínseco siendo uno de ellos, la terapia profiláctica anti-fúngica, políticas de salud, limitado acceso a los servicios de Cuidados Intensivos (UCI) en los hospitales, fallas en el diagnóstico clínico y de laboratorio, entre otros.

Se debe de hacer una oportuna y correcta identificación de las levaduras a nivel de especie para dar al paciente tratamiento efectivo y oportuno a fin de evitar resistencia a los anti-fúngicos, el tratamiento debe comprobarse con los resultados de la prueba de sensibilidad anti-fúngica del laboratorio.

En muchos hospitales del mundo sobre todo en los hospitales de los países desarrollados se identifica correctamente a las levaduras a nivel de especie se realiza prueba de susceptibilidad anti-fúngica, en países en vías de desarrollo estas pruebas anti-fúngicas solo hacen en hospitales nacionales y del tercer nivel, en el resto solo se identifica hasta género, lo cual contribuye que la medicación no sea la adecuada.

En el Perú hay poca información sobre el perfil de las especies de levaduras del género Cándida que se aíslan de pacientes con candidemia y de la respuesta in vitro a los antibióticos anti fúngicos (Rodríguez et al., 2017); este hecho consideré relevante para

aislar levaduras del Género *Cándida* de pacientes hospitalizados y de emergencia del hospital Guillermo Almenara Irigoyen, caracterizarlos a nivel en un periodo de tiempo determinado.

1.2 Descripción del Problema

En la actualidad las levaduras del género *cándida* se reportan como unos de los patógenos nosocomiales más frecuentes que causan infección a nivel del torrente sanguíneo. En los últimos años la información de diferentes países del mundo se ha incrementado, los que incluyen a estudios europeos, americanos, Latinoamérica e incluso peruanos (Tedeschi et al., 2006), estos estudios atribuyen a especies de *cándidas* como causantes de candidemia, lo relacionan a altas tasas de mortalidad, las cuales varían entre los países de 29 a 50 %; esto se debe a la geografía, clima, grado de desarrollo y políticas de salud (Liu et al., 2014).

Las candidemias representan un importante problema clínico - epidemiológico en las unidades de cuidados intensivos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, neonatos y pediátricos; es la segunda causa de fallecimiento de los niños con sepsis. Por lo cual se debe identificar las *cándidas* a nivel de especies lo mismo se debe hacer pruebas de susceptibilidad anti-fúngica, a fin de dar un tratamiento correcto y oportuno.

Cándida albicans es la levadura más común en infecciones superficiales e invasivas, alcanzando una prevalencia global mayor al 50%, según casuística mundial (Nucci et al., 2013). pero en la actualidad se ha observa cambios etiológicos a nivel geográfico en los países, emergiendo especies de *Cánida no albicans* como principales y frecuentes agentes etiológico, destacándose aislamientos de *Cándida glabrata* *Cándida parasilopsis*, *Cándida tropicalis*, *Candida krusei*; atribuyéndose como factor condicionante en las variaciones etiológicas y epidemiológicas de las candidiasis invasoras al uso profiláctico o anticipado de anti fúngicos en pacientes con riesgo (Jarque, Pemán, & Salavert, 2006).

El uso de los antibióticos anti-fúngicos en el tratamiento clínico de los pacientes conllevó a cambios epidemiológicos en las especies de Cándidas, como la aparición de cepas con resistencia secundaria y la sustitución de especies sensibles por otras con resistencia intrínseca, esto último relacionado específicamente al uso de los triazoles (Fluconazole, Itraconazole) como terapia o profiláctico en pacientes inmunosuprimidos. (Cercenado & Cantón, 2006). Se han estandarizado varias técnicas para la evaluación de la sensibilidad de las Cándidas a los antibióticos anti – fúngicos con el fin de detectar la resistencia in vitro y correlacionarlo con la clínica del paciente: la identificación correcta de las levaduras a nivel de especie y la respuesta a los antibióticos contribuye a la instauración de un tratamiento adecuado y efectivo. (Alvarado et al., 2013).

En el Perú hay pocos reportes epidemiológicos de Candidemia, que permitan tomar decisiones terapéuticas o de control basados en la incidencia y en la distribución de especies, en los factores de riesgo, así como en las pruebas de susceptibilidad anti-fúngica; esto considero importante para caracterizar a levaduras a levaduras del género Cándida a nivel de especie lo mismo que evaluar que valuar la resistencia anti-fúngica con la finalidad de contribuir al diagnóstico correcto y al tratamiento eficaz de las Candidemias en el hospital Almenara Guillermo Almenara Irigoyen; estos datos deben servir para orientación al tratamiento de la candidemia en el Perú a los cuales se los colocará en el Sistema de Gestión de Salud.

1.3 Formulación del Problema

Problema general

Por lo descrito anteriormente, se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es la relación entre el perfil fenotípico y el perfil de resistencia de las levaduras del género Cándida aislada de

hemocultivos de pacientes hospitalizados y de emergencia con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen durante los años 2014 al 2015?

Problemas específicos

1. ¿Cuáles son las especies de levaduras del género *Cándida* que se aíslan con mayor frecuencia de los cultivos de sangre de los pacientes hospitalizados y de emergencia con diagnóstico de candidemias que se atienden en el Hospital Guillermo Almenar Irigoyen en periodo 2014 – 2015?

2. ¿Cuál es la resistencia a los antibióticos anti-fúngicos de las levaduras del género *Cándida* aisladas de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de candidemia que atienden en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen en años 2014 - 2015?

1.4 Antecedentes

Colombo et al. (2008) realizaron un estudio sobre de epidemiología de la candidemia en Brasil, y una vigilancia cantinela en once centros médicos de las nueve ciudades más importantes del Brasil; donde detectaron 712 casos en los que *Cándida albicans* fue la especie más común (40,9%), seguido de *C. tropicalis* (20,9%) y *C. parapsilopsis* (20,5 %). En general, la disminución de la susceptibilidad a Fluconazol se produjo en 33 (5%) cepas del total de las cepas aisladas, donde seis (1%) eran resistente. Hubo una correlación lineal entre el Fluconazol y el Voriconazol. Este es el mayor estudio metacéntrico realizado en candidemia en América Latina y muestra la elevada morbilidad y mortalidad de la candidemia en Brasil. La resistencia antimicótica es rara, pero la correlación entre el fluconazol y el voriconazol sugiere que puede ocurrir resistencia cruzada.

En el mismo año, Dolande et al. (2008) realizaron un estudio de distribución y sensibilidad a los anti fúngicos de aislamientos clínicos de *Cándida* en seis centros de salud del área metropolitana de Caracas, Venezuela. Las *Cándidas* fueron identificadas por metodología

convencional manual, y las pruebas de susceptibilidad por ATB- fungus y por E-test. En el estudio se concluye que *Cándida albicans* fue la levadura que se aisló con mayor frecuencia (46,7%), el resto de las especies fueron *Cándida* Spp. (53.3%), las cuales están conformadas por: *C. tropicales*, con 19%. *C. glabrata* con 9.2%; en cuanto a la susceptibilidad se observó que *C. albicans* fue sensible en un 92.6% al fluconazole, mientras que *Cándida tropicalis* y *Cándida glabrata* mostraron 81.1 y 56.7 %; todos los aislamientos estudiados mostraron una CIM < 1 mg/L para Anfoterina B; casi todos resultaron fueron sensibles al Voriconazol (98.6%). El rango promedio de la CMI por E-test fue de 0,002 - 0,125 µg/mL para la anfotericina B, 0,003 - 256 µg/mL para el Fluconazol, 0,003 - 32 µg/mL para el Itraconazol y 0,016 - 1 µg/mL para el Voriconazol. Posteriormente, Eggimann et al. (2011) reportaron un estudio a nivel mundial sobre el diagnóstico de la Candidiasis Invasiva en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y su distribución geográfica. El estudio llegó a la conclusión de que tanto en América del Norte como en América del Sur, *Cándida no albicans* es la especie más frecuentemente aislada del torrente sanguíneo, representando tasas mayores del 50%; siendo *Cándida glabrata* la especie más aislada en América del Norte y *Cándida parasilopsis* en América Latina; mientras que en Europa *Cándida albicans* sigue siendo la especie más aislada. Las tendencias epidemiológicas sugieren que *Cándida no albicans* están emergiendo, sobre todo *Cándida glabrata*; también infieren que estos cambios progresivos en la epidemiología de las Candidemias en los continentes se debe a las diferencias de ecología de los hongos en ambos continentes, así como al uso masivo y mayoritario de azoles en el tratamiento o en la profilaxis de estas infecciones invasoras.

También manifiestan que las tasas de reducción de la susceptibilidad o resistencia anti-fúngica varían desde < 5% a > 30%. La susceptibilidad anti-fúngica de especies *Cándida* a las equinocandinas (Anidulfungina, Micafungina) a los nuevos azoles (Posaconazol,

Voriconazol) y Fluconazol se estudiaron por la metodología del SENTRY de acuerdo con los nuevos puntos de corte clínicos según el Instituto de Standares para Laboratorios Clínicos (CLSI). En *C. albicans*, no se observó resistencia a los cinco anti-fúngicos, por el contrario, las tasas de resistencia de *C. glabrata* fueron reportados a Fluconazol entre 5,6% a 3,7% Posaconazol, Voriconazol 3,5% a 2,4% Anidulafungina y Micafungina 1,9%, respectivamente *C. parapsilosis* se encontró que era resistente a fluconazol en 5% de los aislamientos. *C. tropicalis* fue resistente al Fluconazol en el 3.2% de los aislados, Posaconazol en el 0.9%, y el Voriconazol en un 2.9%. *C. krusei* era resistente en el 2,5% de los casos a Voriconazol, mientras que no se encontró ninguna resistencia a Posaconazol y para los dos Equinocandinas. En Dinamarca, las especies totalmente susceptibles disminuyeron de 79,7% a 68,9%.

Por otro lado, Flores et al. (2008) realizaron una investigación multicéntrica en Andalucía - España de Sensibilidad “in vitro” de las cepas de *Cándida spp*, aisladas de sangre donde testaron 197 cepas de *Cándida spp*. Las CMIs de Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol y Voriconazol se realizaron usando el panel de Sensititre Yeast One. Las CMIs de Posaconazol y Caspofungina se determinaron por Etest. Los resultados del estudio fueron los siguientes: *C. albicans* fue la especie más aislada (49,2%), seguida de *C. parapsilosis* (17,3%), *C. tropicalis* (15,2%), *C. glabrata* (13,7%) y *C. krusei* (3,6%), Todas las cepas tuvieron CMI \leq a 1mg/l de Anfotericina y 98,5% de los aislamientos fueron inhibidos por 1mg/L de Posaconazol. Ocho aislamientos (4,1%) fueron identificados como resistentes a Fluconazol (CMI \geq a 64 mg/L) y 7 (3,6%) como resistentes a Itraconazol (CMI \geq a 1 mg/L). Todos los aislamientos fueron sensibles a Voriconazol y Caspofungina. Ellos concluyen: que *C. Krusei* y *C. glabrata* se aislaron en el 18% de los casos de candidemia. La mayor parte de los aislamientos de estas especies son resistentes a Fluconazol o sensibles dependiendo de la dosis, pero sensibles a Voriconazol y

Casposfungina. Asimismo, ellos proponen que el tratamiento empírico de la candidemia se efectúe con estos Antifúngicos y no con Fluconazol.

Por su lado, Halley et al. (2011) realizaron un trabajo de investigación de sensibilidad frente a drogas anti-fúngicas de levaduras aisladas de fungemias. En el mismo concluyen que los sistemas automatizados permiten la identificación de la mayoría de agentes etiológicos de *Cándida*. Ellos trabajaron con 152 cepas de los cuales 90.8% de los aislamientos correspondieron al género *Cándida* y 9.2% a los géneros *no Cándida* (*Trichosporum*, *Debaryomyces*, *Kodamaea*, *Criptococcus*); las levaduras del género *Cándida* aisladas, el 15.9% corresponde a *Cándida albicans* y 84.1 % corresponden a *otras Cándidas*; de estas la que más se aisló fue *Cándida guilliermondii* con una frecuencia de 29.7%, seguido de *Cándida parasilopsis* con 18,1%, el cuarto lugar lo ocupó *Cándida tropicalis* con 14.5%, también *Cándida pelliculosa* con 8.7% y el 13.1% corresponde a *otras Cándidas spp*; en cuanto a la susceptibilidad, *Cándida guilliermondii* es la que mostró mayor resistencia al Itraconazol. Todas las cepas de *Cándida albicans* fueron sensibles al Fluconazole.

Posteriormente, en China, Liu et al. (2014) realizaron un estudio sobre Candidemia, tasas de incidencia, tipos de especies y factores de riesgo en un hospital universitario de tercer nivel, de enero del 2009 a diciembre del 2011. Ellos concluyeron que el 29.8% de aislamientos corresponden a *Cándida albicans*, el 27.7 % corresponde a *Cándida parasilopsis*, el 16.4 % a *Cándida guilliermondi*, el 11.4% a *Cándida tropicalis*, el 4.6% a *C. glabrata* y el 10.1% a *otras Cándidas*.

Nightingale, Patel y Juma (2011) reportaron una investigación sobre epidemiología, características clínicas, y el resultado de la Candidemia que fue realizado en un centro terciario de referencia en el Reino Unido. Se realizó el aislamiento de 107 de levaduras del género *Cándida*; donde las *Cándidas* más aisladas fueron *Cándida no albicans* (*Cándida*

spp) con el 58%, *Cándida albicans* fue la especie más común con una tasa de 43 %, seguido de *C. glabrata* (31%), *C. parasilopsis* (30%), en el 7% estuvieron: *C. tropicalis*, *C. novergensis*, *C. Krusei*, *C. lusitaniae* entre otras.

También, Rodríguez et al. (2015) , en realizaron estudio sobre la distribución nosocomial de las especies de Cándidas aisladas de sangre en el Hospital Guillermo Almenara. Ellos reportaron que las especies más frecuentes son: *C. albicans*, *C. tropicales*, *C. parasilopsis*, *C. glabrata*, *C. guillermodie* y *C. lipolytica*.

Finalmente, Sanabria et al. (2014) realizaron un estudio sobre perfil de susceptibilidad a anti-fúngicos aislados de *Cándida* spp por el método de microdilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol; manifiestan que la identificación de las especies de Cándida fue realizada por métodos automatizados y convencionales y la CIM a los antifúngicos se determinó por el método de microdilución según el CLSI. Fueron incluidos 50 aislados de *Cándida*, resultando predominante *C. albicans* (40%) seguido de *C. parapsilosis* y *C. glabrata* en igual proporción (20%), *C. tropicales* (16%) y *C. krusei* (4%). Con el antiguo criterio, cinco aislados resultaron resistentes al fluconazol (10%), dos fueron *C. krusei* con resistencia natural, dos *C. tropicalis* y uno *C. albicans*. Tres aislados tuvieron sensibilidad dosis dependiente (SDD), uno de cada especie de *C. tropicales*, *C. parasilopsis* y *C. glabrata*. Con el nuevo criterio, la resistencia aumentó a siete aislados (14%), dos de los cuales fueron clasificados previamente como SDD. Los nueve aislados de *C. glabrata* y dos de *C. albicans* de sensibles pasaron a SDD. Todos resultaron sensibles a anfotericina B. Con los nuevos puntos de corte hubo una variación importante en el perfil de sensibilidad, especialmente de *C. glabrata*.

1.5 Justificación de la Investigación

En el Perú se reporta continuamente infecciones del torrente sanguíneo por levaduras del género Cándida en los servicios de hospitalización y de emergencia de los hospitales, las

cuales ocasionan mayor tiempo de hospitalización más consumo de antibióticos, incrementado las tasas de mortalidad y costos hospitalarios (Rodríguez et al., 2017).

Las infecciones por especies de *Cándida* se observan principalmente en los servicios de hospitalización de: Cirugía, Oncología, Trasplantes, Pediatría, Neonatología, Nefrología, Hematología, Geriatria, Medicina Infecciosa de los hospitales de alta complejidad; desconociéndose en la mayoría de los casos las especies de *Cándidas* involucradas y la respuesta a los antibióticos anti fúngicos, debido a que estas pruebas se hacen en laboratorios especializados. LX et al., (2014)

Se reporta continuamente fallecimiento de pacientes con candidemia por levaduras con tasas de mortalidad alta, esto se puede prevenir con la identificación etiológica correcta y con la realización de pruebas de susceptibilidad estandarizadas.

La resistencia anti fúngica en el Perú es poco conocida, porque las pruebas de susceptibilidad a los anti fúngicos solo se hacen en determinados hospitales; siendo el tratamiento en la mayoría de los casos empírico; desconociéndose la respuesta de las *Cándida* a los anti - fúngicos. (Colombo, 2013; Nucci, 2013; Rodríguez, 2017)

Al finalizar la presente investigación nos proponemos conocer las especies de levaduras del generó *Cándida* (perfil fenotípico) que más se aíslan de los hemocultivos de pacientes con candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, y la resistencia a los antibióticos anti fúngicos; conocer ésta información es de mucha importancia , porque se mejoraría el tratamiento empírico; además se reduciría el tiempo de hospitalización, la mortalidad, los costos hospitalarios de pacientes con este tipo de patología en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

1.6 Limitaciones de la Investigación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología, y en los servicios de hospitalización y emergencia del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, comprendió el

estudio del perfil fenotípico y de resistencia de las especies de levaduras del género *Cándida*, aislada de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de candidemia.

Señalamos como factores limitantes de esta investigación es la demora en la reposición del stock de reactivos e insumos por parte de los laboratorios proveedores como: medios de cultivos, antibióticos, paneles, reactivos; lo cual afecta a la continuidad del proyecto.

Las interrupciones del fluido eléctrico, condiciona el normal funcionamiento de los equipos eléctricos: como incubadoras, equipos de identificación y lectores de antibiograma lo cual retrasos en los análisis y altera la calidad.

La demora en el pedido de las órdenes al laboratorio por parte del médico tratante y la demora en la llegada de las órdenes al laboratorio de Microbiología ocasionan retrasos en la tomas de muestras de hemocultivo al paciente.

Hemocultivos tomados después del tratamiento y sin removedor de antibióticos.

1.7 Objetivos

Objetivo general

Determinar la relación entre el perfil fenotípico y el perfil de resistencia de las especies de levaduras del género *Cándida*, aislada de hemocultivos de pacientes hospitalizados y de emergencia con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen durante los años 2014 al 2015.

Objetivos específicos

1. Identificar las especies de levaduras del género *Cándida* (perfil fenotípico) que se aíslan con mayor frecuencia de los cultivos de sangre de los pacientes hospitalizados y de emergencia con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, en el periodo del 2014 al 2015.

2. Evaluar la resistencia a los antibióticos anti – fúngicos (perfil de resistencia) de las especies de levaduras del género *Cándida* aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados y de emergencia con candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, el periodo 2014 a 2015.

1.8 Hipótesis

Hipótesis general

Hi: El tratamiento médico dado a los pacientes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen con diagnóstico de candidemia por levaduras del género *Cándida*, que son aisladas de hemocultivos, es dado en relación al perfil fenotípico y al perfil de resistencia de las especies de *cándidas* aisladas, lo cual es igual a lo observado en los diferentes países de América Latina. (Rodríguez et al., 2017)

Ho: El tratamiento médico dado a los pacientes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen con diagnóstico de candidemia por levaduras del género *Cándida*, que son aisladas de hemocultivos, no es dado en relación al perfil fenotípico y al perfil de resistencia de las especies de *cándidas* aisladas, lo cual no es igual a lo observado en los diferentes países de América Latina.

Hipótesis específicas

H₁: Las especies de levaduras del género que se aíslan con mayor frecuencia de pacientes hospitalizados con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen son: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. Parasilopis* y *C. Grabrata* y *C. guillermondei*. (Rodríguez et al., 2017).

H₀: Las especies de levaduras del género que se aíslan con mayor frecuencia de pacientes hospitalizados con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo

Almenara Irigoyen no on: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. Parasilopis* y *C. Grabrata* y *C. guillermondei*.

H₂: Las especies de cándidas aisladas de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de candiemia en el Hospital GAI son sensibles a los anti-fúngicos probados como: Flurocitisina, Fluzonal, Variconazol, Anfoterisina B y Caspofugina, lo cual también se observa en los diferentes países latinoamericanos. (Rodríguez., 2017).

H₀: Las especies de cándidas aisladas de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de candiemia en el Hospital GAI no son sensibles a los anti-fúngicos probados como: Flurocitisina, Fluzonal, Variconazol, Anfoterisina B y Caspofugina.

II. Marco Teórico

2.1 Teorías Generales Relacionadas con el Tema

Flora fúngica levaduriforme

En la actualidad la flora microbiota fúngica levaduriforme está conformado por más de 600 especies de levaduras las cuales están distribuidas en 03 clases y 60 géneros; correspondiendo a la clase Ascomycota 36 géneros, 16 géneros para la clase Blastomycota y 10 géneros para la clase Basidiomycota; pero solamente 100 especies están relacionados con patología humana. Viven en diferentes ambientes: tierra, aire, suelo, agua; animales, vegetales; se los puede aislar de diferentes especímenes humanos como: piel, mucosas, uñas, secreciones respiratorias, oculares, óticas, vaginales; heces, sangre, líquidos de punción. El aislamiento de las levaduras de sitios estériles del organismo humano es importante porque se lo relaciona con patología humana, pero el aislamiento a partir de secreciones, heces, piel es discutible porque se lo relaciona con contaminación por flora (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012).

Levaduras

Las levaduras son organismos microscópicos, eucariotas, aclorofilicos, heterótrofos, generalmente unicelulares, a veces pluricelulares cuando forman pseudohifas, hifas o multigemación; son de forma redonda, oval o elongada, se reproducen por brotación simple o fisión (binaria o múltiple), muchas especies se reproducen sexualmente, presentan pared celular a base de quitina o manosa, algunas géneros presentan pigmentos, la respiración es generalmente aerobia, se alimentan por adsorción a base de carbohidratos, son mesófilos, se desarrollan en medios neutros y ligeramente ácidos en un pH de 4.5 a 6.5, macroscópicamente se caracteriza por que forman colonias pequeñas no filamentosas tipo bacteria de 1 a 3 mm de diámetro, de color generalmente blanco o beige,

de consistencia cremosa o mantecosa, de aspecto seco o húmedo, y olor dulzón, las levaduras se agrupan en varios géneros, pero los que tienen importancia médica son el Género *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Trichosporum*, *Geotrichum*, *Blastoschizomyces*, *Wickerhamomyces* (*Hansenula*), *Rhodotorula*, *Sachamoromyces*, *Prototheca*: (Arenas, 2011; Bonifaz , 2012; Jawetz, 2010).

Candidiasis

La candidiasis es una infección primaria o secundaria ocasionada por levaduras del género Cándida; siendo *Cándida albicans* el agente etiológico más frecuente, pero otras especies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* son aisladas con una frecuencia elevada en las muestras clínicas; además, especies saprofitas, empiezan a ser aisladas como patógenas emergentes a la vez que aparecen otras antes no vistas (Bonifaz, 2012; Jawetz, 2010).

Cándida albicans tiene una amplia distribución mundial y es la más aislada en individuos normales como un comensal de la cavidad oral (Cannon y Chaffin, 1999) y del tracto digestivo, pero menos abundante en el tracto vaginal de mujeres normales. Otras especies del género Cándida son habitualmente saprobias de la mucosa digestiva (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) y respiratoria (*C. kefyr*, *C. tropicalis*). También se puede aislar del medio ambiente como: agua, suelo, aire, alimentos, vegetales; por lo cual el aislamiento a partir de estas muestras cuestionable; salvo que el aislamiento ocurra de sitios estériles como: líquidos biológicos, LCR y sangre, para tener la importancia clínica (Arenas, 2011; Bonifaz , 2012).

La mayoría de las infecciones son de origen endógeno a partir de los reservorios mucocutáneos o cutáneos (introducidos por catéteres u otros dispositivos de uso médico, que interrumpen la barrera cutánea), aunque también pueden ser exógenas, esto se da en los hospitales, donde las levaduras pueden ser transmitidas a lactantes a partir de mamaderas

mal esterilizadas, o a pacientes transplantados o inmunosuprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal decontaminados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en unidades de cuidados intensivos (UCI), sin la debida protección.

Los factores desencadenantes de la enfermedad son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección está en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped (Meyer, Geffers, Gastmeier, & Schwab, 2013).

Causas predisponentes

Locales. Maceración, contacto con agua, mala higiene.

Fisiológicas. Recién nacidos, vejez (edades extremas), embarazo.

Endocrinas. Diabetes, hipotiroidismo.

Alteración de la Flora Normal. Por uso de antibióticos (ATB).

Enfermedades Hematológicas. Linfomas, leucemias, anemia aplásica, agranulocitosis, neutropenia, hipo y agamaglobulinemia (Bonifaz, 2012).

Factores Iatrogénicos. Uso prolongado de corticoides, quimioterápicos, inmunosupresores, agentes citotóxicos, alimentación parenteral, transplantes, cirugía abdominal, utilización de sondas y catéteres, radioterapia, prótesis, hemodiálisis (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012).

Enfermedades Debilitantes. Neoplasias, infección por virus de inmunodeficiencia humana, quemaduras graves, drogadicción, tuberculosis (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012).

Candidiasis diseminada aguda

Corresponde a la infección del género *Cándida* en más de dos órganos internos no contiguos, con aislamiento del hongo en uno de ellos, o su identificación mediante

histopatología; o la infección de un órgano acompañado de hemocultivo positivo para *Cándida* no presenta una sintomatología patognomónica, es posible observar fiebre de origen desconocido, en presencia o no de deterioro clínico continuo o aparición brusca de un cuadro de shock séptico con hipotensión u otros signos y síntomas de sepsis asociados; es difícil diferenciar de un cuadro de shock bacteriano por Gram negativos. (Arenas, 2011; Bonifa, 2012; Jawetz, 2010)

Candidiasis diseminada crónica

Se observa en pacientes con neutropenia prolongada, tales como leucemia, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, ocasionalmente denominada, Candidiasis hepatoesplénica, conlleva una evolución de meses hasta más de un año y generalmente compromete otros órganos como pulmones, riñones, piel etc; se requiere la confirmación histológica o micológica de *Cándida* mediante la biopsia hepática; en estos pacientes inicialmente los niveles de fosfatasa alcalina suelen ser normales, pero al lograr la remisión hematológica con neutrófilos superando el millar, se observa una elevación significativa de los niveles de fosfatasas alcalinas; en la exploración hepática y del bazo mediante TC y ultrasonido habitualmente se visualiza la presencia de abscesos lo cual inicialmente no es posible (Jawetz et al., 2010).

2.2 Bases Teóricas Especializadas

Levaduras del género *Cándida*

Las *Cándidas* son organismos microscópicos, eucariotas, aclorofílicos, heterótrofos, generalmente unicelulares, forman: bástulas, tubos germinativos, pseudohifas e hifas verdaderas; son de forma redonda, oval o elongada; se reproducen por brotación simple o fisión (binaria o múltiple), muchas especies presentan reproducción sexual, presentan pared celular a base de quitina, manos; algunas géneros presentan pigmentos, la

respiración es generalmente aerobia, se alimentan por adsorción a base de carbohidratos, se desarrollan en medios neutros y ligeramente ácidos en un pH de 4.5 a 6.5; macroscópicamente se caracteriza por que forman colonias pequeñas no filamentosas tipo bacteria de 1 a 3 μm de diámetro, de color blanco o beige, de consistencia cremosa o mantecosa, de aspecto seco o húmedo, y olor dulzón.

Cándida, es el género más importante en la Micología Clínica, ocasiona la mayoría de patologías humanas. Se han descrito más de 200 especies, pero solamente 20 especies están relacionadas con patologías fúngicas; éstas 14 especies ocasionan el 99% de las infecciones y siete especies el 95%; siendo *Cándida albicans*, la especie responsable de la mayoría de infecciones humanas en el hombre (Bonifaz, 2012).

Las Cándidas que más se aislar de sangre son: *Cándida albicans*, *Cándida tropicales*, *Cándida glabrata*, *Cándida parasilopsis*, *Cándida kusie*, *Cándida dubliniensis*, *Cándida guilliermondii*, *Cándida lipolytica*, *Cándida lisitaniae* (Colombo, 2008; Rodríguez, 2017).

Hemocultivos

El hemocultivo es el cultivo de una cantidad estandarizada de sangre tomada en forma aseptica de pacientes, es inoculada en medios de cultivo líquidos, los cuales son incubados 5 a 7 días, con finalidad de aislar agente etiológico y hacer pruebas de susceptibilidad anti-fúngica (Jawetz et al., 2010).

El hemocultivo es el mejor método disponible para el diagnóstico de la candidemia; pero es un procedimiento que requiere mucho tiempo, esto puede afectar el momento de inicio de la terapia antimicótica y contribuir a un incremento de la morbimortalidad; tiempo de detección es influido por la especie de *Cándida* y el medio utilizado. (Rodríguez, 2014)

El hemocultivo es el *gold standard* para el diagnóstico de la candidemia. Sin embargo, su sensibilidad es variable. A fin de optimizar este método se deben considerar factores que pueden influir sobre la sensibilidad como: el volumen de sangre, el número de cultivos, el

tiempo de detección; así como el tamaño del inóculo y el tipo medios de cultivo utilizados. Se recomienda el uso de frascos aerobios para el diagnóstico de la candidemia mediante hemocultivo dado que este es el procedimiento estándar en todos los hospitales (Arenas, 2011).

Los hemocultivos son solicitados cuando se sospecha de sepsis, septicemia, bacteriemia o fungemia (presencia de microorganismos: bacterias o hongos en la sangre); en procesos febriles de origen desconocido (endocarditis bacteriana subaguda, fungemia, TB diseminada); pacientes que ya tienen terapia antimicrobiana, continúan con fiebre y los cultivos iniciales fueron negativos.

Los hemocultivos deben ser tomados de preferencia antes de la terapia anti- fúngica, de inicio del periodo febril, con técnica aséptica y en número de 3 para evitar la contaminación (menos del 25%) y de aumentar la sensibilidad (97%).

Los frascos con las muestras de sangre fueron incubados en sistemas automatizados, por 5 días para bacterias y por 10 días para hongos; si los frascos son positivos, se realizará una coloración GRAM y de acuerdo al resultado se utiliza el medio de aislamiento para obtener la colonia pura, hacer la identificación final y las pruebas de susceptibilidad. (Arcaya et al., 2006)

Candidemia

Está relacionada con el aislamiento de levaduras del género *Cándida* del torrente sanguíneo utilizando medios de cultivos líquidos. La candidemia es más frecuente en pacientes con inmunodeficiencia, neutrópenicos, oncológicos y los portan catéteres intravenosos; además se describen como factores de riesgo al: uso de anti-fúngicos de amplio espectro, colonización, diálisis, diabetes, flora intestinal disminuida, inmunosupresión, portadores de catéter venoso central, cirugías, uso de esteroides, quemaduras entre otras (Cervera, 2012; Cisneros, 2009).

La incidencia de candidemia en pacientes hospitalizados se ha incrementado en forma progresiva en los últimos años. Desde el punto de vista clínico la candidemia se manifestará como sepsis, sepsis grave o shock séptico de origen nosocomial. En España, la incidencia de candidemia se estima en 4,3 episodios por 100.000 habitantes, la *Cándida* que se aísla con mayor frecuencia es *C. albicans* que ocasionan una mortalidad global de 44%. El diagnóstico de la candidemia se efectúa tardíamente, lo que causa una demora en el inicio de la terapia antimicótica; esto se debe a los signos y síntomas clínicos inespecíficos, a la precisión de las pruebas diagnósticas disponibles, al lento crecimiento de las *Cándidas* en los medios de cultivo, al inadecuado volumen de la muestra, y a los resultados falsos negativos por el uso de agentes antimicóticos en la profilaxis (Colombo, 2006; Jawetz, 2011; Zanabria, 2014).

Anti-fúngicos

Un agente anti fúngico o antimicótico es cualquier sustancia capaz de producir un alteración de las estructuras de la célula fúngica o de inhibir su desarrollo, alterando la viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. La síntesis de estos fármacos comenzó en el siglo XX y desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas las cuales han aumentado en las últimas dos décadas (Vásquez, 2009).

El desarrollo y avances en la medicina y de los sistemas de aislamiento e identificación fúngica laboratorial han mejorado la capacidad preventiva y de diagnóstico de las enfermedades producidas por hongos, además se dispone de una relativa oferta terapéutica. Desafortunadamente, ciertas terapias que implican el uso de procedimientos quirúrgicos invasivos y materiales protésicos o de agentes quimioterapéuticos inducen inmunosupresión severa (como en el caso del tratamiento contra el cáncer y trasplante de

órganos), así como los esquemas de tratamiento y políticas de salud en los países, aumentan la vulnerabilidad del huésped frente a un amplio espectro de patógenos oportunistas fúngicos (Zapata-González et al., 2012).

Clasificación de los anti-fúngicos. Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas; de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012; Jawetz, 2010).

Clasificación de acuerdo a la estructura de su molécula.

- **Polienos: Nistatina, Natamicina, Anfotericina B.** Los polienos se unen al ergosterol de la membrana, donde forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana ocasiona pérdida de proteínas, glúcidos, cationes monovalentes y divalentes, causando la muerte célula (Arenas, 2011).

- **Azoles.** Comprende:

Imidazo Miconazol, Clotrimazol

Triazoles. Fluconazol, Itraconazol, ketoconazol

- **Alilaminas.** Terbinafina, Naftifina, las Alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Jawetz, 2010).

- **Lipopéptidos.**

Papulacandinas. Triterpenos glicosilados;

Equinocandina.: Caspofungina, Anidulofungina, Micafungina

Los lipopéptidos actúan sobre la pared celular, inhibiendo la síntesis de los glucanos por inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en pared vuelve débil el hongo, no soportar el estrés osmótico, y ocasiona la muerte (Bonifaz, 2012).

- **Pirimidinas Fluoradas.** Flucitosina: Tras su transformación a 5-FU, se convierte a 5-Fluorouridina trifosfato y se incorpora al RNA produciendo errores de codificación; también se convierte a 5- Fluorodeoxiuridina monofosfato, que es un inhibidor no competitivo de la timidato sintetasa, interfiriendo con la síntesis de DNA (Vásquez, 2009)

- **Otros.** Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin. La Griseofulvina paraliza la metafase de los hongos alterando la estabilidad de los microtubulos al unirse a la tubulina y así inhibir la formación del huso mitótico.

Importancia de la identificación de las levaduras a nivel de especie

En general las especies fúngicas que frecuentemente producen infecciones en el ser humano, presentan perfiles conocidos de susceptibilidad a los anti-fúngicos, que orientan al clínico al momento de iniciar la terapia, cuando no es posible contar con la CIM. (Zurita, 2018) Por ejemplo, hay levaduras intrínsecamente resistentes a azoles como *C. krusei*, en las que no se deben usar estos fármacos, o que pueden presentar resistencia a anfotericina B como *C. lusitaniae*. También se ha descrito que *C. parapsilosis* puede presentar sensibilidad intermedia a equinocandinas. Por otra parte, las distintas especies de *Trichosporon* presentan diferente susceptibilidad a los anti-fúngicos, como *T. asahii* que es más resistente *in vitro* a anfotericina B que a los triazoles²⁶ En relación a los hongos filamentosos de interés clínico, los Zygomycetes presentan resistencia intrínseca a los azoles, a excepción de Posaconazol, mientras que *A. fumigatus* es sensible a triazoles como Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol, a Equinocandinas y Anfotericina B. (Vásquez, 2009).

Antifungigrama

Es el enfrentamiento de una cepa fúngica levaduriforme pura y viable a varios antibióticos de acción fúngica con la finalidad de obtener información de los antibióticos que inhiben el crecimiento de la levadura y de los antibióticos que no inhiben el crecimiento. Actualmente en el mercado hay varios métodos, manuales como comerciales y automatizados; lo mismo que se han establecido puntos de corte para algunos antifúngicos y se cuenta con metodologías estandarizadas tanto del Instituto de Standares para Laboratorios Clínicos (CLSI), como por Institutos Europeos como el EUCAST.

Se encuentra disponible en el mercado un métodos automatizados para determinar la CIM, como Vitek 2® (Biomerieux), que utiliza una lectura espectrofotométrica, lo cual facilita la lectura de la CIM. Tiene la ventaja de encontrarse acoplado a la identificación de levaduras. Un estudio multicéntrico reveló un alto nivel de reproducibilidad de los resultados y una concordancia de 93,7 a 97,9% con el método de dilución en caldo del CLSI. Además, los resultados pueden obtenerse a partir de las 10 hasta las 26 horas de incubación (Villanova, 2008).

Interpretación del CIM

Un valor de CIM sin una correlación clínica tiene poco valor. En el caso de las infecciones fúngicas, los factores del hospedero juegan un papel muy importante en la respuesta al tratamiento³⁰. Por otra parte, la susceptibilidad *in vitro* no siempre predice el éxito del tratamiento y no siempre la resistencia *in vitro* se asociar a falla en el tratamiento. Esto ha dificultado el establecimiento de puntos de corte. En relación a la lectura de la CIM, en algunos casos se usa el método visual, esto depende de la experiencia del operador. Hay cepas productoras de "*trailing*" que dificultan la interpretación. Una forma de objetivar la lectura de la CIM es realizar una lectura espectrofotométrica, lo cual recomienda el estándar EUCAST. El uso de azul de metileno facilita la lectura del halo o elipse de

inhibición en los métodos de difusión. El uso de métodos estandarizados permite, disminuir la generación de resultados erróneos; al igual el uso de puntos de corte validados de acuerdo a cada metodología (Villanova, 2008; Wayane, 2008).

Perfil de resistencia

Existen múltiples reportes en la literatura sobre la resistencia innata y adquirida de algunas de estas levaduras de interés médico a los tratamientos anti-fúngicos de primera y segunda generación, como es el caso de *Cándida krusei*, *Cándida glabrata* y *Cándida albicans*, las cuales con frecuencia pueden presentar resistencia al Fluconazo, hay reportes de *Cándida lusitaniae* resistente a Anfotericina B, también se ha señalado que entre los serotipos A y B de *Cándida albicans* existen diferencias en cuanto a susceptibilidad frente a los azoles de allí la gran importancia que tiene de hacer la identificación de las Cándidas a nivel de especie y de realizar la susceptibilidad anti-fúngica a fin de conocer la respuesta laboratorial de las especies de Cándidas a los anti-fúngicos a fin de orientar el tratamiento y de esta manera reducir las estancias hospitalarias la mortalidad y los costos y en los hospitales (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012; Vásquez, 2009).

En general las especies fúngicas que frecuentemente producen infecciones en el ser humano, presentan perfiles conocidos de susceptibilidad a los anti-fúngicos, que orientan al clínico al momento de iniciar terapia, cuando no es posible contar con la CIM. Por ejemplo, hay levaduras intrínsecamente resistentes a azoles como *Cándida krusei*, en las que no se deben usar estos fármacos, o que pueden presentar resistencia a Anfotericina B como *Cándida. lusitaniae*. También se ha descrito que *Cándida parapsilosis* puede presentar sensibilidad intermedia a Equinocandina (Villanova, 2008; Wayane, 2008).

2.3 Definición de Términos

Perfil Fenotípico

El fenotipo de una levadura es cualquier característica o rasgo observable como: morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. El fenotipo resulta de la expresión de los genes de una levadura, así como de la influencia de los factores ambientales, y de las interacciones dadas entre ambos. El *perfil fenotípico de las Cándidas de sangre está dado por: Cándida albicans, C. tropicales, C. glabrata, C. parasilopsis, C kusie, C dubliniensis, C guilliermondii, C lipolytica, C lisitaniae* (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012; Jawetz, 2010).

Perfil Genotípico

El genotipo de Cándida es el conjunto de todos sus genes. El genotipo se expresa cuando la información codificada en el ADN de los genes se utiliza para fabricar proteínas y moléculas vía el ARN. El genotipo se expresa a través del fenotipo (Arenas, 2011).

Identificación

La identificación de las levaduras del género Cándida son hace en la actualidad por métodos manuales, comerciales, automatizados y genéticos; caracterizan las Cándidas a nivel de especie es de gran importancia porque permite instaurar un tratamiento eficaz y oportuno, así como seguir y evaluar el tratamiento.

Tratamiento

Es el conjunto de medios: higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos u otros cuya finalidad es la curación o el alivio (paliación) de las enfermedades o síntomas. También se conoce con el sinónimo de terapia o medicación (Jawetz, 2010).

III. Método

3.1 Tipo de Investigación

Observacional

La investigación es observacional ya que consistió en recoger información y datos sobre el perfil fenotípico y el perfil de resistencia de las especies de levaduras del género *Cándida*, aislada de hemocultivos de pacientes hospitalizados con diagnóstico de candidemia en base a los cuales se analizó, interpretó, los hechos y se formuló hipótesis; además permitió describir situaciones y contrastar hipótesis.

Prospectiva

La investigación es prospectiva ya que el inicio del estudio de las especies de levaduras del género *Cándida*, aislada de hemocultivos de pacientes fue anterior a la ocurrencia de los hechos estudiados; los datos se recogieron a medida que se van sucediendo se guardaron, se analizaron y se midieron en el futuro.

Transversal

La comparación de las características sobre el perfil fenotípico y el perfil de resistencia de las especies de levaduras del género *Cándida*, aislada de hemocultivos de pacientes, se hicieron en un momento concreto del tiempo, en el mismo periodo de temporalidad; con la finalidad de describir variables, estudiar su incidencia e interrelaciones en un momento específico; no se realizó ningún seguimiento de los datos recolectados.

Pasos en el diseño de la investigación

- a. Se trabajó con cepas de levaduras del género *Cándida*, aisladas de pacientes con diagnóstico de candidemia que se atendieron en el Hospital GAI.
- b. Mediante tamizaje se evaluó los criterios de inclusión y exclusión.

- c. Se obtuvo el conocimiento informado de los pacientes para el estudio previa autorización del comité de Investigación del Hospital Guillermo Almenara.
- d. Se hizo la asignación no aleatoria se las cepas que se sometieron al estudio.
- e. Se logró hacer mediciones de las cepas en los pacientes antes de efectuar las pruebas de identificación y sensibilidad anti fúngica a fin de obtener información.
- f. Se realizó la distribución según datos sociodemográficos y clínicos previos, en grupos de pacientes con candidemia en los que se realizó las pruebas de identificación de especies con pruebas de identificación y resistencia.
- g. Se logró hacer mediciones en los pacientes después de haber realizado las pruebas de laboratorio para obtener información sobre la eficacia de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de laboratorio usadas en la identificación especies y de la resistencia de las especies de candidas.
- h. Se efectuó el resultado final del estudio.

3.2. Población y Muestra

Población

La población estuvo constituida por 160 cepas de levaduras del género *Cándida* aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia, tanto hospitalizados como de emergencia del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen durante el tiempo del presente estudio (años 2014 al 2015).

Muestra

La muestra fue igual a la población, se trabajó con las 160 cepas de levaduras del género *Cándida*, aisladas de pacientes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, a las cuales se les realizó la identificación de la especie por metodología convencional manual y por

sistema automatizado Vitek 2, lo mismo que la susceptibilidad anti-fúngica en el Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

Criterios de inclusión

Se estudiaron solo hemocultivos positivos a levaduras del género *Cándida* aisladas de pacientes hospitalizados y de emergencia con diagnóstico de del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en el periodo que duró el estudio.

Criterios de exclusión

Hemocultivos positivos a levaduras que no pertenecen al género *Cándida*

Hemocultivos positivos a *Cándidas* aisladas de consultorios.

Hemocultivos positivos a bacterias, hongos filamentosos y parásitos.

Hemocultivos positivos a la coloración de GRAM con crecimientos negativo para levaduras del género *Cándida*.

3.3. Variables

Variables dependientes

Perfil fenotípico. El fenotipo de una levadura es cualquier característica o rasgo observable como: morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. El fenotipo resulta de la expresión de los genes de una levadura, así como de la influencia de los factores ambientales, y de las interacciones dadas entre ambos. El perfil fenotípico de las *Cándidas* de sangre está dado por: *Cándida albicans*, *C. tropicales*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C kusie*, *C dubliniesnis*, *C guilliermondii*, *C lipolytica*, *C. lisitaniae* , entre otras (Arenas, 2011; Jawetz, 2010).

Perfil de Resistencia. Existen tres tipos de resistencia:

Resistencia Intrínseca o Innata. Es aquella resistencia que presentan todas las cepas de una misma especie de una levadura y no tiene relación con la exposición al anti fúngico.

Resistencia Primaria. Ocurre en algunas cepas (especies) de una población normalmente sensibles a un anti fúngico, aparece de forma espontánea cepas resistentes, y sin haber estado en contacto previo con el anti fúngico.

Resistencia Secundaria o Adquirida. Es la que se desarrolla después de la exposición a los anti fúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.

Antifúngicos. Se entiende por anti fúngico o antimicótico a toda sustancia que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte. Dado que los hongos además de tener usos beneficiosos para el ser humano (levadura del pan, hongos de fermentación de los quesos, los vinos, la cerveza, entre otros muchos ejemplos) forman parte del colectivo de seres vivos que pueden originar enfermedades en el ser humano, el conocimiento y uso de los anti-fúngicos es de vital importancia a la hora de tratar muchas enfermedades (Arenas, 2012).

Variables independientes

Cándidas. Son levaduras, generalmente unicelulares, microscópicas. Es un hongo que vive en casi todos los ambientes e incluso dentro de su cuerpo humano; por lo general, el sistema inmunitario los mantiene bajo control. Si las defensas estas bajas o se toma antibióticos, pueden multiplicarse y causar enfermedad. (Bonifaz, 2012)

Hemocultivo. Es, hemocultivo es un cultivo de la sangre con la finalidad de buscar: bacterias, hongos, virus o parásitos. Es un método diagnóstico en medicina empleado para detectar al agente etiológico causante de septicemia (Ramírez, 2017).

Candidemia. La candidemia es la presencia de levaduras del género *Cándida* dentro del torrente sanguíneo, una enfermedad altamente compleja, no presenta síntomas definidos; afectados inmunosuprimidos, los trasplantados, pacientes de UCI, quemados, a los tienen patología compleja (Bonifaz, 2012; Jawetz, 2010).

La candidemia es de dos clases:

Candidiasis Sistémica. Infección de uno o más órganos se producirse por vía hematógena, o por alteraciones de piel o mucosas, cuerpos extraños, malformaciones.

Candidiasis Diseminada. Candidiasis sistémica con afectación de dos o más órganos sin relación de contigüidad, produciéndose la extensión vía hematógena.

3.4 Operacionalización de Variables

Nombres de las Variables	Tipos Variable	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala de medición	Unidades de medida
Cándidas	Cualitativa	-	Laboratorio	% de Cándidas aisladas	Nominal	Cándida aislada en cultivo
Hemocultivo	Cualitativa	Crecimiento de Cándidas en sangre	Laboratorio	% de hemocultivos positivos	Nominal	Hemocultivo positivo
Candidemia	Cualitativa	Infección de la sangre por Cándidas	Laboratorio	% de candidemias	Nominal	Presencia de Candidemia
Perfil fenotípico	Cualitativa	Tipos de Cándidas aisladas en cultivo	Laboratorio	Tipos de Cándidas aislada	Nominal	Tipo de Cándidas aisladas

Nombres de las Variables	Tipos Variable	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala de medición	Unidades de medida
Perfil de resistencia	Cualitativa	Inhibición del crecimiento	Laboratorio	Resistencia a los anti-fúngicos	Nominal	Crecimiento
Anti - fúngicos	Numérica	-	Laboratorio	Intervalo de MIC	Intervalo	012. 64 ug /Dl.

3.5 Instrumentos

Los instrumentos utilizados en la realización de la investigación fueron Cepas Patrón de levaduras adquiridas del laboratorio de la Colección Americana de Colonia Típico (ATCC), ellas con certificado de garantía de calidad: estas cepas fueron: *Cándida albicans* ATCC # 90028, *Cándida parasilopsis* ATCC # 22019, *Candida tropicales* ATCC # 90030, y *Candida krusei* ATCC # 6258. Fueron reactivadas en Agar Saboruraud, por 48 horas (2días) a 35°C, se les hizo la identificación por metodología convencional manual y por sistema automatizado Vetck 2, los resultados a fueron del 99.99%, estos datos sirvieron para hacer la identificaron de *Cándidas* de los pacientes de de emergencia y de hospitalización del hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

La validación de los antibióticos anti-fúngicos, fue atreves de panales de antibióticos los cuales fueron enfrentadas las *Cándidas* a los antibióticas anti-fúngicos a probar.

La lectura se hizo por metodología automatizada por el Vetck 2, hubo una reproducibilidad del 99.99% lo cual garantiza el uso en las pruebas de senibilidad en el laboratorio, los anti fúngicos probados fueron: Fluconazole, Anfoterisina B, Itraconazole, Fluorcitosina, y Voriconazole. Se evaluaron según los criterios del CLSI, norma técnica M27 – A3.

3.6 Procedimientos

Identificación de levaduras

Toma de muestras. La toma de muestras de sangre se realizaron por el sistema vacutainer, usando técnica aséptica, tanto de pacientes hospitalizados y de emergencia del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen que tienen orden médica de pedido para hemocultivos; la cantidad de sangre extraída fue protocolizada, depende de la edad del paciente, lo mismo que el número de frascos, las muestras fueron depositadas en frascos de hemocultivo se registraron los datos de filiación del paciente y la fecha de colección; fueron llevados prontamente al servicio de Microbiología para su procesamiento. (Ramírez & Díaz, 2013)

Ingreso al sistema de gestión de las órdenes de hemocultivos. En el laboratorio de Microbiología las órdenes de los hemocultivos fueron ingresados en el Sistema de Gestión del Hospital para lo cual se llenó una ficha epidemiológica con datos de filiación e identificación del paciente el cual quedó registrado en el banco de datos del hospital teniendo acceso a dicha fuente el personal de laboratorio, admisión y el personal médico. La positividad para levaduras se observó mayoritariamente durante las 72 horas; cuando un frasco de hemocultivo es positivo el sistema automatizado avisa a través de una alarma sonora y una luz de color y roja. (Ramírez & Díaz, 2013)

Ingreso de los frascos de hemocultivo al sistema automatizado. Los frascos de hemocultivos fueron ingresados al Sistema Bactec por escaneado del código de barras del frasco, luego se procedió al llenado de la ficha epidemiológica, para el interfaz del Sistema de Gestión de Hospital. Los frascos de hemocultivo quedaron en la incubadora del equipo automatizado por un tiempo de 10 días, al cabo de los cuales si no hay crecimiento, el equipo avisa a través de una alarma sonora de color verde que el frasco debe de retirarse y debe de informarse como negativo. La positividad para levaduras se observó

mayoritariamente durante las 72 horas; cuando un frasco de hemocultivo es positivo el sistema avisa a través de una alarma sonora y una luz de color roja la cual se desactiva solamente en el momento que se retira el frasco positivo (Ramírez & Díaz, 2017).

Coloración GRAM de frascos positivos de hemocultivos. De los frascos positivos se extrajo unas gotas de sangre con una jeringa estéril y se realizó un frotis en una lámina porta objeto se coloreó con tinción Gram; si se observan levaduras, se procede a su aislamiento en medios adecuados. (Alvarado et al., 2013)

Aislamiento de levaduras de frascos positivos de hemocultivos. De las muestras de Hemocultivo positivas para levaduras se extrajo unas gotas de sangre con jeringa y se cultivó por agotamiento en agar glucosado Sabourad con antibióticos antibacterianos y en Agar Cromo génico, los cultivos fueron incubados en estufa a temperatura de 35°C, por un periodo máximo de 72 horas. (Davise & Larone, 2011)

Identificación presuntiva

A los cultivos positivos se realizó la prueba del tubo germinativo, se los cultivó en CROMagar y se les realizó micro - cultivo por la Técnica de DALMAO; éstas pruebas nos permiten diferenciar a *Cándida albicans*, *Cándida tropicales*, *Cándida kruseii*, *Cándida parasilopsis*, *Candida glabrata*; se reportaron las como las levaduras responsable de candidemias en los hospitales de nuestro país (Díaz & Rojas, 20117).

Identificación Definitiva. La identificación definitiva de las especies de *Cándida* se hizo por metodología automatizada en el Sistema Vitek 2, para lo cual se inocularon los cartones de identificación con la cepa problema de levadura siguiendo el inserto de la casa comercial, se ingresaron los datos en el sistema de gestión y las muestras a la incubadora del Vitek 2, los resultados del sistema automatizado fueron confrontados con los resultados de las pruebas manuales (identificación presuntiva) antes de emitir el resultado final de la especie de *Cándida* obtenida (Ramírez & Díaz, 2013).

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos antifúngicos. La Susceptibilidad Anti-fúngica se evaluó por el Sistema Viteck 2, para lo cual se siguió estrictamente las instrucciones del fabricante: tanto para el aislamiento, cargado, incubación y lectura de la muestra. Los anti-fúngicos a probar fueron: Fluconazole, Anfoterisina B, Itraconazole, Fluorocitosina, y Voriconazole. Se evaluaron según los criterios del CLSI, norma técnica M27 – A3. (Villanova, 2008 ; Wayne, 2008)

Llenado de las fichas de datos. Se procedió al llenado de fichas previamente elaboradas (ver anexos) para cada cepa de Cándida, cuyos datos se tomaron de la orden médica y de la orden de trabajo, se rotularon las cepas con su respectivo informe con el mismo código en forma correlativa.

Llenado de la ficha de resultados. Se procedió al llenado de fichas previamente elaboradas (ver anexo N° 2) para cada cepa de Cándida de acuerdo a los resultados de identificación de levaduras de género Cándida y el resultado de las Pruebas de Susceptibilidad Anti fúngica.

3.7 Análisis de los Datos

Digitación y registro de datos

Para la digitación se utilizó el programa de Microsoft Word XP Microsoft. Para el Registro de Datos se utilizó Microsoft Excel XP Microsoft 2007.

Análisis estadístico

Se utilizó el Programa Estadístico SPSS versión 13.0, teniendo en cuenta que se valoraron variables cuantitativas, se utilizó la Prueba de Chi-Cuadrado de Pearson. Un P menor de 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Presentación de cuadros de gráficos

Se utilizó la hoja de Cálculo Microsoft Office Excel 2000.

IV. Resultados

4.1 Análisis e Interpretación

Entre el año 2014 y el año 2015 se llegaron a recolectar 160 cepas de levaduras del género *Cándida* las cuales fueron identificadas por metodología convencional manual y por el sistema automatizado Vitek 2 (fenotipo), también hizo pruebas de Susceptibilidad anti-fúngica por el sistema automatizado Vitek 2 (resistencia).

4.2 Contrastación de Hipótesis

a. Paso: proponemos las Hipótesis H_0 y H_1

H_0 : 160

H_1 : < 160

b. Elegimos el grado de significancia: alfa 5 %

c. Elegimos Zona de Rechazo o Aceptación.

d. Hallamos Zona Critica: 1. 64

e. Hallamos Zona de Prueba: - 2

f. Fórmula utilizada

Z_p : - 2.0

4.3 Decisión

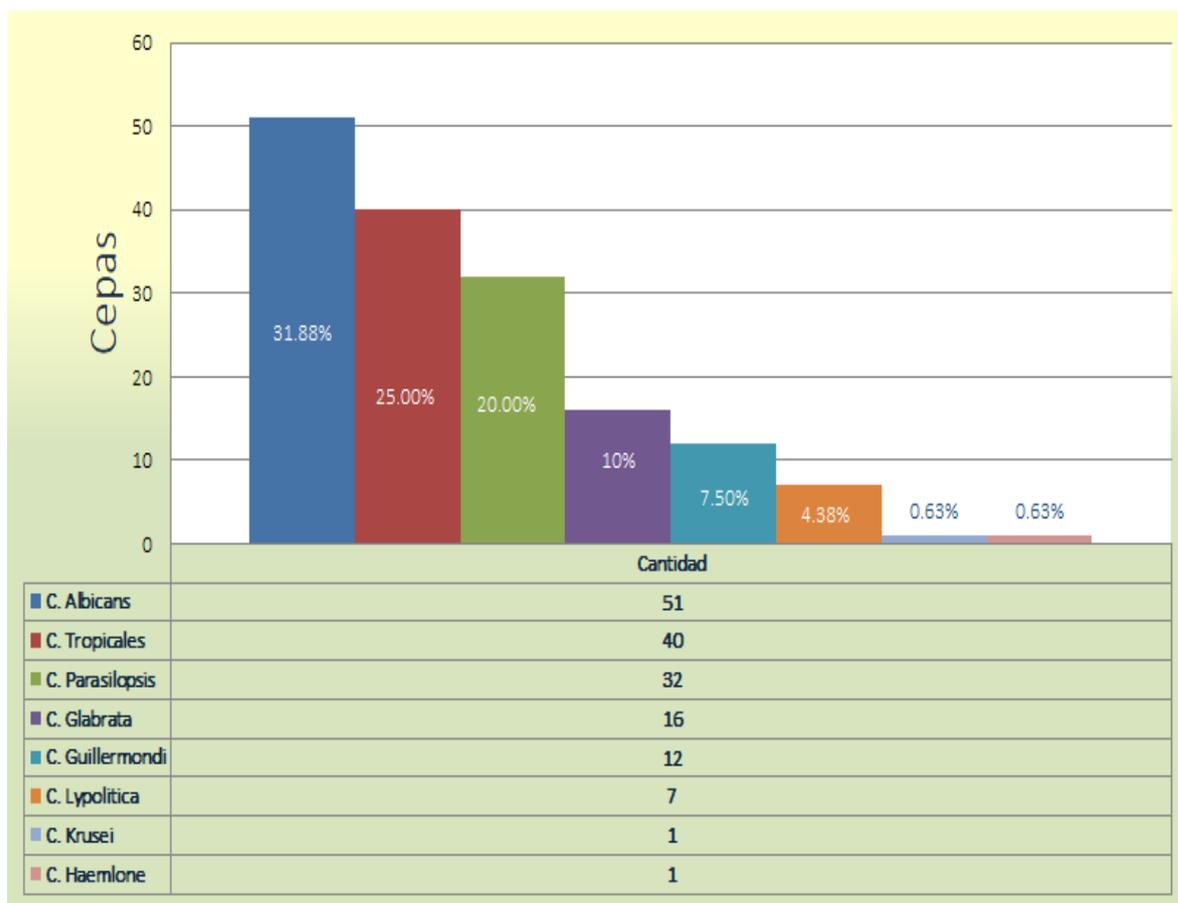
Se rechaza la Hipótesis Nula se acepta la Hipótesis Alternativa.

Se afirma que el tratamiento médico dado a los pacientes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen con diagnóstico de candidemia, está dado en relación al perfil fenotípico y al perfil de resistencia de las especies de *Cándidas* aisladas con grado de significancia del 5 %.

4.4 Perfil Fenotípico

En la Tabla 1 se observa que para evaluar el perfil fenotípico de las candidas, aislados de sangre de pacientes hospitalizados y de emergencia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen se incluyeron 160 cepas las cuales fueron distribuidas: 51 cepas para *Cándida albicans* (31.88%), *C. tropicales* 40 cepas (25 %), 32 cepas para *C. parasilopsis* (20%), 16 cepas para *C. glabrata* (10 %), 12 cepas para *C. guillermundii* (7.5%), 07 cepas para *C. lypolitica* (4.38%), 01cepa de *C. krusei* (0.63%) y 01 cepa de *C. haemlone* (0.63%).

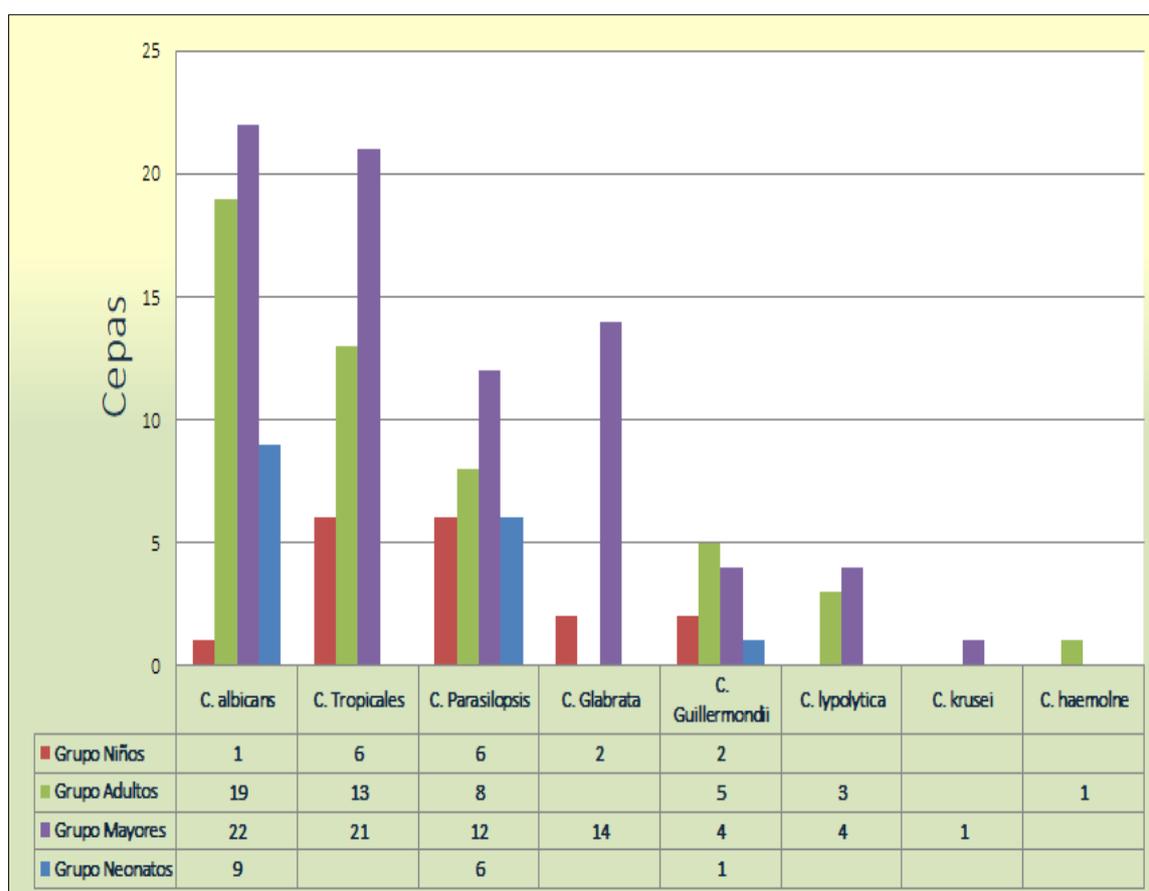
Tabla 1. Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según la Especie. Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

La Tabla 2 muestra la distribución de las *Cándidas aisladas* de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia, en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario y especie de *Cándida*, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 16 cepas para neonatos (10%), 17 cepas para niños (10.63%), 49 cepas para adultos (30.63%), y 78 cepas para mayores (48.75%).

**Tabla 2. Distribución de especies de *Cándidas* aisladas de Sangre y Grupo Etario:
Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015**



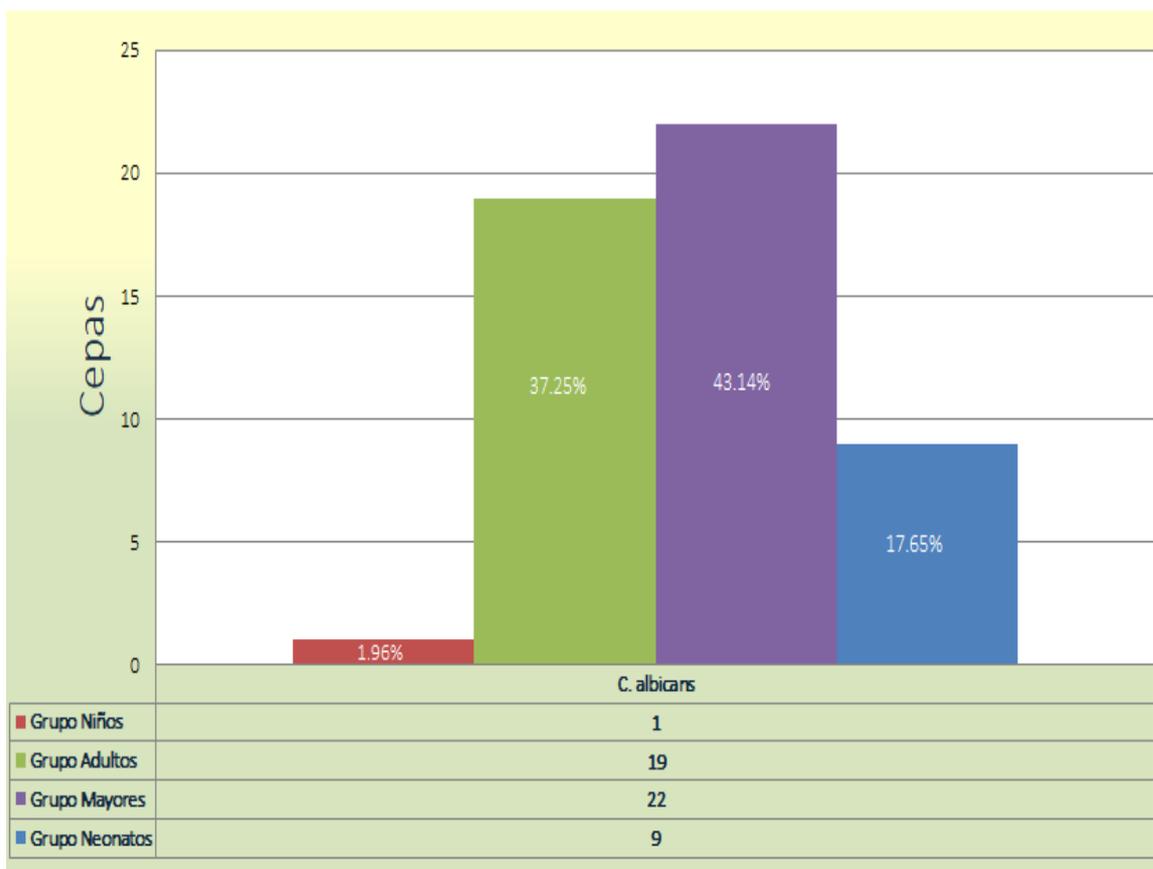
Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 3, muestra la distribución de la *Cándida albicans*, aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 09 cepas para

neonatos (17.65%), 01 cepa para niños (1.96%), 19 cepas para adultos (37.25%) y 22 cepas y para mayores (43.14%).

Tabla 3. Distribución de *Cándida albicans* aisladas de Sangre según el Grupo Etario:

Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015

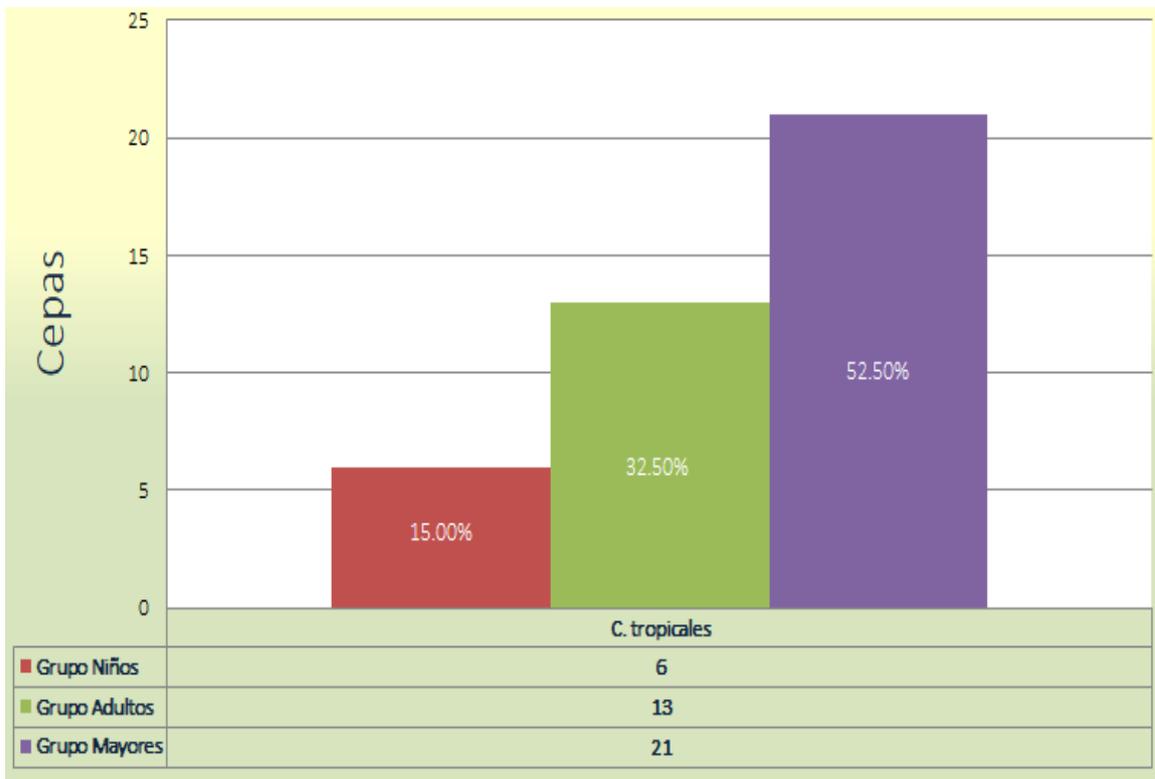


Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 4 muestra la distribución de la *Cándida tropicales*, aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 00 cepas para neonatos, 06 cepa para niños (15%), 13 cepas para adultos (32.5%) y 21 cepas para mayores (52%).

Tabla 4. Distribución de *Cándidas tropicales* aisladas de Sangre según el Grupo

Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015

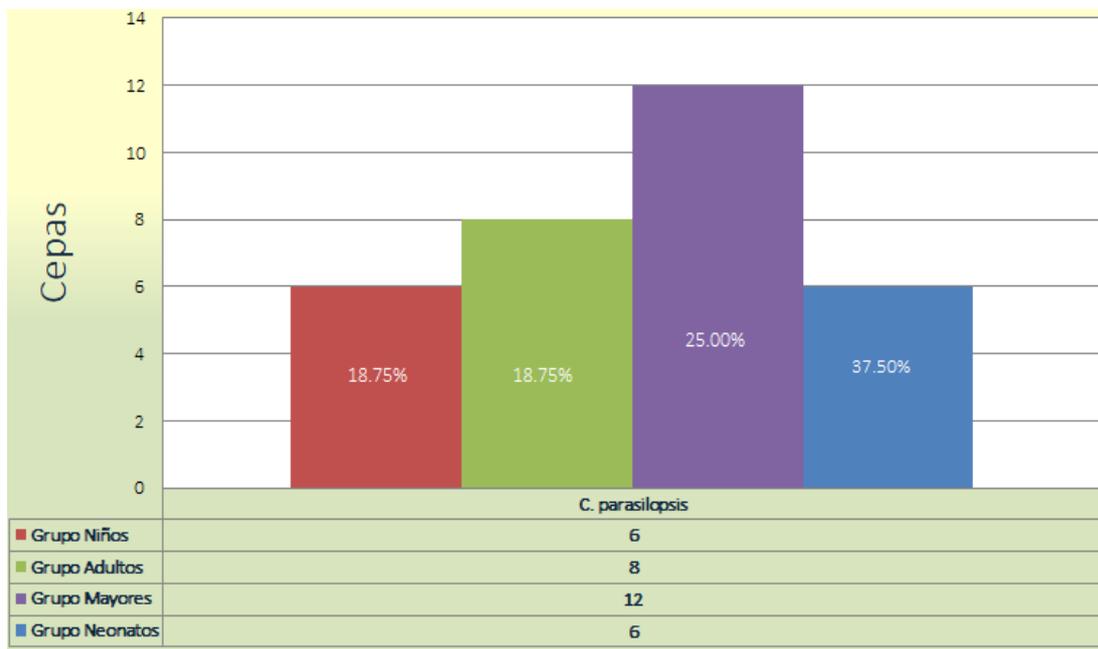


Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 5 muestra la distribución de la *Cándida parasilopsis*, aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 06 cepas para neonatos (18.75), 06 cepa para niños (18.75), 08 cepas para adultos (25%) y 12 cepas para mayores (37.5%).

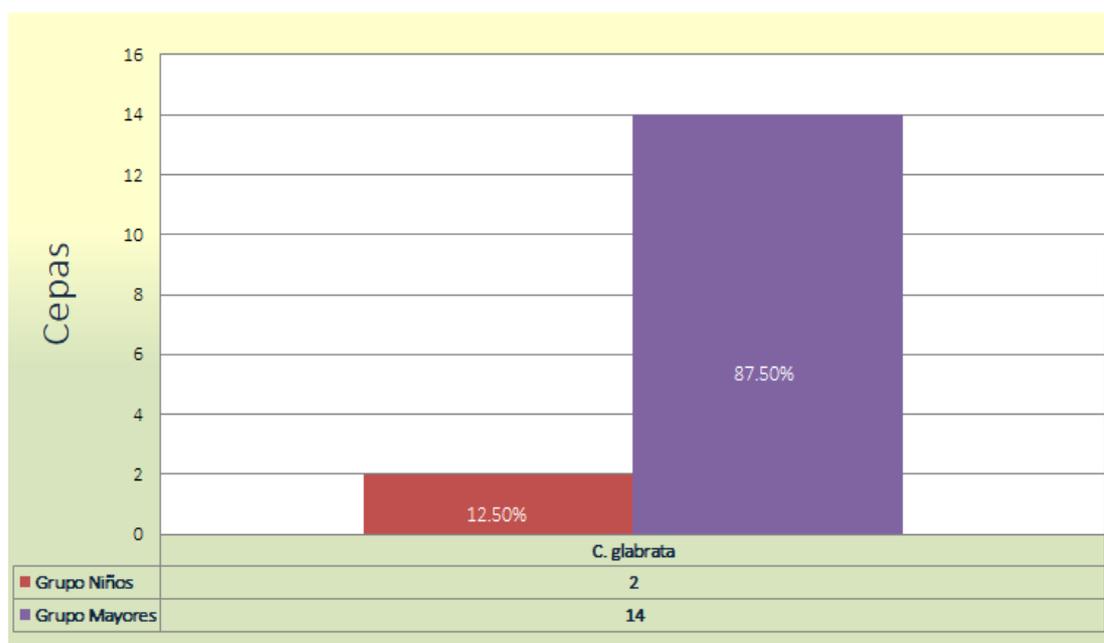
Por otro lado, el gráfico de la Tabla 6 muestra la distribución de la *Cándida glabrata*, aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 00 cepas para neonatos, 02 cepa para niños (12.5%), 00 cepas para adultos y 14 cepas para mayores (87.5%).

Tabla 5. Distribución de *Cándidas parasilopsis* aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

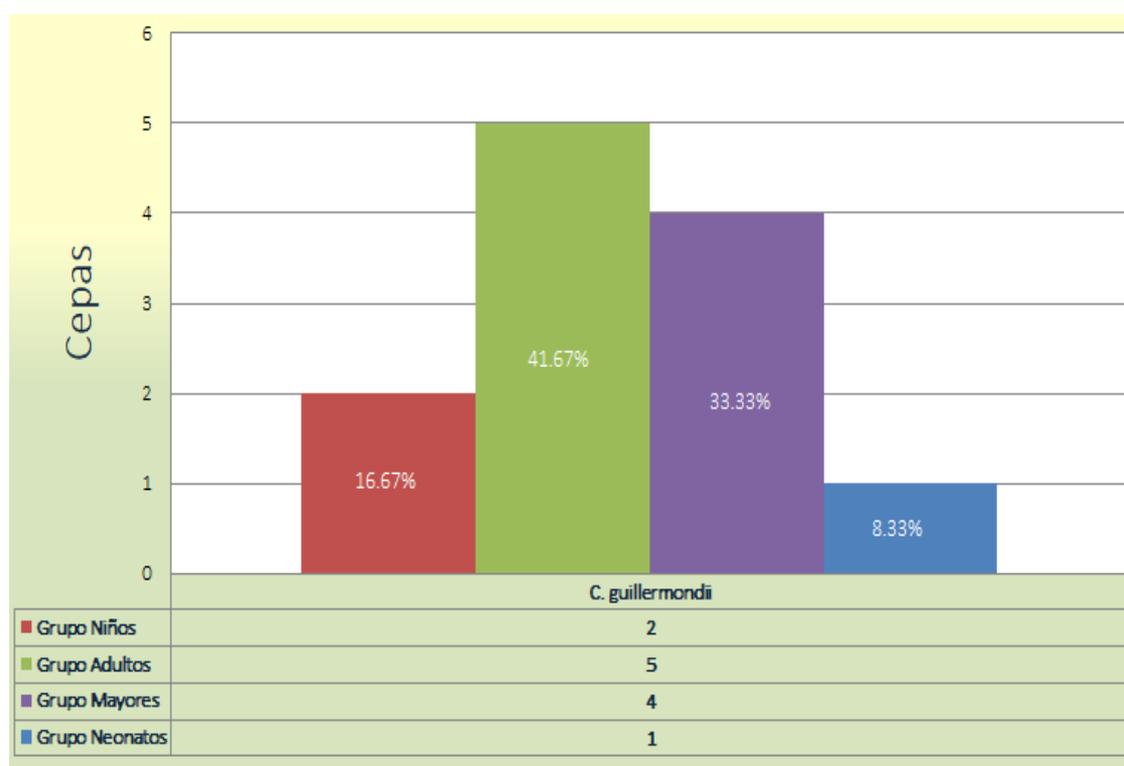
Tabla 6. Distribución de *Cándidas glabrata* aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 7 muestra la distribución de la *Cándida guilliermondii* aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 01 cepas para neonatos (8.34%), 02 cepa para niños (16.67%), 05 cepas para adultos (41.67%) y 14 cepas para mayores (33.33%).

Tabla 7. Distribución de *Cándidas guilliermondii* aisladas de Sangre según el Grupo Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015

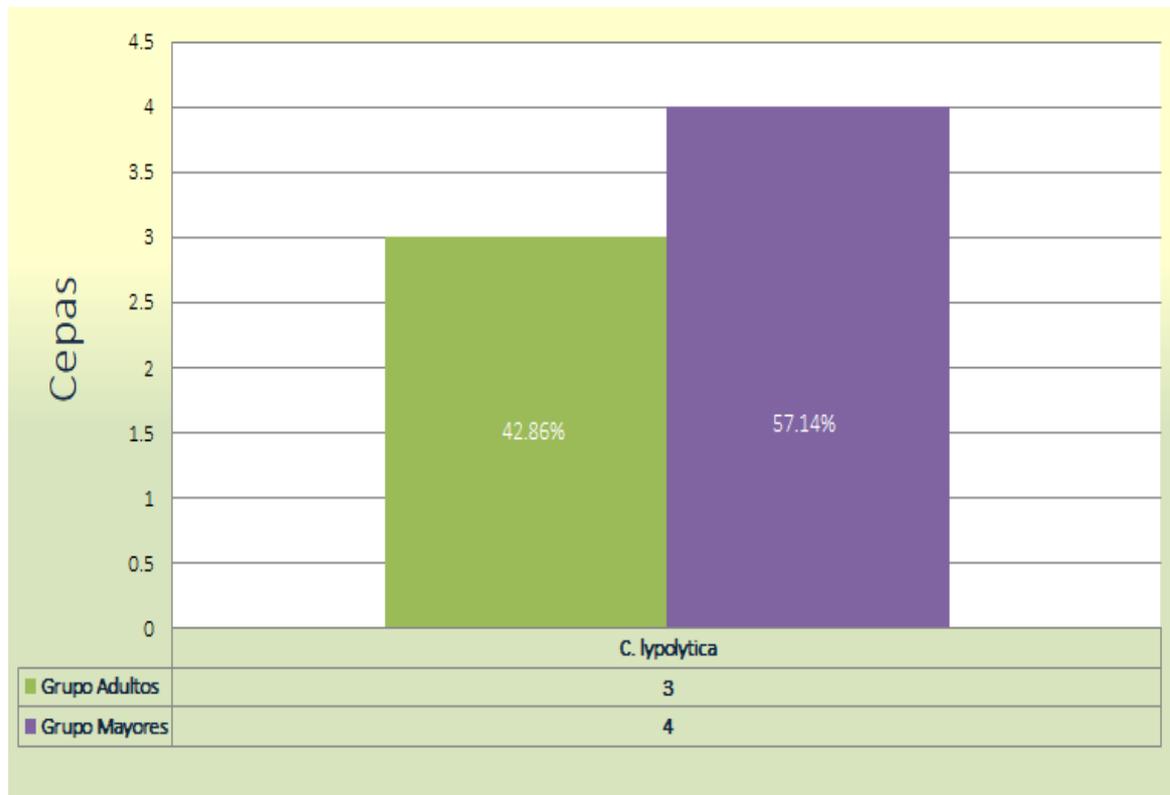


Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 8 muestra la distribución de la *Cándida lypolitica* aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen según el grupo etario, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 00 cepas para neonatos, 00 cepa para niños, 03 cepas para adultos (42.86%) y 04 cepas para mayores (57.14%).

Tabla 8. Distribución de *Cándidas lypolytica* aisladas de Sangre según el Grupo

Etario: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015

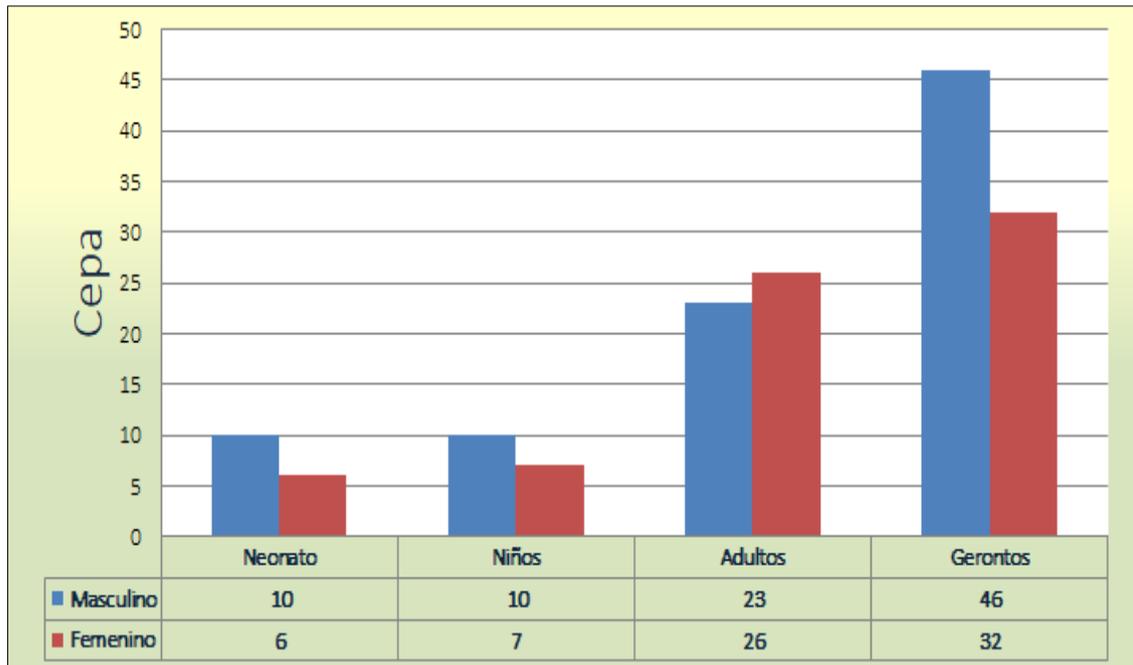


Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 9 muestra la distribución de la *Cándidas* aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, según grupo etario y sexo, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 89 cepas (55.63%) pertenecen al sexo masculino y 71 cepas al sexo femenino (44.38); según el grupo etario se destruyen: 16 cepas para neonatos (10 %), 17 cepas para niños (10.63%), 49 cepas para adultos (30.63%), y 78 cepas para mayores (48.75%).

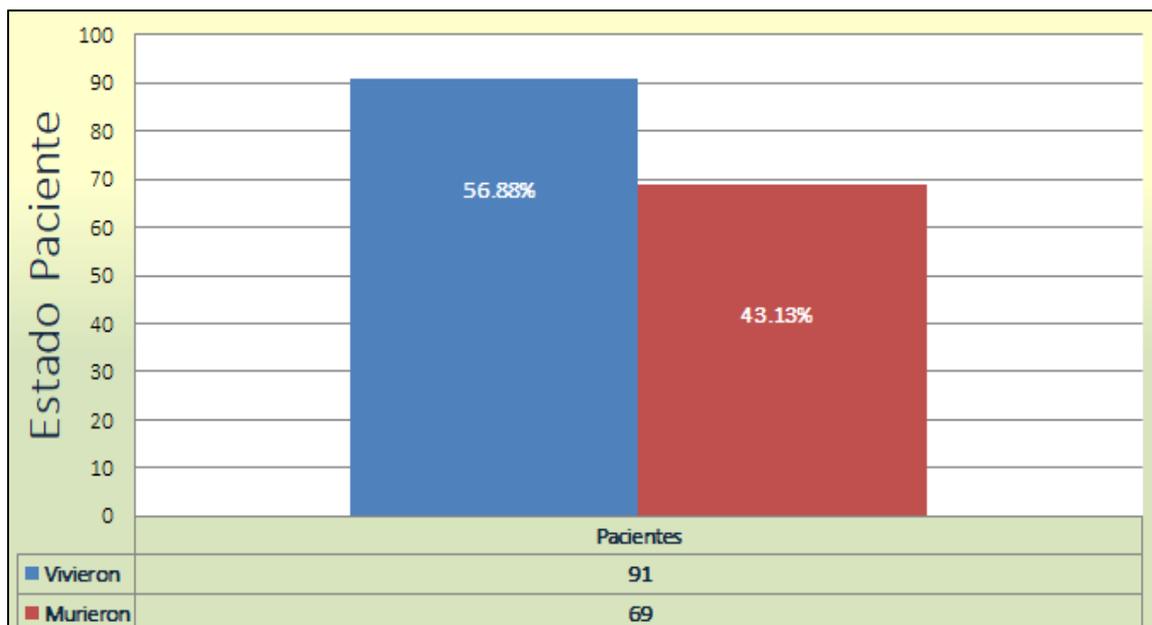
El gráfico número 10, muestra la distribución de *Cándidas*, aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, según la sobrevivencia de los pacientes, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 91 cepas pertenecen a pacientes que viven (58.88%), y 69 cepas pertenecen a pacientes que murieron (43.13 %).

**Tabla 9. Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según el Sexo y Grupo Etario:
Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015**



Fuente: Elaboración propia del autor

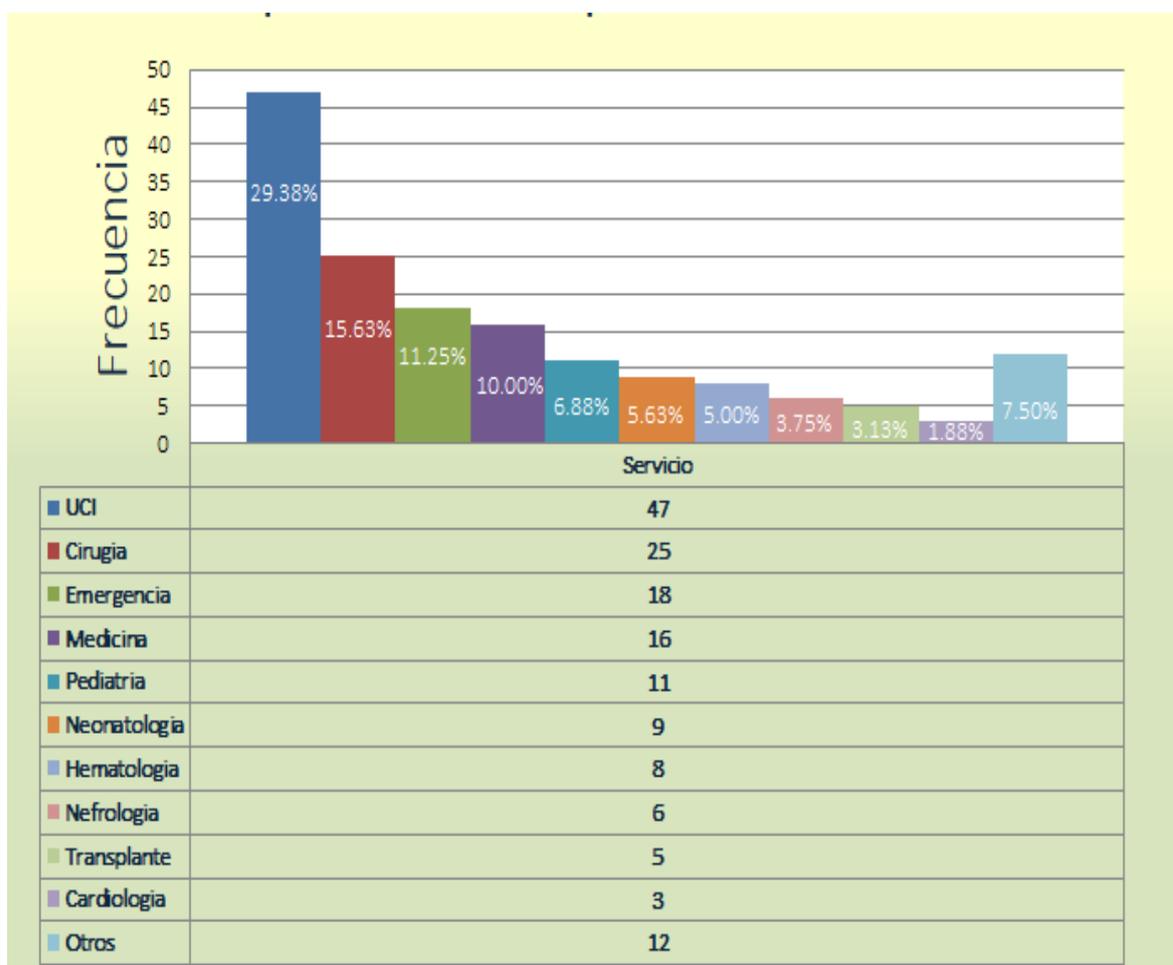
**Tabla 10. Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según Supervivencia del
Paciente: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015**



Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 11, muestra de las *Cándidas*, aisladas de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, las cuales se distribuyen según el servicio de procedencia de los pacientes: 47 cepas proceden de UCI (29.38%), 25 cepas de cirugía, (15.63%), 18 cepas de emergencia (11.25%), 16 cepas de medicina (10%), 11 cepas de pediatría (6.88%), 09 cepas de neonatología (5.63%), 08 cepas de hematología(5%), 06 cepas de nefrología (3.75%), 05 cepas de Trasplante (3.25%), 03 cepas de cardiología (1.88%), otros servicios 12 cepas (7.5%).

Tabla 11. Distribución de Cándidas aisladas de Sangre según Servicio de Procedencia: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015

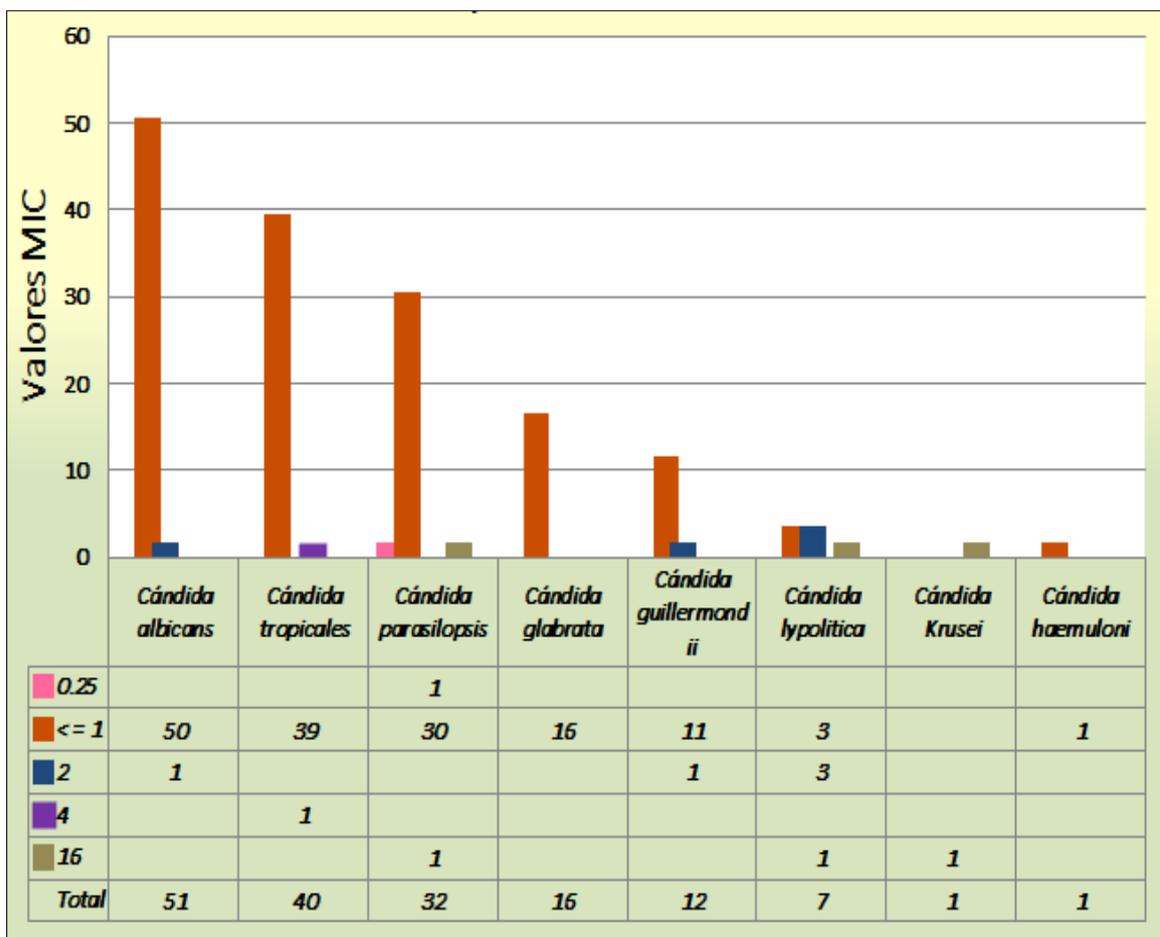


Fuente: Elaboración propia del autor

4.5 Perfil de Resistencia

El gráfico de la Tabla 12 muestra el Perfil de Resistencia a los anti-fúngicos, de las *Cándidas* aislada de sangre a la Flucitosina de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, según metodología, MIC las cuales se distribuyen de la siguiente manera.

Tabla 12. Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre a la Flucitosina: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015

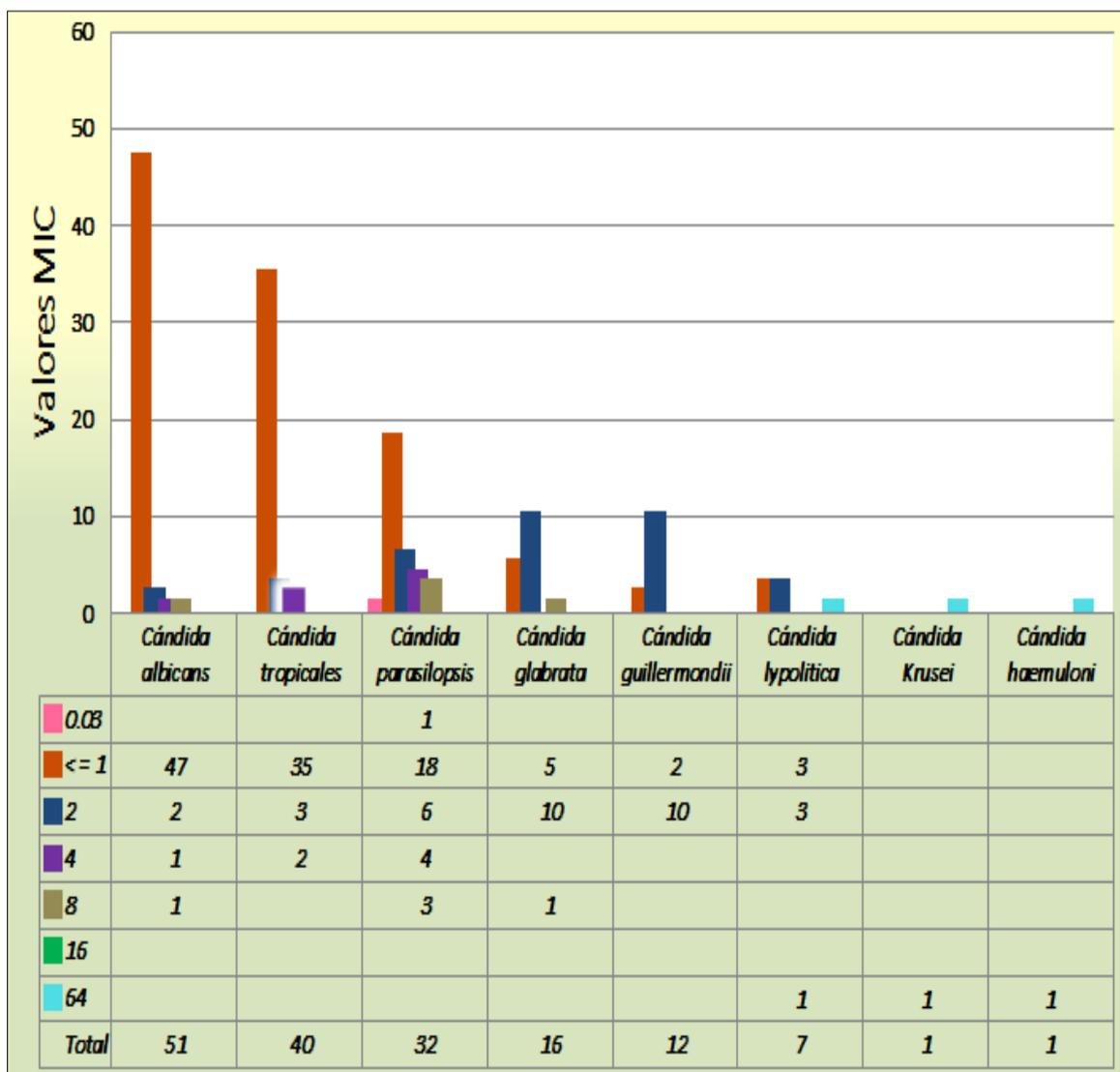


Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 13, muestra el Perfil de Resistencia Fluconazol, de las *Cándidas* aislada de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo

Almenara Irigoyen, según metodología, MIC las cuales se distribuyen de la siguiente manera.

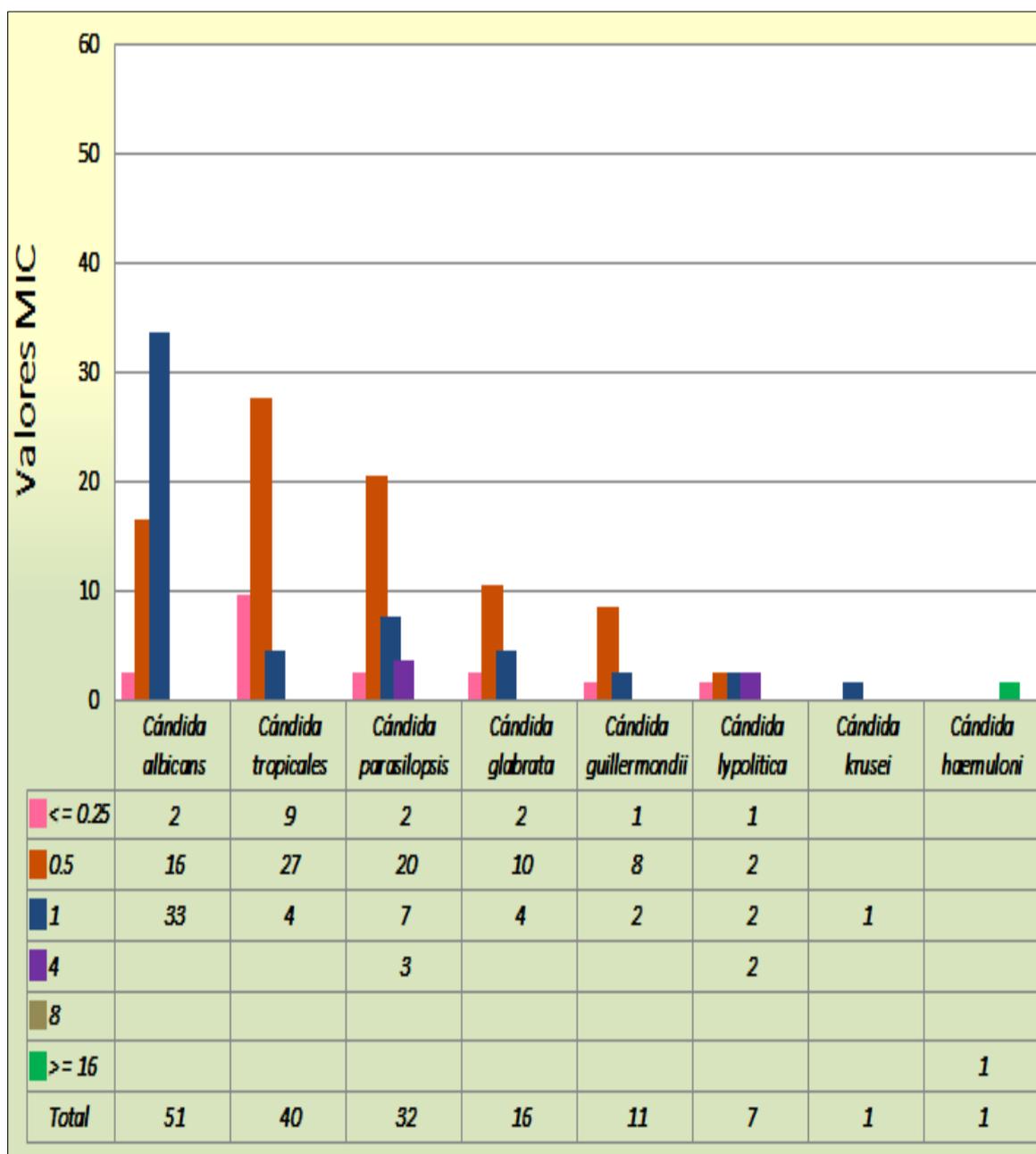
Tabla 13. Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre al Fluconazol: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 14, muestra el Perfil de Resistencia de la Anfotericina B, de las *Cándidas* aislada de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen, según metodología, MIC las cuales se distribuyen de la siguiente manera.

**Tabla 14. Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre a la Anfotericina B:
Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015**

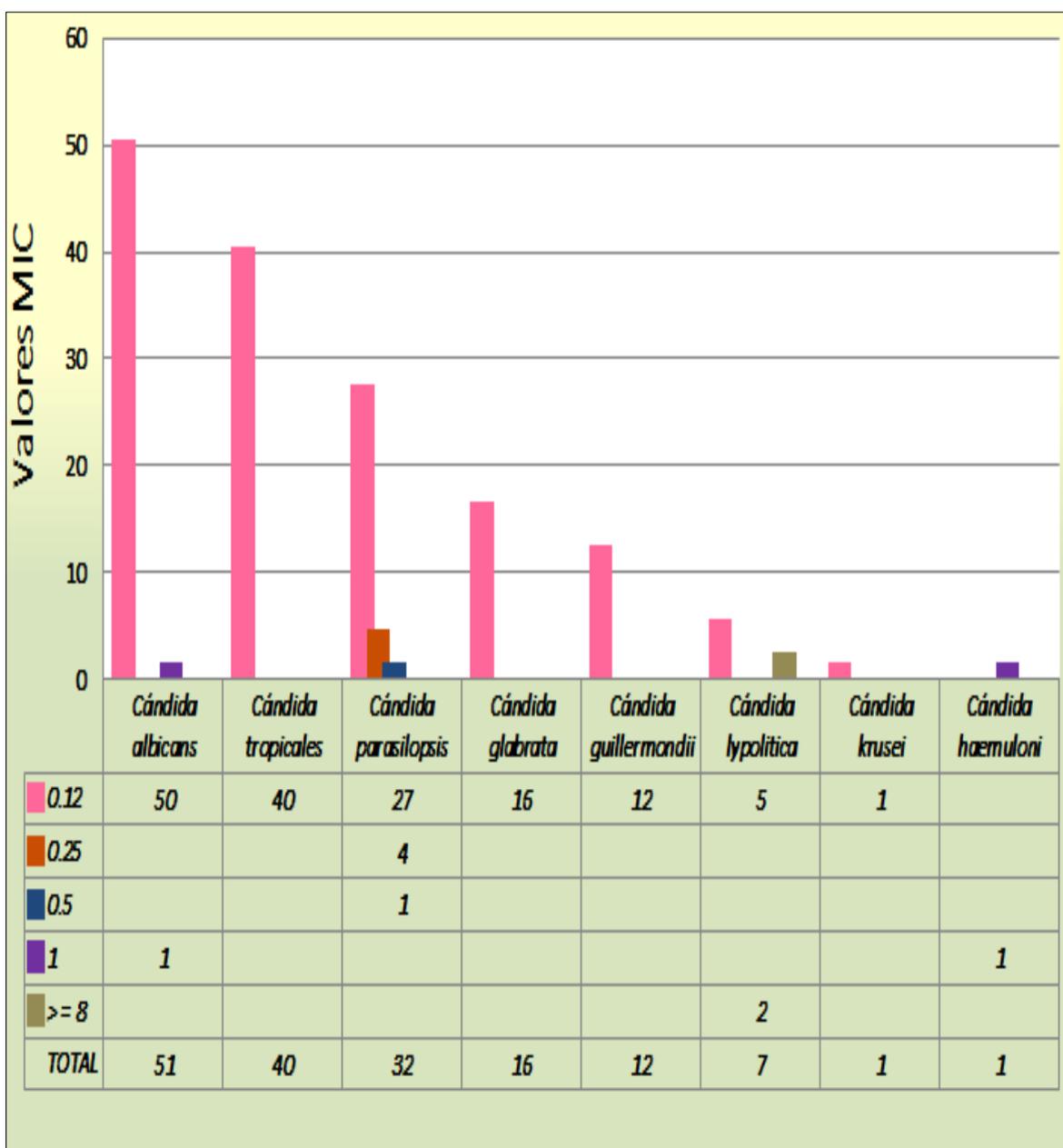


Fuente: Elaboración propia del autor

El gráfico de la Tabla 15, muestra el Perfil de Resistencia al Voriconazol, de las *Cándidas* aislada de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen, según metodología, MIC las cuales se distribuyen de la siguiente manera.

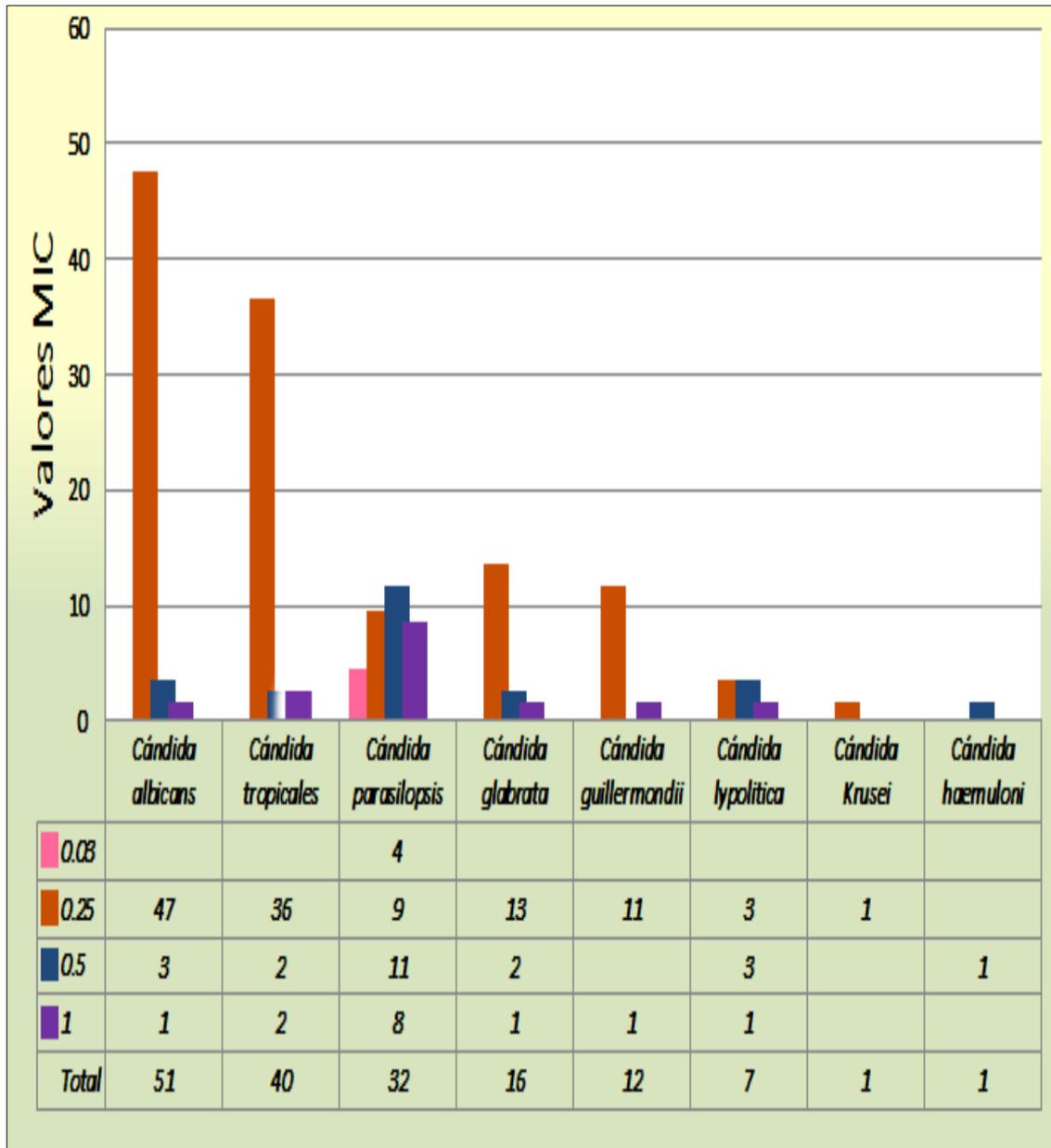
El gráfico número 16, muestra el Perfil de Resistencia a la Caspofungina, de las *Cándidas* aislada de sangre de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, según metodología, MIC las cuales se distribuyen de la manera que se indica.

Tabla 15. Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre al Voriconazol: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

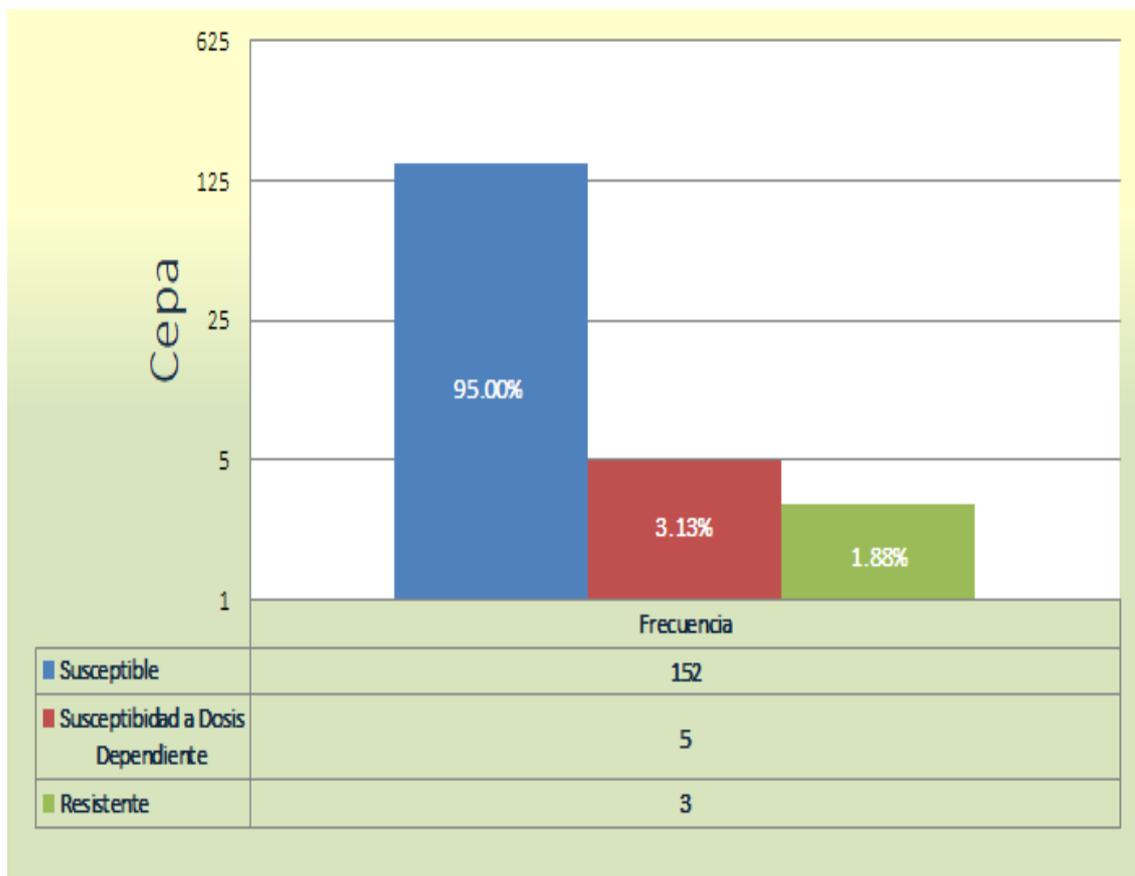
Tabla 16. Resistencia de las Cándidas aisladas de sangre a la Caspofungina: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

En el gráfico de la Tabla 17, se presenta la respuesta de la Cándida al Fluconazole, las cuales presentaron la siguiente: distribución: 152 cepas de Cándidas fueron sensibles (95%), 05 cepas de Cándidas susceptibles a dosis dependiente del sustrato (3.13%), y 03 cepas fueron resistentes (1.88%).

Tabla 17. Susceptibilidad de la Cándida aislada de sangre al Fluconazol: Hospital Guillermo Almenara Irigoyen. 2014-2015



Fuente: Elaboración propia del autor

V. Discusión de Resultados

En la actualidad las infecciones del torrente sanguíneo se han incrementado a nivel mundial, esto también ocurre a nivel de hospitales latinoamericanos y peruanos; se debe a varias causas siendo las principales: aumento de pacientes inmunosuprimidos, aumento de casos complejos con múltiples comorbilidades asociadas a esquemas de tratamiento y terapia, políticas de salud, trasplante de órganos, limitado acceso a los servicios de UCI; la mayoría de casos se identifican en servicios hospitalarios no en UCI (65%), similar a lo que ocurre en América Latina (Alvarado, 2013; Arcaya, 2006; Cervera, 2012).

Según, estudios realizados en hospitales peruanos por Lurdes et al., (2017) la tasa de candidemia es alta de 2.04 episodios por 1000 ingresos, mayor a la reportada por Nucci et al., (2013) quien en una encuesta epidemiológica reciente de países latinoamericanos, informa que la candidemia en Argentina es de 1.95 y 1.18 para el resto de países de Latinoamérica, este estudio no incluyó hospitales peruanos. Además señala las tasas candidemias de hospitales de países industrializados cercanas a 1.0 casos por 1000 admisiones; estudios italianos hechos por De Rosa, (2001); Tedeschi, 2006) muestran una incidencia cercana a la de América Latina de 1.8 a 2.2. En un estudio hecho en un hospital de Trauma en la India informaron una incidencia global de candidiema de 7.76 y 14.95 en UCI, siendo las tasas más altas reportados hasta la fecha (Cisneros, 2009; Colombo, 2006; Corcione, 2015; Rodríguez, 2017; Zurita, 2018).

Se han reportado más de 200 especies de Cándidas pero solamente 20 especies se relacionan con patología fúngica humana y de estas solo 14 especies ocasionan el 99 % de infecciones y solo siete el 95 %, siendo *Cándida albicans* la especie más aislado de candidemia human (Arenas, 2011; Bonifaz, 2012; Ramírez, 2017).

Entre los años del 2014 y el 2015 en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen se recolectaron 160 cepas de levaduras del género *Cándida* a las que se hizo el perfil fenotípico por metodología convencional manual y automatizado Vitek 2; las cuales estaban conformadas por las siguientes especies de *Cándidas* según la frecuencia de aislamiento: 51 cepas para *Cándida albicans* (31.88%), *C. tropicales* 40 cepas (25 %), 32 cepas para *Cándida parasilopsis* (20%), 16 cepas para *Cándida glabrata* (10 %), 12 cepas para *Cándida guilliermondi* (7.5%), 07 cepas para *Cándida lypolitica* (4.38%), 01 cepa de *Cándida krusei* (0.63%) y 01 cepa de *Cándida haemlone* (0.63%). Estos resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Rodríguez et al. (2017) sobre la distribución de *Cándidas* en tres hospitales peruanos, reportan a *Cándida albicans* como la especie que más se aísla, seguido de *Cándida tropicales*, *Cándida parasilopsis*, *Cándida glabrata*, *Cándida guilliermondii*, *Cándida lypolitica*, *Cándida lusitanae*, *Cándida krusei*; Los resultados de este estudio son similares a los resultados informados por los por Godoy y Dos Santos en Brasil, Riera en Argentina, por Cortés en Colombia, Bustamante y Lurdes en Perú, y de América Latina reportado por Nucci en los que manifiestan que *Candida. krusei* es una levadura no muy frecuente en los países de América Latina, y en las regiones de Asia y el Pacífico en contraste con a los estudios sobre la distribución de especies de *Cándida* en Norte América y en Europa que atribuyen a *Cándida albicans* la especie más aislada de candidiana seguido de *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. Guillermonidi*, *C. krusei*, *C. tropicales*, entre otras (Cisneros, 2009; Colombo, 2006; Dolande, 2008; Gastmeier, 2013; Jarque, 2006; Lurdes, 2017).

En cuanto a la distribución de las especies de *Cándidas* según el grupo etario se observó que en la población Mayor se presenta el mayor número de casos 78 casos (48.75%), seguido de los adultos con 49 casos (30.63%), en niños con 17 casos (10.63%) y en neonatos los casos fueron 16 (10%); estos datos son parecidos a los reportadas por Lurdes

et al.,(2017) y colaboradores, pero diferentes a los reportados en América latina en los que manifiestan que la mayoría de casos se presentan en población adulta siendo la edad media de 55 años mucho más alta a la reportada por (Nucci et al., 2013) de 26.0 años, Cortés de 41.2 años, Wille de 32.4 años y Goodoy en Brasil 56.0 años.

En la distribución de las candidas según en el sexo se observa que los hombres presenta la mayoría de casos 89 (55.63%) en relación 71 casos (44.38%).

Según la sobrevivencia de los pacientes, se obtuvo los siguientes resultados: 91 cepas (58.88%), fueron aisladas de pacientes que sobrevivieron a la candidemia y 69 cepas (43.13 %) pertenecen a pacientes que murieron por candidemia. En los estudios de Candidemia realizados por Lurdes et al y colaboradores, en hospitales peruanos la tasa de supervivencia global en el día 30 fue 60.4% (para sujetos tratados es 67.4%, y para sujetos no tratados es de 50.9%), similar a informes recientes, con una tasa de mortalidad general de 24.8 muertes por 1000 días-paciente (Rodríguez, et al.; 2017).

En cuanto al servicio de procedencia la mayoría candidas procedían de pacientes hospitalizados, distribuyéndose las Cándidas de la siguiente manera: 47 cepas proceden de UCI (29.38%), 25 cepas de cirugía, (15.63%), 18 cepas de emergencia (11.25%), 16 cepas de medicina (10%), 11 cepas de pediatría (6.88%), 09 cepas de neonatología (5.63%), 08 cepas de hematología (5%), 06 cepas de nefrología (3.75%), 05 cepas de Trasplante (3.25%), 03 cepas de cardiología (1.88%), otros servicios 12 cepas (7.5%); según el cuadro se observa que la mayoría de cepas proceden de los de servicios de UCI, seguidos de cirugía, emergencia, medicina, pediátrica; los aislados menores proceden de cardiología y trasplante y nefrología.

En hospitales peruanos los factores de riesgo para candidiasis y candidemia invasivas incluyeron colonización por *Cándida*, enfermedad grave, exposición a antibióticos de amplio espectro, cirugía mayor reciente, pancreatitis necrosante, diálisis, nutrición

parenteral, corticosteroides y el uso de CVC. La mayoría de los pacientes fueron tratados con fluconazol o anfotericina B. (Chim, 2002; Leung, 2002; Rodríguez, 2017) En el Perú, queda por ver si una mayor utilización de equinocandinas mejora los resultados o se asocia con una mayor resistencia.

En muchos países incluyendo, Perú, la candidemia no se reconoce como una causa importante y grave de sepsis. Un síndrome clínico inespecífico y una baja sospecha clínica en pacientes de alto riesgo parecen ser factores importantes que contribuyen a la demora en el diagnóstico y al retraso en el inicio de la terapia anti-fúngica adecuada (Colombo, 2006; Rodríguez, 2017).

Analizando el perfil de resistencia de las Cándidas aisladas de sangre en el hospital GAI, para el anti-fúngico Flucitosina observamos que todas *Cándidas albicans* aisladas son sensibles (51) con un MIC de ≤ 1 y 2; todas las cepa (40) de *Cándida tropicales* son sensibles MIC de < 1 y 4; solo 01 cepas de *Cándida parasilopsis* es intermedia con MIC de 16 las otras cepas (31) son sensibles; todas las cepas (16) de *Cándida Glabrata* y (12) *Cándida guilliermondii* sensibles con un MIC: < 1 y 2; 01 cepa de *Cándida lypolitica* es resistente y 06 cepas son sensibles; se aisló solo una cepa de *Cándida Krusie* la cual fue resistente con un MIC $<$ de 16; *Cándida haemuluni* es sensible.

La Flucitosina es un fármaco anti-fúngico activo por vía oral, tiene una estructura semejante a la pirimidina fluorada o al fluroruracilo inhibe la síntesis del ADN, es indicado en el tratamiento de las infecciones de *Aspergillus sp*, *Cándida glabrata*, *Cándida sp*, *Cladosporuim sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus sp*, *Phialophara sp*, *Sporothrix schenckii* (Arcaya, 2006; Arenas, 2012; Bonifaz, 2011; Jawetz, 2010).

Este anti-fúngico es activo únicamente frente a levaduras. No se debe utilizarse en monoterapia por inducir resistencia con facilidad. Suele asociarse a anfotericina B para el tratamiento de infecciones sistémicas este antibiótico es sensible a la mayoría de Cándidas

a excepción de *Cándida krusei* y *Cándida lusitanae* es resistente (Cercenado, 2006). Obtuvimos una cepa de *Cándida parasilopsis* con sensibilidad intermedia, lo mismo 1 cepa de *Cándida krusei* y *Cándida guilliermondi* resistentes lo cual es diferente a la resistencia teórica reportada, lo cual debe ser comprobada por Biología Molecular.

En el perfil de resistencia para Fluconazole se determinó que todas las (51) cepas de *Cándida albicans* son sensibles, con MIC de: ≤ 1 y 8; lo mismo que todas las cepas (40) *Cándida tropicalis* con MIC de < 1 y 4; *Cándida parasilopsis* con un MIC: 0.01 y 8; *Candida Glabrata* (16) cepas y *Cándida Guilliermondii* fueron sensibles con MIC que varía de 0.03 y 08; solo 01 cepa *Candida lypolitica* es Resistente, 07 cepas son sensibles; *Candida Krusei* así como *Cándida haemuloni* son resistentes con un MIC $>$ a 16. (Vásquez, 2009).

El Fluconazol inhibe en forma selectiva la enzima 14α esterol demetilasa en la síntesis del ergosterol, que es dependiente del citocromo p 450. La cual conlleva a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática. Se describen tres posibles mecanismos en la génesis de la resistencia: el primero es la modificación de la enzima blanca; el segundo, la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antibiótico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo; y por último, la inactivación del antibiótico por modificación del mismo. De todos éstos, en el caso de los azoles sólo se conocen los dos primeros como potenciales causas de resistencia. En la actualidad, la resistencia informada al FCZ en especies de *Cándida albicans* es cercana al 3%, con variaciones regionales y locales muy notorias; hasta el 10% de los pacientes con sida y candidiasis mucocutánea presentan resistencia a FCZ. Aunque el fenómeno de resistencia de *Candida* al FCZ no es prevalente, según la literatura mundial, existe un grupo de pacientes con patologías y condiciones predisponentes que deben ser de especial atención como aquellos con patologías neoplásicas de tipo hematológico. *Candida krusei*

tiene resistencia al FCZ lo mismo que *Cándida glabrata* es resistencia o tiene SDD (Vásquez, 2009). En cuanto a la resistencia al Anfoterisin B se llegó a determinar que todas las cepas (51) de *Cándida albicans* fueron sensibles con un MIC de: > 0.25 a 1; las 40 cepas de *Cándida tropicalis* fueron sensibles, con de MIC: > 0.25 y 01; 29 cepas de *Cándida parasilopsis* fueron sensibles con un MIC de: > 0.25 y 01, (03) cepas son resistentes con un MIC de 04; para *Candida glabrata* y *Cándida guilliermondii* todas las cepas fueron sensibles con MIC de: > 0.25 y 01; 02 cepas de *Cándida lypolitica* fueron resistentes con MIC de: 04 (05) cepas fueron sensibles; *Cándida krusei* es sensible y *Cándida haemuloni* fue resistente a un MIC: > =16.

La Anfotericina B se une a los esteroides de las membranas celulares tanto de los hongos como de los humanos, donde altera la integridad de las mismas. Esto se traduce en una pérdida de potasio y otros contenidos celulares. La mayor afinidad de la Anfotericina B hacia el ergosterol, se da en las membranas de los hongos cual es la clave para la acción anti-fúngica. El fármaco se une también al colesterol (esterol preferente de las membranas de las células humanas) la Anfotericina B presenta algunos efectos tóxicos, en particular a nivel renal (Zapata-González & Nardona-Castro, 2012).

In vitro, la Anfotericina B es activa contra muchos hongos patógenos, incluyendo *Acremonium sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondi*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium sp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucor mucedo*, *Rhodotorula spp.*, y *Sporothrix schenckii* (Vásquez, 2009; Zapata-González, 2012).

Cándida glabrata pueden tener resistencia intermedia al anfotericina B mientras que *Cándida krusei* puede ser intermedio o resistente a este anti-fúngico.

En el análisis de la resistencia para el Variconazol se observó que la mayoría de Cándidas son sensibles como un MIC de: ≤ 0.12 a 1.0; solo 02 cepas de *Cándida lypolitica* tienen resistencia con un de MIC $>$ de 8.

Para la Caspofungina se observó que todas las especies de cándidas aisladas son sensibles a este ant-fungico con MIC de ≤ 0.03 a 1.0. *Cándida parasilopsis* puede ser sensible o resistente a esta anti- fúngico.

El monitoreo de la susceptibilidad a estos medicamentos y la evaluación de su importancia clínica en el futuro será muy importante ya que es probable que el uso de estos medicamentos aumente en la región. La mayoría de los pacientes fueron tratados con Fluconazol o Anfotericina B. En nuestro país, queda por ver si una mayor utilización de equinocandinas mejora los resultados o se asocia con una mayor resistencia (Vásquez, 2009; Zapata-González, 2012; Zurita, 2018).

VI. Conclusiones

1. El perfil fenotípico de las candidas aisladas de hemocultivos del Hospital Guillermo Almenara están conformadas por: 51 cepas para *Cándida albicans* (31.88%), 40 cepas ((25 %) de *Cándida tropicales*; 32 cepas (20%) para *Candida parasilopsis* 16 (10%); 16 cepas para *Cándida. glabrata*, 12 cepas para *Cándida guillermondi* (7.5%), 07 cepas para *Cándida lypolitica* (4.38%), 01 cepa de *Cándida krusei* (0.63%) y 01 cepa de *Cándida haemlone* (0.63%).

2. En cuanto a la distribución de las *Cándidas* según el grupo etario se observó que, en la población mayor se aislaron la mayoría de cepas 78 (48.75%), seguido de la población adultos con 49 cepas (30.63%), en niños se aislaron 17 cepas (10.63%) y en neonatas cepas fueron 16 (10%).

3. En la distribución de las *Cándidas* según el sexo se observó que en los hombres se aisló la mayoría de cepas 89 (55.63%) y en las mujeres solo 71 cepas (44.38%).

4. Según la sobrevivencia de los pacientes, se obtuvo que: 91 cepas (58.88%), fueron aisladas de pacientes que sobre vivieron a la candidemia y 69 cepas (43.13 %) pertenecen a pacientes que murieron por candidemia.

5. En la distribución por servicio de procedencia se determinó que la mayoría de candidas procedían de pacientes hospitalizados las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 47 cepas proceden de UCI (29.38%), 25 cepas de cirugía, (15.63%), 18 cepas de emergencia (11.25%), 16 cepas de medicina (10%), 11 cepas de pediatría (6.88%), 09 cepas de neonatología (5.63%), 08 cepas de hematología (5%), 06 cepas de nefrología (3.75%), 05 cepas de Trasplante (3.25%), 03 cepas de cardiología (1.88%), otros servicios 12 cepas (7.5%).

6. En cuanto al perfil de resistencia de las Cándidas aisladas de sangre para el anti-fúngico Flucitosina observamos que todas Cándidas albicans son sensibles (51); al igual que las cepas de Cándida tropicales (40); en cuanto a Cándida parasilopsis (31 cepas) fueron sensibles y 1 sola cepa es intermedia; todas las cepas de Cándida Glabrata y Cándida guillermondii fueron sensibles; 01 cepa de Cándida lypolitica es resistente y 06 cepas son sensibles; se aisló solo una cepa de Cándida Krusie resistente; Cándida haemuluni es sensible.

7. En el perfil de resistencia para Fluconazole se determinó que todas las cepas de Cándida albicans son sensibles; lo mismo que las cepas de Cándida tropicalis; Cándida parasilopsis; Cándida glabrata y Cándida Guillermondii fueron sensibles; solo 01 cepa de Cándida lypolitica es Resistente; así como Cándida Krusei como Cándida haemuloni son resistentes.

8. En cuanto a la resistencia a la Anfoterisina B se llegó a determinar, todas las *Cándida albicans* y las *Cándida tropicalis* fueron sensibles; 03 cepa de Cándida parasilopsis fueron resistentes; tanto *Candida glabrata* y *Cándida guillermondii* fueron sensibles; (02) cepas de *Cándida lypolitica* fueron resistente; *Cándida krusei* es sensible y *Cándida haemuloni* fue resistente.

9. Dos cepas de *Cándida lypolitica* no fueron resistentes al Variconazol

10. Todas las cándidas son sensibles a la Caspofungina.

11. *Cándida albicans* es la levadura que se aísla con mayor frecuencia seguida de *Cándida tropicales*, *Cándida parasilopsis* y *Cándida glabrata*.

12. No se observó resistencia de *Cándida albicans* a los anti-fúngico; la resistencia de *Cándida no albicans* es baja (12.7%) sin embargo, la tasa de mortalidad es alta esto posiblemente, a la demora en el inicio del tratamiento anti-fúngico al paciente.

VII. Recomendaciones

1. Se debe hacer una correcta identificación de las especies de Cándidas a nivel de especie a fin de establecer un diagnóstico correcto.
2. Se debe realizar una correcta prueba de Susceptibilidad a los antibióticos anti-fúngica, teniendo en cuenta los Standares del CLSI, con la finalidad de dar un tratamiento adecuado.
3. Las especies de Cándidas raras y las con sensibilidad no usable deben ser comprobadas por laboratorios de Micología de referencia tanto a nivel nacional o internacional.
4. En todo estudio de investigación se debe valorar el perfil fenotípico como el perfil de resistencia de las Cándidas aisladas para obtener datos para usados en el tratamiento empírico de las Cándidas a nivel país.

VIII. Referencias Bibliográficas

- Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Schreckenberger, P., & Winn, W. (2010). *Diagnostico Microbiológica*. Washington, USA: Medical Panamericana.
- Almeida, L et al., (2006. May). Clinical and Microbiological aspects of candidemia due to *C. parasilopsis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Rev Med Mycol*. 44(3):261-266. doi.org/10.1080/13693780500421476.
- Alvarado, T., Colombo, A.L., Cortés. J.A., De Quiroz, F., Guzmán-Blanco, M., & Zurita, J. (2013, Setiembre). Recomendaciones para el diagnóstico de candidemia en América Latina. Red de Micosis Invasiva de América Latina. *Rev Iberoam Micol*. 30 (3): 150-157.
- Araiza, S.J., Bonifaz, A., & De-Pablo, P. (1998, Junio). CROMagar - Cándida, experiencia en la identificación presuntiva de levaduras oportunistas aisladas de candidosis oral en pacientes inmunosuprimidos. *Revista de Bioquímica*, 1. 23 (2): 794-800.
- Arcaya, N., Beltrán, H., Calvo, T., Milla, L., & Pineda, M.R. (2006, Mayo). Perfil de sensibilidad anti-fúngica de especies de Cándida aisladas de hemocultivos en un hospital universitario, Maracaibo, Venezuela. *Rev Iberoam Micol*. 44(3):261-266. doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70022-5.
- Arenas, R. (2011). *Micología Médica Ilustrada*. Santa Fe, México: McGraw Hill Interamericana. S.A.
- Beltrán, H., Calvo, B., Mesa, L., Perozo, A., & Pineda, M. (2010,16 de mayo). Cambios en la distribución de especies de Cándida aisladas de hemocultivos en pacientes del hospital universitario de Maracaibo, Venezuela. *Rev de Infectología*, 24(5): 358-366.

- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*. Santa Fe, México: McGraw Hill Interamericana. S.A.
- Cercenado, E., & Cantón, R. (2006). *Diagnóstico microbiológico de la micosis, estudios de sensibilidad a los anti-fúngicos*. Bilbao, España: Soc. Española de Microbiología.
- Cervera, C. (2012, Julio). Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(8):483-491.
- Chim, C., Cheng, V., Ho, P., Leung, A., Lie, A., & Yuen, K. (2002). *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with haematological malignancies. Clinical features and risk factors. *J Hosp Infect*. 50:316-319.
- Cisneros, J.M., Flores, C., Garcia, M.V., Herrero, M., Martín, E., & Ruiz, M. (2009). Andalusian Study Group for Candidemia. In vitro susceptibilities of bloodstream isolated of *Candida* spp.: Results from a multicenter active surveillance program in Andalusia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27: 518–22. doi.org/10.1016/j.eimc.2008.09.013.
- Colombo, A., Nucci, M., Park B., Noué, S., Arthington – Skaggs, B., & Da Matta, D. (2006, 8 Aug). Epidemiology of Candidemia in Brazil. A Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J Clin Microbiol*, 44(8): 2816–2823. doi: 10.1128/JCM.00773-06.
- Colombo, AL., Cortés, JA., Zurita., J., Guzmán-Blanco, M., Alvarado, MT. y Quiroz, TF et al. (2013, Octubre). Recomendaciones para el diagnóstico de candidemia en América Latina. Red de Micosis Invasiva de América Latina. *Rev Iberoam Micol*, 30 (3): 150-157.
- Corcione, S., De Rosa, FG., Filippini, C., Fossati, L., Montrucchio, C., & Raviolo, S. (2015, Mayo). The Effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment

in candidemia in internal medicine wards [corrected]. *PLoS One*, 10(5): doig: 10.1371/journal.pone.0125149.

Cornejo-Juárez, P., Velásquez-Acosta, C., Díaz-González, A., & Volkow-Fernández, P. (2005). Tendencia del perfil de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de sangre en un hospital oncológico (1998-2003). *Salud Pública México*, 47(4):288-93.

Davise, H., Larone. Editors. (2011). *Medically Important Fungi a Guide to Identification*. (5th edition). Washington, USA: ASM Press. American Society for Microbiology.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., & Figueiras, M.J. (2011). *Atlas of Clinical Fungy*. (3rd ed). (*C D only*). Entraal bureau Voor Schimmelecultures: Paises Bajos., Washington, USA: Amer Society for Microbiology.

De La Torre, J., & Gallego, C. (2001). Actualización diagnóstica y terapéutica en infecciones fúngicas invasoras: de los antiguos tópicos a las nuevas evidencias: *Farmacia Hospitalaria*, 25(5):345-55.

Diaz, J., & Rojas, R. (2011). *Guía de Prácticas de Micología*. Lima, Perú: Universidad Federico Villareal.

Dolande – Franco, M – E., Reviákina, V., Panizo, M – M., Macero, C., Moreno, X., Calvo, A., & Selgrad, S. (2008, May). Estudio de distribución y sensibilidad a los anti fúngicos de aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol*, 30 (6): 250-757.

Eliakim-Raz, N., Babaooff. R., Yahav, D., Yanai, S., Shaked, H., & Bishara, J. (2016, Junio). Epidemiology, microbiology, clinical characteristics, and outcomes of candidemia in internal medicine wards-a retrospective study. *Int J Infect Dis*, 52 (7): 49–54.

- Gastmeier, P., Geffers, C., Meyer, E., & Schwab, F. (2013). No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011 Euro surveillance: *European Communicable Disease Bulletin*, 18(24).
- Jarque, R., Pemán, G., & Salavert, M. (2006). Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clínico terapéuticas, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, (4): 36-45.
- Jawetz., Melnick., y Adelberg. (2010) *Microbiología Médica*. México, México. Editorial: McGraw Hill Interamericana. Editores S.A. De CV.
- Leung , AYH., Chim, CS., Cheng, VCC., Yuen, KY., Lie, AKW et al., (2002). *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. *J Hosp Infect*, 50:316 -319.
- Liu, Y., Xiabo, F., Ying, L., Wang, S., Zhu, X., & Chen, G. (2014, May). Candidemia tasas de incidencia tipos de especies y factores de riesgo en un hospital universitario de tercer nivel de China. *Rev, Journal Info*, (22): 4-4).
- LX., Bustamante, B., Garcia, C., Jacobs, J., Martins, MA., & Szeszs, MW. (2014, Octubre). Distribución de especies y perfil de susceptibilidad anti-fúngica de aislados de *Cándida* de infecciones del torrente sanguíneo en Lima, Perú. *J. Med Microbiol*, 63 (6): 855-560.
- Meyer, E., Geffers. C., Gastmeier, P., Schwab, F. (2013). No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. Euro surveillance: *European Communicable Disease Bulletin*. 18(24.).
- Quindós, G., Guarro., J., Cabañes, F. J. (2016). *Revista Americana de Micología*. Madrid, España: View Editorial Board.
- Ramírez, R., Díaz, T (2013). *Manual de Normas y Procedimientos del Servicio de Microbiología*. Lima, Perú: Hospital Guillermo Almenara - Essalud.

- Ramírez, R., Díaz, J. (2017, marzo). *Microbiología Básica Médica*. Lima, Perú. Editorial MACRO.
- Rodríguez, L., Bustamante, B., Illescas, R., Ramirez, R., Díaz, A., & Hidalgo, J. (2014, diciembre 01). Nosocomial Bloodstream Infections due to *Candida* at a Tertiary Care Center in Lima - Peru: Species Distribution and Clinical Features. Infectious Diseases Unit, Almenara Hospital in Lima. *Open Forum Infectious Disease*, (1): 381–382. doi.org/10.1093/ofid/ofu052.994.
- Rodríguez, L., Bustamante, B., Huaroto, L., Agurto, C., Illescas, R., Ramírez R. y Díaz (2017, 18 de abril). Un estudio *multicéntrico de la* infección del torrente sanguíneo por *Candida* en Lima-Callao, Perú: distribución de especies, resistencia antifúngica y resultados clínicos. *Rev. POLOS Medicine*, 12(4).
- Sanabria, R et al., (2014, Mayo). Perfil de Susceptibilidad a los anti fúngicos de aislados de *Cándida* spp por el método de micro - dilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 12 (1): 33-40.
- Tedeschi, S et al., (2006, 21 Augst). *Candida* Network. Epidemiology and outcome of candidemia in internal medicine wards: a regional study in Italy. *Eur J Intern Med*, 34:39-44.
- Vásquez, D. (2009). *Antimicóticos en Micología Médica Básica* (Tercera ed.). Ciudad de México, México: *Mac Graw-Hill*.
- Villanova, PA. (2008, April). *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved Standard. M27 A3*. Editorial: CLSI.
- Wayane, P.A. (2008, Julio). *Clinical Laboratory Standards Institute. Method antifungal disk diffusion susceptibly testing of yeast. Approved Guideline. Second edition M-38 A2*. Barcelona, España. Editorial: Editorial: CLSI.

- Yen Tan, T et al., (2016, February 28). Antifungal susceptibility of invasive *Candida* bloodstream isolates from The Asia-Pacific region. *Med Mycol*, (25): 471–477. doi.org/10.1093/mmy/myv114.
- Zapata-González, F., & Nardona-Castro, N. (2012, 30 de junio). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los anti-fúngicos. *Rev CES Med*, 26(1): 71-83.
- Zurita Macalupú, S. (2018, marzo). Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev. Perú. med. exp. Salud Publica*, 35(1). doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3563

IX. Anexos

9.1 Fichas

**FICHA 1: DE FILIACION DEL PACIENTE SEGÚN SERVICIO HOSPITAL Y
NÚMERO DE MUESTRAS, HOSPITAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN**

Servicio.....

Cama. N°:

Fecha.....

Hora.....

B. RESPONSABLE.....

C. DATOS DE FILIACIÓN DEL PACIENTE

a. Nombres y Apellidos.....

b. Ocupación.....

c. Seguro Social.....

d. Diagnóstico.....

e. Tratamiento.....

f. Número de Muestras Tomadas.....

**FICHA 2: AISLAMIENTO DE LEVADURAS DEL GENERO CANDIDA DE
HEMOCULTIVOS, HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA
IRIGOYEN, 2014 A 2015**

- a. Código de la levadura.....**
- b. Fecha de cultivo.....**
- c. Medios de cultivo utilizados.....**
- d. Metodología utilizado.....**
- e. Fecha crecimiento.....**
- f. Montaje húmedo.....**
- g. Coloración de GRAM.....**
- h. Responsable.....**

FICHA 3: DE IDENTIFICACION DE LEVADURAS

- 1. Código de la levadura.....**
- 2. Fecha de identificación.....**
- 3. Metodología utilizada.....**
- 4. Pruebas adicionales.....**
 - Tubo Germinativo.....**
 - CROMagar.....**
 - Micro-cultivo en DALMAO.....**
 - Cicloheximida.....**
- 5. Género.....**
- 6. Especie.....**
- 7. Responsable.....**

FICHA 4: SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA, PERFIL FENOTIPICO Y PERFIL DE RESISTENCIA DE LEVADURAS DEL GENERO CANDIDA AISLADAS DE HEMOCULTIVOS EN EL HOSPITAL NACIONAL GUILLERMO ALMENARA, 2014 A 2015.

- 1. Código de la levadura.....**
- 2. Fecha de identificación.....**
- 3. Metodología utilizada.....**
- 4. Anti - fúngico testados.....**

- 5. Lectura del MIC**

Flusitocina.....
Fluconazole.....
Voriconazole.....
Anfoterisina B.....
Caspofungina.....

FICHA 5: AISLAMIENTO Y DE IDENTIFICACION DE CANDIDAS SEGÚN

SERVICIO: HOSPITAL GUILLERMO ALMENARA

Tipo de muestra.....

Código de la muestra:.....

Fecha.....

Responsable del proceso.....

A. AISLAMIENTO PRIMARIO: CULTIVO:

1. Medios enriquecidos.....

2. Medios selectivos.....

B. LECTURA DE LOS CULTIVOS:

1. Hongos Levaduriformes:

Montaje húmedo en SSF.:

Coloración GRAM.....

C. PRUEBAS ADICIONALES

Prueba del Tubo Germinativo.....

Cultivo en CROMagar.....

Micro cultivo: Prueba de DALMAO.....

Prueba de la Ureasa.....

Tolerancia a la Cicloheximida.....

D. IDENTIFICACION ETIOLOGICA

1. Método Convencional Manual.....

2. Sistema Automatizado.....

E. SUSCEPTIBILIDAD ANTIFUNGICA

- 1. Método de Difusión en Disco en Agar.....
- 2. Método Automatizado.....

F. LECTURA DEL MIC

a. Antibióticos

Sensibles.....
.....
.....

b. Antibióticos

Intermedios.....
.....
.....

c. Antibióticos

resistentes.....
.....
.....

9.2. MATRIZ DE CONSISTENCIA

	TITULO	PROBLEMA	OBETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES
general	<u>Perfil fenotípico y perfil de resistencia de levaduras del género cándida aisladas de hemocultivos en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, en los años: 2014 a 2015.</u>	¿Cuál es la relación entre el perfil fenotípico y perfil de resistencia de las levaduras del género Cándida aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados con candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen durante los años 2014 al 2015?	Determinar la relación entre el perfil fenotípico y el perfil de resistencia de las especies de levaduras del género Cándida aislada de hemocultivos de pacientes hospitalizados con candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen durante los años 2014 al 2015.	El tratamiento médico dado a los pacientes hospitalizados en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen con diagnóstico de candidiemia por levadura del género Cándida, aisladas de hemocultivos durante los años de 2014 al 2015 está en relación al perfil fenotípico y al perfil de resistencia de las especies de cándidas aisladas (Rodríguez et al., 2017).	Cándidas hemocultivos candidemias perfil fenotípico perfil de resistencia anti- fúngicos	% de cándidas aisladas % de hemocultivos positivos % de candidemias tipos de candidas tasa de resistencia intervalos del MIC

	TITULO	PROBLEMA	OBETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES
especifico	<u>Perfil fenotípico y perfil de resistencia de levaduras del género cándida aisladas de hemocultivos en el Hospital Nacional Guillermo</u>	1.- ¿Cuáles son las especies de levaduras del género cándida que se aíslan con mayor frecuencia de los cultivos de sangre de los pacientes hospitalizados en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en el periodo 2014 al 2015?	1. Identificar las especies de levaduras del género cándida que se aíslan con mayor frecuencia de los cultivos de sangre de los pacientes hospitalizados en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en los años 2014 al 2015	1. Las especies de levaduras del género que se aíslan con mayor frecuencia de pacientes hospitalizados con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen son: <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parasilopis</i> y <i>C. garbrata</i> (perfil fenotípico) Rodríguez et al. (2017).		

específico	Almenara Irigoyen, en los años: 2014 a 2015	2. ¿Cuál es la resistencia a los antibióticos anti-fúngicos de las levaduras del género cándida aisladas de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en años 2014 al 2015?	2. Determinar la resistencia a los antibióticos anti – fúngicos de las especies de levaduras del genero cándida aisladas de hemocultivos de pacientes hospitalizados en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en los años 2014 al 2015	3. Las especies de cándidas aisladas de hemocultivos de pacientes con diagnóstico de candidemia en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen son sensibles a los anti-fúngicos probados como: Flurocitisina, Fluzonal, Voriconazol, Anfoterisina B 4. y Caspofugina (Rodríguez et al., 2017).		
------------	--	--	--	--	--	--

9.3. VALIDACION DE LOS INSTRUMENTOS

A. IDENTIFICACIÓN DE Cándidas ATCC (PERFIL FENOTIFICO)

CEPAS ATCC	IDENFICACION	SENSIBILIDAD	REPRODUCIBILAD
90028	<i>Cándida albicans</i>	99.99	Excelente
22019	<i>Cándida parasilopsis</i>	99.99	Excelente
750	<i>Cándida tropicales</i>	99.99	Excelente
90030	<i>Cándida glabrata</i>	99.99	Excelente
6258	<i>Cándida kuseii</i>	99.99	Excelente

9.4. VALIDACION DE LAS INSTRUMENTOS

B. LECTURA DEL MIC DEL Cándidas ATCC (PER. DE RESISTENCIA)

CANDIDAS ATCC	FLUSITO SINA	FLUC ONAL	ANFO- B	VORIC ONAZO L	CASPOF UN	SENSIB ILIDAD
<i>Cándida albicans</i>	<= 4	<= 2	<= 1	<= 0.12	<= 0.25	99.99
<i>Cándida parasilopsis</i>	<= 4	<= 2	<= 1	<= 0.12	<= 2	99.99
<i>Cándida tropicales</i>	<= 4	<= 2	<= 1	<= 0.12	<= 0.25	99.99
<i>Cándida glabrata</i>	<= 16	<= 32	<= 1	<= 0.12	<= 0.12	99.99
<i>Cándida kuseii</i>	<= 18	<= 64	<= 1	<= 0.50	<= 0.25	99.99