



Departamento de Microbiología
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**“Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en
el área hospitalaria del H.U Virgen del Rocío en el
periodo 2003-2009”**

**Tesis presentada por la licenciada Doña María de Toro Crespo para optar
al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla.**

Sevilla 2011



Departamento de Microbiología

D^a M^a José Torres Sánchez, Profesora Doctora de la Universidad de Sevilla y
D. Javier Aznar Martín, Catedrático de Microbiología de la Universidad de
Sevilla.

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla lleva por títulos “**Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área hospitalaria del H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009**” ha sido realizado por D^a María de Toro Crespo bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a
15 de febrero de 2011.

Fdo. Dra. M^a José Torres Sánchez

Fdo. Prof. Javier Aznar Martín

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

Estoy especialmente agradecida a mis dos directores de tesis, el Prof. Javier Aznar, quien además de haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, ha orientado cada uno de mis pasos y a la Prof. María José Torres, con quien ha sido tan fácil trabajar y aprender, por su paciencia, disponibilidad y generosidad a la hora de compartir su experiencia y amplio conocimiento en el campo de la Biología Molecular.

A la Dra. Maite Ruiz quien pensó en mí para este proyecto y me guió pacientemente en el principio del camino.

A los facultativos del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, de quienes he aprendido tanto a lo largo de mi formación como microbióloga, especialmente a la Dra. Terrones y al Dr. Cantos, dos grandes profesionales y excelentes personas que siempre me han animado en este proyecto.

A Rafa y Juan, del laboratorio de modelos animales de enfermedades infecciosas, quienes me han dedicado su tiempo y me han alegrado muchas tardes que hemos pasado haciendo RPMI.

Y como no, a mi familia y a Miguel, por su apoyo y comprensión durante todo este largo camino.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	1
1.1 Candidemia: magnitud del problema.....	2
1.2 Descripción del complejo <i>C. parapsilosis</i> e identificación en el laboratorio.....	3
1.3 Epidemiología de Candidiasis invasora por el complejo <i>C. parapsilosis</i>	6
1.3.1 Factores de riesgo.....	7
1.3.2 Aspectos clínicos.....	8
1.4 Factores de virulencia en el complejo <i>C. parapsilosis</i>	11
1.4.1 Secreción de enzimas.....	11
1.4.2 Adherencia.....	13
1.4.3 Formación de biopelículas.....	13
1.4.4 Morfogénesis.....	16
1.5 Sensibilidad a los antifúngicos.....	17
2. Justificación y objetivos	25
3. Material	28
3.1 Microorganismos.....	29
3.1.1 Cepas seleccionadas.....	29
3.1.2 Cepas patrón.....	37
3.2 Productos químicos y biológicos.....	37
3.3 Agentes antimicrobianos.....	38
3.4 Aparatos y materiales.....	38
3.5 Soluciones y tampones.....	40
3.6 Medios de cultivo.....	43
4. Métodos	45
4.1 Recogida de datos clínicos.....	46
4.2 Aislamiento e identificación de las levaduras en el laboratorio.....	48
4.3 Identificación molecular de las cepas estudiadas.....	50

4.4 Formación de biopelículas.....	57
4.5 Determinación de sensibilidad a los antifúngicos mediante microdilución en caldo.....	60
4.6 Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos sobre biopelículas.....	67
4.7 Análisis estadístico.....	68
5. Resultados.....	69
5.1.1 Descripción de los datos epidemiológicos de las cepas productoras de candidemia.....	70
5.1.2 Descripción de los datos epidemiológicos de las candidemias por <i>C. parapsilosis</i> complex producidas en H.U Virgen del Rocío durante el periodo 2003-2009.....	73
5.2 Aislamiento e identificación del complejo <i>Candida parapsilosis</i>	76
5.2.1 Identificación a nivel fenotípico.....	76
5.2.2 Identificación genotípica.....	77
5.2.2.1 Selección de cebadores para la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) en <i>C. parapsilosis</i> complex.....	77
5.2.2.2 Identificación molecular de las cepas estudiadas de <i>C. parapsilosis</i> complex mediante RAPD-PCR y RFLP.....	84
5.3 Producción de biopelícula en <i>C. parapsilosis</i> complex.....	89
5.4 Determinación de sensibilidad a los antifúngicos.....	92
5.4.1 Determinación de la sensibilidad a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre células planctónicas de <i>C. parapsilosis sensu stricto</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i>	92
5.4.2 Determinación de la sensibilidad a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre células sésiles de <i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	95
6. Discusión.....	101
7. Conclusiones.....	126
8. Bibliografía.....	129
9. Anexo I.....	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas de <i>C. parapsilosis</i> complex aisladas de hemocultivos y catéteres.....	32
Tabla 2: Cepas de <i>C. parapsilosis</i> complex aisladas de otras localizaciones.....	36
Tabla 3: Cebadores y sus secuencias de nucleótidos utilizados en RAPD-PCR.....	53
Tabla 4: Componentes de la reacción en RAPD-PCR.....	54
Tabla 5: Componentes de la PCR para la amplificación del gen <i>SADH</i>	55
Tabla 6: Rangos de concentraciones y disolventes recomendados para anfotericina B, voriconazol y anidulafungina.....	62
Tabla 7: Límites de CMI recomendados para la técnica de microdilución para las cepas de control de calidad, según el CLSI.....	65
Tabla 8: Índices para la lectura de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)....	66
Tabla 9: Puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp.....	67
Tabla 10: Distribución de episodios de candidemia en el H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.....	72
Tabla 11: Datos epidemiológicos de candidemias producidas por <i>C. parapsilosis</i> complex en el H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.....	76
Tabla 12: Cepas utilizadas para realizar la selección apropiada de cebadores en la RAPD-PCR.....	80
Tabla 13: Procedencia de los aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> complex.....	87
Tabla 14: Distribución de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i> en los 122 aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> complex.....	90
Tabla 15: Cuantificación de formación de biopelículas en cepas procedentes de hemocultivos y otras localizaciones de <i>C. parapsilosis</i> complex.....	92
Tabla 16: Comparación de formación de biopelícula entre aislamientos de <i>Candida parapsilosis</i> complex procedentes de hemocultivos y otras localizaciones.....	94
Tabla 17: Actividad <i>in vitro</i> de voriconazol en cepas de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i>	95
Tabla 18: Actividad <i>in vitro</i> de anfotericina B en cepas de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i>	96

Tabla 19: Actividad <i>in vitro</i> de anidulafungina en cepas de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i>	97
Tabla 20: Tabla resumen de la actividad <i>in vitro</i> de voriconazol, anfotericina B y voriconazol en cepas de <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. metapsilosis</i>	98
Tabla 21: Distribución de CMI's para las células planctónicas (CMI) y sésiles (CMIB) frente a voriconazol.....	100
Tabla 22: Distribución de CMI's para las células planctónicas (CMI) y sésiles (CMIB) frente a anfotericina B.....	101
Tabla 23: Distribución de CMI's para las células planctónicas (CMI) y sésiles (CMIB) frente a anidulafungina.....	101
Tabla 24: Características de las diferentes técnicas para la formación de biopelículas <i>in vitro</i>	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfotipos de las colonias de <i>Candida parapsilosis</i> complex.....	5
Figura 2: Etapas de desarrollo de una biopelícula: adhesión (1), maduración (2 y3), disgregación (4) y dispersión (5).....	16
Figura 3: Estructura química de anfotericina B.....	19
Figura 4: Estructura química de voriconazol.....	20
Figura 5: Estructura química de anidulafungina.....	22
Figura 6: Estructura química de fluorcitosina.....	23
Figura 7: Complejo Hospitalario H.U Virgen del Rocío.....	47
Figura 8: Distintas especies de Candida en agar cromogénico.....	49
Figura 9: Paso 1: Etiquetar y llenar los tubos con DMSO.....	62
Figura 10: Paso 2: Diluciones insolubles.....	62
Figura 11: Paso 4: Llenado de la microplaca.....	63
Figura 12: Distribución por especies de las candidemias producidas en el H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.....	70
Figura 13: Evolución del número de candidemias por especies a lo largo del periodo 2003-2009.....	72
Figura 14: Candidemias totales a lo largo del periodo 2003-2009 en el H.U Virgen del Rocío.....	73
Figura 15: Distribución por edades de los pacientes con candidemia por <i>C.</i> <i>parapsilosis</i> complex en el H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.....	74
Figura 16: Patrones de bandas correspondientes al cebador OPE-6.....	79
Figura 17: Patrones de bandas correspondientes al cebador OPA-1.....	80
Figura 18: Patrones de bandas correspondientes al cebador OPE-13.....	81
Figura 19: Patrones de bandas correspondientes al cebador OPA-10.....	81
Figura 20: Patrones de bandas correspondientes al cebador OPE-10.....	82
Figura 21: Patrones de bandas correspondientes al cebador OPA-20.....	83
Figura 22: Patrones de bandas correspondientes al cebador RPO2.....	83
Figura 23: Patrones de RAPD-PCR obtenidos de aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> complex con el cebador RPO2.....	86

Figura 24: Posiciones de los puntos de corte con la enzima <i>BanI</i> en el amplicón <i>SADH</i> de 716pb para diferenciar entre las 3 especies del complejo “ <i>psilosis</i> ”.....	87
Figura 25: Patrones de restricción con <i>BanI</i> obtenidos a partir de la amplificación de <i>SADH</i>	87
Figura 26: Ensayo de formación de biopelículas de diferentes aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> complex, mediante la reducción de una sal de tetrazolio.....	89
Figura 27: Distribución de biopelículas de <i>C. parapsilosis</i> complex según el índice y la procedencia de la muestra.....	91
Figura 28: Determinación de sensibilidad a voriconazol sobre biopelículas de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto.....	96
Figura 29: Porcentaje acumulado de la actividad de voriconazol sobre biopelículas formadas por aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto.....	99
Figura 30: Porcentaje acumulado de la actividad de anfotericina B sobre biopelículas formadas por aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto.....	99
Figura 31: Porcentaje acumulado de la actividad de anidulafungina sobre biopelículas formadas por aislamientos de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto.....	100

Introducción

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área hospitalaria
H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Candidemia: magnitud del problema.

Desde hace unas décadas, las infecciones fúngicas invasoras se han convertido en un importante problema de salud pública debido a sus altas tasas de mortalidad y morbilidad (1) sobre todo en enfermos con inmunodeficiencias y pacientes hospitalizados con enfermedades subyacentes.

Según un estudio reciente de la epidemiología de la sepsis (2, 3), en Estados Unidos se ha producido un incremento en el número fungemias anuales de un 207% entre 1979 y 2000.

Aunque globalmente los microorganismos productores de infecciones fúngicas invasoras más frecuentes son *Candida* spp y *Aspergillus* spp, están emergiendo nuevos agentes patógenos antes considerados como colonizadores, y aumentando la incidencia de hongos oportunistas infrecuentes como *Fusarium* spp, *Acremonium* sp, *Pseudoallescheria boydii*, *Scedosporium* spp, *Paecilomyces* spp (4).

Actualmente las especies de *Candida* constituyen la cuarta causa (7,6%) de aislamientos en hemocultivos en Estados Unidos, con una mortalidad bruta relacionada del 40% (1). En un estudio multicéntrico (5) realizado en España las infecciones fúngicas representaron el 3,1% de las infecciones hematógenas

diseminadas, siendo el 72% de los casos de origen nosocomial y *Candida* spp el octavo agente causal.

En los últimos años se ha observado un aumento de incidencia de las infecciones invasoras por *Candida* spp debido al mayor número de pacientes en situación de riesgo para su adquisición.

Aunque se han descrito más de 17 especies como agentes causales de candidiasis invasora, más del 90% están causadas sólo por 5 especies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (6). En el estudio de vigilancia de sensibilidad antifúngica ARTEMIS DISK, donde se determinaron la sensibilidad antifúngica e identificación de especie de 134.715 aislamientos productores de candidiasis invasora de 137 hospitales de 39 países durante un periodo de 6,5 años (1997-2003), además de registrar que el número de aislamientos de *Candida* spp ha aumentado a lo largo de los años, se observan cambios temporales en la distribución de las especies aisladas. A pesar de que *C. albicans* sigue siendo la especie que se aísla con más frecuencia en candidiasis invasora (66% con respecto a todas las *Candida* spp), su porcentaje ha ido disminuyendo. La presencia de *C. glabrata* y *C. krusei* no ha experimentado cambios, mientras que el caso de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* se ha producido un incremento del 4,6% al 7,5% y del 4,2 al 7,3% respectivamente (6).

1.2 Descripción del complejo *C. parapsilosis* e identificación en el laboratorio.

Candida parapsilosis fue aislada por primera vez por Ashford, como una especie de *Monilia* incapaz de fermentar maltosa, de las heces de un paciente con diarrea en Puerto Rico en 1928 (7, 8). La especie fue llamada *Monilia parapsilosis* para distinguirla de otros aislamientos más frecuentes, *Monilia psilosis*, conocida hoy como *Candida albicans*.

Aunque inicialmente se consideró que no era patógena, *C. parapsilosis* fue identificada como el agente etiológico de una endocarditis fatal en un adicto a drogas por vía parenteral en 1940 (9).

Scherer y colaboradores (10) muestran que los aislamientos de *C. parapsilosis* son genéticamente más heterogéneos que otras especies de *Candida*. Los aislamientos de *C. parapsilosis* se clasificaban en tres grupos, grupo I, II y III en base a la heterogeneidad descrita para las regiones ITS1, ITS2 y la secuencia del ADN ribosomal 5.8S (ADNr), por lo que se empezó a denominar *C. parapsilosis* complex.

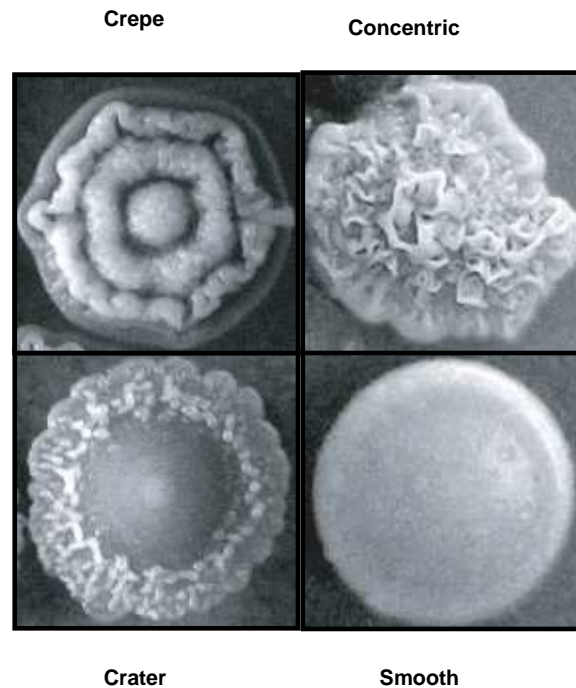
En 2005, Tavanti y colaboradores (11) estiman que estos grupos, aunque fenotípicamente iguales, deben ser considerados como tres especies diferentes, ya que las diferencias genotípicas existentes entre los aislamientos de estos grupos son demasiado grandes como para seguir clasificándolos dentro de una misma especie, y proponen una nueva nomenclatura para ellas. De esta forma, *C. parapsilosis* grupo I mantiene el nombre de *Candida parapsilosis*, y los aislamientos del grupo II y III constituyen las nuevas especies *Candida orthopsilosis* y *Candida metapsilosis* respectivamente.

A partir de ahora nos referiremos a *C. parapsilosis* complex, cuando la identificación de la levadura se haga a nivel de complejo, y específicamente *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* cuando se haya identificado a nivel de especie.

Tradicionalmente, la identificación de las levaduras se lleva a cabo atendiendo a criterios morfológicos y bioquímicos. La mayoría de las levaduras crecen fácilmente en numerosos de los medios que se utilizan habitualmente en el laboratorio como agar sangre, agar chocolate o agar brucella. Sin embargo, el agar Sabouraud glucosado es el medio por excelencia para la identificación de las levaduras.

El crecimiento de las colonias de *C. parapsilosis* complex se hace evidente a las 24-48 h de horas de incubación en aerobiosis a 37°C y presentan un tamaño de 2-4 mm. En cuanto a la morfología de la colonia se han descrito 4 morfotipos diferentes con apariencia de lisa a rugosa, que Sean y colaboradores (12) describen como 4 morfotipos denominados como *crepe*, *crater*, *concentric* y *smooth* (**fig.1**).

Los medios cromogénicos son medios diferenciales útiles para la identificación de especies de *Candida*. El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas mediante hidrólisis específicas de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima (13). La utilización de estos medios puede ser útil para la identificación de determinadas especies como *C. tropicalis*, que da lugar a una coloración azul o *C. krusei* que da lugar a coloración rosa. A diferencia de estas especies, *C. parapsilosis* complex puede dar lugar a diferentes coloraciones que van desde el blanco al malva, esto se debe a la mezcla de la coloración natural de la colonia y al pigmento resultante de la actividad enzimática. Por otra parte, esto mismo ocurre en el caso de otras especies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. kefyr* y *C. lusitaniae*.

Fig 1: Morfotipos de las colonias de *Candida parapsilosis* complex.

Los microbiólogos experimentados pueden identificar *C. parapsilosis* complex combinando el color que produce la levadura en el medio cromogénico con la morfología de la colonia.

En los casos en los que no se obtenga una identificación precisa, se realiza un auxonograma, donde se estudia la capacidad de la levadura para asimilar diferentes compuestos tanto hidrocarbonados como nitrogenados. Estos métodos nos permiten hacer una identificación como *C. parapsilosis* complex ya que como demuestran Tavanti y colaboradores (11) *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* son fenotípicamente indistinguibles tanto por el perfil de asimilación de sustratos como por la coloración en el medio cromogénico y la morfología de la colonia.

La identificación de las especies *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* se realiza mediante técnicas moleculares y aunque se han descrito muchas, aún no hay una técnica molecular de referencia establecida.

Se han descrito diferentes técnicas para el estudio molecular y caracterización de cepas de *C. parapsilosis*, como el cariotipo, el análisis de isoenzimas, la tipificación por comparación de secuencias (MLST), polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (11), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) y la secuenciación de ADN.

1.3. Epidemiología de candidiasis invasora por *Candida parapsilosis* complex

En comparación con otras especies de *Candida*, *Candida parapsilosis* complex se distribuye ampliamente en la naturaleza y a diferencia de *C. albicans* y *C. tropicalis*, no es un patógeno humano obligado, ya que ha sido aislado tanto de muestras humanas, es uno de los hongos que se aísla más frecuentemente en el espacio subungueal humano, como de muestras procedentes de animales domésticos, insectos, suelo y ambientes marinos (7).

La incidencia de *Candida parapsilosis* complex está aumentando en todo el mundo. Los datos del Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY 2003, muestran que *C. parapsilosis* complex es la segunda especie de *Candida* más aislada de sitios normalmente estériles en pacientes hospitalizados. *C. parapsilosis* complex se aísla, proporcionalmente, más que *C. albicans* de sangre y dispositivos intravasculares (14).

La incidencia de Candidiasis invasora por *C. parapsilosis* complex varía geográficamente, y en función de las características y enfermedades de base del paciente, así *C. parapsilosis* complex representa el 15% de los aislamientos de *Candida spp* en América del Norte, 16,3% en Europa y 23,4% en América latina (15). Los datos de los que se dispone respecto a las candidemias producidas por *C. parapsilosis* complex en España, se extraen de un trabajo de Almirante y colaboradores (16) donde recogen que el 23% de los episodios de candidemia fueron producidos por este complejo.

Con respecto a las especies integrantes del complejo “*psilosis*”, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, hasta el momento, en la literatura hay muy pocos datos acerca de su distribución, así como de la sensibilidad antifúngica (17, 18). En general, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* suponen menos del 10% del total del complejo “*psilosis*” y presentan conjuntamente una notable variación regional, así, el más alto porcentaje se da en Sudamérica donde representan 10,9% y donde menos presencia se ha detectado es en África con 0,7%.

En el estudio de vigilancia ARTEMIS, realizado entre 2001 y 2006, se identificaron 1.929 aislamientos de *Candida parapsilosis* complex (17). Estos aislamientos procedían de 89 centros de 29 países de todos los continentes. *C. parapsilosis* sensu stricto representó el 91,3% de los aislamientos (1.762), mientras que *C. orthopsilosis* el 6,1% (117) y *C. metapsilosis* el 1,8% (34 aislamientos).

Del estudio de Lockhart y colaboradores (17) se desprende que, al igual que ocurre con *C. parapsilosis*, la presencia de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* depende de la localización geográfica, así el 10,9% de los aislamientos de Sudamérica fueron *C. orthopsilosis* y la distribución varió desde 16,5% y 16% en Venezuela y Brasil, respectivamente a 4,3% y 3,1% en Ecuador y Argentina, mientras que en países como Finlandia, Reino Unido o Rusia no se aisló ninguna *C. orthopsilosis*.

C. metapsilosis también está presente en todos los continentes, donde presenta el porcentaje más alto es en Polonia con 13,8% de los aislamientos de *C. parapsilosis* complex y el más bajo en América del Norte donde sólo el 0,6% de los aislamientos fueron *C. metapsilosis*.

Gomez-Lopez y colaboradores (18), encuentran que la prevalencia de estas especies en España con respecto al complejo “*psilosis*” es de 6,9% y 5,7% de *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis*, respectivamente.

1.3.1 Factores de riesgo

La enfermedad invasora por *C. albicans* y *C. tropicalis* suele estar precedida de colonización y además estas levaduras se transmiten verticalmente. Sin embargo la enfermedad invasiva por *C. parapsilosis* complex puede ocurrir sin colonización previa y frecuentemente se transmite horizontalmente por la contaminación externa de dispositivos médicos o soluciones, las manos del personal sanitario, determinadas prótesis y catéteres (19).

El incremento del número de infecciones por *C. parapsilosis* complex se ha atribuido a determinados factores de riesgo, incluyendo la capacidad del microorganismo de crecer en nutriciones parenterales y su afinidad por los dispositivos intravasculares y materiales protésicos (20).

Los pacientes inmunocomprometidos como los infectados por el VIH y pacientes que hayan sido sometidos a cirugía, particularmente gastrointestinal, tienen alto riesgo de infección por *C. parapsilosis* complex. Además, se incrementa el riesgo de infección en aquellos pacientes que requieren catéteres centrales o algún tipo de dispositivo intravascular durante un tiempo prolongado, como pacientes con cáncer (21).

Aunque la población con más riesgo de infección nosocomial por *C. parapsilosis* complex son los neonatos de muy bajo peso (22). La colonización de la piel o el tracto gastrointestinal es, frecuentemente el primer paso en la patogénesis de la infección por *Candida* spp, y los neonatos son especialmente propensos a la

infección debido a la integridad comprometida de la piel, la sensibilidad a la infección del tracto gastrointestinal, la necesidad de catéteres centrales durante periodos prolongados así como intubación endotraqueal prolongada. *C. parapsilosis* complex se ha aislado de, aproximadamente, un tercio de los neonatos que tenían el tracto gastrointestinal colonizado por *Candida* spp (23) y de la orofaringe del 23% de los neonatos sanos (24).

Las manos del personal sanitario son el mayor vector para la adquisición exógena de *C. parapsilosis* complex, aunque los porcentajes varían entre estudios (23, 25) *C. parapsilosis* complex es el microorganismo que se aísla con más frecuencia de las manos del personal sanitario.

Las técnicas moleculares han puesto de manifiesto la relación entre colonización por *C. parapsilosis* complex y la transmisión horizontal de esta, al demostrar que las cepas aisladas de personal sanitario sano y los aislamientos clínicos procedentes de brotes son idénticas genéticamente (26-28).

1.3.2 Aspectos clínicos

A. Candidemia

La candidemia se define como el aislamiento de una especie de *Candida* en sangre. En todo episodio de candidemia, aun cuando la previa retirada del catéter haya hecho que desaparezca la fiebre y los signos de infección, es fundamental el tratamiento antifúngico precoz, inicialmente por vía intravenosa (29).

C. parapsilosis complex está entre las especies de *Candida* que más frecuentemente producen enfermedad invasiva en el mundo (9). La fungemia por *C. parapsilosis* complex (30) se puede diseminar por los tejidos, produciendo infecciones profundas, con un rango de mortalidad del 4% al 45%. Según datos de trabajos que recogen los índices de mortalidad de candidemias, la producida por *C. parapsilosis* complex es 28,5% frente a 44,8% de *C. albicans* (31-33).

Un análisis de las candidemias producidas en Barcelona entre 2002 y 2003 revela que el 23% de las mismas fue producida por *C. parapsilosis* complex y el 51% de estas estaban relacionadas con el uso de catéteres (5). Clínicamente, la candidemia por *C. parapsilosis* complex se caracterizó por fiebre (100%), shock séptico (22%) y fallo renal (10%). En cuanto a enfermedades subyacentes más frecuentemente relacionadas con la infección de *C. parapsilosis* se encontró cáncer (27%), trasplante (16%) y diabetes mellitus (9%).

En comparación con *C. albicans*, las candidemias por *C. parapsilosis* complex se producen más frecuentemente entre neonatos (20% frente a 4%), pacientes con catéteres intravenosos que han recibido terapia antifúngica previa (26% frente a 7%), con nutrición parenteral (54% frente a 33%) o que han sido sometidos a trasplante (16% frente a 2%) (9).

La candidemia relacionada con catéter producida por *C. parapsilosis* complex presenta una tasa de aclaramiento espontáneo mayor, una menor proporción de infecciones profundas provocadas a raíz de la diseminación de la levadura por los tejidos, así como una menor tasa de mortalidad que las debidas a otras especies de *Candida* (34).

B. Endocarditis

La endocarditis fúngica supone entre el 1,3 y 6% de todas las endocarditis infecciosas, y esta incidencia ha aumentado en las dos últimas décadas debido a la mejora del diagnóstico gracias al uso de ecografía transesofágica, a mejores sistemas de cultivo, y al incremento de terapias médicas que predisponen al paciente a la infección fúngica (35). *Candida* spp supone el 94 % de las endocarditis fúngicas, muchas de las cuales se desarrollan después de la cirugía cardiaca (36) y *C. parapsilosis* complex supone la segunda causa más común después de *C. albicans* suponiendo el 17% de los casos identificados (35).

Actualmente, los factores predisponentes más comunes son las válvulas protésicas, el uso de drogas por vía parenteral, nutrición parenteral, cirugía abdominal, inmunosupresión, tratamiento con antibióticos de amplio espectro y enfermedad valvular previa (35).

La endocarditis por *C. parapsilosis* tiene un índice de mortalidad y una frecuencia de diseminación similar a la producida por las fungemias por *C. albicans*, oscilando el rango de mortalidad entre el 41,7 y el 65% (37).

C. Meningitis

Candida spp suele producir meningitis aguda neutrofílica, mientras que las meningitis crónicas linfocíticas y las meningitis granulomatosas se asocian normalmente con *Cryptococcus neoformans* y *Coccidioides* spp, respectivamente (38). *C. parapsilosis* complex es una causa infrecuente de meningitis fúngica, de varios trabajos que revisan las meningitis causadas por *Candidas* concluye que *C. albicans* supone el 90,1% mientras que *C. parapsilosis* complex sólo el 1,6% (39, 40).

Sin embargo, teniendo en cuenta el aumento en la incidencia de *C. parapsilosis* complex, es necesario vigilar el desarrollo de meningitis en neonatos, debido a la potencial morbilidad y mortalidad asociada con esta infección.

D. Peritonitis

La peritonitis por *Candida* se define como el aislamiento de *Candida spp* en una muestra peritoneal obtenida por medio de laparotomía o punción percutánea en pacientes con clínica asociada, como perforación de una víscera abdominal, dehiscencia de una sutura intestinal con peritonitis, pancreatitis aguda grave o existencia de un catéter para diálisis peritoneal (29).

La peritonitis fúngica tiene una alta morbilidad y una mortalidad por encima del 44% (41). En pacientes con enfermedad crónica sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria (C.A.P.D) se produce peritonitis fúngica entre el 3 y el 10% de los casos (42).

Wang y colaboradores (41) refieren que la presencia de dolor abdominal, el empleo de antibióticos en los 3 meses previos a la peritonitis fúngica, oclusión del intestino y un catéter mantenido *in situ* parecen estar asociados con el desarrollo de peritonitis fúngica y hace necesario la interrupción del CAPD.

Aunque *C. albicans* es la principal causa de peritonitis fúngica, muchos trabajos muestran que *C. parapsilosis* complex es la especie que se asocia con más frecuencia a pacientes que reciben CAPD (43).

E. Artritis

La artritis fúngica es rara, y la mayoría está asociada con *Candida spp*. La mayoría de los casos se produce por inoculación directa intraarticular, sobre todo en pacientes mayores (44). Los factores de riesgo implicados en estos casos esporádicos incluyen la diabetes mellitus, el uso de drogas por vía parenteral y la inmunosupresión (45).

F. Otras manifestaciones clínicas

C. parapsilosis complex se asocia con enfermedad invasiva ocular como endoftalmitis y queratitis. La endoftalmitis endógena fúngica es relativamente poco común incluso en el contexto de enfermedad sistémica. Las endoftalmitis y queratitis ocasionadas por *C. parapsilosis* complex se deben principalmente a infecciones postoperatorias (9).

La baja frecuencia actual de endoftalmitis por *Candida* spp se atribuye al diagnóstico temprano de candidemia y a tratamientos más agresivos y potencialmente menos tóxicos con agentes antifúngicos. En todo caso de candidemia debe practicarse un fondo de ojo para descartar una endoftalmitis asociada (29).

La otomicosis es una causa relativamente infrecuente de otitis media o externa. Determinados autores cuestionan la relevancia del aislamiento fúngico en una muestra ótica, planteándose si hay que considerarlo un signo de infección o como comensalismo (46). Sin embargo, existe correlación entre infección fúngica y la inflamación crónica del oído, así la inflamación como el eritema, edema y descamación epitelial se resuelven en todos los pacientes tratados con pautas de antifúngicos tópicos (47).

La onicomycosis es la infección de la uña y puede estar causada por dermatofitos, levaduras y hongos filamentosos. Las onicomycosis por *C. parapsilosis* complex están asociadas con enfermedad distal de la uña, al contrario que la producida por *C. albicans* que se manifiesta como onicomycosis proximal u onicomycosis total.

C. parapsilosis complex es una causa poco frecuente de vulvovaginitis. La candidiasis urinaria, se define como el aislamiento en orina de *Candida* spp en recuentos de colonias $>10^4$ ufc/ml. En este apartado se considera que es la orina el único lugar donde se aísla la levadura y no forma parte de una colonización múltiple (29).

1.4. Factores de virulencia de *Candida parapsilosis* complex.

La patogénesis de la candidiasis invasora está facilitada por los factores de virulencia como la morfogénesis, la secreción de enzimas, el cambio fenotípico y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas. Se ha investigado mucho en la identificación de estos factores en *C. albicans*, pero en el caso de *C. parapsilosis* complex se conoce relativamente poco. A continuación se describen, de manera independiente, cada uno de estos factores.

1.4.1 Secreción de enzimas

Recientemente, la secreción enzimas extracelulares por los patógenos fúngicos, ha ido ganando protagonismo, por su potencial papel en la patogénesis y

como posibles dianas para el diseño de inhibidores sintéticos para el tratamiento de la infección.

- **Secreción de aspartilproteinasas**

La secreción de aspartilproteinasas (Saps) facilita la colonización e invasión de los tejidos del hospedador por ruptura de las membranas y degradación de importantes proteínas inmunológicas, como la cadena pesada de la inmunoglobulina G y la α -2 macroglobulina (48).

En *C. albicans*, la secreción de aspartilproteinasas es un determinante de virulencia importante y se han identificado 10 tipos de Saps (Saps1 a Saps 10). En el caso de *C. parapsilosis* complex, ésta ha demostrado menos actividad de aspartilproteinasas, además de que sólo se han identificado 3 tipos de Saps (Sapp1p a Sapp3p), únicamente Sapp1p está bien caracterizada (49).

- **Fosfolipasas**

Las fosfolipasas son enzimas capaces de hidrolizar una o más de las uniones éster de los glicerofosfolípidos. La función de las fosfolipasas durante la infección aún no se conoce bien, aunque se cree que interviene en la destrucción de membranas (50,51).

La actividad de las fosfolipasas se ha implicado en la virulencia de *C. albicans* en varios sistemas experimentales. Las fosfolipasas se han asociado a virulencia en modelos murinos de infección, adhesión a células epiteliales, penetración en células del hospedador e invasión de epitelio oral humano reconstituido (52).

El papel de las fosfolipasas en *C. parapsilosis* complex es menos claro. Hay hallazgos contradictorios, algunas investigaciones informan 51% de actividad de fosfolipasas en *C. parapsilosis* complex y otras no encuentran esta actividad. Se han encontrado diferencias en la cantidad de fosfolipasa al comparar cepas de distintas localizaciones, encontrándose mayor cantidad en aislamientos procedentes de localizaciones superficiales que de los productores de candidemia (50,51).

- **Lipasas**

Las lipasas catalizan la hidrólisis y la síntesis de triglicéridos y se caracterizan por su estabilidad a altas temperaturas y frente a disolventes orgánicos, alta enantioselectividad y resistencia a la proteólisis (53).

Los papeles que se le atribuyen a las lipasas extracelulares incluyen la digestión de lípidos para la adquisición de nutrientes, adhesión a células y tejidos del

hospedador, interacciones sinérgicas con otras enzimas, iniciación de procesos inflamatorios por afectación de células inmunes, etc (52).

Las lipasas extracelulares han sido propuestas como factores de virulencia de otros patógenos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes*, y *P. aeruginosa* así como hongos patógenos como *Malassezia furfur*, *Hortea werneckii* y *C. albicans*.

Frente a los 10 genes que codifican lipasas en *C. albicans*, sólo se han identificado 2 genes, en el caso de *C. parapsilosis* complex, CpLIP1- CpLIP2 y sólo uno de ellos CpLIP2, codifica para una proteína activa (54).

Se ha estudiado recientemente el papel de la lipasa en la infección por *C. parapsilosis* complex y se ha demostrado que la inhibición de esta enzima reduce el daño tisular durante la infección (55). Además, Gacser y colaboradores (56) observaron que, a partir de mutantes homocigotos de cepas de *C. parapsilosis* complex, CpLIP1- CpLIP2 dan lugar a biopelículas más finas y menos complejas, y se reduce el crecimiento en medios ricos en lípidos, son más fácilmente fagocitadas y menos virulentas que las cepas salvajes.

Estos hallazgos son particularmente importantes ya que, como hemos subrayado anteriormente, las infecciones por *C. parapsilosis* complex suelen ocurrir en neonatos de bajo peso que reciben nutrición parenteral rica en lípidos.

1.4.2 Adherencia:

La colonización e infección por *C. parapsilosis* complex depende de la habilidad del hongo para adherirse a las células del hospedador y en especial a sus mucosas. La adherencia a dispositivos intravasculares facilita la formación de biopelículas y promueve el daño al hospedador. La hidrofobicidad de la superficie celular ha sido relacionada con la adhesión inicial de *C. parapsilosis* complex y la producción de matriz, se ha relacionado con la tendencia de esta para adherirse a los catéteres (57).

1.4.3 Formación de biopelículas:

El factor de virulencia más importante de *Candida* es la habilidad para adaptarse a diversos hábitats y la formación de comunidades microbianas adheridas a la superficie, conocidas como biopelículas (58, 59).

Las biopelículas de *Candida* se pueden desarrollar tanto en superficies naturales del hospedador como en biomateriales utilizados en dispositivos médicos como implantes dentales, catéteres, válvulas cardíacas, lentes oculares, prótesis articulares, reservorios etc (60-62).

Las biopelículas son comunidades celulares, de una o varias especies de microorganismos, embebidas en una matriz polisacárida altamente hidratada, adheridas sobre superficies biológicas o inertes y comunicadas con el exterior mediante canales de agua. Estas estructuras biológicas son organizaciones muy heterogéneas con diferentes ambientes de pH, concentración de iones, oxígeno, carbono y nitrógeno (63).

Las células que forman parte de estas biopelículas tienen un comportamiento distinto a las células en suspensión o formas planctónicas, lo que tiene importantes repercusiones clínicas, ya que las biopelículas muestran una resistencia elevada tanto a las defensas del hospedador como frente a los agentes antimicrobianos, además de que son capaces de soportar la presión competitiva ejercida por otros microorganismos (64).

Muchas candidiasis se encuentran asociadas a la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales o cardíacas y otros dispositivos biomédicos, convirtiéndose en un foco de diseminación de la infección.

Las células de las biopelículas, denominadas células sésiles, se diferencian de sus homólogas planctónicas, es decir, de las células en suspensión por las siguientes características:

1. **Presencia de una matriz extracelular:** formada por polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, altamente hidratada y que confiere un aspecto gelatinoso a la biopelícula. Sin embargo, hay un alto porcentaje de componentes de las biopelículas, que siguen sin identificar (64). La matriz es el soporte de la biopelícula y su espesor aumenta con la edad de esta (65). Su composición puede variar según los microorganismos que la formen tanto en el tipo de moléculas como en la proporción de proteínas y carbohidratos, así en *C. albicans* el principal azúcar de la matriz es la glucosa, en *C. tropicalis* la hexosamina (66) y en el caso de biopelículas de *C. parapsilosis* complex están compuestas mayoritariamente por carbohidratos siendo la proporción de proteínas relativamente baja a diferencia de *C. glabrata* que forma biopelículas con altas proporciones tanto de carbohidratos como de proteínas (64). Las diferencias en la composición de la matriz puede ser la causa de la diferencia en el grado de penetración de los antifúngicos en las biopelículas (67).
2. **Expresión de genes específicos:** Las células que forman parte de la biopelícula se asocian a patrones específicos de expresión de genes, incluyendo genes de sobreexpresión de aminoácidos, particularmente los que

contienen azufre (68). Así, la formación de biopelículas requiere la activación de la vía de la filamentación, ya que las mutantes defectivas de los genes de filamentación como *efg1* y *cph1*, son incapaces de formar biopelículas (69).

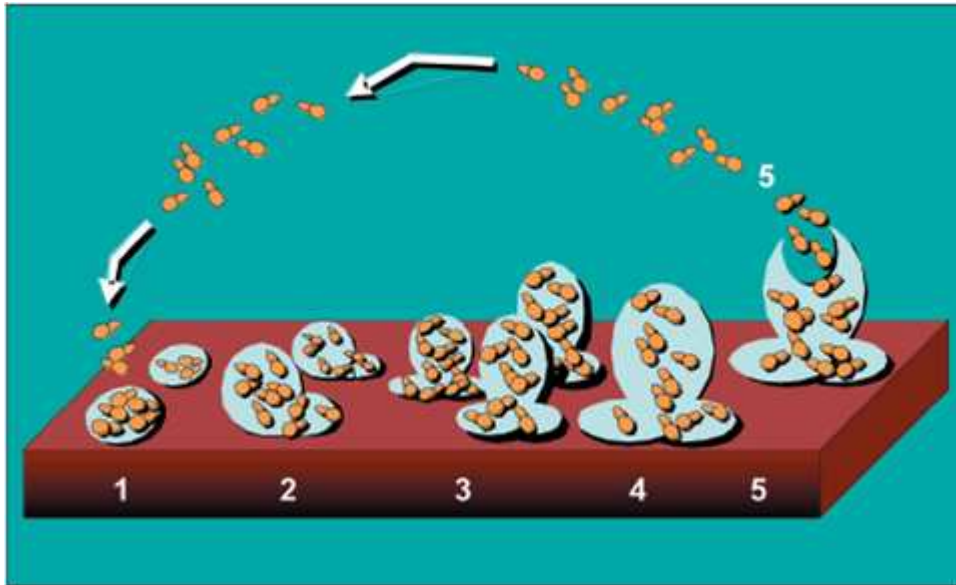
3. **Comunicación intercelular (quorum-sensing):** En el interior de la biopelícula, las células se comunican mediante la síntesis de sustancias que difunden entre ellas (70). El farnesol es un compuesto, estudiado ampliamente en *C. albicans*, que inhibe la formación de biopelícula así como la filamentación (71). En el caso de *C. parapsilosis* complex, el farnesol tiene un efecto similar, inhibe la formación de biopelícula si se añade a la placa de microtitulación antes de inocular la levadura, pero no inhibe la formación si ya se ha producido la adherencia del hongo (12).
4. **Mayor resistencia a las defensas de hospedador y a los antifúngicos:** Los microorganismos se encuentran protegidos por los polímeros de la matriz y eluden la acción del sistema inmune (72). La resistencia de las biopelículas del género *Candida* a los antifúngicos es un fenómeno multifactorial en el que pueden intervenir, la propia matriz extracelular que actúa como barrera limitando el paso de antifúngicos, la baja tasa de crecimiento de las células que forman parte de la biopelícula debido a la escasez de nutrientes y oxígeno, la expresión de genes que confieren resistencia o la presencia de células persistentes capaces de escapar a su acción y formar de nuevo una biopelícula (65, 73).

En el proceso de formación de una biopelícula (**fig. 2**) se distinguen varias fases:

- Fase inicial: Las células levaduriformes se adhieren sobre la superficie y comienzan a formar microcolonias.
- Fase intermedia: Se comienza a formar la matriz.
- Fase de maduración: la matriz recubre totalmente a las levaduras.

Las células que forman parte de la biopelículas pueden disgregarse y dispersarse por el medio, volviendo al estado planctónico, así la biopelícula se convierte en un foco persistente de infección (73).

Fig 2: Etapas de desarrollo de una biopelícula: adhesión (1), maduración (2 y 3), disgregación (4) y dispersión (5).



1.4.4 Morfogénesis

Candida albicans es polimórfica, ya que existe en forma de levadura (blastosporas) o como filamentos (pseudohifa o hifa). Las células de *C. parapsilosis* complex pueden presentar formas ovaladas, redondas y cilíndricas. A diferencia de *C. albicans* o *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* complex (12) no forma verdaderas hifas y se presenta en cualquiera de las dos formas, pseudohifas y formas de levaduras.

La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa. La conversión de la forma unicelular de levadura al crecimiento filamentoso es esencial para la virulencia de *C. albicans*. La morfogénesis por sí misma, está bajo múltiples controles y rutas de transducción de señales (74).

La generación de biopelículas en *C. albicans* esta asociada con el cambio dimórfico de la levadura a hifa, y la estructura de la biopelícula engloba a 2 tipos de capas diferentes: una fina, la capa de levaduras basal, y una más gruesa pero menos densa, que esta compuesta por hifas (75).

En contraste, *C. parapsilosis* complex produce cuantitativamente menos biopelículas y menos complejas estructuralmente que *C. albicans* (76). A pesar de que

la estructura es menos compleja, las biopelículas de *C. parapsilosis* complex son tan resistentes a los antifúngicos como las formadas por *C. albicans*.

C. parapsilosis complex forma biopelículas compuestas por una densa red de varias morfologías, es decir en forma de levadura y de pseudohifa. La formación de biopelículas en *C. parapsilosis* complex es cepa dependiente (64).

En cuanto a la morfología de las colonias de *C. parapsilosis* complex, Sean y colaboradores (12) describen 4 morfotipos denominados como *crepe*, *crater*, *concentric* y *smooth*. El fenotipo de la colonia va ligado a la morfogenia de la levadura, así mientras que los fenotipos *crepe* y *concentric* están compuestos principalmente por pseudohifas, mientras que los fenotipos *crater* y *smooth* lo están por células levaduriformes.

El cambio en la morfología de las colonias en *C. parapsilosis* complex fue descrito por primera vez por Lott y colaboradores (77) y extendido por el grupo de Enger y colaboradores (78). En el estudio de Sean describen que el fenotipo *concentric*, aislado frecuentemente en muestras clínicas, forma cuantitativamente más biopelícula y el biotipo *smooth* el que menos.

Los fenotipos filamentosos (pseudohifas) producen más biopelículas y son más invasivos en el agar que las cepas que permanecen predominantemente en forma de levadura.

Aun existiendo diferencias en la morfología de las colonias y las formas morfogenéticas de la levadura, Tavanti y colaboradores (11) demuestran que *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* son fenotípicamente indistinguibles. Los perfiles de asimilación de sustratos evaluados con API 32 C son prácticamente iguales. En CHROMagar Candida, las colonias de todos los grupos tienen el mismo aspecto, colonias malva-blancas y todos los aislamientos crecen bien tanto a 37° C como a 30° C pero no crecen a 42°C (78).

1.5. Sensibilidad a los antifúngicos.

El término antibiótico antifúngico o antimicótico incluye aquellas sustancias que puedan producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo o alterando su viabilidad y produciendo mínimas alteraciones posibles en las células del hospedador (79).

La similitud de las dianas de algunos antifúngicos con estructuras o rutas metabólicas de las células humanas determina el escaso número de estos fármacos

en comparación con los antibióticos antibacterianos existentes, así como la posibilidad de aparición de efectos secundarios y/o tóxicos (80,81). La membrana celular de los hongos está situada en la parte interna de la pared y tiene una estructura parecida a la membrana de las células animales, de la que se diferencia por la presencia de ergosterol en lugar de colesterol.

Los antifúngicos se clasifican basándose en su estructura química, su origen (natural o de síntesis química), su espectro y su mecanismo de acción (82).

El estudio de la sensibilidad antifúngica *in vitro* juega un papel creciente en la selección de los agentes antifúngicos, como ayuda en estudios de desarrollo de nuevos fármacos y como vigilancia de las resistencias a los antifúngicos en estudios epidemiológicos (83).

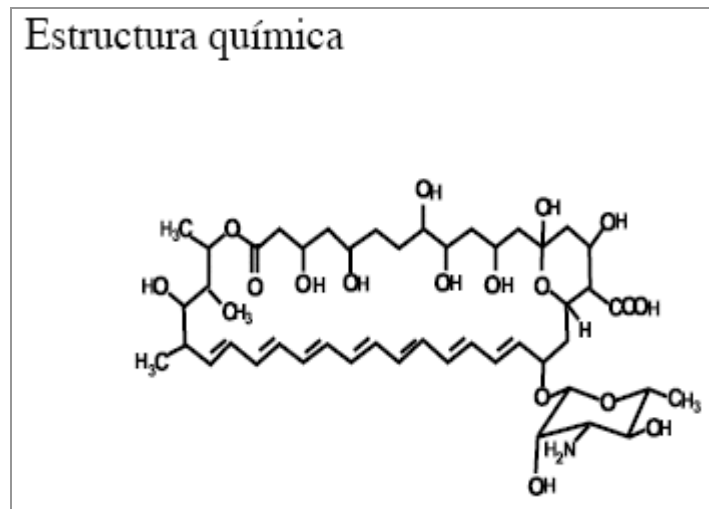
En la guía IDSA (84) (Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas) para el manejo de la candidiasis después de una revisión de la literatura, establecen que los antifúngicos sistémicos que ha demostrado eficacia en el tratamiento de la candidiasis comprenden cuatro familias de antifúngicos:

- Los polienos: anfotericina B.
- Los triazoles: fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol.
- Las equinocandinas: caspofungina, anidulafungina y micafungina.
- Flucitosina.

1.5.1 Polienos

Los polienos son sustancias antibióticas sintetizadas por actinomicetos del género *Streptomyces*, y fueron los primeros antifúngicos que se desarrollaron. Se conocen más de cien compuestos distintos, de los cuales el más importante es la anfotericina B (**fig. 3**). La anfotericina B se obtuvo a partir de *Streptomyces nodosus* y fue comercializada en 1958. A pesar de ser el compuesto de referencia para el tratamiento de las micosis sistémicas, su nefrotoxicidad limita su dosificación y administración (85).

Fig. 3: Estructura química de anfotericina B.



La actividad antifúngica de los polienos se basa en la capacidad para unirse al ergosterol, provocando la formación de pequeños canales que permiten la salida de moléculas del interior de la célula fúngica y la entrada de otras sustancias. Su acción requiere sólo algunos minutos para alterar el equilibrio osmótico de la célula fúngica y provocarle la muerte.

Actualmente, aunque la formulación tradicional ha sido la más utilizada, existen otras formulaciones que permiten administrar dosis más elevadas de anfotericina B y presentan menos problemas de toxicidad, estas son anfotericina B liposómica, el complejo lipídico de la anfotericina B y la anfotericina B en dispersión coloidal.

Las resistencias a anfotericina B existen tanto *in vivo* como *in vitro* y es posible correlacionarlas, sin embargo se ha comprobado que es difícil definir un punto de corte concreto (86-88).

Los datos de CMI obtenidos, según la metodología del documento M27-A3 (89) del CLSI, se agrupan en su mayoría entre 0,25 y 1 mg/L. Cuando se detectan aislamientos de *Candida* resistentes a anfotericina B en modelos animales, según el documento M27-A3 pueden tener una CMI mayor a 1 mg/L.

Desafortunadamente, esta metodología no permite la detección de todos los aislamientos resistentes *in vivo*, debido al estrecho margen de CMIs obtenidas, por esta razón el CLSI aún no ha establecido unos puntos corte.

Los aislamientos de *Candida* con una CMI mayor a 1 mg/L son infrecuentes y posiblemente “resistentes” o al menos pueden requerir de altas dosis para un tratamiento óptimo (84, 90).

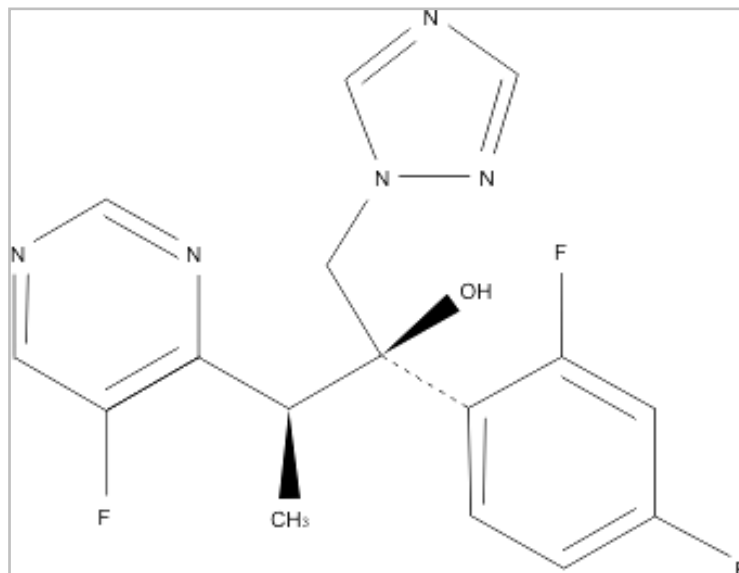
1.5.2 Azoles

Los azoles son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico (**fig.4**) que contiene 2 o 3 nitrógenos. En función de esta última característica los azoles se dividen en imidazoles y triazoles.

Actualmente, el uso de los imidazoles se limita al tratamiento de las micosis superficiales, siendo los más utilizados ketoconazol, clotrimazol, miconazol y sertaconazol. Los triazoles son moléculas con un amplio espectro de acción, siendo de menor toxicidad y más estables metabólicamente que los imidazoles y están indicados en micosis tanto superficiales como sistémicas. Representantes principales son el fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol y albaconazol.

Los azoles son antifúngicos que actúan inhibiendo la actividad citocromo P-450 del hongo, también denominado lanosterol 14- α -desmetilasa. Este sistema enzimático está presente en un gran número de seres vivos y su función es la síntesis de ergosterol (hongos) o colesterol (mamíferos) (91).

Fig.4: Estructura química de voriconazol.



Este enzima cataliza la desmetilación de lanosterol a ergosterol, compuesto esencial de la membrana celular de los hongos que regula su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las enzimas unidas a ella.

Además en las levaduras, el ergosterol es el componente principal de las vesículas que participan en las reacciones de fosforilación oxidativa necesarias para la producción de energía (91).

Los triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol, y posaconazol) son seguros y eficaces para el tratamiento de la candidiasis invasora (84,92). Los triazoles de espectro extendido (itraconazol, voriconazol, y posaconazol) son más potentes que el fluconazol frente a la mayoría de las especies de *Candida*. El empleo generalizado de estos agentes, especialmente fluconazol, ha dado lugar a preocupaciones en cuanto a la emergencia de resistencia a este grupo de antifúngicos.

Fluconazol es la alternativa a anfotericina B más administrada. Desde su introducción a principios de los 90, el fluconazol ha sido sometido a estudios de vigilancia (6, 7, 92-94). La universidad de Iowa estudió la sensibilidad a fluconazol mediante microdilución en caldo, entre 1992 y 2004, de 13.338 aislamientos de *Candida* procedentes de hemocultivos, pertenecientes a 12 especies de más de 200 hospitales de todo el mundo. La resistencia a fluconazol (> 64 mg/L) supuso el 3% de todas las especies, con excepción de *C. glabrata* (9%) y *C. krusei* (40%) (7).

La resistencia a fluconazol de *C. parapsilosis* complex observada en el programa ARTEMIS (1997-2003) osciló entre 2-4,2% (6).

En el caso de voriconazol, este muestra valores de CMI, frente a *C. parapsilosis* complex, menores a las correspondientes a anfotericina B y a los azoles anteriores a voriconazol (95). La resistencia *in vitro* a voriconazol es rara, los últimos estudios de vigilancia muestran sensibilidades cercanas al 100% (93). Más recientemente, el análisis de 9.371 aislamientos de *C. parapsilosis* complex ha mostrado que sólo el 1,9% fueron resistentes a voriconazol y que el 36,7% de los aislamientos resistentes a fluconazol fueron sensibles a voriconazol (96). Por tanto esto demuestra que entre los azoles se da resistencia cruzada.

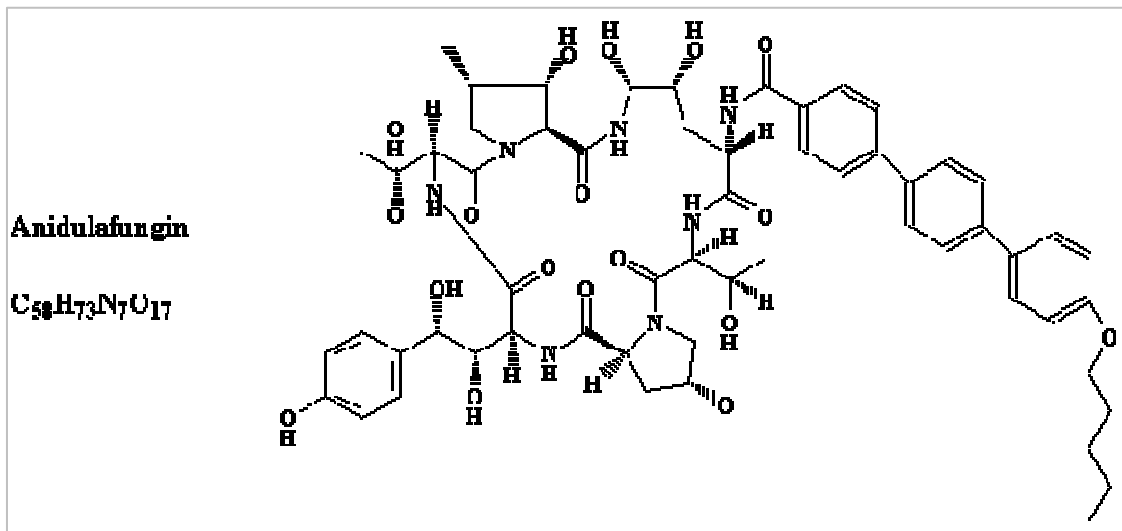
1.5.3 Equinocandinas

Las equinocandinas son polipéptidos cíclicos (**fig.5**) que bloquean la síntesis de glucano, que es el polímero que constituye el principal componente de la pared fúngica manteniendo la morfología de la célula y protegiéndola de los cambios osmóticos ambientales.

El mecanismo de acción de todas las equinocandinas es común y se basa en la producción de daños en la pared fúngica al unirse a la β -1,3-D-glucano sintetasa responsable de la síntesis del β -1,3-D- glucano. Este enzima no se encuentra en las

células animales y por este motivo constituye una buena diana (97). Esta acción resulta fungicida para *Candida* y fungiestática para *Aspergillus*. El tratamiento con equinocandinas produce el hinchamiento y la lisis celular en las zonas de crecimiento de la pared.

Fig.5: Estructura química de anidulafungina



Las CMI de las equinocandinas son bajas para un amplio número de especies de *Candida*, incluyendo *C. glabrata* y *C. krusei*. En el caso de *C. parapsilosis* complex se ha observado menor sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas que el resto de las especies de *Candida* (84).

Debido a su mecanismo de acción, cuya diana es diferente a la del resto de antifúngicos comercializados, no existe resistencia cruzada con azoles ni polienos.

La anidulafungina es una nueva equinocandina con una potente actividad frente a *Candida* spp y *Aspergillus* spp.

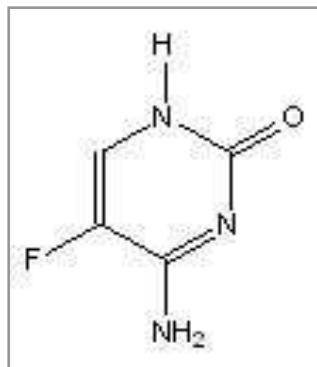
Los estudios de vigilancia multicéntricos conducidos por Pfaller y colaboradores (1, 6, 7) y Ostrosky-Zeichner y colaboradores (98) muestran la excelente potencia y espectro de las tres equinocandinas frente a más de 4.000 aislamientos procedentes de sangre, sin embargo especies como *C. parapsilosis* complex y *C. guilliermondi* muestran CMI elevadas (1-4 mg/L) (99). Los datos clínicos disponibles indican que todas las especies responden de forma similar a todas las equinocandinas, sin embargo debemos resaltar que se han observado candidemias persistentes por *C. parapsilosis* complex tratada con caspofungina (100).

1.5.4 Flucitosina

Fluorocitosina o 5-fluorocitosina (**fig.6**) es el único antifúngico disponible perteneciente a la clase de las pirimidinas.

La fluorocitosina es un fármaco fungistático que penetra en el interior de la célula fúngica tras contactar con una enzima de la membrana llamada citosina permeasa.

Fig 6: Estructura química de la fluorocitosina.



Ya en el interior de la célula, la fluorocitosina es desaminada a 5-fluorouracilo, tras lo que se producen varias fosforilaciones que acaban por generar ácido fluorardílico, que se incorpora a la cadena de ARN, lo que ocasiona la producción de ARN aberrante.

Su espectro de acción se reduce a las levaduras, ya que es inactiva frente a los hongos filamentosos. Existen algunas cepas de *Candida* spp y de *Cryptococcus* spp que muestran resistencia primaria. Asimismo, cuando se utiliza en monoterapia, genera resistencia secundaria con facilidad (101), por esta razón se suele administrar conjuntamente con anfotericina B en candidiasis invasoras como endocarditis o meningitis. Ocasionalmente se utiliza para candidiasis del tracto urinario (84). En la actualidad, la 5-FC tiene unas indicaciones clínicas reducidas condicionadas por su espectro limitado, por su toxicidad (exantema, náuseas, alteraciones hematológicas, alteraciones hepáticas) y por la inducción rápida de resistencia secundaria cuando se utiliza en solitario. Por ello, las indicaciones aceptadas para la utilización en combinación con anfotericina B son en el tratamiento de la meningitis criptocócica y en determinadas infecciones graves causadas por *Candida* spp.

En la literatura precedente se establecía que entre el 10 y 15% de los aislamientos de *Candida albicans* presentaban resistencia primaria a flucitosina y esto era incluso mayor en otras especies (102, 103). Sin embargo, estudios más recientes basados en los métodos del CLSI rebaten esta aseveración (101, 104-106). Estudios de Canadá (105) y España (101) han estimado una resistencia a la flucitosina del 0-0,6% en *Candida albicans* y del 0,6-6% para el conjunto de las candidas. En un estudio de Pfaller y colaboradores (106) con 8.803 aislamientos de *Candida* spp recogidos de más de 200 hospitales del mundo encuentran un nivel de resistencia primaria de 1 al 7 % entre todas las candidas, con la excepción de *Candida krusei* que presenta un 28% de resistencia primaria a la flucitosina.

Justificación y objetivos

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del
H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de las infecciones invasoras por *Candida* spp, además de cambios temporales en las especies aisladas. También se ha registrado un aumento en la incidencia de enfermedad invasora por *C. parapsilosis* complex, ya que hay estudios que muestran que es la segunda especie de *Candida* más aislada en hemocultivos. Además la incidencia de Candidiasis invasora por *C. parapsilosis* complex varía geográficamente y en función de las características y enfermedades de base del paciente.

El **primero de los objetivos generales** de este trabajo es analizar los datos procedentes de las candidemias producidas en el Hospital Universitario Virgen del Rocío en el período 2003-2009.

Con respecto a las especies integrantes del complejo "*psilosis*", *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, hasta el momento en la literatura hay muy pocos datos acerca de su distribución así como de su sensibilidad a los agentes antifúngicos, dicho esto, nuestro **segundo objetivo** es conocer la distribución, mediante técnicas de biología molecular, de las distintas especies dentro del complejo en una colección de aislamientos de *C. parapsilosis* complex procedentes de diferentes localizaciones.

La formación de biopelículas es el factor de virulencia más importante en *C. parapsilosis* complex, ya que estas confieren una elevada resistencia a las defensas del hospedador y a los agentes antifúngicos, por ello el **tercer objetivo** de este trabajo es la determinación mediante un ensayo *in vitro* de la capacidad de formación de biopelículas de los diferentes aislamientos de *C. parapsilosis* complex.

Por último y como consecuencia de lo anteriormente expuesto, el **cuarto objetivo** es estudiar la sensibilidad a los antifúngicos de estas levaduras tanto en forma planctónica como sésil.

Los **objetivos concretos** de este trabajo son:

1. Análisis de las candidemias identificadas en HU virgen del Rocío en el período 2003-2009.
 - Recoger y analizar los datos correspondientes a las candidemias registradas, teniendo en cuenta la especie de *Candida* productora así como el porcentaje atribuido a cada especie.
 - Análisis de los datos correspondientes a candidemias producidas por *C. parapsilosis* complex en relación al tipo de paciente.
2. Identificación de levaduras en el laboratorio.
 - Identificación fenotípica de *C. parapsilosis* complex.
 - Identificación genotípica.
 - ✓ Puesta a punto de RAPD-PCR (Amplificación al azar de ADN polimórfico): Selección de cebadores.
 - ✓ Identificación a nivel de especie dentro del complejo “*psilosis*” mediante dos técnicas de biología molecular, RAPD- PCR y RFLP, y comparación de resultados entre estas.
3. Determinación de la capacidad de formación de biopelículas.
 - Análisis de la relación entre especie y capacidad de formación de biopelículas.
 - Análisis de la relación entre procedencia de aislamiento y capacidad de formación de biopelículas.
4. Estudiar la sensibilidad a los siguientes agentes antifúngicos, anfotericina B, anidulafungina y voriconazol.
 - Sobre las formas planctónicas de las tres especies.
 - Sobre las formas séviles (biopelículas) de las tres especies.

Material

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

3. MATERIAL

3.1 Microorganismos

3.1.1. Cepas seleccionadas

Se seleccionaron cepas de *Candida parapsilosis* complex procedentes de distintas muestras clínicas, procesadas desde enero de 2003 hasta diciembre de 2009, en el laboratorio de Microbiología y Parasitología Clínicas del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Distribuimos las cepas en 2 tablas, en la **tabla 1** recogemos las procedentes de hemocultivos y catéteres. En la **tabla 2** recogemos los procedentes de otras localizaciones, que pertenecen cada una a un paciente distinto.

En la primera parte de la **tabla 1**, las cepas están identificadas desde la **A-M**, así las cepas identificadas con la misma letra pertenecen al mismo paciente y son las que utilizaremos para elegir el cebador adecuado y poner a punto la técnica de RAPD-PCR.

Tabla 1. Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de hemocultivos y catéteres.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
1	A	Hemocultivo	H. Infantil. Infecciosos
2	B	Hemocultivo	H. infantil. Preescolares
3	A	Hemocultivo	H. Infantil. Infecciosos
4	B	Hemocultivo	H. infantil. Preescolares
5	B	Hemocultivo	H. infantil. Preescolares
6	C	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
7	D	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
8	E	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
9	E	Hemocultivo	H. Infantil. Neonatal
10	F	Hemocultivo	H. Infantil. Neonatal
11	G	Hemocultivo	H. Infantil. Neonatal
12	G	Hemocultivo	H. Infantil. Infecciosos
13	A	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
14	E	Hemocultivo	H. Infantil. Neonatal
15	N	Hemocultivo	H. Infantil. Infecciosos
16	A	Hemocultivo	H. Infantil. Infecciosos
17	H	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
18	I	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
19	H	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
20	J	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica

Tabla 1 (Continuación): Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de hemocultivos y catéteres.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
21	K	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
22	L	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
23	L	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
24	M	Hemocultivo	H. Infantil. UCI pediátrica
25	26	Hemocultivo	H. General. UCI Medicina Interna
26	27	Hemocultivo	H. General. Observación
27	28	Hemocultivo	H. General. 2º Sur
28	29	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
29	31	Hemocultivo	H. General. 4º Sur
30	32	Hemocultivo	H. General. 2º Sur
31	34	Hemocultivo	H. Infantil. Neonatal.
32	35	Hemocultivo	H. Infantil Neonatal
33	38	Hemocultivo	Anatomía patológica
34	39	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
35	42	Hemocultivo	H. Traumatología
36	43	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
37	44	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
38	45	Hemocultivo	Anatomía patológica
39	46	Hemocultivo	H. Traumatología
40	47	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal

Tabla 1 (Continuación): Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de hemocultivos y catéteres.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
41	48	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
42	49	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
43	50	Hemocultivo	H. Infantil. neonatal
44	51	Hemocultivo	H. General. 3º Norte
45	52	Hemocultivo	H. General. UCI Medicina Interna
46	53	Hemocultivo	H. Infantil. neonatal
47	54	Hemocultivo	H. Infantil. neonatal
48	55	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
49	56	Hemocultivo	H. Infantil
50	58	Hemocultivo	H. General. UCI Medicina Interna
51	59	Hemocultivo	H. Infantil. neonatal
52	60	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
53	62	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
54	63	Hemocultivo	H. Infantil. Infecciosos
55	65	Hemocultivo	H. General. UCI
56	66	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
57	67	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
58	68	Hemocultivo	H. Traumatología UCI

Tabla 1 (Continuación): Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de hemocultivos y catéteres.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
59	69	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
60	70	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
61	71	Hemocultivo	H. General. 2º Norte
62	72	Hemocultivo	H. General. 7º
63	73	Hemocultivo	H. Infantil. preescolares
64	74	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
65	75	Hemocultivo	H. General. UCI
66	76	Hemocultivo	H. Infantil. nefrología
67	78	Hemocultivo	H. General. 3º Sur
68	79	Hemocultivo	H. General. Infecciosos
69	80	Hemocultivo	H. Infantil. Oncohematología
70	81	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
71	83	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
72	84	Hemocultivo	H. General. UCI
73	87	Hemocultivo	H. General. Infecciosos
74	51T	Hemocultivo	H. Infantil. UCI neonatal
75	52T	Catéter	H. Infantil. UCI neonatal
76	55T	Catéter	H. General. 2º Norte
77	71T	Catéter	H. General. 3º Sur

Tabla 2: Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de otras localizaciones.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
77	1T	Ex. vaginal	C.S Fleming
74	2T	Escamas	C. S Virgen de los Reyes
75	3T	Ex. ótico	C. S Camas
76	4T	Ex. vaginal	C.S El Juncal
77	5T	Ex. vaginal	C. S Mallen
78	6T	Orina	H. General. 2º Norte
79	7T	Ex. ótico	C.S Fleming
80	8T	Ex. vaginal	C.S Ramón y Cajal
81	9T	Ex. ótico	C.S El Puntal
82	10T	Ex. ótico	C. S Camas
83	11T	Ex. ótico	H. San Juan de Dios
84	12T	Ex. ótico	Centro de Diagnóstico y Tratamiento
85	13T	Ex. ótico	H.G UCI trasplante
86	14T	Ex. ótico	Centro de Diagnóstico y Tratamiento
87	15T	Escamas	C.S Ramón y Cajal
88	16T	Escamas	C. S Virgen de los Reyes
89	17T	Ex. ótico	C. S Polígono sur
90	18T	Escamas	C. S Polígono sur
91	19T	Ex. uretral	C. S Virgen de los Reyes
100	20T	Ex. ótico	Centro de Diagnóstico y Tratamiento

Tabla 2 (continuación): Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de otras localizaciones.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
101	21T	Úlcera	C.S Ramón y Cajal
102	22T	Muestra ambiental	Medicina Preventiva
103	23T	Absceso cervical	Centro de Diagnóstico y Tratamiento
104	24T	Escamas	Centro de Diagnóstico y Tratamiento
105	25T	Escamas	C.S Utrera norte
106	26T	Espuito	C.S La Plata
107	27T	Ex. ótico	C.S La Candelaria
108	28T	Ex. herida	H. General. Infecciosos
109	30T	Ex. herida	C.S Fleming
110	32T	Escamas	C.S Mallen
111	33T	Absceso cervical	Centro de Diagnóstico y Tratamiento
112	34T	Escamas	C.S Cerro del Águila
113	36T	Escamas	H. Maternal
114	37T	Escamas	C.S El Cachorro
115	38T	Orina	H. Infantil oncohematología
116	44T	Escamas	C.S Utrera norte
117	45T	Ex. ótico	H. Maternal
118	53T	Ex. conjuntival	H. Maternal
119	54T	Ex. ótico	C.S Amate

Tabla 2 (continuación): Cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas de otras localizaciones.

Nº	Identificación	Muestra	Servicio
120	56T	Escamas	H. Maternal
121	57T	Escamas	C.S Torreblanca
122	58T	Ex. ótico	C.S Virgen de los Reyes
123	59T	Escamas	H. Maternal
124	60T	Ex. Endocervical	C.S Torreblanca
125	61T	Espuito	C.S Virgen de los Reyes
126	62T	Ex. ótico	C.S Polígono Sur
127	64T	Escamas	C.S Cerro del Águila
128	65T	Escamas	C.S La Candelaria
129	67T	Escamas	C.S Torreblanca
130	68T	Escamas	C.S Torreblanca
131	69T	Ex. ótico	C.S Utrera norte
132	70T	Ex. ótico	H. Maternal
133	72T	Ex. ótico	C.S La Plata
134	73T	Ex. ótico	H. Maternal
135	77	Líqu. sinovial	H. General. 3º Sur
136	79	Absceso renal	H. General. 1º Norte
137	80	Derivación LCR	H. Infantil oncohenatología

3.1.2. Cepas patrón

Como cepas control se utilizaron *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. metapsilosis* 96144 *C. albicans* ATCC 99055 y *C. krusei* ATCC 6258.

3.2. Productos químicos y biológicos.

- Acetona (Sigma Aldrich 32.377-2).
- Ácido bórico (Pharmacia Biotech 17-1322-01).
- Ácido clorhídrico concentrado (Panreac 181345).
- Ácido morfolino sulfónico (MOPS) (Sigma Aldrich M-3183).
- Agarosa (Bethesda Research 5510UB).
- Agua destilada estéril.
- Albúmina Bovina Sérica (Sigma A 2153).
- Api 20 C (BioMérieux® SA, ref 32.600).
- ARNasa (Promega 0890).
- Azul de bromofenol (Amershan Pharmacia Biotech 17-1329-01).
- Bromuro de Etidio (Roche Molecular Biochemicals 200 271).
- Chromogenic Candida Agar (Oxoid).
- Cloruro de magnesio $MgCl_2$ (Sigma M-8266).
- Cloruro Sódico (Panreac 131.659).
- Dimetilsulfoxido 99% (DMSO) (Sigma Aldrich 154938).
- dNTP Desoxinucleótidos trifosfato (10mM) (Amershan Pharmacia Biotech US77118).
- EDTA Na_2 o ácido etilendiaminotetracético disódico (Sigma E-5134).
- Enzima de restricción Smal (Roche Diagnostics 10 656 348001).
- Etanol absoluto 98% (Disco E-7148).
- Hidróxido sódico (Panreac 131687).
- Isopropanol (Difco 1-9516).
- Lactato Ringer.
- Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma L5750).
- Lisozima clorhídrica (Roche Molecular Biochemicals 1 585 657).
- MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit. (Cat. No. MPY80200).
- Menadiona (Sigma Aldrich M5625).

- N-lauroylsarcosina (Feinbiochemica-Heidelberg Serva 27570).
- Patrón de peso molecular BPL-100 (Arnershan Pharmacia Biotech 27- 4001-01).
- Placas de agar sangre (bioMerieux).
- Placas de agar sabouraud dextrosa (Oxoid).
- Proteinasa-K (Sigma P6556).
- RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato (Rosewell Park Memorial Institute)
- Safranina (Francisco Soria Melguizo S.A. 99 85 50).
- Solución salina 0,85% estéril.
- Suspension medium 2ml (API® 70700).
- Tampón de restricción (Roche diagnostics 10 656 348001).
- Taq ADN polimerasa (Este enzima viene con el tampón de pH adecuado para su óptima actividad, comprobar que el Mg 2+ venga incorporado en la solución tampón).
- Tris-Clorhídrico (Roche Molecular Biochemicals 812846).
- Trizma base o Tris-base (Sigma T-8404).
- Violeta Cristal (Francisco Soria Melguizo S.A. 99 87 42).
- XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (Sigma-AldrichX4626).

3.3. Agentes antimicrobianos.

En la realización de las pruebas de sensibilidad de las cepas estudiadas se emplearon los siguientes antimicrobianos, en forma de polvo valorado:

- Anfotericina B (Sigma E-6376).
- Voriconazol (Pfizer).
- Anidulafungina (Pfizer CT0019B).

3.4 Aparatos y materiales.

- Incubador de $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Incubador de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Asas bacteriológicas estériles.

- Tubos de vidrio de boca ancha con tapón de rosca.
- Placas de Petri estériles.
- Autoclave.
- Lavaplatos.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.
- pHmetro.
- Neveras y congeladores.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Espejo para lectura de placas.
- Placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con fondo en "U".
- Placas de microtitulación de 96 pocillos estériles con fondo plano.
- Agitador rotatorio tipo vortex.
- Filtros de 0,22 μm de diámetro de poro para filtración ajustables a bomba de vacío.
- Congelador -70°C.
- Espectrofotómetro.
- Bomba de vacío.
- Frascos de vidrio estériles con tapón de rosca de capacidad 250, 500 y 1000 ml.
- Barras magnéticas de agitación.
- Tapas de plástico para incubación de las placas de microtitulación estériles.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Tubos de plástico de 15 ml tipo Falcon.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Micropipetas de volumen variable unicanal y multicanal.
- Puntas de micropipetas sin filtro estériles
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.
- Termociclador.
- Microcentrífuga de tubos *ependorf*.
- Cubetas para electroforesis en gel de agarosa.
- Fuente de electroforesis.
- Elementos para la confección de geles de agarosa: molde, bandeja, peines.
- Transiluminador de luz ultravioleta y cámara fotográfica o analizador de imágenes.

- Termobloque.
- Papel de aluminio.
- Tubos de PCR de 0,6 ml.
- Soporte de tubos *ependorf*.
- Criotecas y/o tubos de conservación de cepas.
- Escala de MacFarland.
- Soluciones de verificación de pHmetro.

3.5. Soluciones y tampones.

✓ **Tampón de carga :**

- Azul de bromofenol.....0,25%(p/v)
- Xylene cyanole FF.....0,25%(p/v)
- Glicerol.....30%(p/v)

Disolver los componentes para un volumen total de 10ml.

✓ **Tampón de electroforesis (TBE concentración 10x):**

- Tris base 890 mM..... 108 g
- Ácido bórico 890 mM..... 55 g
- EDTA 0,5 M pH = 8,040 ml
- Agua destilada c.s.p.....1.000 ml

Autoclavar en alícuotas de 500 ml o 1 l.

✓ **Solución de Proteinasa K (10 mg/ml):**

- Proteinasa K.....10 mg
- Agua destilada estéril..... 1 ml

Conservar en pequeñas alícuotas a -20°C.

✓ **Tampón fosfato salino (PBS):**

- Cloruro sódico..... ..8 g
- Cloruro potásico.....0,2 g
- Na₂HPO₄.....1,44 g
- KH₂HPO₄.....0,24 g
- Agua destilada c.s.p.....800 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl, si es necesario. Esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente.

✓ **Solución de etanol al 70% (v/v):**

- Etanol absoluto 98%.....70 ml
- Agua destilada.....30 ml

Almacenar a temperatura ambiente.

✓ **Menadiona (10 mM):**

- Menadiona.....172 mg
- Acetona.....10 ml

Disolver mediante agitación suave. Almacenar en un frasco topacio, para proteger la disolución de la luz, a temperatura ambiente.

✓ **Solución de Hidróxido sódico (NaOH 1 M):**

- NaCl.....40 g
- Agua destilada.....1 l

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente

✓ **Solución de bromuro de etidio (BrEt 10 mg/ml):**

- Bromuro de etidio.....1 g
- Agua destilada.....100 ml

Disolver con ayuda de un agitador magnético durante varias horas hasta disolver el colorante. Almacenar en botes topacio, o frascos cubiertos con papel de aluminio para evitar la fotoinactivación. Las soluciones de bromuro de etidio se deben manejar con precaución ya que es un potente agente mutágeno. Siempre debe manipularse con guantes y debe ser desactivado antes de desecharlo.

✓ **Preparación de sales de XTT:**

- XTT (sigma) se prepara como una solución saturada de 0,5g/l en lactato Ringer. La solución de XTT es fotosensible, por lo que el frasco debe cubrirse con papel de aluminio durante su preparación.
- La solución XTT/lactato Ringer de debe esteriliza mediante filtrado a través de un filtro de 22 µm de poro.
- Se hacen alícuotas de 10 ml y se guarda a -70°C para evitar la penetración de la luz.
- Se prepara una solución de Menadiona (Sigma) 10 mM en acetona 100% y se guarda a -70°C.
- Antes de cada determinación se descongela una alícuota de XTT/lactato Ringer y la solución de menadiona se añade para una concentración final de 1 µM (añadir 1 µl por 10 ml de XTT).

3.6 Medios de cultivo.

✓ **Sabouraud dextrosa agar (Oxoid).**

- Dextrosa 20 g
- Peptona10 g
- Agar15 g
- Agua destilada.....1000 ml

Ajustar el pH a 5,6. Disolver los ingredientes mediante ebullición, dispensar en tubos y autoclavar 10 minutos a una atmósfera de presión (121°C). Para la preparación de medios de cultivo en placas, disolver los ingredientes mediante ebullición, autoclavar 10 minutos y dispensar en las placas con el espesor suficiente para evitar la desecación.

✓ **Agar sangre (bioMerieux):**

- Sangre desfibrinada estéril.....5 ml
- Agar nutritivo (Difco P-0140-01)..... 100 g
- Agua destilada c.s.p.....1000 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl, si es necesario. Esterilizar en autoclave.
Conservar en frío.

✓ **Agar cromogénico (Chromogenic Candida Agar, Oxoid, England):**

- Peptona4 g
- Mezcla cromogénica.....13,6 g
- Agar.....13,6 g
- Agua destilada c.s.p.....1000 ml

La mezcla cromogénica está compuesta por las enzimas hexosaminidasa y fosfatasa alcalina y unas sustancias cromógenas. Ajustar el pH a 7.4 con HCl, si es necesario. Esterilizar en autoclave. Conservar en frío.

- ✓ **RPMI 1640 con L-glutamina sin bicarbonato** (Rosewell Park Memorial Institute):

El medio de cultivo, que prepararemos el medio según las indicaciones del CLSI M27-A3 (89), que vamos a utilizar para la determinación de formación de biopelículas, para la determinación de sensibilidad de las levaduras frente a los antifúngicos tanto en forma planctónica como sésil es el RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) con glutamina, sin bicarbonato y con rojo fenol como indicador de pH.

- RPMI.....10,4 g
- MOPS.....34,53 g
- Agua destilada c.s.p.....1000 ml

El medio en polvo es muy higroscópico y se debe proteger de la humedad. No se deben preparar soluciones muy concentradas ya que se pueden formar precipitados.

- Medir el 90% del volumen final de agua requerido. La temperatura del agua debe estar entre 15-20°C.
- Mientras agitamos cuidadosamente el matraz con el agua, vamos añadiendo el polvo que previamente hemos pesado. Agitar hasta disolver. No se puede hacer mediante calor.
- Ajustamos el pH a 7.0 con NaOH 1 Molar (40g/l).
- Añadimos el resto de agua hasta 1l que es el volumen final.
- Esterilizar mediante filtración a través de un filtro de 22 µm de poro.
- Guardar a 4°C.

Métodos

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

4. MÉTODOS

4.1 Recogida de datos clínicos.

El estudio se ha realizado en el H.U Virgen del Rocío, un centro hospitalario de tercer nivel que atiende a una población de referencia como hospital básico de 550.502 habitantes, tiene 1.316.728 habitantes asignados como hospital de referencia provincial y 1.434.013 habitantes como hospital de referencia regional.

Este complejo hospitalario (**fig.7**), que está compuesto por varios hospitales, el Hospital General, el Hospital de Rehabilitación y Traumatología, el Hospital Infantil y el Hospital de la mujer, cuenta con unas 1.200 camas.

Los datos referentes a la población atendida y los ingresos/año utilizados para calcular la incidencia media anual de las candidemias, se tomaron de la Memorias 2003-09 del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Fig 7: Complejo hospitalario H. U Virgen del Rocío.



Fuente: Memoria 2009 H.U Virgen del Rocío

Todas las muestras procedentes de aislamientos de sangre iban acompañadas de su correspondiente formulario de recogida de datos (**anexo 1**). Estos datos básicos incluyen los datos demográficos del paciente así como la presencia o ausencia de los principales factores de riesgo para la adquisición de una candidemia por *Candida parapsilosis* complex, datos microbiológicos de interés etc. Posteriormente, los datos de cada paciente pudieron ser ampliados consultando sus historias clínicas. Definimos caso como el primer aislamiento de *Candida parapsilosis* complex obtenido durante el periodo de estudio en un hemocultivo. Los episodios de candidemia detectados en un mismo paciente pasados 30 días tras el último hemocultivo fueron considerados casos nuevos.

En cuanto a los aislamientos de *C. parapsilosis* complex con los que trabajamos constituyen dos grupos diferenciados por el origen de la muestra. El grupo de aislamientos procedentes de hemocultivos, donde además se incluyen aislamientos de catéteres cuyo cultivo semicuantitativo es mayor o igual a 15 ufc de *C. parapsilosis* complex y el grupo de otras localizaciones donde encontramos aislamientos procedentes de piel, mucosas, exudados óticos...

4.2. Aislamiento e Identificación de las levaduras en el laboratorio.

Los microorganismos estudiados fueron aislados a partir de distintas muestras clínicas procesadas en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica del H.U Virgen del Rocío siguiendo los protocolos normalizados de trabajo de cada sección.

La conservación de los microorganismos se realizó a -70° C en viales específicos para la conservación de microorganismos, los cuales contienen unas partículas esféricas con un orificio central y un fluido de criopreservación (PROTEK, Technical Service c.s), tras realizar una suspensión densa a partir de un cultivo en medio sólido.

Tradicionalmente, la identificación de las levaduras se lleva a cabo atendiendo a criterios morfológicos y bioquímicos. La mayoría de las levaduras crecen fácilmente en muchos de los medios que se utilizan habitualmente en el laboratorio como agar sangre, agar chocolate, agar brucella, sin embargo, el agar Sabouraud glucosado es el medio por excelencia para la identificación de las levaduras. El crecimiento se hace evidente a las 24-48 h de horas de incubación en aerobiosis a 37° C. Las colonias de *C. parapsilosis* complex presentan un tamaño de 2-4 mm y en cuanto a la morfología de la colonia se han descrito 4 morfotipos diferentes con apariencia de lisa a rugosa.

La identificación de las cepas se realiza mediante siembra en medio cromogénico Chromogenic Candida Agar (Oxoid, England) que es un medio diferencial útil para la recuperación y aislamiento de colonias y la diferenciación de especies de *Candida* encontradas en muestras clínicas. Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos (13). El fundamento de los mismos se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima. El medio Chromogenic Candida Agar (Oxoid, England) contiene dos sustratos cromogénicos, que son hidrolizados por las enzimas hexosaminidasa y fosfatasa alcalina, que se encuentran en determinadas especies de *Candida*. La acción de las enzimas sobre las sustancias cromógenas produce la coloración

de las colonias sobre el agar. El color que se produce depende de la enzima que posea esa especie de *Candida* (**fig 8**).

Candida tropicalis, *C. albicans* y *C. dubliniensis* tienen hexosaminidasa que da lugar a un pigmento verde, sin embargo en *C. tropicalis* se producen otras reacciones metabólicas que dan lugar a un descenso del pH que ocasiona que el pigmento sea azul.

Fig 8: Distintas especies de *Candida* en agar cromogénico



La actividad de la fosfatasa alcalina en *C. krusei* dan lugar a una pigmentación rosa (marrón), mientras que *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae* pueden aparecer de color beige, marrón, amarillo, esto se debe a la mezcla de la coloración natural de la colonia y de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Los microbiólogos experimentados pueden diferenciar estas especies por el color y la morfología de la colonia. Cuando se combina con las características morfológicas, es posible dar una identificación presuntiva.

Aquellas cepas en las que no se llegue a una identificación clara, se identifican mediante el sistema comercial API 32C (bioMérieux, France), esta galería está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada. Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API.

La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina.

❖ Procedimiento para la utilización de la galería ID32C.

- Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en 2 ml de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
- Transferir 250 µl de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar.
- Inoculación manual: Dispensar 135 µl de la suspensión anterior en cada cúpula.
- Incubar a 30°C durante 48 h.
- Lectura automática con mini API: El lector detecta en cada cúpula si hay crecimiento y transmite los datos al ordenador que, una vez procesados, propone la identificación de la especie.

4.3 Identificación molecular de las cepas estudiadas.

❖ Extracción y purificación del ADN.

Para la extracción de ADN pueden utilizarse diferentes métodos, dependiendo de la cantidad de proteínas y mucina que contenga la muestra. Así, es recomendable usar métodos poco agresivos y sencillos.

Para la extracción y purificación del ADN partimos de un cultivo en Saboraud de 24 h obtenido a partir de los viales de crioconservación.

El procedimiento para la extracción del ADN utilizando el kit (Epicentre, MasterPure™ Yeast Purification kit), es el siguiente:

- Tomar una colonia de levadura de una placa de Sabouraud (aproximadamente de 2 mm de diámetro) con un asa de cultivo, procurando no arrastrar restos del medio de cultivo y resuspender en 300 µl de solución de lisis de levaduras contenido en un tubo de microcentrífuga.
- Incubar la suspensión en un baño a 65°C durante 15 min.
- Poner las muestras en hielo durante 5 min. Añadir 150 µl de reactivo MPC de precipitación de proteínas y agitar durante 10 segundos.
- Centrifugar a >10.000 rpm durante 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga ya añadir 500 µl de Isopropanol.

- Mezclar vigorosamente por inversión.
- Centrifugar a >10.000 rpm durante 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante con la precaución de no arrastrar el ADN precipitado (puede ser visible como un punto pequeño blanquecino), para lo cual es conveniente dejar unos 20 µl de líquido. Debe aspirarse lentamente colocando la punta de la pipeta en el lado opuesto del precipitado. Debido a que este precipitado no siempre es visible, es conveniente colocar siempre del mismo modo los tubos en la centrifuga (con el pico de la tapa hacia fuera, pues el precipitado estará siempre en el fondo del tubo en ese lado). Desechar el sobrenadante.
- Añadir 0,5 ml de alcohol 70° para lavar el sedimento.
- Desechar cuidadosamente el etanol. Centrifugar ligeramente para eliminar el etanol restante.
- Suspender el ADN en 50 µl de TE.
- Guardar a 4° C hasta su utilización.

❖ Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR).

En la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR) se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorios y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja astringencia (temperatura de anillamiento a 36-45° C y >2 mM MgCl₂).

El cebador utilizado hibrida con regiones homologas dentro del genoma, en el caso de que el cebador hibride en ambas hebras con una distancia de aproximadamente 3 Kb, entonces la región entre ambos puntos se amplificara dando lugar a determinado patrón (107).

Las ventajas más interesantes de la RAPD-PCR son su rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo coste. Por otro lado es una técnica poco reproducible, por lo que es recomendable que esta técnica se valide y optimice en cada laboratorio.

En el presente trabajo para la técnica RAPD-PCR, vamos a utilizar los siguientes cebadores (11,78) que recogemos en la **tabla 3**.

Tabla 3: Cebadores y sus secuencias de nucleótidos utilizados en RAPD-PCR.

Cebador	Secuencia
RPO-2	(5'-GCGATCCCCA-3').
OPA-1	(5'-GCGATCCCCA-3')
OPA-6	(5'-GGTCCCTGAC-3')
OPA-10	(5'-GTGATCGCAG-3')
OPA-20	(5'-GTTGCGATCC-3')
OPE-10	(5'-CACCAGGTGA-3')
OPE-13	(5'-CCCGATTCCG-3')

La amplificación del ADN molde, con los distintos cebadores, se realizó siguiendo el protocolo de Tavanti y colaboradores (11) en un termociclador modelo *Eppendorf* Mastercycle personal mediante una PCR convencional. Los componentes de la PCR se indican la siguiente **tabla 4**.

Tabla 4: Componentes de la reacción en RAPD-PCR.

	Concentración	Volumen (μ L)
Tampón	10 x	5 μ l
dNTP	200 μ M	1 μ l
Taq ADNpolimerasa	(5U/ μ l)	0,5 μ l
Cebadores	(10 μ M)	5 μ l
H₂O		40 μ l
MgCl₂	(50 μ M)	1,5 μ l
ADN		2 μ l
Volumen total		50 μ l

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos
- amplificación (35 ciclos)
 - 94°C durante 1 minuto
 - 36°C durante 1 minuto
 - 72°C durante 75 segundos
- con un ciclo final de extensión de 72°C durante 10 minutos
- mantener a 4°C

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

❖ **Identificación de especie según los patrones de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *SADH* (Alcohol deshidrogenasa secundaria)**

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias polimórficas. Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma. La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción.

En nuestro caso, seguimos el protocolo de Tavanti y colaboradores (11), amplificando el gen *SADH* (alcohol deshidrogenasa secundaria) y posteriormente haremos la digestión del producto amplificado con la enzima de restricción *BanI*.

La amplificación del gen *SADH* con los cebadores S1F (5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3') y S1R (5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3') se realizó en un termociclador modelo *Eppendorf* Mastercycle personal mediante una PCR convencional. Los componentes de la PCR se indican en la **tabla 5**.

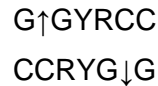
Tabla 5: Componentes de la PCR para la amplificación del gen *SADH*.

	Concentración	Volumen (μL)
Tampón	10 x	5 μl
dNTP	200 μM	2 μl
Taq ADN polimerasa	(5U/ μl)	0,5 μl
Cebador S1F	(10 μM)	2,5 μl
Cebador S1R	(10 μM)	2,5 μl
H₂O		34,5 μl
MgCl₂	(50 μM)	2 μl
ADN		1 μl
Volumen total		50 μl

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- Desnaturalización durante 3 minutos a 94°C.
- Amplificación (40 ciclos)
 - 30 segundos a 94°C
 - 30 segundos a 50°C
 - 1 minuto a 72°C
- Extensión durante 7 minutos a 72°C
- Mantener a 4°C

El producto de la amplificación se analiza en un gel de agarosa al 1,5%. Una vez amplificado el gen *SADH*, se realiza la digestión con la endonucleasa de restricción *BanI*, la secuencia reconocida por esta enzima es:



Y = pirimidina (C o T)

R = purina (A o G)

Los puntos de corte de la enzima vienen indicados por los símbolos \uparrow y \downarrow . Esta enzima tiene un lugar de restricción para *C. parapsilosis* sensu stricto, en la posición 196, para *C. orthopsilosis* no tiene ninguno y para *C. metapsilosis* tiene tres lugares de restricción (96, 469 y 529 pb).

Para digerir el ADN se prepara la siguiente mezcla de reacción, en un volumen total de 20 -25 μl :

- 2 μl Tampón G 10x.
- El volumen de ADN depende de la cantidad obtenida en la amplificación.
- 0,5 μl *BanI* (20 U/ μl).
- 0,2 μl BSA (10 μg /ml).
- Hasta 20-25 μl agua estéril.

Una vez realizada la mezcla de reacción, la mantendremos en incubación durante 18 horas a 37°C.

Es importante respetar el orden de los componentes de la mezcla, y añadir la endonucleasa siempre al final, ya que es muy sensible a las condiciones del tampón. Además, el volumen final añadido de la enzima no debe superar el 10% del volumen total, debido a que el glicerol presente en el tampón de conservación de la enzima puede inhibir la reacción; se necesitan de 2 a 3 unidades de enzima por cada μg de ADN.

Someter a electroforesis en un gel de agarosa 1,5% en TBE 0,5x para visualizar los fragmentos resultantes de la digestión.

❖ Preparación de un gel de agarosa y observación de los amplicones.

Mediante la electroforesis de los productos de amplificación en geles de agarosa con bromuro de etidio, se produce la visualización de los productos de la PCR, y se pueden comprobar tanto el tamaño como el número de amplicones.

Dependiendo de la técnica que se haya realizado, el porcentaje de agarosa del gel varía. Así, en caso del RAPD, necesitamos un gel al 0,8% para la visualización de los amplicones, para ello:

- Pesar 0,32 gramos de agarosa en 100 ml de tampón TBE 1X (preparar la cantidad necesaria según el número de muestras).
- Disolver mediante calor (microondas o mechero) hasta que la solución este transparente.
- Dejar enfriar un poco, añadir 2,5 µl de bromuro de etidio. Agitar para homogeneizar.
- Volcar sobre el molde de la cubeta de electroforesis (elegir un molde adecuado para el número de muestras que se hayan amplificado).
- Colocar un peine adecuado al número de muestras.
- Dejar solidificar.
- Retirar el peine.
- Colocar en la cubeta de electroforesis.
- Añadir tampón TBE1X de forma que se llenen las cubetas laterales y que el gel quede cubierto por el tampón.
- Cargar el gel, para ello extender un trozo de *parafilm* sobre la mesa de trabajo y depositar tantas gotas de 5 µl de tampón de carga como muestras se vayan a cargar además de las escaleras de peso molecular.
- Mezclar 10 µl de cada muestra con una gota de tampón de carga de las que previamente hemos depositado en el *parafilm*. Cargar la muestra en un pocillo del gel, repetir este paso con cada una de las muestras.
- Reservaremos un pocillo o dos, dependiendo de la cantidad de muestras y del tamaño del gel, para cargar un marcador de peso molecular.
- Conectar los electrodos de forma que los pocillos queden más cerca del electrodo negro (cátodo) y por tanto el ADN (cargado negativamente a pH neutro) migrará hacia el ánodo (electrodo rojo).

- Conectar la fuente de electroforesis de manera que no sobrepase 5 V/cm.
- Desconectar la fuente y quitar la tapa cuando el azul de bromofenol esté aproximadamente a la mitad del gel.

❖ Lectura e interpretación.

- Manipular (siempre con guantes) el molde de la cubeta con el gel y depositar sobre un transiluminador de luz ultravioleta en un lugar oscuro.
- Para validar los resultados del ensayo, en el carril del control negativo no debe aparecer ninguna banda.
- Fotografiar el gel.

4.4 Formación de biopelículas

La formación de biopelículas de *Candida parapsilosis* complex se estudia siguiendo las directrices de Krom y colaboradores (108) y Ramage y colaboradores (109). Este método se basa en la formación de biopelículas equivalentes que se forman en el fondo y las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano preesterilizadas y el uso posterior de un ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica de las células sésiles que forman parte de las biopelículas y de esta forma se correlaciona con la viabilidad de estas células.

Partimos de cultivos puros de las levaduras en medio de Sabouraud dextrosa incubado a 37° durante 24-48h.

Tanto para el ensayo de formación de biopelículas como para la determinación de la actividad de los distintos antifúngicos frente a las formas sésiles y planctónicas de las levaduras, utilizaremos un medio líquido de RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute) con glutamina, sin bicarbonato y con rojo fenol como indicador de pH. Se preparan suspensiones en RPMI con una turbidez aproximada de $1-5 \times 10^3$ ufc/ml.

❖ Preparación del inóculo

- Un día antes de hacer el estudio de sensibilidad, se subcultivan las levaduras en agar Sabouraud dextrosa.
- El inóculo se prepara picando varias colonias distintas (alrededor de 5), de 1 mm de diámetro, y resuspendiéndolas en agua destilada o solución salina 0,85%.
- La suspensión se homogeniza con un agitador de sobremesa a 2.000 rpm, durante 15 segundos.
- El inóculo se ajusta a un 0,5 McFarland (mediante escala, turbidímetro o espectrofotómetro a 530 nm (la densidad óptica de 0,09-0,13), lo que equivale a una suspensión de levaduras de $1-5 \times 10^6$ ufc/ml.
- Por último, se hace una dilución 1:100 (10 μ l en 5 ml de RPMI) preparando la suspensión de trabajo que tendrá $1-5 \times 10^3$ ufc/ml.
- Deben hacerse recuentos periódicos en placa de agar Sabouraud dextrosa, para controlar la validez del tamaño del inóculo.

Para el ensayo de formación de biopelícula cada cepa se ensaya en 4 pocillos de una placa de poliestireno de fondo plano, donde se depositan en cada uno, 200 μ l de suspensión de levaduras.

En cada placa se incluyen 4 pocillos que contendrán únicamente el medio de cultivo, y se utilizarán posteriormente como blanco y 4 pocillos destinados a la cepa de ATCC 22019 *Candida parapsilosis* y otros 4 para la cepa de ATCC 99055 *C. albicans*. Se cubre la placa y se incuba durante 48 h a 37°C.

❖ Proceso posterior a la formación de la biopelícula.

- Después de la formación de la biopelícula, se aspira el RPMI. La aspiración del medio se debe hacer cuidando de no tocar y destruir la biopelícula. Dirigiendo las puntas de una pipeta multicanal hacia la esquina del pocillo, minimizamos el contacto con la biopelícula.
- Las células planctónicas y las que no se han adherido se eliminan lavando 3 veces con PBS.
- El PBS residual se elimina manteniendo la placa bocabajo sobre papel de filtro.

La formación de biopelículas se verificó mediante el ensayo de reducción de sales de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT, Sigma Aldrich), este compuesto está ampliamente aceptado para determinar la viabilidad celular y la sensibilidad sobre biopelículas. La preparación de la solución para el ensayo de reducción de sales de XTT la haremos como hemos visto previamente en el punto **3.5** de material.

❖ **Cuantificación de la actividad metabólica de las células de la biopelícula**

- Se añade 100 µl de la solución XTT/menadiona a cada pocillo, que previamente ha sido lavado, tanto a los pocillos donde se ha formado biopelícula como los controles negativos.
- Se cubren las placas con papel de aluminio y se incuban 1h a 37°C.
- El XTT-menadiona, que se convierte por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, en un producto de color naranja soluble en agua que puede ser medido espectrofotométricamente.
- Después de la incubación, se toman 75 µl de cada pocillo, y se transfieren a los pocillos de otra placa de microtitulación rotulada. (sin biopelículas)
- Estas placas se leen en un lector de placas de microtitulación a 492nm.
- La determinación se realizó por cuadruplicado, considerándose cepas productoras de biocapas aquéllas con una $DO \geq 0,222$, una vez restada la densidad óptica del pocillo de control de esterilidad (RPMI).
- Según la densidad óptica obtenida, los aislamientos se clasificaron como 6+ ($DO \geq 1,301$), 5+ (1,000-1,300), 4+ (0,699-0,999), 3+ (0,398-0,699), 2+ (0,222-0,398) y 1+ ($DO \leq 0,222$).

4.5 Determinación de sensibilidad a los antifúngicos mediante microdilución en caldo.

Existen varias técnicas de referencia para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. Las técnicas del CLSI y del EUCAST son las más difundidas y de las que se disponen más estudios de validación. Estas pruebas determinan la CMI de los antifúngicos mediante la dilución en caldo RPMI con o sin glucosa, frente a levaduras y hongos filamentosos.

❖ Preparación de los antifúngicos

Para la preparación de las soluciones madre de los 3 antifúngicos voriconazol, anfotericina B y anidulafungina, seguimos las directrices del documento M27-S3 del CLSI (110).

Preparación de la solución madre de los antifúngicos.

Para evitar los errores en las concentraciones vamos a seguir esta fórmula para la preparación de las soluciones madre de los antifúngicos:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

Para ello, se deben tener en cuenta la potencia de la sustancia valorada y las concentraciones a las que se quieren preparar las placas para los estudios de sensibilidad.

Debemos pesar, al menos, 100 mg de sustancia valorada en la balanza de precisión, para disminuir al máximo los errores de pesado. Las soluciones madre deben prepararse a una concentración 100 veces más elevada que la que se va a incluir en el estudio de sensibilidad.

En la **tabla 6** figuran las concentraciones deseables de los antifúngicos que vamos a utilizar, así como el disolvente en el que son solubles y los rangos de concentraciones a ensayar.

Tabla 6: Rangos de concentraciones y disolventes recomendados para anfotericina B, voriconazol y anidulafungina.

Antifúngico	Disolvente	Concentración de la solución madre en mg/l	Intervalos de concentración recomendados en mg/l
Anfotericina B	DMSO	3.200	0,03-16
Voriconazol	DMSO	1.600	0,015-8
Anidulafungina	DMSO	3.200	0,03-16

Preparación de las placas de microdilución.

Para estudiar la sensibilidad de las levaduras a diferentes antifúngicos, se siguió el protocolo recomendado por el CLSI documento M27-A3 (89).

Las placas deben de ser de microdilución, estériles con 96 pocillos de fondo en "U". El medio de cultivo recomendado es RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) con glutamina, sin bicarbonato y con rojo fenol como indicador de pH.

La preparación de las placas es diferente según sea el antifúngico, hidrofílico o hidrofóbico. En nuestro caso, anfotericina B, voriconazol y anidulafungina son insolubles en agua, por lo que haremos las diluciones en DMSO, para hacerlas correctamente seguiremos los esquemas de los **pasos 1-4**. Debemos recordar que para trabajar con DMSO tenemos que utilizar tubos de vidrio.

Para conseguir las diferentes concentraciones, partimos de la solución de partida 3200 mg/l contenida en un tubo rotulado con el número **2**. Esta solución se prepara a partir de la solución madre (rotulada con el número **1**) e iremos transfiriendo los distintos volúmenes como se muestra en el esquema del **paso 2**.

Fig. 9: Paso 1: Etiquetar y llenar los tubos con DMSO.

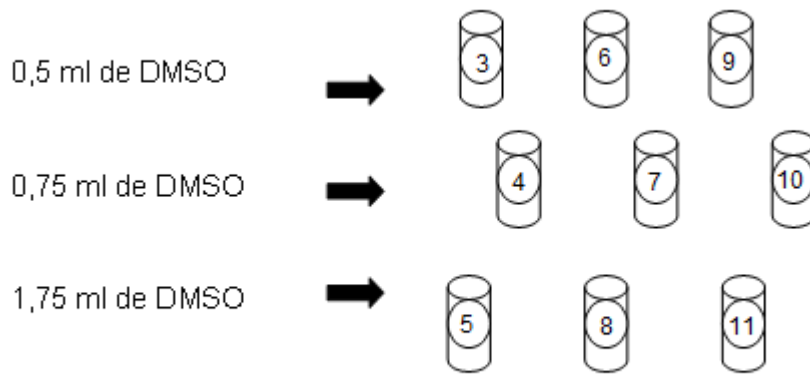
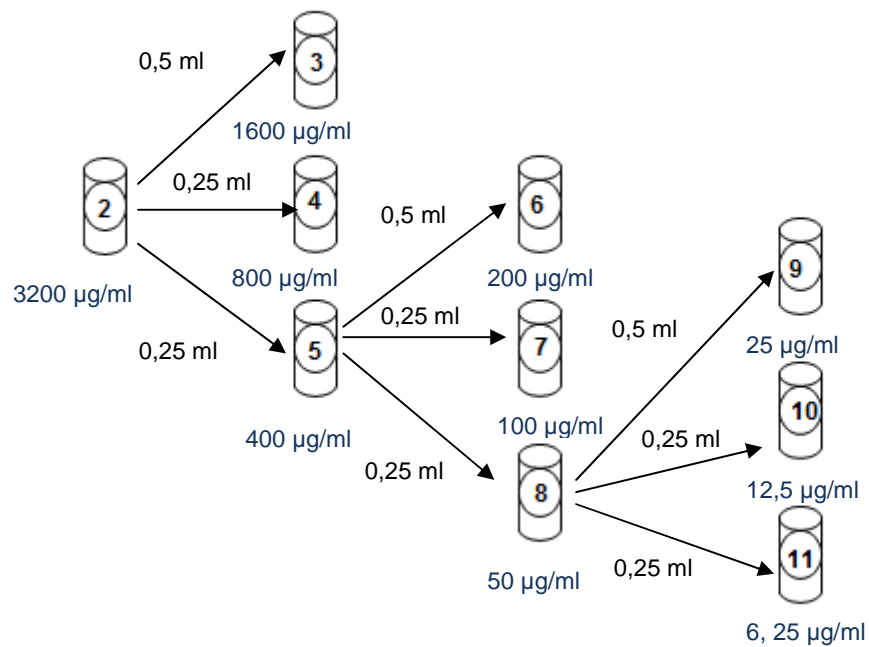


Fig. 10: Paso 2: Diluciones insolubles



Paso 3: Dilución 1/100 en RPMI.

El siguiente paso es hacer una dilución 1/100 de cada concentración de antifúngico en RPMI.

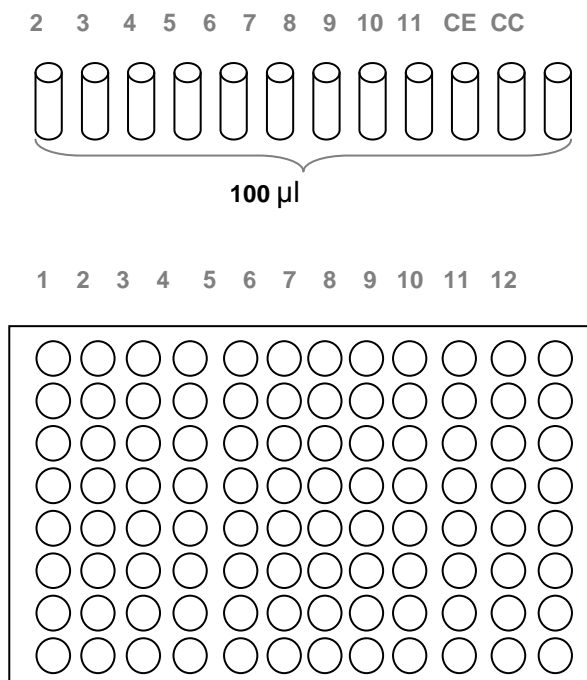
Se preparan los tubos con 10 ml de RPMI, y en el caso de los tubos correspondientes al control de crecimiento y control de esterilidad se pone 9,8 ml de RPMI + 0,2 ml de DMSO.

Transferir 100 µl de cada dilución de antifúngico, empezando por la concentración más baja (tubo **11**) a la más alta (tubo **2**).

Es importante homogeneizar las soluciones tanto antes de transferir los 100 µl como después.

Llenamos los pocillos de la microplaca con 100 µl (0,1 ml) de la dilución correspondiente del antifúngico. Siguiendo el esquema, vamos llenando las columnas de pocillos, con una pipeta multicanal, empezando por la concentración más baja (pocillos de la columna **10**) a la más alta (pocillos de la columna **1**), la columna **11** se reserva como control de esterilidad y la **12** como control de crecimiento.

Fig. 11: Paso 4: Llenado de la microplaca.



Una vez realizado el llenado de la microplaca, obtenemos una concentración final de 32 hasta 0,06 µg/ml. Una vez preparadas las microplacas se sellan para evitar la evaporación y se guardan en el congelador a -70°C un máximo de 6 meses, excepto en el caso de la anidulafungina que sólo se puede conservar durante 3 meses (89).

Inoculación e incubación de las placas.

En cada placa se pueden ensayar 8 cepas, una por fila. En cada experimento vamos a incluir *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 49619 como cepas control de calidad (**tabla 7**).

Las cepas de control de calidad deben incluirse siempre que se realicen pruebas de sensibilidad, para comprobar que sus CMIs están dentro del intervalo de control.

Tabla 7: Límites de CMI recomendados para la técnica de microdilución para las cepas de control de calidad según el CLSI.

Cepa de control De calidad	Agente antifúngico	Intervalos de concentración (mg/l)	
		24 horas	48 horas
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Anfotericina B	0,25-2	0,5-4
	Anidulafungina	0,25-2	0,5-2
	Voriconazol	0,016- 0,12	0,03-0,25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Anfotericina B	0,5-2	1,0-4
	Anidulafungina	0,03-0,12	0,03-0,12
	Voriconazol	0,06-0,5	0,12-1

Además de esto, se recomienda hacer controles de los lotes de RPMI y del proceso de preparación de las placas de microdilución. Se recomienda mantener las cepas de control de calidad a -70°C . Si se quieren mantener almacenadas para uso frecuente, pueden subcultivarse en agar Sabouraud y conservarlas entre 2 y 8°C , durante 15 días. Transcurrido este periodo deben subcultivarse de nuevo.

Se preparan inóculos con una turbidez aproximada de $1-5 \times 10^3$ ufc/ml en RPMI. Cada pocillo es inoculado con 100 μl de las suspensiones de trabajo, por lo que todos los pocillos se diluyen a la mitad, por tanto la concentración final de antifúngicos va de 16 a 0,03 $\mu\text{g/ml}$.

A la columna 11 se le añaden 100 μl de RPMI, ya que es el control de esterilidad y el blanco. Las placas se incuban a $35-37^{\circ}\text{C}$ en estufa durante 48 horas.

❖ **Lectura de determinación de sensibilidad mediante microdilución.**

La lectura de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), según el documento M27-A3 del CLSI (89), se realiza comparando visualmente el crecimiento en los distintos pocillos con el crecimiento en el pocillo libre de antifúngicos usando la siguiente escala (**tabla 8**).

Las placas se leen visualmente con ayuda de un espejo invertido, y estas pueden ser agitadas antes de la lectura.

Anfotericina B: El punto final está bien definido y la CMI se lee como la concentración más baja de antifúngico que impide el crecimiento (**índice 0**). En el caso de la anfotericina B no se suele dar “trailing” en el punto final.

Flucitosina (5-FC) y azoles: Este punto final está peor definido que el de Anfotericina B, lo que da lugar a una fuente de variabilidad. El punto final es aquel donde se ha producido al menos un descenso del 50% del crecimiento respecto al pocillo de control de crecimiento (**índice 2**).

Equinocandinas: Para las equinocandinas la CMI se determina a las 24 horas y se lee como la concentración menor a la que se produce un descenso del crecimiento del 50% respecto al pocillo de control de crecimiento (**índice 2**).

Tabla 8: Índices para la lectura de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Índice	Significado
0	Opticamente claro
1	Ligeramente turbio
2	Descenso prominente de la turbidez (50%)
3	Ligera disminución de la turbidez
4	Sin reducción en la turbidez

En la **tabla 9**, se recogen los puntos de corte del CLSI para la interpretación de las pruebas de sensibilidad. El CLSI no ha establecido aún puntos de corte para Anfotericina B. Los datos de CMI obtenidos en *Candida spp* se agrupan entre 0,25 y 1 µg/ml. Cuando aislamientos son resistentes a anfotericina B en modelos animales, según el método del CLSI M27 pueden tener una CMI mayor a 1 µg/ml.

Tabla 9: Puntos de corte para interpretar las pruebas de sensibilidad *in vitro* de *Candida spp*.

Agente Antifúngico	Sensible				No Sensible
	Sensible	Dosis dependiente	Intermedio	Resistente	
Anidulafungina	≤ 2 µg/ml				>2 µg/ml
Voriconazol	≤ 1 µg/ml	2 µg/ml		>4 µg/ml	

Desafortunadamente, la metodología M27 no permite la detección de todos los aislamientos, y en el presente se puede concluir que si un aislamiento de *Candida spp* presenta una CMI > 1 µg/ml la anfotericina B, es más probable que sea resistente a Anfotericina B.

4.6. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos sobre biopelículas.

El método que vamos a utilizar para la determinación de la actividad de los agentes antifúngicos que estamos estudiando, anfotericina B, anidulafungina y voriconazol frente a las células que forman parte de las biopelículas, se basa en el descrito por Krom y colaboradores (108) Ramage y colaboradores (109), este método es rápido, no es caro, reproducible y fiable.

Consiste en añadir las distintas concentraciones de antifúngicos sobre las biopelículas previamente formadas sobre las paredes de los pocillos de una placa de microtitulación.

❖ Formación de biopelículas

Este ensayo lo realizaremos con las cepas que han mostrado capacidad de formar biopelículas.

El desarrollo de las biopelículas lo efectuaremos como hemos visto en el punto **4.4 Formación de biopelículas**, pero teniendo en cuenta que necesitamos una biopelícula para cada concentración de antifúngico, por tanto, en cada placa, se pueden ensayar 8 cepas, una por fila.

- Después de la formación de la biopelícula, se aspira el RPMI. La aspiración del medio se debe hacer cuidando de no tocar y destruir la biopelícula. Dirigiendo las puntas de una pipeta multicanal hacia la esquina del pocillo, minimizamos el contacto con la biopelícula.
- Las células planctónicas y las que no se han adherido se eliminan lavando 3 veces con PBS.
- El PBS residual se elimina manteniendo la placa bocabajo sobre papel de filtro.
- Añadimos 200 µl de las distintas concentraciones de (0,03-16 µg/ml) de las soluciones de los antifúngicos anfotericina B, anidulafungina y voriconazol que se prepararon en el punto **4.4**, apartado **Preparación de las placas de microdilución**.
- La última columna de la placa se deja vacía, de esta forma los 8 pocillos actúan como control negativo para el análisis y cuantificación posteriores.
- Las placas se incubaron a 37° C durante 48 h.

La actividad de los antifúngicos frente a las biopelículas se verificó mediante el ensayo de reducción de XTT (punto **4.4. Formación de biopelículas** apartado: **Cuantificación de la actividad metabólica de las células de la biopelículas**).

Las placas se incubaron en la oscuridad durante 1h a 37°C leyéndose cada pocillo en un espectrofotómetro a 492 nm.

En este caso, en vez de clasificar la densidad óptica (DO) mediante índices, como hicimos en el apartado que acabamos de mencionar, calculamos la CMI de las células en la biopelícula (**CMIB**).

Interpretación de la concentración mínima inhibitoria

- La CMI de las células en la biopelícula (**CMIB**) se definió como la concentración más baja de antifúngico capaz de producir una reducción de la densidad óptica mayor o igual al 50% (**CMIB₅₀**) y al 80% (**CMIB₈₀**), respectivamente en comparación al control de crecimiento (109).
- Alternativamente, se puede inspeccionar las placas visualmente.

La determinación se realizó por cuadruplicado y al menos 2 veces en días diferentes, incluyéndose siempre los pocillos de control de esterilidad y de control de crecimiento.

4.7. Análisis estadístico

Se realizó Chi cuadrado para la determinación de diferencias entre los distintos orígenes de los aislamientos, se consideró que la diferencia era significativa cuando $p < 0,05$.

Resultados

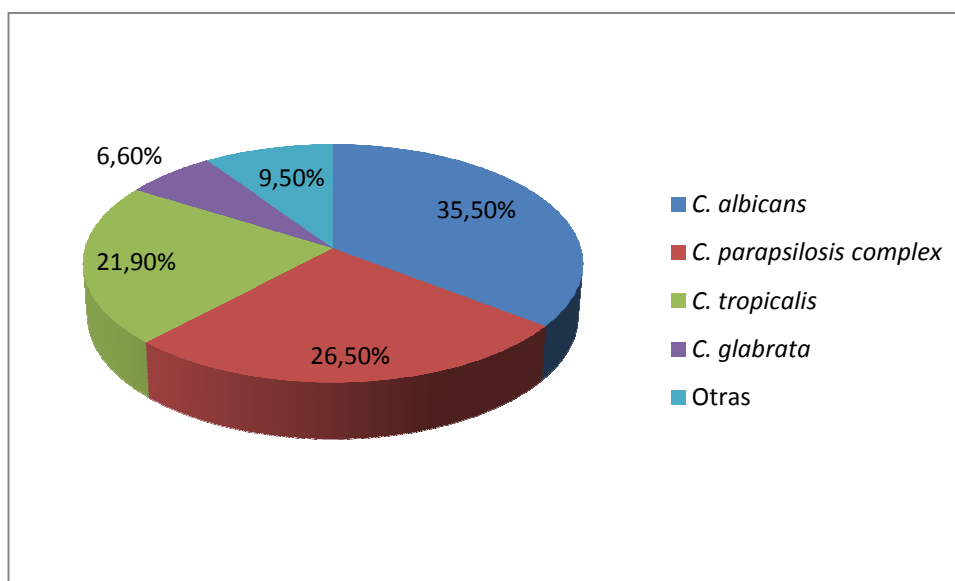
Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

5. RESULTADOS

5.1.1 Descripción de los datos epidemiológicos de las cepas productoras de candidemia.

Entre enero de 2003 y diciembre de 2009 se detectaron 456 casos de candidemia en el H.U Virgen del Rocío. Globalmente, la distribución por especies en estos casos fue la siguiente: el 35,5% se debieron a *C. albicans*, el 26,5% a *C. parapsilosis* complex, el 21,9% a *C. tropicalis* y el 6,6% a *C. glabrata* (tabla 10, fig.12)

Fig 12: Distribución por especies de las candidemias producidas en el H.U Virgen del Rocío en el período 2003 - 2009.



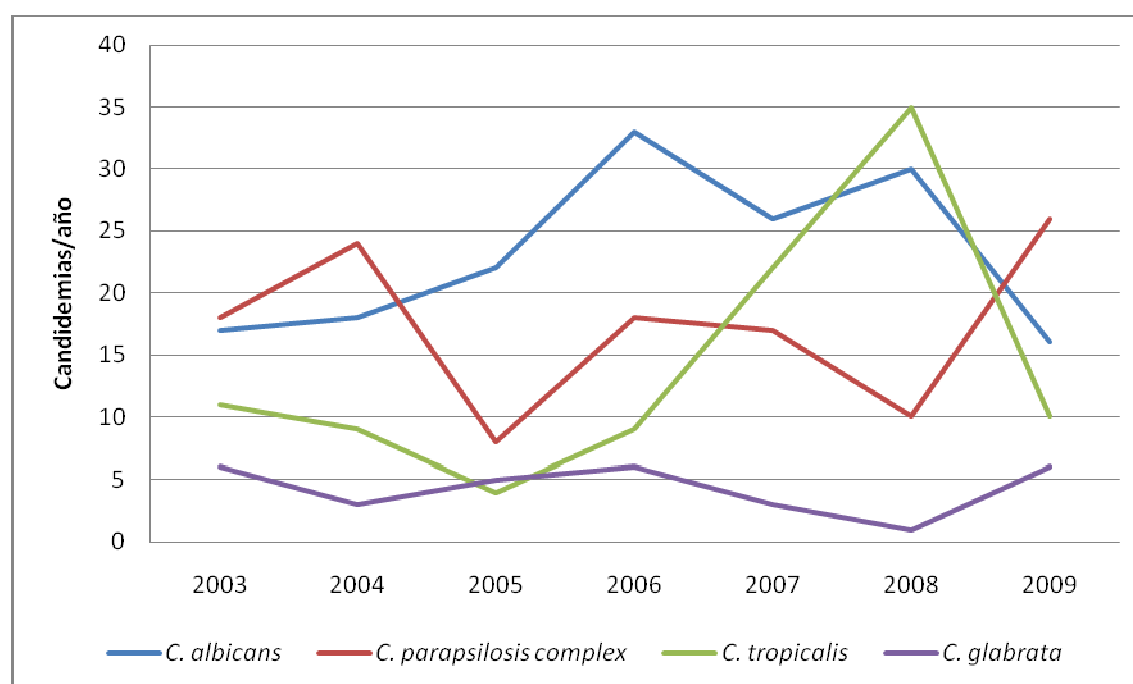
La incidencia media anual de las candidemias detectadas en el H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009 respecto a la población de la provincia de Sevilla fue de 3,4 candidemias por cada 100.000 habitantes y 1,2 candidemias por cada 1.000 ingresos. En el caso concreto de las candidemias por *C. parapsilosis* complex la incidencia anual fue de 0,90 por cada 100.000 habitantes y 0,32 candidemias por *C. parapsilosis* complex por cada 1.000 ingresos.

Tabla 10: Distribución de episodios de candidemia en el H.U Virgen del Rocío en el período 2003-2009.

Año	Nº de Candidemias				Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i> complex	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	
2003	(17) 27,4%	(18) 29%	(11) 17,7%	(6) 9,7%	62
2004	(18) 30%	(24) 40%	(9) 15%	(3) 5%	60
2005	(22) 47,8%	(8) 17,4%	(4) 8,7%	(5) 10,9%	46
2006	(33) 43,3%	(18) 23,7%	(9) 11,8%	(6) 7,8%	76
2007	(26) 36,1%	(17) 23,6%	(22) 30,5%	(3) 4,16%	72
2008	(30) 37,5%	(10) 12,5%	(35) 43,7%	(1) 1,25%	80
2009	(16) 26,6%	(26) 43,3%	(10) 16,6%	(6) 10%	60
Total	(162) 35,5%	(121) 26,5%	(100) 21,9%	(30) 6,6%	456

Aunque globalmente la especie productora de candidemia aislada con más frecuencia (**tabla 10**) en este periodo fue *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* complex, al analizar los casos de candidemia que se han producido por año y especie, observamos oscilaciones en los porcentajes en función de la especie y el año (**fig. 13 y 14**).

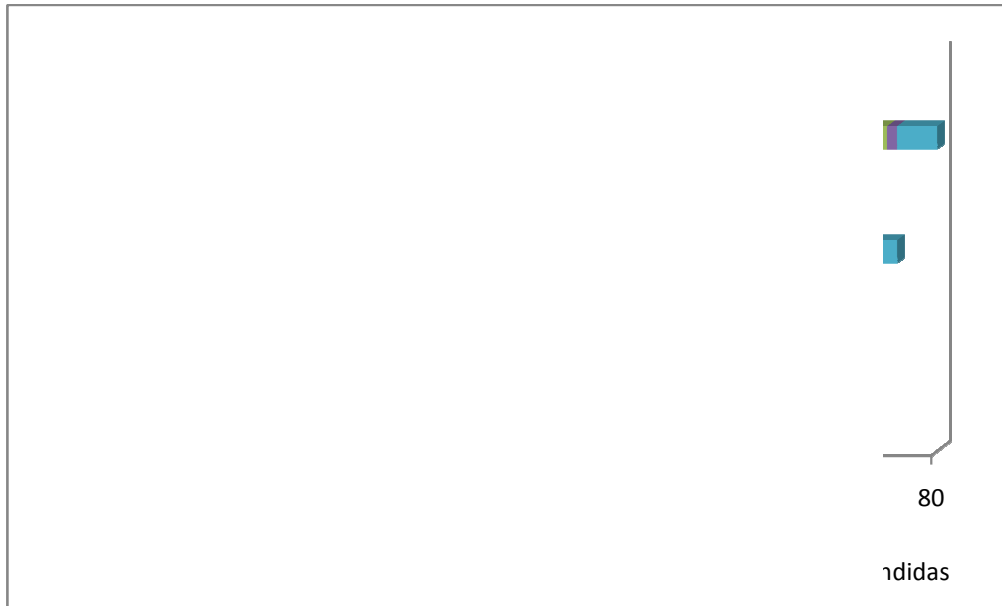
Fig. 13: Evolución del número de candidemias por especies a lo largo del periodo 2003-2009 en el H.U Virgen del Rocío.



Respecto a la distribución de las especies de *Candida* en las candidemias por año, como podemos observar en la **tabla 10**, mientras que en los años 2003, 2004 y 2009 *C. parapsilosis* complex fue la especie de *Candida* más frecuente en candidemias, del año 2005 al 2007 inclusive lo fue *C. albicans* y en 2008, *C. tropicalis* fue la primera causa de candidemia con el 43,7% de los aislamientos de *Candida*.

Si bien es verdad que se aprecian diferencias entre el número de candidemias registradas por año, ya que este oscila entre 46 en el año 2005 y 80 en el año 2008, no se observa una tendencia de aumento de las candidemias a lo largo del periodo de estudio (**fig.14**).

Fig. 14: Candidemias totales a lo largo del periodo 2003-2009 en el H.U Virgen del Rocío.

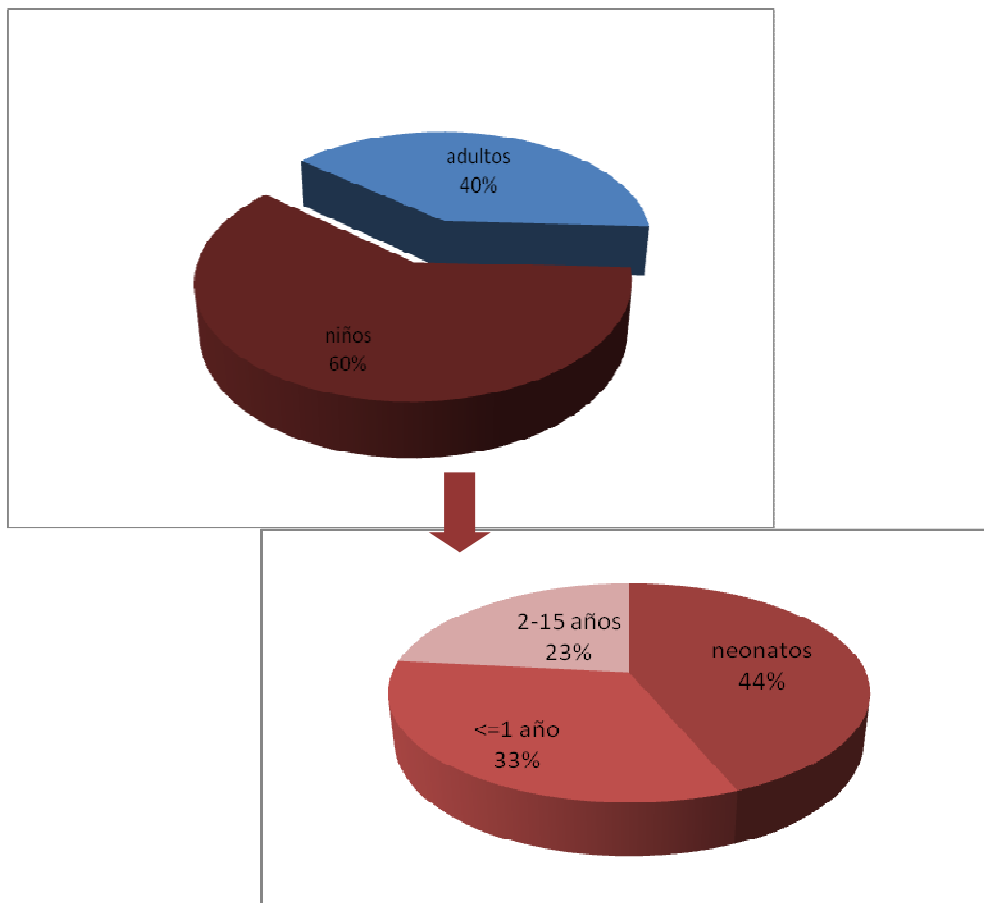


5.1.2. Descripción de los datos epidemiológicos de las candidemias por *C. parapsilosis* complex producidas en H. U Virgen del Rocío durante el período 2003-2009.

Al analizar los datos clínicos de las candidemias producidas por *C. parapsilosis* complex, obtenidos mediante revisión de las historias registradas en H.U. Virgen del Rocío durante el periodo 2003-09, observamos una serie de características epidemiológicas a destacar, que detallamos a continuación.

En la distribución por sexos se observa predominio del sexo masculino (64,4%) sobre el femenino (35,7%). El rango de edades de los pacientes que presentaron candidemia en este periodo osciló entre 0 y 74 años, la media de edad fue de 23,8 años y la mediana sólo de 2 años (**fig.15**).

Fig 15: Distribución por edades de los pacientes con candidemia por *C. parapsilosis* complex en H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003- 2009.



El 60,4% del total fueron niños, en este grupo el rango de edades osciló entre 0 y 13 años, la mediana fue de 2 meses y la media de 1,56 años. En los niños el grupo más representado fue el de los neonatos, que supuso el 44% de todos los niños. En el grupo de los adultos, el rango de edades osciló entre 29 y 74 años, la mediana fue de 60 años y la media de 59,2 años, en este grupo los mayores de 65 años supusieron el 23,5%.

Al analizar la distribución de los aislamientos por servicio de procedencia diferenciando entre niños y adultos (**tabla 11**), observamos que el 41,2% de los adultos estaban ingresados en un Servicio de Cirugía, el 32,3% en UCI y 11,7% en

Oncología, en el momento que padecieron la candidemia por *C. parapsilosis* complex.

Tabla 11: Datos epidemiológicos de candidemias producidas por *C. parapsilosis* complex en el HU Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

Procedencia de los aislamientos por Servicio			
Adultos (n= 48)		Niños (n=73)	
Cirugía	(20) 41,2%	Neonatología	(28) 38,5%
UCI	(15) 32,3%	UCI	(17) 23%
Oncología	(6) 11,7%	Pediatría Gral	(16) 21,5%
Factores de riesgo			
Adultos (n= 48)		Niños (n=73)	
Cirugía previa	(18) 47%	Prematuridad	(21) 28,9%
UCI	(6) 17%	UCI	(18) 25%
Cáncer	(4) 11,7%	Cirugía	(13) 17,3%
Otros (trasplante, VIH, quemaduras..)	(3) 8,8%	Catéter	(13) 17,3%

En el caso de los niños, 38,5% estaba ingresado en Neonatología, el 23% en UCI y el 21% en Pediatría General. El factor de riesgo (**tabla 11**) asociado con más frecuencia a la candidemia por *C. parapsilosis* complex en el caso de los adultos es la cirugía previa en un 47% de los casos y en los niños la prematuridad en un 28,9%.

5.2. Aislamiento e identificación de *Candida parapsilosis* complex.

Los métodos de identificación se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en las características morfológicas y/o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos de identificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos.

5.2.1 Identificación fenotípica

La identificación fenotípica de las cepas de *Candida parapsilosis* complex se realizó en el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínicas del H.U Virgen del Rocío. Esta se llevo a cabo mediante siembra en medio cromogénico Chromogenic Candida Agar (Oxoid, England) y/o mediante el sistema comercial API 32C (bioMerieux, France) compuesto por pruebas bioquímicas y de asimilación de sustratos, previo aislamiento en agar Sabouraud Cloranfenicol, según se detalla en la sección **3.2 de métodos**.

Las características fenotípicas sólo permiten la identificación de *C. parapsilosis* a nivel de complejo ya que no se encuentran diferencias claras entre las tres especies. Así los aislamientos de las tres especies, *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, crecen tanto a 30°C como a 37°C, mientras que no son capaces de crecer a 42°C, no se observan diferencias en la morfología en agar Sabouraud, ni en la coloración que producen en el medio cromogénico ya que las tres especies dan lugar a colonias de coloración pálida a malva, coloración que por otra parte también puede ser producida por otras especies y tampoco se encuentran en los perfiles de asimilación de sustrato correspondientes al API 32C entre las especies.

Las cepas incluidas en los diferentes apartados de este estudio se recogen en las **tablas 1 y 2** en material.

5.2.2 Identificación genotípica

Al no ser posible la identificación de especie con los métodos fenotípicos, procedimos a la identificación genotípica de los aislamientos.

Las técnicas de identificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en la amplificación de genes o secuencias de ADN y detección de los productos. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos.

Nuestro objetivo es encontrar técnicas moleculares sencillas, capaces de diferenciar a nivel de especie dentro del complejo "*psilosis*". Tras la revisión crítica de la literatura decidimos realizar las técnicas RAPD-PCR y PCR- RFLP.

En primer lugar, en el caso de la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR), al existir la posibilidad de utilizar distintos cebadores, hicimos una serie de ensayos para seleccionar el cebador más apropiado para los objetivos planteados en este trabajo.

Una vez hecho esto, procedimos a la identificación a nivel de especie de 122 cepas, previamente identificadas como aislamientos de *Candida parapsilosis* complex, mediante estas dos técnicas de Biología Molecular.

5.2.2.1 Selección de cebadores para la Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) en *C. parapsilosis* complex.

La RAPD-PCR se utiliza para la identificación de bacterias y hongos. En esta técnica se emplean uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja astringencia.

Entre las ventajas de esta técnica se encuentra que no se requiere el conocimiento previo de la secuencia del genoma, y permite analizar regiones de este muy diversas que pueden estar sometidas a presiones selectivas diferentes y con tasas de evolución distintas, lo que hace posible la obtención de marcadores genéticos utilizables para diferenciar especies, cepas, biotipos etc. Por otra parte, siempre es recomendable que esta técnica se valide y optimice en cada laboratorio.

Trabajamos con 7 cebadores diferentes: **OPA-1** (5'-GCGATCCCCA-3'), **OPA-6** (5'-GGTCCCTGAC-3'), **OPA-10** (5'-GTGATCGCAG-3'), **OPA-20** (5'-GTTGCGATCC-3'), **OPE-10** (5'-CACCAGGTGA-3'), **OPE-13** (5'-CCCGATTCCGG-3') y **RPO2** (5'-GCGATCCCCA-3') para determinar la capacidad de generar patrones de bandas reproducibles y discriminativos entre los distintos aislamientos, con el objetivo de seleccionar el más adecuado de los cebadores probados y que aplicaríamos posteriormente para la detección a nivel de especie de todas las cepas.

Seleccionamos, para este estudio preliminar, 23 aislamientos procedentes de hemocultivos previamente identificados como *C. parapsilosis complex* mediante métodos fenotípicos, también incluimos una cepa identificada como *C. albicans*. En la tabla 12 se detallan los aislamientos utilizados, mediante una letra se designan los pacientes a partir de los que se aislaron las cepas. Las cepas de referencia *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y *C. metapsilosis* ATCC 96144 son empleadas como controles.

Tabla 12: Aislamientos de *C. parapsilosis complex* utilizados para realizar la selección apropiada de cebadores en la RAPD-PCR.

Paciente	Nº de identificación de la cepa	Paciente	Nº de identificación de la cepa
A	1,3,13,16	H	17,19
B	2,4,5	I	18
C	6	J	20
D	7	K	21
E	8,9,14	L	22,23
F	10	M	24
G	11,12	N	15

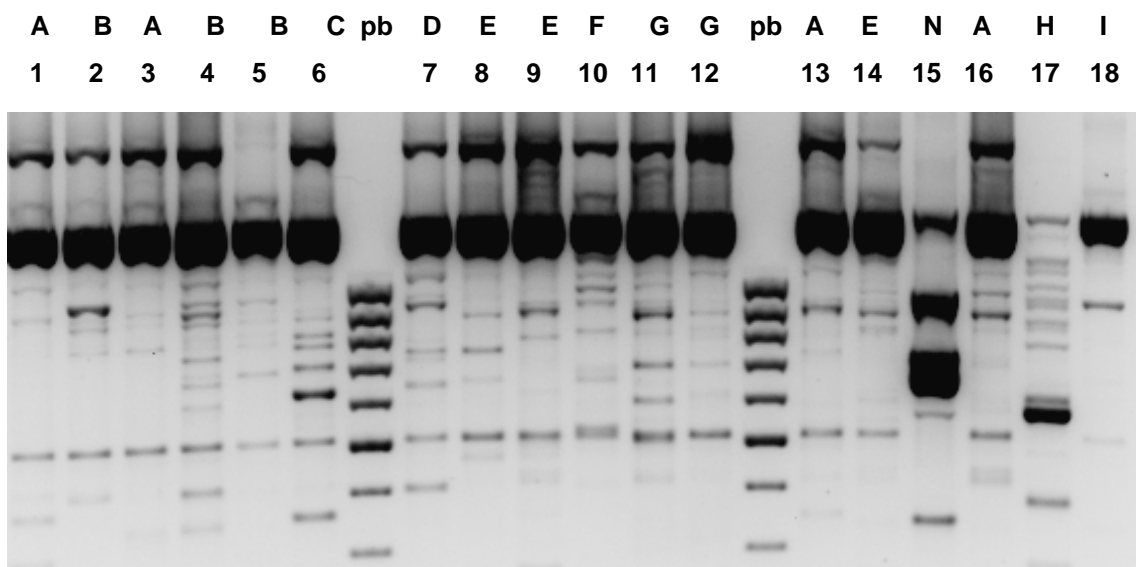
La selección del cebador más adecuado para identificar las especies del complejo “*psilosis*” se hizo en base al análisis de los patrones resultantes con cada cebador por separado.

Los criterios que seguiremos a la hora de examinar los distintos patrones obtenidos con los cebadores a estudiar son, la reproducibilidad, la intensidad y tamaño de las bandas y el análisis de los patrones encontrados en las cepas pertenecientes al mismo paciente.

Cuando se amplifica con el cebador **OPA-6 (fig. 16)**, se observa que la mayoría de las cepas presentan un patrón de amplificación con 2 ó 3 bandas de gran intensidad y un número variable de bandas muy finas que son poco reproducibles.

En cuanto a las bandas de mayor intensidad, pueden ser el producto de la amplificación de una secuencia altamente repetida a lo largo del genoma o el resultado de la amplificación de determinado sitio del genoma que es muy estable cuando hibrida con el cebador.

Fig 16: Patrones de bandas correspondientes al cebador **OPA-6**. A-N: Pacientes. 1-18: nº de cepa. Pb: marcador molecular de 100 pb.

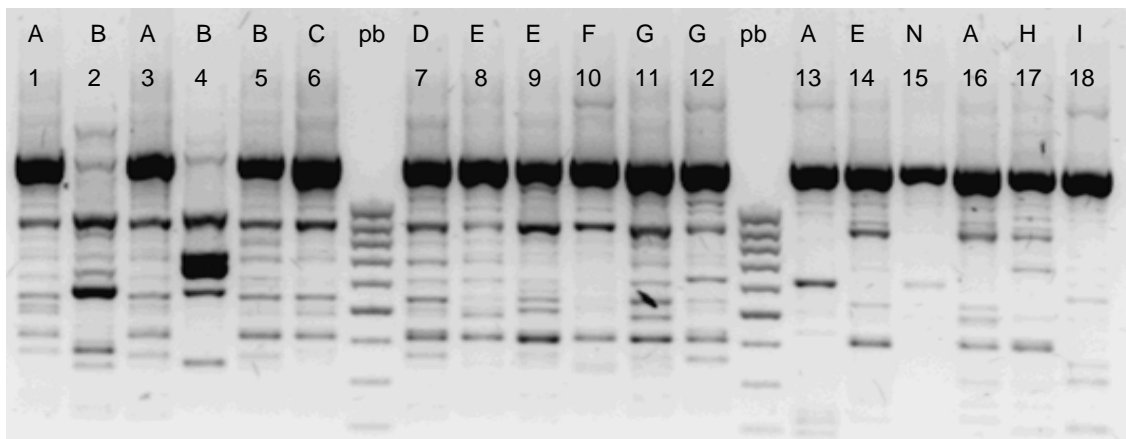


Al analizar los patrones constatamos que todos los aislamientos de la **figura 16** presentan la banda intensa a la misma altura excepto los aislamientos 15 y 17, si bien sabemos que el aislamiento 15 es una *C. albicans*, el 17 es *C. parapsilosis* complex, pero además de estas bandas observamos numerosas bandas de menor intensidad que no son reproducibles, por tanto descartamos este cebador, podemos observar en la figura 3 que las cepas 2, 4 y 5 pertenecientes al paciente B, muestran la banda de

alta intensidad pero el resto de las bandas no coinciden, mostrando por tanto distinto patrón.

En la **figura 17**, observamos que el cebador **OPA-1** presenta patrones con 2 ó 3 bandas intensas y múltiples bandas muy débiles. La presencia de múltiples bandas tenues y como en este caso, polimórficas, puede deberse a un ensamblaje frustrado de los cebadores ensayados, debido a que sus secuencias no sean las adecuadas para la identificación de las especies del complejo “*psilosis*”.

Fig 17: Patrones de bandas correspondientes al cebador **OPA-1**. A-N: Pacientes. 1-18: nº de cepa. Pb: marcador molecular de 100 pb. 22019: *C. parapsilosis* sensu stricto ATCC 22019.



Con el cebador **OPE-13 (fig 18)** no se consiguió ningún patrón de amplificación característico que nos permita establecer un criterio para la diferenciación de las especies del complejo “*psilosis*”. Como ocurrió con los cebadores anteriores observamos como cepas pertenecientes al mismo paciente no tienen el mismo patrón, así ocurre con las cepas 8 y 9 pertenecientes al paciente E.

El producto de amplificación obtenido con el cebador **OPA-10 (fig 19)** muestra unos patrones con un número suficiente de bandas con intensidades similares, que hacen pensar en la posible utilización de este cebador para la diferenciación de especie, sin embargo, al analizarlos observamos que presentan una banda común a la altura de 700 pb, pero además presentan otras bandas intensas que difieren en altura entre aislamientos pertenecientes al mismo paciente, véanse los patrones referentes a las cepas 1, 3 y 13 que corresponden al paciente A.

Fig 18: Patrones de bandas correspondientes al cebador **OPE-13**. A-N: Pacientes. 1-18: nº de cepa. Pb: marcador molecular de 100 pb.

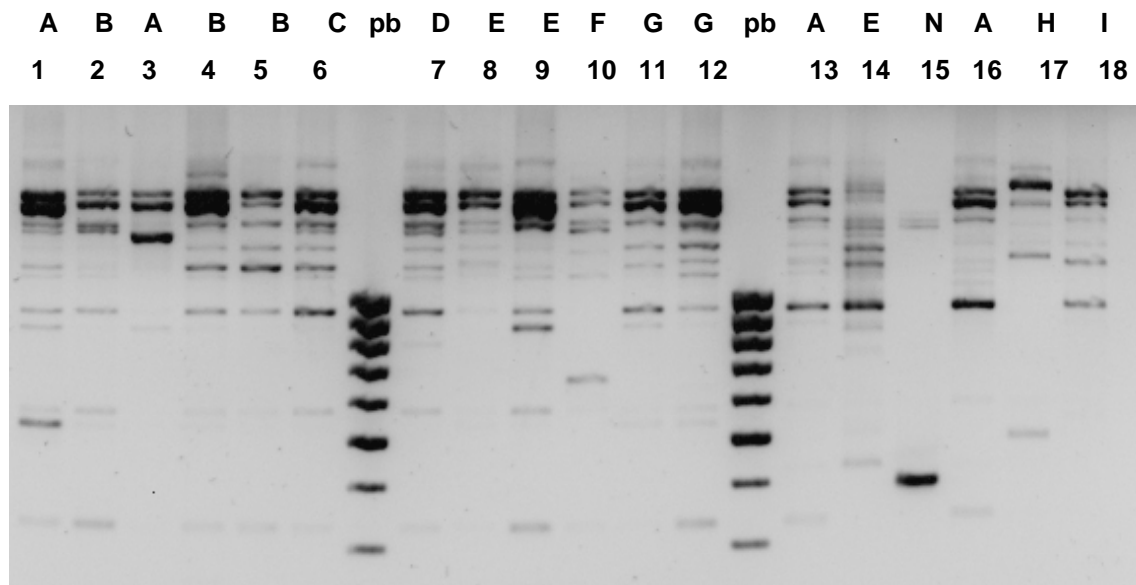
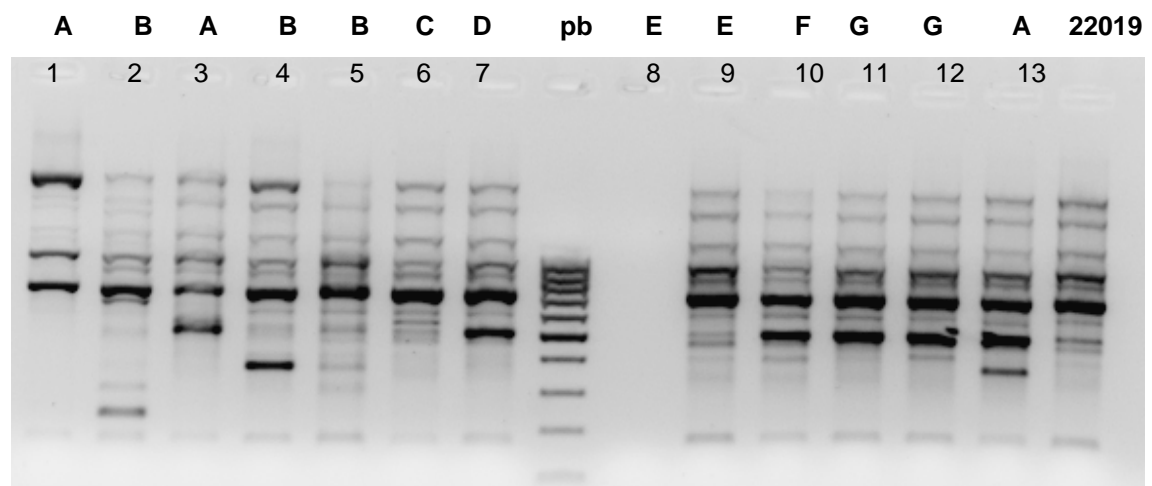


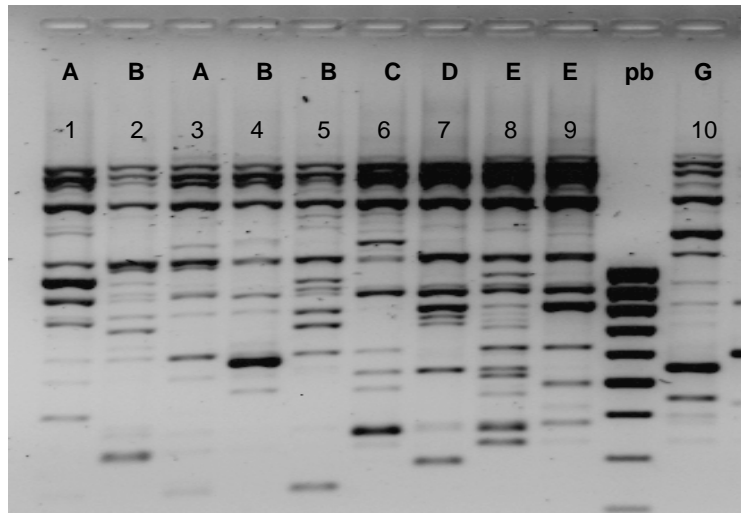
Fig 19: Patrones de bandas correspondientes al cebador **OPA-10**. A-N: Pacientes. 1-18: nº de cepa. Pb: marcador molecular de 100 pb. 22019: *C. parapsilosis* sensu stricto ATCC 22019.



En el caso del cebador **OPE-10 (fig. 20)** obtenemos unos patrones con mayor número de bandas intensas que los anteriores, pero demasiado variables para que se puedan asociar un patrón con una especie del complejo, además observamos que los patrones no son reproducibles entre los distintos aislamientos de la misma cepa.

Así en los amplificadores de las cepas 2, 4 y 5 pertenecientes al paciente B son diferentes, y por tanto no se puede establecer un patrón que permita caracterizar los diferentes aislamientos.

Fig 20: Patrones de bandas obtenidos con el cebador **OPE -10**. A-G: Pacientes 1-10: nº de cepa. Pb: marcador molecular de 100 pb.



En el análisis de los patrones de amplificación además de lo visto hasta ahora, también podemos observar como con alguno de los cebadores obtuvimos patrones de bandas que nos permitieron la caracterización de los aislamientos.

Con el cebador **OPA-20 (fig.21)** obtenemos, además de patrones sencillos, patrones reproducibles entre aislamientos pertenecientes al mismo paciente y por otra parte claramente diferenciables cuando la cepa analizada pertenece a otra especie, como es el caso de la 15 que es una *Candida albicans* y tiene un patrón totalmente distinto.

En la **figura 22** que corresponde a la amplificación hecha con el cebador **RPO-2**, además de evidenciarse que los patrones de bandas son sencillos y fácilmente interpretables, se puede apreciar como cepas pertenecientes al mismo paciente presentan el mismo patrón. Este cebador da lugar a patrones con mayor número de bandas que **OPA-20**.

Fig 21: Patrones de bandas correspondientes al cebador **OPA-20**. **A-I:** Pacientes. **10-18:** nº de cepa. **pb:** marcador molecular de 100 pb. **PI:** patrón I, **PII:** patrón II, **Ca:** *C. albicans*.

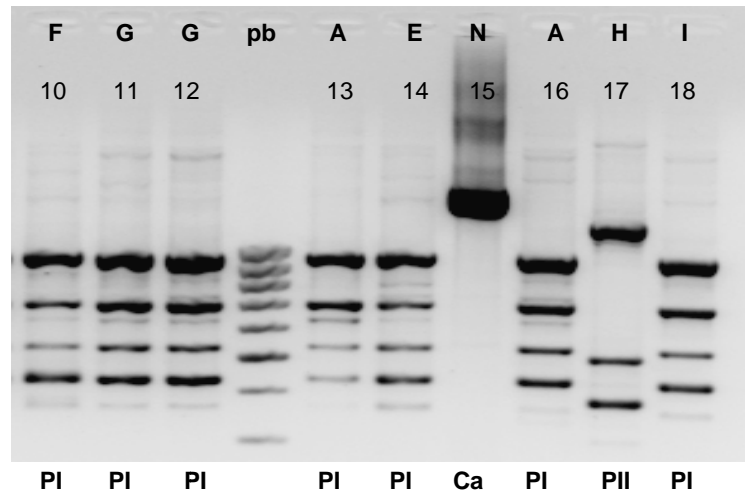
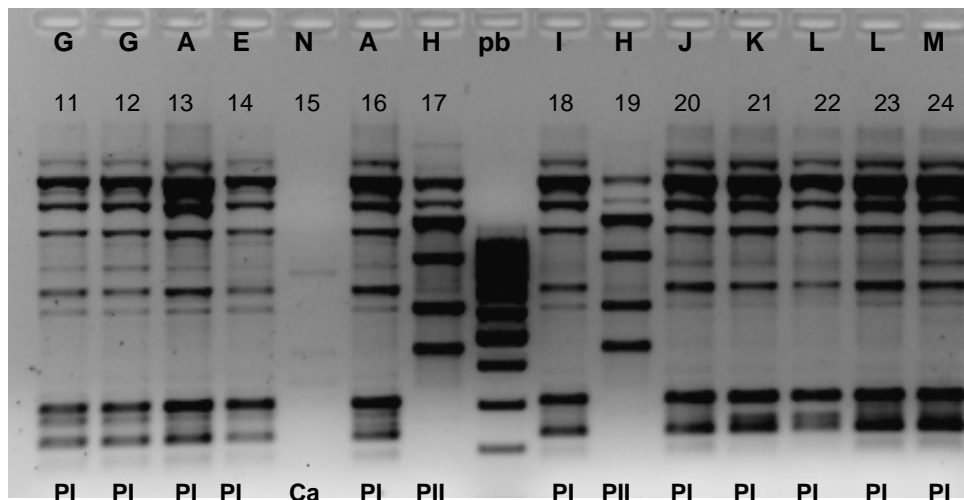


Fig 22: Patrones de bandas correspondientes al cebador **RPO2**. **A-M:** Pacientes. **11-24:** nº de cepa. **Pb:** marcador molecular de 100 pb. **PI:** patrón I, **PII:** patrón II, **Ca:** patrón correspondiente a *C. albicans*.



Con ambos cebadores, además del patrón correspondiente a *C. albicans*, observamos dos patrones, uno mayoritario, el **patrón I** y el **patrón II** que sólo aparece en las cepas 17 y 19. Además se obtenían patrones claramente distinguibles con las tres cepas de ATCC, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y *C. metapsilosis* ATCC 96144.

Si comparamos estos patrones con los obtenidos de las cepas de control de calidad, el **patrón I** corresponde a *C. parapsilosis* sensu stricto y el **patrón II** a *C. orthopsilosis*.

En el caso del aislamiento correspondiente a *C. albicans*, el producto de amplificación obtenido con el cebador **OPA-20** da lugar a una sola banda, y en el caso de **RPO-2** apenas se insinúan tres bandas, por tanto estos cebadores, aunque dan lugar a un patrón fácilmente distinguible del de *C. parapsilosis* complex, no son adecuados para la identificación de *C. albicans*.

Una vez descartados los cebadores **OPA-1**, **OPA-10**, **OPE-6**, **OPE-10** y **OPE-13**, entre los dos restantes, elegiremos para la identificación a nivel de especie del complejo “*psilosis*” al cebador **RPO-2** ya que se utiliza más en la literatura que el **OPA-20** y esto facilitara el análisis y comparación posterior de los resultados.

Con el cebador **RPO2 (Fig. 22)** obtuvimos 3 patrones, el **patrón I** es el mayoritario y corresponde con el de *C. parapsilosis* ATCC 22019, el **patrón II**, observado en los aislamientos 17 y 19 y que coincide con el de *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y el **patrón III** que únicamente lo produjo la cepa de *C. metapsilosis* ATCC 96144.

5.2.2.2. Identificación molecular de las cepas estudiadas de *C. parapsilosis* complex mediante RAPD-PCR y RFLP.

Como hemos puntualizado anteriormente, utilizaremos dos técnicas, la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR), concretamente, con el cebador **RPO-2**, seleccionado en el punto anterior y la técnica de PCR-RFLP, donde amplificaremos el gen *SADH* y posteriormente lo digeriremos con la enzima de restricción *BanI* comparando la capacidad de ambos métodos para discriminar entre especies.

El objetivo es comprobar si los patrones I, II y III, correspondientes a los patrones obtenidos de las cepas de ATCC 22019, 96139 y 96144 se corresponden con *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* según los fragmentos de restricción obtenidos mediante la digestión del fragmento correspondiente al gen *SADH*.

En ambas técnicas de biología molecular se incluyen como controles las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y *C. metapsilosis* ATCC 96144.

En la **tabla 13** se recoge el tipo de muestra a partir de los cuales se han aislado las cepas seleccionadas. Estas pertenecen cada una a pacientes diferentes, y son las cepas que utilizaremos de ahora en adelante tanto para las técnicas de biología molecular (RAPD-PCR) y (RFLP-PCR) como para detectar la capacidad de formación de biopelículas y, por último, su comportamiento frente a los antifúngicos tanto en forma planctónica como sésil (biopelícula) de la levadura.

Tabla 13: Procedencia de los aislamientos de *C. parapsilosis* complex.

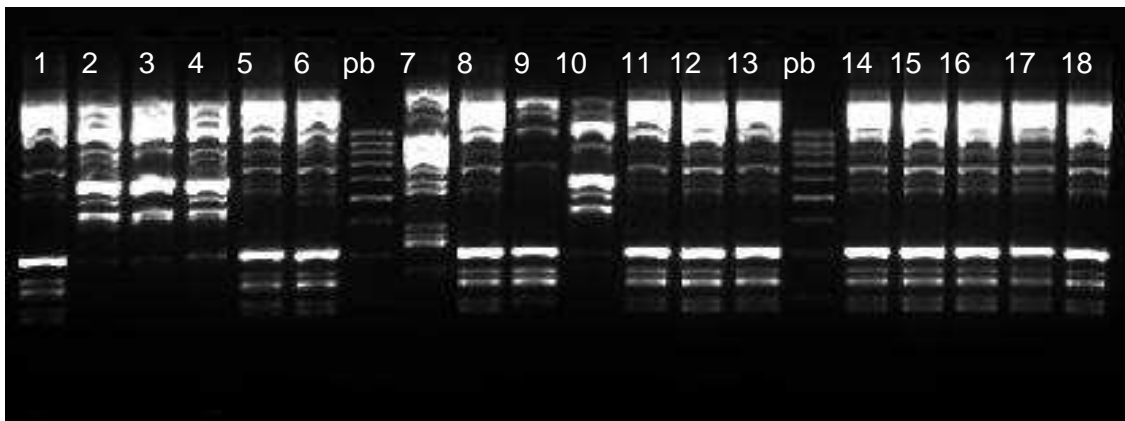
Procedencia de aislamiento	Nº de cepas
Absceso	3
Hemocultivo	62
Catéter	3
Ambiental hospitalario	1
Mucosa	7
Exudado herida	3
Ótico	19
Tracto respiratorio	2
Piel	18
Líquido sinovial	1
Orina	2
Válvula derivación de LCR	1
Total	122

A. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR).

Los 122 aislamientos clínicos se sometieron a la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR) para la identificación a nivel de especie de los aislamientos de *Candida parapsilosis* complex, esta técnica ha sido descrita brevemente en el punto 5.2.2.1.

En la **figura 23**, se observan patrones pertenecientes a las tres especies del complejo “*psilosis*”.

Fig 23: Patrones de RAPD-PCR obtenidos de aislamientos de *C. parapsilosis* complex con el cebador **RPO2**. Carriles 1,5,6,8,9,11-18 presentan perfiles de RAPD representativos de *C. parapsilosis* **grupo I**, carriles 2-4 y 10, **grupo II** y carril 7, **grupo III**.



B. Restricción de fragmentos polimórficos (RFLP-PCR).

Esta técnica se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas.

Para diferenciar las 3 especies pertenecientes al complejo “*psilosis*” se amplificó un fragmento del gen *SADH* de *C. parapsilosis* complex (716 pb). De acuerdo con el patrón de restricción con la enzima *BanI* del gen *SADH* mencionado anteriormente, los aislamientos fueron discriminados por el tamaño de los fragmentos como *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

C. parapsilosis sensu stricto tiene un lugar de restricción con *BanI*, en la posición 196, *C. orthopsilosis* no tiene ninguno y *C. metapsilosis* tiene tres lugares de restricción con *BanI* (96, 469 y 529 pb), como se representa en la **figura 24**.

Fig 24: Posiciones de los puntos de corte con la enzima *BanI* en el amplicón *SADH* de 716pb para diferenciar entre las 3 especies del complejo “*psilosis*”.

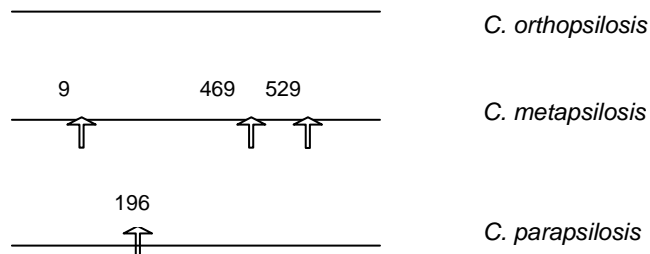
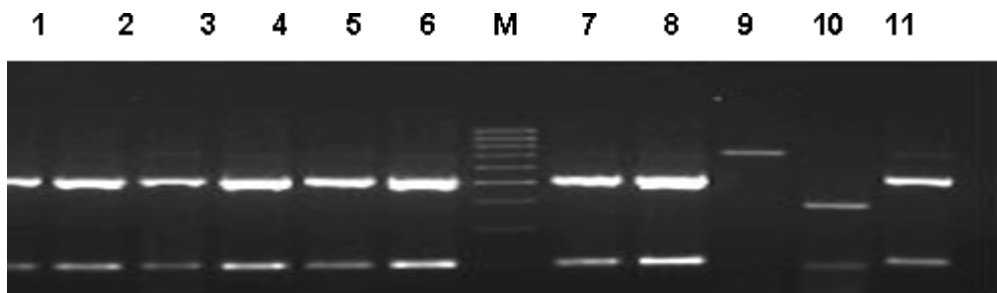


Fig 25: Patrones de restricción con *BanI* obtenidos a partir de la amplificación de *SADH*. *C. metapsilosis* (carril 10), *C. orthopsilosis* (carril 9) y *C. parapsilosis* sensu stricto (carril 1-8 y 11), Carril M, escalera de peso molecular de 100-pb.



Una vez realizadas las dos técnicas en los 122 aislamientos, podemos comprobar que hay correspondencia entre ellos, a la hora de separar por especies.

Podemos comprobar que los aislamientos que mediante RAPD PCR produjeron el **patrón I**, mediante el RFLP fueron identificadas como *C. parapsilosis* sensu stricto, las del **patrón II** como *C. orthopsilosis* y las del **patrón III** como *C. metapsilosis*, por tanto comprobamos que hay correlación entre los métodos y que los dos permiten la identificación de las especies que componen el complejo “*psilosis*”.

La distribución de las tres especies se detalla en la **Tabla 14**, 111 (90,98%) de los aislamientos fueron identificados como *C. parapsilosis* sensu stricto, 10 (8,19%) como *C. orthopsilosis* y 1 (0,81%) como *C. metapsilosis*. Si atendemos a la procedencia de la muestra, observamos que de las 10 cepas identificadas como *C. orthopsilosis*, 6 procedían de sangre, 3 de muestras óticas y 1 de una muestra de orina, y en el caso de la única cepa identificada como *C. metapsilosis* el origen de la muestra fue la piel.

Tabla 14: Distribución de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* en los 122 aislamientos de *C. parapsilosis* complex.

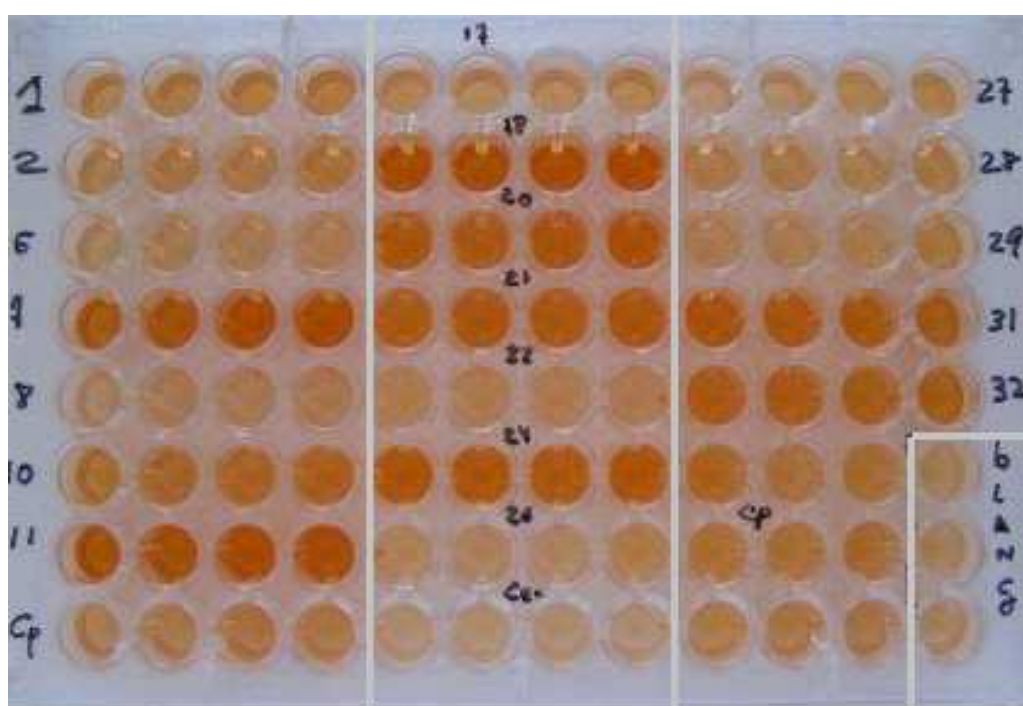
Lugar de aislamiento	Nº de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto	Nº de <i>C. orthopsilosis</i>	Nº de <i>C. metapsilosis</i>	Nº de cepas
Absceso	3	0	0	3
Hemocultivo	56	6	0	62
Catéter	3	0	0	3
Ambiental	1	0	0	1
Mucosas	7	0	0	7
Exudado herida	3	0	0	3
Ótico	16	3	0	19
Tracto respiratorio	2	0	0	2
Piel	17	0	1	18
Líquido sinovial	1	0	0	1
Orina	1	1	0	2
LCR valvular	1	0	0	1
Total	111 (90, 98%)	10 (8, 19%)	1 (0, 81%)	122

5.3. Producción de biopelícula en *Candida parapsilosis* complex.

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de la formación de biopelículas y de la actividad antifúngica sobre las mismas es el propuesto por Ramage (109) y colaboradores, en el cual se forman las biopelículas sobre placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano.

En este método, la formación de la biopelícula y la actividad de los antifúngicos se miden por colorimetría utilizando una sal de tetrazolio (XTT) (**figura 26**).

Fig 26: Ensayo de formación de biopelículas de diferentes aislamientos de *C. parapsilosis* complex, mediante la reducción de una sal de tetrazolio. 1,2,6,7,8,10,11,17,17,18,20-22,24,26-29,31,32= nº cepas, Cp = *C. parapsilosis* ATCC 22019, Ca = *C. albicans* ATCC 90055.



Un total de 65 (53,2%) de los 122 aislamientos de *C. parapsilosis* complex mostraron capacidad de formación de biopelícula (**Tabla 16**). En cuanto a la relación entre procedencia de la muestra y la capacidad de formación de biopelículas, observamos que de las cepas procedentes de hemocultivos, 38 de 65 (58,4%) fueron productoras de biopelículas mientras que de las 57 cepas aisladas de otras localizaciones fueron productoras de biopelículas 27 (47,3%).

Al hacer el análisis estadístico, no encontramos diferencias significativas ($P>0,05$) en cuanto a formación de biopelículas entre aislamientos de *C. parapsilosis* complex procedentes de hemocultivos y los que proceden de otros tipos de muestras.

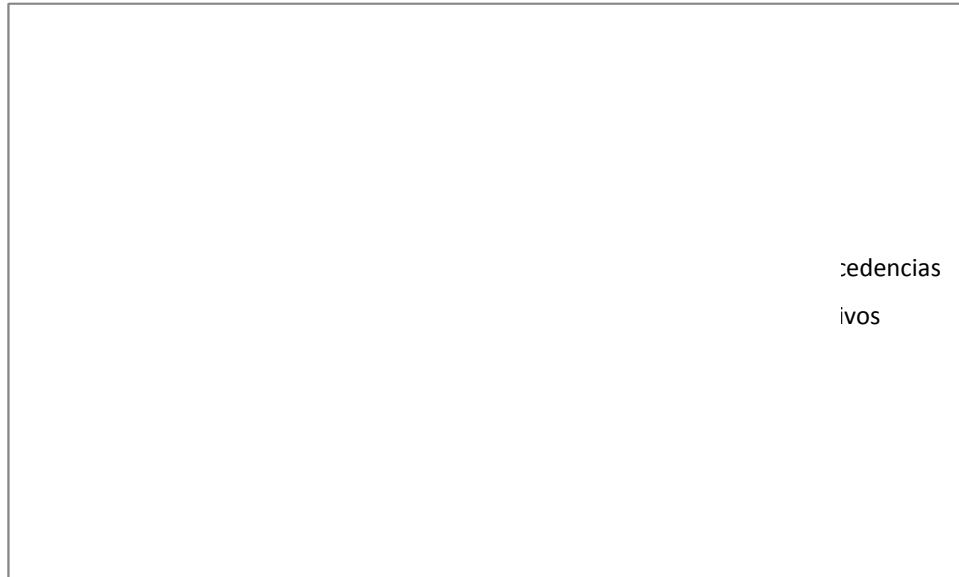
La cuantificación de biopelículas, así como su desglose por procedencia se recoge en la tabla y figura siguientes (**Tabla 15, fig 27**). Si cuantificamos la actividad metabólica de las biopelículas según la densidad óptica obtenida, los aislamientos se clasifican como **6+** ($DO \geq 1,301$), **5+** (1,000-1,300), **4+** (0,699-0,999), **3+** (0,398-0,699), **2+** (0,222-0,398) y **1+** ($DO \leq 0,222$).

Tabla 15: Cuantificación de formación de biopelículas en cepas procedentes de hemocultivos y otras localizaciones de *C. parapsilosis* complex. **Índice:** 5+; Densidad óptica (DO): 1,000-1,300, 4+; DO:0,699-0,999, 3+; DO: 0,398-0,699, 2+; DO: 0,222-0,398 y 1+: $DO \leq 0,222$.

Formación de biopelículas	Hemocultivos	Otras procedencias	Total
NO	27	30	57
1+	1	1	2
2+	17	9	26
3+	8	9	17
4+	12	6	18
5+	0	2	2
Total	65	57	122

En nuestro caso, del total de las 65 cepas que mostraron capacidad de formación de biopelículas, el 40% (26) de ellas se clasificaron con el índice **2+**, encontramos 17 cepas (26,1%) con el índice **3+** y 18 (27,7%) con el índice **4+**, mientras que sólo 2 aislamientos en cada caso (3%) produjeron biopelículas con índices de **1+** y **5+**.

Fig 27. Distribución de biopelículas de *C. parapsilosis* complex según el índice y la procedencia de la muestra. **Índice:** 5+; Densidad óptica (DO): 1,000-1,300, 4+; DO:0,699-0,999, 3+; DO: 0,398-0,699, 2+; DO: 0,222-0,398 y 1+: DO<=0,222.



Aunque la comparación de los índices entre los aislamientos procedentes de hemocultivos y los de otras procedencias es difícil, debido al escaso número de aislamientos que hay en cada categoría, parece que es similar entre ambos grupos ya que en el caso de los aislamientos procedentes de hemocultivo el 66,5% de los aislamientos tenían índice 2+ y 3+ y los de otras localizaciones el 65,3%.

Al analizar la capacidad de formación de biopelícula en cada una de las especies observamos que todos los aislamientos productores de biopelículas (65 de 122) habían sido previamente identificados como *C. parapsilosis* sensu stricto, mientras que ninguna de las cepas de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* mostró la capacidad de formar biopelículas *in vitro*.

Los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto procedentes de hemocultivos no demostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en cuanto a formación de biopelículas con respecto a los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto de otras procedencias (64,4% [38 de 59] versus 51,9% [27 de 52]).

Tabla 16: Comparación de formación de biopelícula entre aislamientos de *Candida parapsilosis* complex procedentes de hemocultivos y otras localizaciones.

Especies del complejo “ <i>psilosis</i> ” (nº de aislamientos)	Nº de biopelículas/total nº (%)		
	Hemocultivos	Otras Procedencias	Total
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (111)	38/59 (64,4%)	27/52 (51,9%)	65/111 (58,5%)
<i>C. orthopsilosis</i> (10)	0/6 (0%)	0/4 (0%)	0/10 (0%)
<i>C. metapsilosis</i> (1)	-	0/1 (0%)	0/1 (0%)
Total <i>C. parapsilosis</i> complex (122)	38/65 (58,4%)	27/57 (47,3%)	65/122 (53,2%)

5.4. Determinación de la sensibilidad a los antifúngicos.

5.4.1. Determinación de la actividad de voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre células planctónicas de *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antifúngicos frente a los microorganismos se realizó mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo las directrices del documento M27-A3 del CLSI (89). Los resultados de sensibilidad antifúngica a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina se presentan en las siguientes tablas, incluyendo valores de rangos de CMI, CMI₅₀ y CMI₉₀.

Todos los aislamientos fueron sensibles a voriconazol (**Tabla 17**), siendo el rango de CMI de <0,03 a 0,125 mg/l en el caso de las 111 cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto, CMI₅₀ inferior a 0,03 mg/l y CMI₉₀ 0,03 mg/l, mientras que en las 10 cepas de *C. orthopsilosis* el rango de CMI fue de 0,03 a 0,5 mg/l, CMI₅₀: 0,06 mg/l y CMI₉₀: 0,125 mg/l, por último, la única cepa de *C. metapsilosis* presentó una CMI de 0,06 mg/l.

Tabla 17: Actividad *in vitro* de voriconazol en cepas de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Especie	Voriconazol (mg/l)				
	Nº cepas	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto	111	<0,03-0,125	<0,03	0,03	100
<i>C. orthopsilosis</i>	10	0,03-0,5	0,06	0,125	100
<i>C. metapsilosis</i>	1	0,06	-	-	-

Todos los aislamientos presentaron valores de CMI a anfotericina B muy homogéneos, siendo el rango de CMI de 0,125 a 1 mg/l, CMI₅₀: 1 mg/l y CMI₉₀: 1 mg/l (tabla 18).

En el caso de las 111 cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto, el rango de CMI frente a anfotericina B osciló entre 0,125 y 1 mg/l, y tanto la CMI₅₀ como la CMI₉₀ fueron igual a 1 mg/l. En las 10 cepas de *C. orthopsilosis* el rango de CMI fue de 0,25 a 1 mg/l, CMI₅₀: 0,5 mg/L y CMI₉₀: 1 mg/l. Por último, la única cepa de *C. metapsilosis* presentó una CMI de 0,5 mg/l.

Tabla 18: Actividad *in vitro* de anfotericina B en cepas de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Especie	Anfotericina B (mg/l)				
	Nº	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto	111	0,125-1	1	1	100
<i>C. orthopsilosis</i>	10	0,25-1	0,5	1	100
<i>C. metapsilosis</i>	1	0,5	-	-	-

En la **tabla 19**, podemos observar los valores de CMI de las distintas especies obtenidos frente a anidulafungina, el rango de CMI para los 111 aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto osciló entre 0,5 y 4 mg/l, y tanto la CMI₅₀ como la CMI₉₀ fueron igual a 2 mg/l. El rango de CMIs correspondientes a los aislamientos de *C. orthopsilosis* fue de 0,5 a 2 mg/l, y la CMI₅₀ y CMI₉₀ igual a 1 mg/l. El único aislamiento identificado como *C. metapsilosis* tuvo una CMI de 1 mg/l. De los 111 aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto, 2 presentaron una CMI de 4 mg/l, por tanto los tenemos que clasificar como “no sensibles”.

Tabla 19: Actividad *in vitro* de anidulafungina en cepas de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Especie	Anidulafungina (mg/l)				
	Nº	Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	%S
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto	111	0,5-4	2	2	98,2
<i>C. orthopsilosis</i>	10	0,5-2	1	1	100
<i>C. metapsilosis</i>	1	1	-	-	-

En la **tabla 20** recogemos todos los datos de CMI de voriconazol, anfotericina B y anidulafungina frente a las 3 especies del complejo “*psilosis*” en forma planctónica. Todos los aislamientos fueron sensibles a voriconazol y anfotericina B, sólo 2 (1,8%) aislamientos de *C. parapsilosis sensu stricto* fueron no sensibles (NS) a anidulafungina.

La actividad global de voriconazol, anfotericina B y anidulafungina fue similar en las tres especies del complejo *psilosis*, la mayoría de los aislamientos fueron inhibidos por concentraciones <0,125 mg/l de voriconazol, 1 mg/l de anfotericina B y 2 mg/l de anidulafungina. Sin embargo, la CMI₉₀ de voriconazol fue mayor (0,125 mg/l) para *C. orthopsilosis* comparado con CMI₉₀ de *C. parapsilosis sensu stricto* (0,03 mg/l).

Tabla 20: Tabla resumen de Actividad *in vitro* de voriconazol, anfotericina B y voriconazol, anfotericina B y anidulafungina en cepas de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

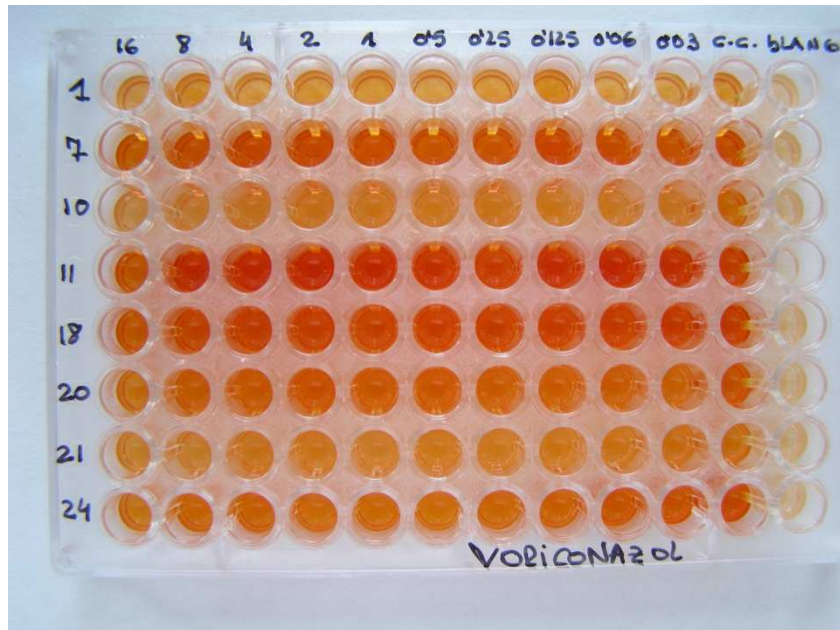
Especies (nº aislamientos)	Antifúngicos	CMI (mg/l) Rango	CMI ₅₀ (mg/l)	CMI ₉₀ (mg/l)	% S
<i>C. parapsilosis</i> (n=111)	VRC	<0,03-0,125	<0,03	0,03	100%
	AMB	0,125-1	1	1	100%
	ANI	0,5-4	2	2	98,2%
<i>C. orthopsilosis</i> (n=10)	VRC	0,03-0,5	0,06	0,125	100%
	AMB	0,25-1	0,5	1	100%
	ANI	0,5-2	1	1	100%
<i>C. metapsilosis</i> (n=1)	VRC	0,06	-	-	-
	AMB	0,5	-	-	-
	ANI	1	-	-	-

5.4.2. Determinación de la sensibilidad a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre células sésiles de *C. parapsilosis sensu stricto*.

El estudio de la sensibilidad *in vitro* a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina de las biopelículas se llevo a cabo mediante el ensayo de reducción de sales de tetrazolio (XTT). Se prepararon diluciones de los antifúngicos (0,03-16 mg/l) que se añadieron a biopelículas de 48h de maduración y se incubaron otras 48 h a 37°C (**figura 28**). Este ensayo se realizó por triplicado en días diferentes.

Se determinó la actividad antifúngica *in vitro* de voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre las células sésiles de los 65 aislamientos de *C. parapsilosis sensu stricto* productores de biopelícula.

Fig 28. Determinación de sensibilidad a voriconazol sobre biopelículas de *C. parapsilosis* sensu stricto. **11, 7, 10, 11, 18, 20, 21, 24** = N° de la cepa sobre las que se están ensayando concentraciones de voriconazol de 0,03 a 16 mg/l. **CC:** corresponde a suspensión de levaduras sin antifúngico y **blanco** sólo contiene RPMI.



Al analizar los resultados, excluimos 6 aislamientos, ya que los resultados carecían de reproducibilidad entre repeticiones y de linealidad entre los valores de densidad óptica y las diferentes concentraciones de antifúngicos. Observamos que los índices de producción de biopelículas de estos aislamientos, fueron: **1+** en dos de los aislamientos y **2+** en los 4 aislamientos restantes.

En las siguientes tablas (**Tablas 21, 22 y 23**) se muestran los resultados de la actividad de los antifúngicos ensayados sobre células planctónicas y sésiles de los 59 aislamientos seleccionados.

La CMI de las células en la biopelícula (**CMIB**) se definió como la concentración más baja de antifúngico capaz de producir una reducción de la densidad óptica mayor o igual al 50% (**CMIB₅₀**) y al 80% (**CMIB₈₀**), respectivamente en comparación al control de crecimiento (109).

El rango de CMI de las células planctónicas frente a voriconazol osciló entre 0,015 y 0,06 mg/l, CMI₅₀ 0,015, CMI₉₀ 0,03 µg/ml siendo la media geométrica (MG): 0,022 mg/l. En el caso de las células sésiles la CMIB₅₀ osciló entre 0,5->16 mg/l, MG:

11,51 mg/l y la CMIB₈₀ osciló entre 2 ->16 mg/l, (MG): 26,50 mg/l y la mediana de CMIB₅₀ y CMIB₈₀ fueron de 8 mg/l y >16 mg/l respectivamente.

Tabla 21: Distribución de CMI para células planctónicas (CMI) y sésiles (CMIB) frente a voriconazol. **CMIB₅₀** y **CMIB₈₀**: concentraciones de antifúngico a las cuales se produce una disminución de la DO de un 50% y un 80% con respecto al pocillo control.

Tipo de CMI	Nº de aislamientos con CMI (mg/l) frente a voriconazol de:											
	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
CMI	36	19	4									
CMIB₅₀		1		1		2	4	5	14	14	5	13
CMIB₈₀								2	2	2	6	45

Al analizar estos datos observamos que mientras voriconazol muestra una alta actividad frente a las células planctónicas, es inactivo frente a las mismas células cuando forman parte de las biopelículas.

El rango de CMI para células planctónicas a anfotericina B fue 0,25-1 mg/l y la MG: 0,66 mg/l, la CMIB₅₀, osciló de 0,03-0,5 mg/l y la MG: 0,125 mg/l y la CMIB₈₀ osciló de 0,125-2 mg/l y la MG: 0,78 mg/l. Por tanto, anfotericina B muestra actividad frente a biopelículas de *C. parapsilosis* sensu stricto de 48 horas de maduración.

Tabla 22: Distribución de CMI para células planctónicas (CMI) y sésiles (CMIB) frente a anfotericina B. **CMIB₅₀** y **CMIB₈₀**: concentraciones de antifúngico a las cuales se produce una disminución de la DO de un 50% y un 80% con respecto al pocillo control.

Tipo de CMI	Nº de aislamientos con CMI (mg/l) frente a anfotericina de:											
	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
CMI					1	24	34					
CMIB₅₀		10	6	22	10	11						
CMIB₈₀				13	5	15	12	14				

El rango de CMIB₅₀ en el caso de anidulafungina, osciló entre 0,03 y 16 mg/l, la media geométrica MG: 4,135 mg/l y el rango de CMIB₈₀: 0,5 - >16 mg/l, la media geométrica MG: 8,82 mg/l, en cuanto a las medianas fueron 2 mg/l (CMIB₅₀) y 4 mg/l (CMIB₈₀), respectivamente.

Tabla 23: Distribución de CMI para células planctónicas (CMI) y sésiles (CMIB) de *C. parapsilosis* sensu stricto frente a anidulafungina. **CMIB₅₀** y **CMIB₈₀**: concentraciones de antifúngico a las cuales se produce una disminución de la DO de un 50% y un 80% con respecto al pocillo control.

Tipo de CMI	Nº de aislamientos con CMI (mg/l) frente a anidulafungina de:											
	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
CMI						1	14	44				
CMIB₅₀		1	1	1	1	7	12	10	12	8	6	
CMIB₈₀						3	5	13	8	17	6	7

Para estas mismas cepas, la CMI de las células planctónicas a anidulafungina osciló entre 0,5-2 mg/l, y la media geométrica (MG) fue 1,73 mg/l. Observamos que el valor de la media geométrica de CMIB₅₀ se triplica con respecto a la media de CMI planctónica.

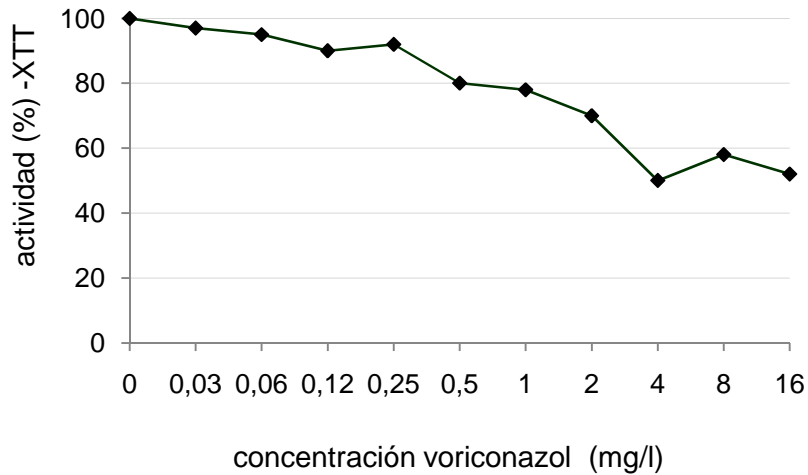
Las figuras **29**, **30** y **31** muestran las curvas de inhibición de crecimiento de biopelícula como porcentaje acumulado para *Candida parapsilosis* sensu stricto en presencia de diferentes concentraciones de voriconazol, anidulafungina y anfotericina B.

El efecto inhibitorio de cada concentración de antifúngico fue determinado mediante el ensayo de reducción de XTT, determinado como la media de DO de todos los pocillos que contienen antifúngico y expresado como el porcentaje de DO de los pocillos de control (pocillos sin antifúngico) considerados como el 100%.

A la hora de analizar los datos correspondientes a voriconazol, observamos que el 100% de las cepas son sensibles a este agente con CMI muy bajas cuando se encuentran en forma planctónica, sin embargo cuando determinamos la actividad de voriconazol frente a células sésiles de estas cepas, la CMIB₅₀ fue igual o superior a 4 mg/l (R según CLSI) en 46 de las 59 cepas estudiadas (77,9%) y la CMIB₈₀ lo fue en

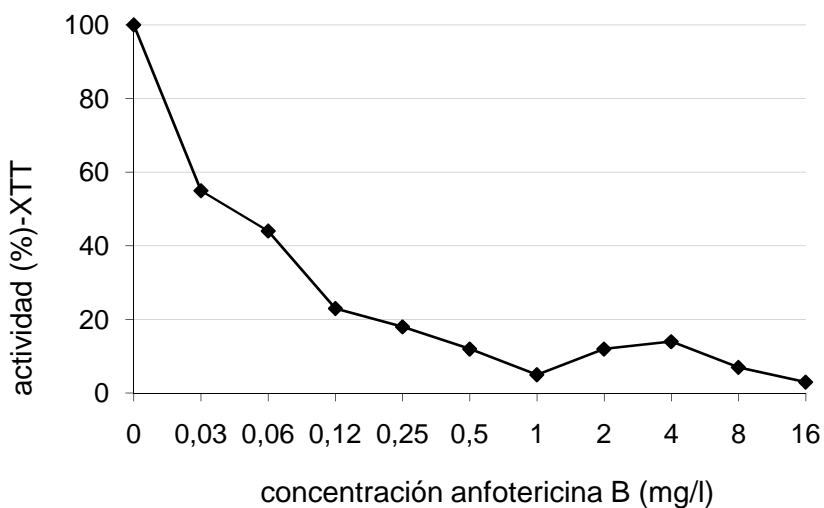
55 de 59 (93,2%). Estos datos ponen de manifiesto el acusado incremento en los valores de CMI frente al voriconazol entre células planctónicas y las sésiles.

Fig.29: Porcentaje acumulado de la actividad de voriconazol sobre biopelículas formadas por aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto.



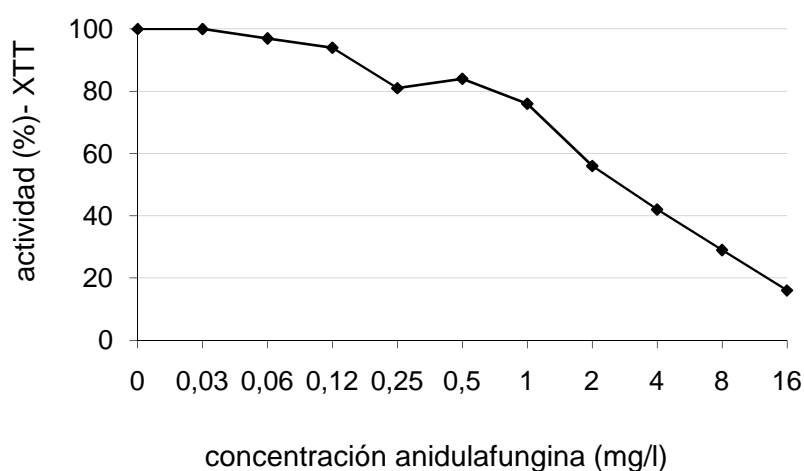
En el caso de anfotericina B observamos que, sobre células planctónicas, los 59 aislamientos presentaron unas CMI ≤ 1 mg/l, y en el caso de las biopelículas, todos los aislamientos presentaron una CMIB₅₀ ≤ 1 mg/l y el 23,7% (14) de los aislamientos presentó una CMIB₈₀ igual a 2 mg/l.

Fig.30: Porcentaje acumulado de la actividad de anfotericina B sobre biopelículas formadas por aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto



Candida parapsilosis muestra CMI más altas a anidulafungina que la mayoría de las especies de *Candida*, así 44 de las 59 cepas (74,5%) presentaron una CMI sobre células planctónicas de 2 mg/l, y estas concentraciones aumentan notablemente en el caso de las biopelículas, donde el 44% de los aislamientos presento una CMIB₅₀ superior a 2 y el 64% lo hizo en el caso de la CMIB₈₀.

Fig.31: Porcentaje acumulado de la actividad de anidulafungina sobre biopelículas formadas por aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto.



En resumen, en los 122 aislados de nuestro estudio se determinó la actividad *in vitro* a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre células planctónicas y obtuvimos como resultados que todos los aislamientos fueron sensibles a voriconazol y anfotericina B y sólo 2 (1,8%) aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto fueron no sensibles (NS) a anidulafungina. Mientras que en el caso de los 59 aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto productores de biopelícula, observamos que voriconazol es totalmente inactivo, mientras que anfotericina B y anidulafungina muestran actividad frente a las células que forman parte de la biopelículas. En el caso de anidulafungina, obtenemos CMIB mayores.

Discusión

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

6. DISCUSIÓN

Las infecciones invasoras producidas por *Candida* spp han aumentado considerablemente en los últimos años y se están convirtiendo en una causa importante de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunocomprometidos (9).

En Estados Unidos, en un estudio realizado en 180 hospitales de todo el país entre los años 1980 y 1989, la tasa de fungemia aumentó en un 75% en hospitales comarcales y en un 370% en hospitales especializados no universitarios (111), en hospitales terciarios, entre 1980 y 1992 aumentó de un 5,4% a un 9,9% y *Candida* spp fue el cuarto microorganismo más frecuentemente aislado en las sepsis (111-113).

En 1989, casi el 80% de las candidemias eran causadas por *C. albicans* (114), pero durante la década de los 90 se observó un cambio epidemiológico, aumentando la candidemia por especies diferentes a *C. albicans*, especialmente por *C. glabrata* en Estados Unidos y por *C. parapsilosis* complex y *C. tropicalis* en Europa (1).

Entre los diferentes factores que han condicionado este cambio, hay que destacar, además de la presión farmacológica debida al uso generalizado de fluconazol, otras variables como la edad del paciente, el servicio de ingreso, la enfermedad de base y el grado de cumplimiento de las políticas de antibióticos locales (115,116).

En la revisión realizada por Trofa y colaboradores (9) se recogen los porcentajes correspondientes a las candidemias detectadas en todo el mundo, desde 1991 a 2008 de 18.454 aislamientos de los cuales, el 49,8% corresponde a *C. albicans*,

19% a *C. parapsilosis* complex, 14,8% *C. glabrata*, 10,9% *C. tropicalis* y el 5,5% corresponde a otras especies.

En el primer estudio poblacional realizado en España, Almirante y colaboradores (16) se centraron en el área de Barcelona durante 2002-2003 y encontraron que *C. albicans* fue el agente etiológico del 51% de las candidemias, *C. parapsilosis* complex del 23%, *C. tropicalis* del 10%, *C. glabrata* del 9% y *C. krusei* del 4%.

En el periodo 2003-2009 en el H.U Virgen del Rocío *C. albicans* fue la especie de *Candida* más frecuentemente aislada en los hemocultivos (35,5%) seguida de *C. parapsilosis* complex con el 26,5%, *C. tropicalis* con el 21,9%, *C. glabrata* con el 6,6% y el 9,5% correspondiente a otras especies.

Aunque nuestro porcentaje de aislamientos de *C. albicans* es más bajo que el de otros trabajos (9, 16, 117), la distribución de las especies es similar a la que encontramos en nuestro medio y vemos que *Candida* no *albicans* han desplazado a *C. albicans*.

En los últimos años la incidencia de *C. parapsilosis* complex ha aumentado notablemente. En nuestro caso, uno de los motivos que nos impulsó al estudio de *C. parapsilosis* complex fue el incremento registrado en 2004, año en que *C. parapsilosis* complex fue el agente etiológico del 40% de las candidemias registradas en el H.U Virgen del Rocío y que en su mayoría afectaban a neonatos. Globalmente, *C. parapsilosis* complex ha sido la segunda especie de *Candida* más aislada en las candidemias en nuestro hospital como también ocurre en numerosos trabajos (9, 15, 16, 117).

Sabemos que la incidencia de Candidiasis invasora varía geográficamente, si atendemos a la distribución geográfica y al porcentaje de Candidiasis invasora producida por *C. parapsilosis* complex, vemos que supone el 15% de los aislamientos de *Candida* en América del norte, el 23,4% en América latina y el 23% en Europa (15), y en un estudio multicéntrico realizado en España (117) encuentran que *C. parapsilosis* complex produce el 30% de las Candidemias ocasionadas por levaduras y el 23% en el caso del estudio realizado en Barcelona (16). Según los datos recogidos en H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-09, a *C. parapsilosis* complex se atribuye el 26,5% de todos los episodios de Candidemia, siendo este porcentaje mayor que los recogidos en otros trabajos (9, 15, 16), por otra parte nuestro índice de candidemia es menor que el encontrado en el estudio multicéntrico realizado en España que es del 30% (117).

Entre Enero 2003 y Diciembre de 2009 se documentaron 456 casos de candidemia entre los pacientes ingresados en el H.U Virgen del Rocío. La incidencia media anual de las candidemias detectadas en el H.U Virgen del Rocío respecto a la población de la provincia de Sevilla fue de 3,4 candidemias por cada 100.000 habitantes y 1,2 candidemias por cada 1.000 ingresos hospitalarios. La incidencia media de candidemias en Barcelona (16) es similar a la nuestra con 4,3 casos por 100.000 habitantes y además concuerda con los datos provenientes del norte de Europa donde las incidencias tienen unos valores que van de 1,7 a 4,9 casos por 100.000 habitantes (118, 119). La incidencia media de candidemias acontecida en Estados Unidos es mayor a las anteriormente comentadas con índices de 6 a 10 casos por 100.000 habitantes (120- 122).

La incidencia media anual de candidemias por *C. parapsilosis* complex, en el periodo que va desde Enero de 2003 hasta Diciembre de 2009 en el H.U Virgen del Rocío, fue de 0,90 por cada 100.000 habitantes y 0,32 candidemias por *C. parapsilosis* complex por cada 1.000 ingresos. En un estudio de Almirante y colaboradores en el área de Barcelona (5) la media anual de la incidencia de fungemia por *C. parapsilosis* complex fue similar, 1 caso por cada 100.000 habitantes y 1,3 en el caso de Estados Unidos (120) y superior en el caso de Finlandia con una tasa de 0,3 casos por cada 100.000 habitantes (119).

Existen una serie de factores relacionados que influyen en la especie de *Candida* aislada en los hemocultivos. En el caso de *C. parapsilosis* complex, el incremento de la frecuencia de infección se atribuye a varios factores de riesgo, que incluyen la capacidad de crecimiento del microorganismo en nutriciones parenterales y su afinidad a materiales protésicos y catéteres (7, 18, 28, 30, 45, 57, 123-125). Los individuos inmunocomprometidos como los infectados por el VIH y pacientes sometidos a cirugía, particularmente del tracto gastrointestinal, tienen mayor riesgo de infecciones por *C. parapsilosis* complex. Además, en pacientes que requieren uso prolongado de catéter central o de dispositivos intravasculares, como los pacientes oncológicos, se incrementa el riesgo de infección por esta levadura. En un estudio de fungemias realizado durante 9 años, en pacientes con leucemia en un hospital universitario Italiano, se recogieron 79 casos de fungemia en 77 pacientes, de estos 19 fueron causados por *C. parapsilosis* complex (20,3%) y esta se asoció con mayor frecuencia al uso de catéter central y a nutrición parenteral que otras especies de levaduras (20). La asociación de *C. parapsilosis* complex con la candidemia relacionada con catéter puede explicarse por la especial afinidad de esta especie por

el material sintético y su papel como colonizadora de la piel, tanto de los pacientes como del personal sanitario (7, 30, 126).

El estudio de Almirante y colaboradores (5) realizado recientemente en Barcelona identifica como factores de riesgo: catéteres (97%), antibioticoterapia previa (91%), nutrición parenteral (54%), cirugía previa (46%), terapia inmunosupresora previa (38%), cáncer (27%), receptor de trasplante (16%), neutropenia (12%) o colonización previa (11%).

La población con mayor riesgo de adquirir una infección nosocomial por *C. parapsilosis* complex son los neonatos de muy bajo peso. La colonización de la piel o del tracto gastrointestinal es, frecuentemente, el primer paso en la patogenia de la infección invasora por *C. parapsilosis* complex, y los neonatos son especialmente propensos a esta infección debido a que la integridad de su piel está comprometida, son más proclives a las infecciones del tracto digestivo y suelen tener necesidad de catéteres e intubación endotraqueal durante largo tiempo (22).

Las infecciones por *Candida* spp constituyen una causa importante de morbilidad en los pacientes ingresados en las UCIs neonatales, ya que en estos pacientes convergen una serie de factores de riesgo que favorecen la infección fúngica. Así, como factores intrínsecos destacamos la edad gestacional menor a 30 semanas y el bajo peso en el nacimiento. La alta incidencia de *C. parapsilosis* complex entre la población pediátrica ha sido descrita en múltiples estudios epidemiológicos (5, 127), por ejemplo Rodríguez y colaboradores (128) encuentran que *C. parapsilosis* complex es la especie más frecuentemente aislada en las candidemias neonatales.

En las candidemias por *C. parapsilosis complex* detectadas en el H.U Virgen del Rocío, la distribución de edades de los pacientes concuerda con los datos existentes (5, 9), ya que observamos que el 60,4% de estas se produjeron en niños, dentro de este grupo hay que destacar que el 44% eran neonatos. En cuanto a las candidemias acontecidas en adultos, el 23,5% de ellas se presentaron en mayores de 65 años.

En relación a la ubicación de los pacientes, también haremos distinción entre adultos y niños. En el caso de los adultos podemos destacar que el 42% de ellos estaban ingresados en un servicio de cirugía, 32,3% en UCI y 11,7% en oncología. La procedencia de los aislamientos por servicios en el caso de los niños fue en el 38,5% de los casos neonatología, el 23% en UCI (17,3% UCI pediátrica y 5,8% UCI neonatal), y el 21,5% de los niños estaban ingresados en pediatría general.

Aunque nuestro trabajo no es un estudio epidemiológico exhaustivo, de los datos de las candidemias por *C. parapsilosis* complex que pudimos extraer mediante

la revisión de historias clínicas observamos que los factores predisponentes son similares a los de otros trabajos, siendo en el caso de los adultos la cirugía previa en el 47% de los casos y la prematuridad en los niños en el 28,9% (5, 9).

La identificación de la especie de toda levadura aislada en sangre o en cualquier otro líquido corporal estéril está plenamente justificada. También es conveniente la identificación de levaduras de otras procedencias, sobre todo cuando ocurre de forma reiterada en diferentes muestras clínicas del mismo paciente, y siempre que se asuma que se trata de un organismo responsable de patología.

Debido a los problemas en la clasificación tradicional de las levaduras dentro del género *Candida*, se necesitan técnicas moleculares para identificar y clasificar las especies de levaduras medicamente importantes. Esto ayuda a entender las relaciones de evolución entre estos organismos. Así, la aplicación de procedimientos moleculares ha desembocado, en algunos casos, en la reclasificación de determinadas especies (45).

El análisis genético de *C. parapsilosis* se ha visto dificultado por la falta de un ciclo sexual caracterizado, y por no tener una herramienta molecular apropiada (23). Ya en 1984, trabajos como el de Scherer y Stevens (10) mostraron que los aislamientos de *C. parapsilosis* eran genéticamente más heterogéneos que otras especies de *Candida*, estos autores (10) usaron como método de identificación la técnica de PCR- RFLP con el que consiguieron separar los aislamientos clínicos de *C. parapsilosis* en tres grupos diferenciados (con 5 subtipos). En estudios siguientes (26) se describieron nuevos subtipos, siendo el más frecuente el RFLP subtipo I-VII. Lehmann y colaboradores (129) analizando los perfiles obtenidos mediante amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR) observaron tres grupos entre los aislamientos clínicos de *C. parapsilosis*, con una mínima heterogeneidad intragrupo. Igualmente, Lin y colaboradores (126) caracterizaron los tres grupos mediante las diferencias en los perfiles de las isoenzimas y los espacios internos de transcripción (ITS1) y comprobaron que estos concordaban con los patrones obtenidos mediante RAPD-PCR.

Según Tavanti y colaboradores (11) las diferencias entre las secuencias de ADN de *C. parapsilosis* I, II y III son tan grandes que no es posible seguir tratándolos como subespecies y son ellos los que han propuesto la nueva nomenclatura, esto es *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* respectivamente. El nivel de diferencias en las secuencias ITS1 son de la misma magnitud que las que tienen lugar entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*. A pesar de que el complejo "*psilosis*" se

conoce desde hace años, aún se sabe muy poco de la epidemiología de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Normalmente, la identificación de las levaduras en un laboratorio clínico se lleva a cabo mediante el estudio de las características morfológicas, bioquímicas y de asimilación de sustrato, en nuestro caso, hemos constatado la laboriosidad y la necesidad de experiencia por parte del microbiólogo para hacer la identificación a nivel de complejo además de, que como ya hicieran Tavanti y colaboradores (11), comprobar que no es posible la identificación a nivel de especie únicamente con el estudio de las características fenotípicas.

Nuestro objetivo es identificar las tres especies que forman parte del complejo, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* por tanto recurrimos a técnicas de biología molecular. Tras revisar la literatura sabemos que tanto la técnica de RAPD-PCR como RFLP-PCR pueden ser útiles para la identificación de estas especies. A la hora de seleccionar estas técnicas hay que tener claro el objetivo que se persigue, pues muchas de estas técnicas también pueden utilizarse con fines epidemiológicos, en nuestro caso buscamos técnicas que discriminen entre especies y que sean sencillas y fáciles de interpretar.

Uno de los factores que han limitado la utilización de la técnica RAPD-PCR en estudios de genética molecular es la reproducibilidad de la técnica. En el proceso de optimización observamos que tanto el número de bandas como la intensidad de las mismas, podían variar al cambiar las condiciones experimentales, lo que pone de manifiesto la necesidad de un proceso de estandarización antes de su utilización de forma sistemática, para obtener resultados comparables dentro del mismo laboratorio y que permitan la comparación con los resultados obtenidos en otros centros. Éstos dependen de las condiciones en que se realiza la técnica, constituyendo una variación que enmascara los resultados, pero que puede evitarse sometiendo a esta técnica a un proceso de puesta a punto, en el que se definan las condiciones bajo las cuales los patrones obtenidos sean fiables y reproducibles (57).

Por otra parte, necesitamos seleccionar el cebador más apropiado para nuestro objetivo. Después de analizar los patrones de bandas obtenidos con los 7 cebadores: OPA-1, OPA-6, OPA-10, OPA-20, OPE-10, OPE-13 y RPO2, observamos que tanto OPA-20 como RPO-2, a diferencia del resto, dan lugar a patrones de bandas sencillos y fácilmente interpretables que son adecuados para la identificación de especie dentro del complejo "*psilosis*". Finalmente optamos por seleccionar el RPO-2 ya que se utiliza más en la literatura (11, 130) que el OPA-20 y esto facilitara el análisis y comparación posterior de los resultados.

La técnica de PCR-RFLP se basa en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias polimórficas. Con esta técnica se estudia una región muy limitada del genoma, por lo que su poder de discriminación suele ser algo inferior al de otros métodos. En general, el poder de discriminación de esta técnica depende de una serie de factores como la especie del microorganismo, el gen analizado y el tipo de enzima de restricción. La ventaja principal de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de esta técnica y la reproducibilidad de los patrones de restricción.

Realizamos amplificación del gen *SADH* basándonos en unos trabajos de Tavanti y colaboradores (11, 131) donde eligen este gen después de haber comparado con otras técnicas el poder de resolución de la amplificación de 11 genes y su posterior digestión.

Tras seleccionar el cebador RPO2 para la técnica de RAPD-PCR y el gen *SADH* para la de PCR-RFLP estudiamos una colección de 122 cepas, identificadas fenotípicamente como *C. parapsilosis* complex, obteniendo resultados equivalentes con ambas técnicas. Tavanti y colaboradores (11, 131), después de la amplificación con el cebador RPO2, obtienen un perfil de bandas para *C. parapsilosis* y otro para *C. metapsilosis* mientras que en los 9 aislamientos de *C. orthopsilosis* obtienen cuatro perfiles diferentes identificados como B1-B4 e interpretan que *C. orthopsilosis* exhibe una variabilidad genética que da lugar a diferentes patrones, mientras que esto no ocurre con *C. parapsilosis* sensu stricto ni *C. metapsilosis*, bien es verdad que en el caso de *C. metapsilosis* esto puede deberse al escaso número de aislamientos disponibles.

A diferencia de ellos, nosotros obtenemos un solo patrón por especie y en el caso de *C. orthopsilosis*, el patrón que obtenemos coincide con el B2 de Tavanti y colaboradores (11) por lo que podemos interpretar que debido a las diferencias en la distribución geográfica de las distintas especies de *Candida*, en nuestro medio predomina la *C. orthopsilosis* cuyo perfil genético se ha clasificado como B2.

Al consultar la bibliografía, comprobamos que en ninguno de los trabajos realizados en la península Ibérica la técnica de biología molecular elegida para la identificación de especie permite comprobar o comparar el tipo de *C. orthopsilosis* circulante (18, 132). El único trabajo realizado en Barcelona (18) identifican las especies mediante la secuenciación de la región ITS1, clasificando a 67 aislamientos como *C. parapsilosis* sensu stricto, 6 como *C. metapsilosis* y 5 como *C. orthopsilosis*, pero en este caso donde encuentran variabilidad genética es entre los aislamientos de *C. metapsilosis*. Del otro trabajo, realizado en Portugal (132) no podemos deducir nada ya

que la identificación a nivel de especie fue únicamente realizada mediante la digestión del producto del gen *SADH*. Por tanto son necesarios nuevos estudios unificando la técnica utilizada para poder comparar los resultados posteriormente, que se centren en la variabilidad genética y lo hagan todos con la misma técnica.

Ambas son técnicas que se pueden implantar fácilmente en un laboratorio clínico, sin embargo RAPD-PCR con el cebador RPO2 en concreto, a pesar de los inconvenientes que presenta la técnica, es más sencilla, más económica y consume menos tiempo. Además, esta técnica también serviría para monitorizar la variabilidad genética en *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

En cuanto a la distribución de las especies dentro del complejo encontramos que *C. parapsilosis* sensu stricto representaba el 91% (111) mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* el 8,2% (10) y 0,8%, (1) respectivamente. De los 10 aislamientos identificados como *C. orthopsilosis* en nuestro estudio, 6 procedían de muestras de sangre lo que sugiere que esta especie puede comportarse como comensal humano pero también como patógeno. Entre nuestras cepas sólo encontramos una *C. metapsilosis* que procedía de una muestra de piel.

El estudio más importante en cuanto al número de cepas, es un estudio de Lockhart y colaboradores (17) donde utilizan una colección de 1.929 cepas de *C. parapsilosis* complex aisladas en el periodo comprendido entre 2001 y 2006 inclusive, que forman parte de la colección del ARTEMIS Global Surveillance study, en este estudio encuentran que el 91,3% de estos aislamientos eran *C. parapsilosis* sensu stricto, mientras que el 6,1% fueron *C. orthopsilosis* y el 1,8% fueron *C. metapsilosis*. Además observaron que, de las cepas de las que disponían el lugar de aislamiento, el 77% de *C. orthopsilosis* y el 66% de *C. metapsilosis* fueron aisladas de sangre frente al 79% de *C. parapsilosis* sensu stricto. Observaron que el porcentaje de *C. orthopsilosis* fue aumentando a lo largo del estudio. Finalmente concluyen que aunque existen grandes variaciones regionales, conjuntamente *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* no suponen más del 10% de todos los aislamientos de *C. parapsilosis* complex.

En el trabajo, antes mencionado, realizado en Barcelona con las cepas productoras de candidemias aisladas entre 2002 y 2003, Gómez-López y colaboradores (18), encuentran que *C. metapsilosis* supuso el 6,9% (6/87) y *C. orthopsilosis* supuso el 5,7% (5/87) de todos los aislamientos de *C. parapsilosis* complex recogidos en ese periodo. En un estudio realizado en un hospital terciario de Portugal a partir de 167 aislamientos obtenidos de muestras de diferentes localizaciones Silva y colaboradores (132), encuentran que el 91,4% de estos

aislamientos pertenecían a *C. parapsilosis* sensu stricto, 2,3% a *C. orthopsilosis* y 2,9% a *C. metapsilosis* y ninguna fue de hemocultivo o de catéter.

La distribución de las especies que encontramos en nuestras cepas concuerda con los datos extraídos de estudios realizados a nivel internacional (17, 18, 132), aunque existen variaciones debidas a la variabilidad geográfica presente, en ningún caso la suma de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* alcanza el 10% del total de los aislamientos.

Si bien se ha dudado del papel de *C. metapsilosis*, de la que se ha dicho que raramente se aislaba de muestras clínicas (133) y se ha considerado como un microorganismo ambiental (11), podemos extraer de estos trabajos (17, 18, 132) que las tres especies son capaces de producir candidemias, por tanto son patógenas además de comensales.

La formación de biopelículas es el factor de virulencia más importante de *C. parapsilosis* complex ya que confiere resistencia al microorganismo al limitar la penetración de sustancias a través de la matriz y lo protege de la respuesta inmune del hospedador (59).

Los microorganismos, entre ellos las levaduras, son capaces de entablar numerosos comportamientos sociales, incluyendo la formación de biopelículas resistentes a los antibióticos y la coordinación de un grupo de actividades vía *quorum sensing*, un proceso en el que la transcripción génica está controlada, dentro de una población, por pequeñas moléculas señal (134).

Las características estructurales y fisiológicas de las biopelículas confieren una resistencia innata tanto a antimicrobianos como a desinfectantes y germicidas. Los microorganismos de las biopelículas son resistentes a los agentes antimicrobianos por mecanismos adicionales y diferentes a los de las células planctónicas como sistemas de expulsión activa, mutación de la diana y enzimas modificadoras, principalmente.

Otra característica importante, es que los microorganismos que forman parte de las biopelículas recuperan la sensibilidad original de la cepa, una vez que se dispersan de la misma (135). Por tanto, parece que la resistencia de las biopelículas a los agentes antimicrobianos probablemente no se debe a mecanismos codificados genéticamente ni a la selección de mutantes resistentes presentes en subpoblaciones, ya que los altos niveles de resistencia desaparecen cuando se retiran los dispositivos donde se han desarrollado las biopelículas.

Los mecanismos responsables del elevado grado de resistencia son uno o más de los siguientes:

- La impermeabilidad de la biopelícula a los agentes antimicrobianos. El primer paso para que los agentes antimicrobianos ejerzan su actividad es que alcancen su diana. Las biopelículas poseen una capa de glucocáliz que protege a los microorganismos de los sistemas de defensa del hospedador, así como de la difusión de los agentes antimicrobianos hacia las dianas celulares, actuando de este modo como una barrera que impide o reduce el transporte de los antimicrobianos al interior de la biopelícula (135).
- Una tasa alterada de crecimiento de los microorganismos de la biopelícula. Los microorganismos embebidos en las biopelículas presentan una tasa de crecimiento más lenta en comparación con las células planctónicas, lo que retrasa la acción de los antimicrobianos. En el interior de la biopelícula hay una limitación de nutrientes, lo cual conduce a un retraso en el crecimiento. De este modo, la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria se ve acompañada por aumento de la resistencia (136, 137).
- El microambiente en el interior de las biopelículas es un factor que afecta a la actividad antimicrobiana *in vitro* debido a diferentes variables como la pO_2 y la pCO_2 , concentración de cationes divalentes, niveles de hidratación, pH o concentraciones de pirimidinas, produciendo efectos adversos en la acción de los antimicrobianos en el interior de la biopelícula donde las condiciones ácido-básicas y aeróbicas-anaeróbicas pueden variar (138).

La formación de una biopelícula levaduras es un proceso extraordinariamente complejo sujeto a una gran cantidad de factores ambientales, difíciles de reproducir en los laboratorios. Los estudios de actividad antimicrobiana sobre biopelículas tienen importantes limitaciones metodológicas que dificultan la comparación de los resultados.

La mayoría de los estudios acerca de la formación de biopelículas en levaduras se han realizado con *C. albicans* (59, 60, 61, 66, 69, 73, 75), pero de todos ellos extraemos que hay numerosos factores que afectan a la adhesión fúngica y a la posterior formación de biopelículas. Entre estos factores podemos destacar la especie de *Candida* (139), la cepa en concreto (140, 141) y su inóculo, el flujo del medio, la presencia de bacterias (142), el medio de cultivo (composición, pH, temperatura, presencia de iones), las propiedades del sustrato donde se desarrolla la biopelícula y

por último, la presencia de condicionante de biopelícula como la albumina o fibrinógeno (140).

En las biopelículas que se han formado *in vivo* se suelen encontrar bacterias junto con *Candida* spp y es probable que se produzcan interacciones entre las distintas especies en estas poblaciones adheridas. *In vitro*, se ha utilizado el modelo de desarrollo de biopelícula en discos de catéteres para estudiar las biopelículas mixtas formadas por *Staphylococcus epidermidis* y *C. albicans*, agentes comunes en las infecciones relacionadas con catéter. La microscopia electrónica pone de manifiesto numerosas interacciones físicas entre *Staphylococcus epidermidis* y *C. albicans*, tanto en forma de levadura como formando hifas. Además, estudios de sensibilidad antifúngica muestran que las células fúngicas modulan la acción de los antibióticos mientras que las bacterias pueden afectar la actividad de los agentes antifúngicos sobre las biopelículas (142).

A la hora de valorar los estudios de la formación de biopelículas y de actividad antifúngica sobre biopelículas, hay que tener presente los múltiples factores que condicionan su formación en *Candida* spp, así como los propios del método utilizado y la madurez de la biopelícula.

La evaluación de diferentes materiales con los que se fabrican catéteres, muestra que la formación de biopelículas en *C. albicans* se incrementa en los casos en que el material es látex o elastómero de silicona, comparado con PVC, y decrece sustancialmente en el caso de poliuretano o silicona al 100%, así Hawser y Douglas muestran en un trabajo pionero como hay materiales sobre los cuales se desarrollan las biopelículas extensivamente mientras que sobre otros no (140).

In vivo, los materiales de los que están compuestos los catéteres adsorben rápidamente proteínas del hospedador, lo que favorece la formación de biopelículas sobre estas. La preincubación *in vitro* de los catéteres de PVC con fibrinógeno o colágeno intensifica la formación de biopelículas en el caso de *C. albicans* (140).

Una de las características que definen a las biopelículas es la presencia de una matriz de material polimérico extracelular en la cual están embebidos los microorganismos. La cantidad de matriz depende, además de la técnica de preparación, de las condiciones de incubación durante el desarrollo de la biopelícula (143). La cantidad de matriz aumenta sustancialmente cuando las biopelículas se incuban bajo condiciones dinámicas, en vez de estáticas, lo que produce un flujo de líquido sobre la superficie de las células. Hay varios estudios que apuntan que bajo condiciones de flujo las biopelículas se desarrollan mejor (144,145), así las biopelículas

de *C. albicans* desarrolladas bajo condiciones estáticas contienen pequeñas cantidades de material expolimérico.

La cantidad de biopelícula presente se puede monitorizar cuantitativamente con la medida espectrofotométrica o mediante un ensayo colorimétrico, que puede ser mediante la reducción de una sal de tetrazolio o por la incorporación de [H^3] leucina, estos métodos se correlacionan excelentemente con el peso de la biopelículas secas (140).

Se han desarrollado varios sistemas para la obtención artificial de biopelículas ya que como hemos visto, son numerosos los factores que condicionan las características de estas, pero nos centraremos en los siguientes parámetros experimentales:

- el material que compone la superficie donde se va a desarrollar la biopelícula (silicona, poliestireno...).
- el medio de cultivo, su concentración en azúcares y si se ha realizado una preincubación del sustrato donde se va a desarrollar la biopelícula con albúmina, fibrinógeno...
- las condiciones de la incubación (estática o dinámica).
- y por último, el método mediante el que se cuantifica la formación de biopelículas.

A la hora de elegir un método experimental que se adapte a nuestros objetivos, debemos de tener en cuenta los distintos factores que intervienen en la formación de biopelículas y las condiciones experimentales ya que la elección del método por el cual desarrollaremos las biopelículas es determinante para la posterior evaluación de los resultados y la comparación de estos con los obtenidos por otros autores.

El modelo más simple para la obtención de biopelículas *in vitro* y el primero que fue descrito (**tabla 24**) consistía en el desarrollo de estas sobre la superficie de pequeños discos de catéteres (140, 143). Un modelo similar es el que desarrolla biopelículas sobre tiras de dentadura acrílica (146).

Otro modelo donde se desarrollan las biopelículas bajo condiciones estáticas son los realizados sobre placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano (108, 109, 147), entre las ventajas de este método encontramos que es rápido, seguro y reproducible, además brinda una alta capacidad de procesamiento de muestras

En cuanto a los modelos que utilizan condiciones dinámicas (143, 148-150) es conocido que dan lugar a biopelículas con una mayor cantidad de biopolímero que cuando se desarrollan en condiciones estáticas, pero también tienen una serie de

inconvenientes, por ejemplo, Domingue y colaboradores (149) proponen el uso del dispositivo de Robbin modificado (MRD) para la obtención de biopelículas sobre las que ensayar diferentes concentraciones de antimicrobianos. Este modelo se conoce muy bien pero es una técnica compleja que requiere un personal altamente entrenado, se producen un número relativamente pequeño de biopelículas equivalentes, consume mucho tiempo, la probabilidad de contaminación es mucho mayor que en el método que hemos utilizado en nuestro caso y, por todas estas razones, no es un método adecuado para la determinación de sensibilidades en un laboratorio clínico (150).

Tabla 24: Características de las diferentes técnicas para la formación de biopelículas *in vitro*.

Modelo de sistema	Tipo de sistema (estático/dinámico)	Referencia
Disco de catéter	Estático	140, 143
Disco acrílico	Estático	146
Placa de microtitulación	Estático	108,109, 147
Filtros de celulosa cilíndricos	Dinámico	143
Fermentador de biopelículas perfundido	Dinámico	143
Dispositivo de Robbin modificado	Dinámico	148,149
Dispositivo de Calgary	Dinámico	150

Nuestros experimentos se realizaron siguiendo el protocolo de Ramage y colaboradores (147) donde las biopelículas se desarrollan sobre placas de micropocillos de fondo plano de poliestireno, se incuban a 37°C en RPMI, ya que el método que describen es rápido, eficiente, seguro y reproducible, además brinda una alta capacidad de procesamiento de muestras.

En cuanto a la cuantificación de biopelículas, en nuestro caso la realizamos mediante un ensayo colorimétrico que determina la capacidad de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas para convertir un sal de tetrazolio (XTT) en un producto coloreado (formazan) que puede ser medido espectrofotométricamente. Como esta sal es soluble en agua, el ensayo de reducción de XTT puede ser cuantificado fácilmente, sin necesidad de pasos adicionales como centrifugación, adición de tampón de lisis o sonicación. Según la hipótesis de Ramage y colaboradores (147) sólo las células sésiles que han resistido la acción de los

antifúngicos, son metabólicamente activas y por tanto producen cambios en el color de XTT, mientras que las células muertas no, por tanto este método es apropiado para medir la actividad de los antifúngicos frente a las células sésiles.

Hay estudios que establecen que *C. albicans* forma biopelículas con más frecuencia que otras especies de *Candida* potencialmente invasivas pero normalmente menos patógenas como *C. parapsilosis* complex, *C. glabrata* y *C. tropicalis* (76,140). En el caso de Khun y colaboradores (76) entre las condiciones de formación de biopelículas encontramos, que el medio utilizado ha sido YNB (yeast nitrogen base) con baja concentración de glucosa y las biopelículas se desarrollan sobre discos de silicona. Hawser y Douglas (140) encuentran que *C. parapsilosis* complex y *C. glabrata* forman significativamente menos biopelículas que *C. albicans* en un estudio realizado con el mismo medio que el anterior.

Sin embargo, hay otros estudios que observan que la formación de biopelículas es más frecuente entre las especies de *Candida* no albicans, así Shin y colaboradores (151), en un estudio realizado con Sabouraud dextrosa enriquecido con un 8% de glucosa, encuentran que la proporción de aislamientos que producen biopelículas en relación con la especie es mayor en *C. tropicalis* seguida de *C. parapsilosis* complex, *C. glabrata* y *C. albicans*. Tumbarello y colaboradores (152), utilizando Sabouraud dextrosa (SBD) enriquecido con el 8% de glucosa, encuentran que la proporción de los aislamientos que formaron biopelículas fue del 71,4% en el caso de *C. tropicalis* seguida del 23,1% en *C. glabrata*, 22,6% en *C. albicans* y el 21,8% *C. parapsilosis* complex.

Aunque sabemos que un medio rico en glucosa predispone a la formación de biopelículas en el caso de *C. parapsilosis* complex, al contrario que con *C. albicans*, que es capaz de formar más biopelículas en ambientes con una pequeña concentración en azúcares (57), en nuestro caso, nos decidimos a la utilización de RPMI como medio ya que es el de elección en el CLSI para la determinación de la actividad antifúngica. Por lo tanto, lo hemos empleado tanto para el ensayo de formación de biopelículas como para la determinación de la actividad de los antifúngicos sobre células planctónicas y sésiles, para que de esta forma los resultados obtenidos sean comparables entre sí.

La principal ventaja del método seleccionado (108) es que se pueden determinar varios parámetros fácilmente, como la capacidad de formación de biopelículas así como el efecto de estas en la actividad de los antimicrobianos de manera más sencilla y se pueden comparar con otras técnicas.

Bajo nuestras condiciones experimentales, encontramos que el 53,2% (65 de 122) de los aislamientos de *Candida parapsilosis* complex fueron capaces de formar biopelículas, además nuestro estudio muestra que la capacidad de formación de biopelículas varía entre las distintas especies. El 58,5% de las cepas *C. parapsilosis* sensu stricto, formaron biopelículas mientras que ningún aislamiento de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* mostró capacidad de formar biopelículas.

Existen pocos trabajos que estudien la capacidad de formación de biopelículas en *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Nuestros resultados coinciden con datos previos de estudios de Song y colaboradores (153) y Tavanti y colaboradores (131). Sin embargo, hay algunos autores como Lattif y colaboradores (154) que afirman que las tres especies tienen capacidad de formar biopelículas, y que tanto el espesor como la estructura de la biopelícula son similares en las tres especies. Melo y colaboradores (155) también encuentran que las tres especies del complejo son capaces de formar biopelículas. En los casos de Lattif (154) y Melo (155) debemos subrayar que las biopelículas se han desarrollado bajo condiciones dinámicas, que dan lugar a mayor cantidad de biopolímero.

Algunos autores (57, 151-153, 156, 157) han estudiado la diferencia en cuanto a formación de biopelículas entre los aislamientos procedentes de sangre y de otras localizaciones para conocer si este factor de virulencia juega un papel importante en el desarrollo de candidemia.

En nuestro estudio, encontramos que la producción de biopelículas entre *C. parapsilosis* sensu stricto fue del 65% de los aislamientos de sangre y del 50,9% de los aislamientos procedentes de otras localizaciones, sin encontrar diferencias significativas respecto a la formación de biopelículas en función del origen de la muestra.

Nuestros resultados concuerdan con las conclusiones de Song y colaboradores (153) y Branchini y colaboradores (57) que no encontraron diferencias respecto a la formación de biopelículas entre aislamientos procedentes de sangre y otras localizaciones.

Por otra parte, en la literatura también encontramos estudios cuyos hallazgos difieren de los nuestros, como es el caso del estudio llevado a cabo por Shin y colaboradores (151), donde un 86% de los aislamientos de *C. parapsilosis* complex procedentes de hemocultivos demostraron capacidad *in vitro* para formar biopelículas frente al 47% de los aislamientos de otras procedencias, aunque debemos resaltar el reducido número de aislamientos estudiados, 35 aislamientos procedentes de sangre y

sólo 17 procedentes de otras localizaciones, siendo estos grupos muestrales demasiados pequeños para asegurar la fiabilidad de los resultados.

De forma similar, Ruzicka y colaboradores (156) observaron que mientras que el 59% de los aislamientos procedentes de hemocultivos demostraron capacidad de formación de biopelículas, sólo lo hizo el 39% de los aislamientos de piel, aunque en el caso de este estudio, debemos resaltar que se estudiaron 85 aislamientos de piel, el número de aislamientos de sangre sólo fue de 32, lo que pone de manifiesto que los grupos no son comparables.

En la última década se han desarrollado varios métodos para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Estas técnicas han mostrado una buena reproducibilidad inter-laboratorio y cierta capacidad para detectar la resistencia *in vitro* a estos fármacos, por lo que la mayoría de expertos creen que las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos tienen utilidad clínica (89, 110, 158).

Una de las consecuencias más importantes derivada de la estandarización en el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos es la realización de estudios de vigilancia de resistencias a estos agentes (6, 83). Así se puede evaluar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos y correlacionar estos resultados con la actividad de los fármacos en estudios *in vivo*.

Existen varios métodos de referencia para realizar estas pruebas con levaduras y hongos filamentosos. Los más difundidos son los del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (89, 110) aunque otras sociedades e instituciones también han desarrollado métodos de referencia como el EUCAST, [European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing perteneciente a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID)] (158).

Las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos están basadas en las técnicas en caldo, que se desarrollaron para conocer la actividad *in vitro* de los antibacterianos. Estas técnicas determinan la CMI (concentración mínima inhibitoria), que se obtiene calculando porcentajes de inhibición respecto a un control de crecimiento. Los estándares incluyen recomendaciones para la conservación, la preparación y la interpretación de las pruebas, así como un sistema para controlar la calidad de los resultados (89, 110, 158).

El proceso requerido para la estandarización de las pruebas de estudio de los antifúngicos ha sido lento, debido al gran número de variables que pueden influir en los resultados, como son: el medio de cultivo, el pH del medio, la densidad del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación (86). Los estudios que han evaluado las correlaciones *in vitro* - *in vivo* son muy escasos, aún así, estas pruebas han jugado un

papel importante en el desarrollo de nuevos antifúngicos, también en las evaluaciones *in vivo* que preceden a los estudios clínicos.

También ha influido el hecho de que las infecciones por hongos son menos frecuentes que las infecciones bacterianas, y esto implica que haya un número inferior de datos para establecer posibles correlaciones. Tener un número suficiente de datos acumulados es lo más importante a la hora de poder establecer los puntos críticos y poder separar las cepas sensibles de las resistentes.

La introducción de métodos estandarizados, como los pertenecientes a CLSI y EUCAST, produjo un cambio cualitativo en los estudios de sensibilidad a los antifúngicos. Por primera vez se disponía de métodos reproducibles para detectar la resistencia *in vitro* a estos antimicrobianos, por lo que se podía evaluar su utilidad clínica. La aplicabilidad práctica de una técnica de determinación de sensibilidad reside en la fiabilidad de sus resultados; si estos no son reproducibles no pueden establecerse puntos de corte que guíen las recomendaciones terapéuticas. Además, la aparición de estos estándares ha permitido diseñar y validar varios métodos de difusión en agar y técnicas comerciales para realizar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, que pueden utilizarse para detectar la resistencia a los azoles, especialmente a fluconazol en levaduras que es el reto asistencial más destacable en este campo (159).

El subcomité de hongos del CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) ha desarrollado dos métodos para el estudio *in vitro* de la sensibilidad de *Candida* spp, la microdilución en caldo estandarizada y la difusión en disco (89). Estos métodos son reproducibles y proporcionan una información clínica útil que es comparable a la obtenida en el caso de las bacterias (7, 88, 160-162). El CLSI ha establecido puntos de corte para cuatro antifúngicos sistémicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol y flucitosina [5FC]), estos han sido desarrollados considerando los datos obtenidos con la CMI y los mecanismos de resistencia, la distribución de los perfiles de CMI (y el diámetro de inhibición), los parámetros la farmacocinética (PK) y farmacodinamia (PD), y la relación entre la actividad *in vitro* y los datos clínicos (7, 88, 161).

Aunque aún no se han establecido los puntos de corte para el posaconazol, el CLSI ha llegado a un consenso para establecer los métodos estandarizados para este compuesto, y se espera que los puntos de corte se establezcan próximamente (93, 163), en el caso de las equinocandinas se ha establecido un punto de corte provisional a partir de datos de pacientes no neutropénicos, por lo aún se desconoce la relevancia en otros contextos clínicos (110).

El EUCAST ha establecido puntos de corte para fluconazol y voriconazol y está desarrollando los puntos de corte de otros agentes antifúngicos (164). Los puntos de corte de EUCAST se han establecido a concentraciones más bajas que en el caso del CLSI.

EUCAST y CLSI (89, 158) han desarrollado métodos estandarizados basados en la microdilución en caldo para determinar la sensibilidad en levaduras. Entre las diferencias metodológicas se encuentran la concentración de glucosa, el tamaño del inóculo, el tipo de pocillos (en “U” o con el fondo plano) o la forma de lectura (visual o espectrofotométrica), pero en general tienen más puntos en común que diferencias y con ellos se obtienen resultados similares (165).

Finalmente, realizamos la determinación de la sensibilidad frente a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina siguiendo las directrices del CLSI, ya que al analizar la literatura encontramos más trabajos basados en este método, lo que nos facilitará la posterior comparación de resultados.

Según la IDSA (Infectious Diseases Society of America) (84) la candidemia producida por *C. parapsilosis* complex debe ser tratada con fluconazol. En el caso de pacientes que hayan sido tratados previamente con una equinocandina que tengan hemocultivos negativos y hayan demostrado mejoría, una vez conocido que el agente causal es *C. parapsilosis* complex pueden seguir siendo tratados con una equinocandina. En esta última versión de la guía IDSA, sólo recomiendan el uso de anfotericina B si existe intolerancia a los otros agentes antifúngicos o hay una disponibilidad limitada de estos. La terapia debe continuar durante dos semanas a partir del último hemocultivo positivo. Además recomiendan la retirada del catéter en pacientes no neutropénicos con candidemia.

Históricamente, anfotericina B ha sido el antifúngico más ampliamente utilizado en el tratamiento de las candidemias, se han publicado casos que documentan la resistencia *in vivo* (166, 167), y resistencias *in vitro* a anfotericina B entre los aislamientos de *C. parapsilosis* complex en un porcentaje del 2 al 3 % (104).

Fluconazol es la alternativa más utilizada a la anfotericina, con tendencia a ser el antifúngico de primera elección en candidemias. Se ha documentado resistencia *in vitro* entre especies de *Candida* distintas de *C. albicans*, principalmente *C. glabrata* y *C. krusei* (95, 168, 169). Hay controversia en cuanto a si el fluconazol ha influido en el incremento de candidemias por especies de *Candida* diferentes a *C. albicans*, con argumentos a favor (170), y en contra (171). La resistencia *in vitro* a fluconazol en *Candida* spp va desde 0 al 4,6% (95, 96, 98), sin embargo, la resistencia *in vitro* a voriconazol es rara, con una sensibilidad cercana al 100% (172). Más recientemente,

un análisis de 9.371 aislamientos de *C. parapsilosis* complex muestra que sólo el 1,9% de los aislamientos eran resistentes a voriconazol, y que el 36,7 % de los aislamientos resistentes a fluconazol fueron sensibles a voriconazol (96).

En el caso de las equinocandinas, hay diferentes estudios (98, 163, 173) que muestran el excelente espectro y gran potencia de las tres equinocandinas frente a *Candida* spp, sin embargo las CMI's en *C. parapsilosis* complex son considerablemente mayores que en otras especies de *Candida*, como se ha descrito previamente (174). Los valores elevados de CMI frente a equinocandinas se asocian con mutaciones en 2 regiones altamente conservadas de *fsk1* y *fsk2* que codifican para la subunidades β -1,3-D-glucanosintasa (GS), diana de esta familia de antifúngicos en la pared celular (175). Messer y colaboradores (99) comprueban que anidulafungina es muy activa frente a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* y lo es menos frente a *C. parapsilosis* complex y *C. guilliermondii*.

En los 122 aislados de nuestro estudio se determinó la actividad *in vitro* a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina sobre células planctónicas y obtuvimos como resultados que todos los aislamientos fueron sensibles a voriconazol y anfotericina B y sólo 2 (1,8%) aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto fueron no sensibles (NS) a anidulafungina.

Al analizar la actividad de voriconazol observamos que muestra una gran actividad frente a las especies del complejo "*psilosis*", lo que concuerda con estudios de vigilancia recientes que muestran sensibilidades al voriconazol cercanas al 100% (93), comprobamos que los valores de las CMI's de las 111 cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto, oscilaron entre <0,03 y 0,125 mg/L, mientras que en las 10 cepas de *C. orthopsilosis* el rango de CMI fue de 0,03 a 0,5 mg/L, la única cepa de *C. metapsilosis* presentó una CMI de 0,06 mg/L.

Los valores de CMI a anfotericina B fueron muy homogéneos, en el caso de las 111 cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto, el rango de CMI fue de 0,125 a 1 mg/L, en las 10 cepas de *C. orthopsilosis* el rango de CMI osciló entre 0,25 y 1 mg/L y la única cepa de *C. metapsilosis* presentó una CMI de 0,5 mg/L, así al igual que se describe en la literatura la mayoría de las CMI's se encuentran entre 0,25 y 1 mg/L (86-88).

La anidulafungina, caspofungina y micafungina comparten el mismo espectro de actividad frente a *Candida* spp y la actividad *in vitro* de esta familia de antifúngicos es reducida frente a las 3 especies del grupo "*psilosis*" (176). Así, en nuestro caso los valores de CMI correspondientes a la actividad de anidulafungina frente a las distintas especies del complejo "*psilosis*" concuerdan con otros estudios (99, 174) que

establecen que anidulafungina tiene una menor actividad intrínseca frente a *C. parapsilosis* complex que otras especies de *Candida*. En general, la anidulafungina mostró valores de CMI para los 111 aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto que oscilaron entre 0,5 y 4 mg/L, el rango de CMIs correspondientes a los aislamientos de *C. orthopsilosis* fue de 0,5 a 2 mg/L, y el único aislamiento identificado como *C. metapsilosis* tuvo una CMI de 1 mg/L.

Nuestros resultados referentes a la sensibilidad del complejo “*psilosis*” frente a voriconazol, anfotericina B y anidulafungina concuerdan con otros estudios, como el programa SENTRY (antimicrobial surveillance program) que periódicamente hace estudios de vigilancia de la sensibilidad a los antifúngicos con cepas de todo el mundo, y en el último estudio correspondiente a 2008, Messer y colaboradores (99) determinan la sensibilidad de 196 aislamientos de *C. parapsilosis* complex, entre otras especies, frente a 10 antifúngicos entre los que se encuentran anidulafungina, voriconazol y anfotericina B. La CMI₉₀ de *C. parapsilosis* complex a anidulafungina fue de 2 mg/L, el rango de CMI osciló entre 0,25 y 4 mg/L y tanto la CMI₅₀ como CMI₉₀ fue de 2 mg/L, frente a voriconazol estos aislamientos se comportaron como sensibles, siendo el rango de CMI $\leq 0,06$ –0,5 mg/L, CMI₅₀ $\leq 0,06$ y CMI₉₀ fueron de 0,5 mg/L, por último en el caso de la anfotericina B el rango osciló entre 0,25 y 1 mg/L y tanto la CMI₅₀ como CMI₉₀ fueron de 1 mg/L .

En un estudio realizado en Portugal, Silva y colaboradores (132) obtienen valores que concuerdan con los nuestros en el caso de anfotericina B y voriconazol y diferentes cuando hablamos de anidulafungina, ya que encuentran que casi el 30% de los aislamientos se mostraron como no sensibles a este antifúngico frente al 1,8% encontrado en nuestro trabajo.

Los estudios referentes a las diferencias en la sensibilidad frente a los antifúngicos entre las especies del complejo “*psilosis*” (17,18,132) encuentran diferencias aunque estas son muy pequeñas, y hay que señalar que tanto en el trabajo de Gómez-López y colaboradores (18) como en el de Silva y colaboradores (132), al igual que en nuestro caso, el número de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* es muy pequeño lo que dificulta la obtención de conclusiones acerca de su comportamiento frente a los antifúngicos.

En nuestro estudio observamos algunas diferencias, aunque muy ligeras respecto a la sensibilidad entre las tres especies, aunque como hemos mencionado anteriormente, el número de aislamientos de *C. orthopsilosis* y sobre todo de *C. metapsilosis* es muy reducido. En el caso de esta última, de la que sólo contamos con

un aislamiento, no podemos analizar su comportamiento frente a los antifúngicos. Así, *C. parapsilosis* sensu stricto es más sensible a voriconazol que *C. orthopsilosis*. Sin embargo, *C. parapsilosis* sensu stricto muestra unas CMI's superiores a las de *C. orthopsilosis* frente a anfotericina B y anidulafungina.

Nuestros resultados concuerdan con los de Lockhart y colaboradores (17) que exponen que tanto *C. orthopsilosis* como *C. metapsilosis* presentan CMI's a anfotericina B y a las equinocandinas inferiores a las mostradas por *C. parapsilosis* sensu stricto y que en esta última, las CMI's a fluconazol son ligeramente superiores. También en esta línea, van Asbeck y colaboradores (177) encuentran que *C. parapsilosis* sensu stricto fue menos sensible a anidulafungina y caspofungina que las otras 2 especies y teorizan sobre que las diferencias interespecies se podrían explicar por las diferencias estructurales de la pared celular, una afinidad reducida por el complejo proteico de la glucano sintasa o la variación en el metabolismo en este grupo. Sin embargo, *C. metapsilosis* fue menos sensible a fluconazol que *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* sensu stricto, esto puede reflejar la diferente afinidad de los azoles por la ergosterol sintasa, 14-desmetilasa u otras enzimas de esta ruta de síntesis.

Al igual que ocurre en nuestro estudio, Silva y colaboradores (132) encuentran difícil la comparación de los patrones de sensibilidad debido al reducido número de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, a pesar de ello concluyen que los únicos aislamientos resistentes a anfotericina B y voriconazol pertenecían a la especie *C. parapsilosis* sensu stricto y que las CMI's para las equinocandinas fueron altas para las tres especies, pero *C. parapsilosis* sensu stricto fue menos sensible a anidulafungina y caspofungina que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, en conclusión, ellos encuentran que *C. parapsilosis* sensu stricto da lugar a CMI's mayores frente a los tres antifúngicos que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

Las ligeras diferencias en la sensibilidad antifúngica observadas en nuestros resultados entre las especies del complejo "*psilosis*" y descritas en los diferentes trabajos (17, 18, 99, 132, 177) nos sugieren que la diferenciación entre especies no sería necesaria de forma rutinaria en los laboratorios clínicos, sin embargo creemos necesaria la vigilancia epidemiológica para monitorizar cambios en la distribución de la especie y en los perfiles de sensibilidad antifúngica.

La característica clínica más importante de las biopelículas es el incremento marcado de la resistencia a los agentes antifúngicos (155). La bibliografía acerca de la determinación de la actividad a los antifúngicos por parte de las células sésiles de las

diferentes especies de *Candida* y, más aún, acerca de *Candida parapsilosis* complex en concreto es muy escasa (155, 178-180).

A la hora de estudiar los resultados correspondientes a la actividad de los antifúngicos frente a las biopelículas, seleccionamos 59 de los 65 aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto que habían resultado productores de las mismas, descartando 6 aislamientos que dieron lugar a CMI's no reproducibles en las células sésiles, lo que parece estar asociado al espesor de la biopelícula producida, ya que los índices de producción de estas biopelículas fueron bajos. Esto se ha descrito anteriormente, así Choi y colaboradores (178) utilizando el mismo método que nosotros, seleccionaron los aislamientos cuyas densidades ópticas tuvieron un valor superior a 0,3, ya que observaron que las biopelículas con índices inferiores daban lugar de CMI's no reproducibles, por lo que consideramos que son necesarios más estudios acerca de la asociación entre la densidad de la biopelícula y la sensibilidad a los antifúngicos.

Nuestros resultados relativos a las CMIB de estos 59 aislamientos muestran que voriconazol es totalmente inactivo frente a biopelículas de *C. parapsilosis* sensu stricto, sin embargo anfotericina B y anidulafungina muestran actividad. Debemos subrayar que la CMI's a anidulafungina, que ya son altas en el caso de las células planctónicas, se triplican en el caso de las células sésiles.

En un trabajo realizado, bajo condiciones experimentales similares a las del nuestro, con *C. albicans* y *C. tropicalis*, Valentín y colaboradores (181), concluyen que anfotericina B y anidulafungina muestran actividad frente a las biopelículas formadas por estas especies, pero que la actividad es mayor en el caso de anidulafungina. Shuford y colaboradores (157), en un trabajo dedicado exclusivamente al estudio de la actividad de los antifúngicos frente a biopelículas de *C. albicans*, encuentran que tanto la anfotericina B como la caspofungina muestran actividad frente a las biopelículas de *C. albicans*, mientras que voriconazol se muestra inactivo.

En cuanto a trabajos donde incluyan a *C. parapsilosis* complex, Choi y colaboradores (178) han estudiado la actividad de fluconazol, anfotericina B y caspofungina frente a células sésiles y planctónicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* complex, *C. glabrata* y *C. tropicalis* con las mismas condiciones experimentales que en nuestro caso. Las conclusiones de este trabajo son que, anfotericina B es moderadamente activa frente a las biopelículas, observándose un comportamiento similar frente a las cuatro especies, mientras que fluconazol no muestra actividad

frente a las biopelículas de ninguna de las especies. Sin embargo, encuentran diferencias específicas de especie respecto al comportamiento frente a las equinocandinas, ya que en el caso de *C. albicans* y *C. glabrata* se alcanza una reducción del 80% respecto al pocillo control con concentraciones que no superan el 1 mg/L, lo que no ocurre en el caso de *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* complex que presentan CMI's mucho más altas, concretamente en *C. parapsilosis* complex, la media de $CMIB_{80}$ para caspofungina y micafungina fue > 16 mg/L.

Katragkou y colaboradores (179) estudiaron la actividad de voriconazol, posaconazol, caspofungina y anidulafungina frente a biopelículas de *C. albicans* y *C. parapsilosis* complex, formadas sobre discos de silicona pretratados con suero fetal bovino, e incubado bajo movimiento constante durante 48 horas en el caso de *C. albicans* y 72 horas en el de *C. parapsilosis* complex en RPMI. Observaron una marcada resistencia de las células de la biopelícula de ambas especies de *Candida* frente a los nuevos azoles, y que las equinocandinas retenían actividad frente a las biopelículas, mostrando más actividad en el caso de las biopelículas de *C. parapsilosis* complex que en el de *C. albicans*.

Kuhn y colaboradores (180) determinan la actividad de distintos antifúngicos sobre las biopelículas de 2 aislamientos de *C. albicans* y 2 de *C. parapsilosis* complex y observan, como en el caso anterior, que mientras los dos nuevos triazoles (voriconazol y ravuconazol) no mostraron actividad frente a las biopelículas de estas mismas especies, anfotericina B muestra actividad frente a las biopelículas de las 2 especies, manteniendo las CMI's de las células planctónicas en el caso de *C. albicans* y las equinocandinas mantienen su actividad en el caso de las 2 cepas de *C. albicans* sin embargo en una de las cepas de *C. parapsilosis* complex se obtuvieron valores muy altos de CMI.

Como hemos mencionado anteriormente, Melo y colaboradores (155) encuentran que las tres especies del complejo "*psilosis*" forman biopelículas, bajo condiciones de agitación durante 72 h, y comparan la actividad de la caspofungina frente a células sésiles y planctónicas. Concluyen que caspofungina tiene buena actividad *in vitro* frente al complejo "*psilosis*" tanto en forma planctónica como sésil, pero que las biopelículas de *C. parapsilosis* sensu stricto presentaron CMI's más altas que las de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* aunque en la forma planctónica todas presentarían la misma CMI.

En conclusión, de todos los trabajos podemos extraer que los azoles, y en concreto el voriconazol no es activo frente a las biopelículas de ninguna de las especies de *Candida* estudiadas y que anfotericina B muestra actividad frente a las biopelículas de las especies estudiadas. En el caso de las equinocandinas, aunque estas demuestran actividad frente a las células sésiles, parece que esta varía según la especie de *Candida*, así esta mayor en el caso de que se trate de biopelículas de *C. albicans* o *C. glabrata* y es menor en el caso de *C. parapsilosis* o *C. tropicalis*.

Conclusiones

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del
H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

7. CONCLUSIONES

1. Aunque las tres especies del complejo “*psilosis*”, se pueden comportar como patógenos humanos, *C. parapsilosis* sensu stricto es la especie más frecuentemente aislada del complejo (90%), mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* conjuntamente no llegan al 10%, siendo necesarios más estudios clínicos y epidemiológicos para conocer el papel de las tres especies.

2. En el H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009, *C. albicans* es la especie de *Candida* más frecuentemente aislada en hemocultivos (35,5%) seguida de *C. parapsilosis* complex (26,5%), *C. tropicalis* (21,9%), *C. glabrata* (6%) y el 9,1% restante corresponde a otras especies.

3. Las candidemias por *C. parapsilosis* complex afectan de forma predominante a dos grupos de población, en primer lugar a los neonatos, encontrando como principal factor predisponente la prematuridad en el 28,9% de los niños y, en segundo lugar, a los adultos mayores de 65 años, siendo en este caso la cirugía previa el factor predisponente en el 47% de los adultos.

4. De nuestra colección de cepas aisladas de hemocultivos, *C. parapsilosis* sensu stricto es la especie del complejo más frecuentemente aislada en candidemias (90%) seguida de *C. orthopsilosis* (10%).

5. Es necesario llegar a un consenso sobre el uso de las técnicas de Biología Molecular a utilizar en la identificación de especie dentro del complejo “*psilosis*”, que permita la obtención de unos resultados comparables y haga posible la confección de un mapa epidemiológico tanto de las especies como de la variabilidad genética de

estas.

6. Las técnicas RAPD-PCR y PCR-RFLP son muy útiles para la identificación de especies dentro del complejo “*psilosis*”, y fáciles de implantar en un laboratorio clínico. Consideramos que la técnica RAPD-PCR, con el cebador RPO2 consume menos tiempo, es más sencilla, económica y además permite la detección de variabilidad genética dentro de las diferentes especies.

7. El gran número de factores que intervienen en la formación de biopelículas y las diferentes condiciones experimentales bajo las que se desarrollan, dificultan la comparación de resultados, así como la obtención de conclusiones. Esto pone de manifiesto la necesidad de establecer una metodología patrón. El método propuesto por Ramage y colaboradores es rápido, seguro y reproducible, y posee una alta capacidad de procesamiento de muestras. Se puede implantar fácilmente en un laboratorio clínico y es aplicable tanto a la formación de biopelículas como a la determinación de actividad de los antifúngicos frente a las células sésiles.

8. La capacidad de formación de biopelículas varía entre las distintas especies, así ningún aislamiento de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* mostró capacidad de formar biopelículas, y sin embargo el 58,5% de los aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto, presentaron dicha característica.

9. Aunque la formación de biopelículas se considera un factor de patogenicidad, en nuestro estudio, no encontramos diferencias significativas entre los aislamientos de sangre y los procedentes de otras localizaciones.

10. Voriconazol, anfotericina B y anidulafungina mostraron una excelente actividad sobre células planctónicas del complejo “*psilosis*”, siendo todos los aislamientos sensibles a voriconazol y anfotericina B y sólo 2 (1,8%) aislamientos de *C. parapsilosis* sensu stricto se clasificaron como no sensibles (NS) a anidulafungina.

11. Voriconazol es totalmente inactivo frente a biopelículas de *C. parapsilosis* sensu stricto, mientras que anfotericina B y anidulafungina muestran actividad. Sin embargo, debemos subrayar que la CMI a anidulafungina, que ya son altas en el caso de las células planctónicas, se triplican en el caso de las células sésiles.

12. Las ligeras diferencias en la sensibilidad antifúngica observadas en nuestros resultados entre las especies del complejo “*psilosis*” y las descritas en los diferentes trabajos, sugieren que la diferenciación entre especies no sería necesaria de forma rutinaria en los laboratorios clínicos. Sin embargo, sí consideramos imprescindible realizar la identificación de las especies para profundizar en el conocimiento del papel patógeno y de la epidemiología de las mismas.

Bibliografía

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del
H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* **20**: 133-163.
2. Martin GS, Mannino DM. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* **348**:1546-1554.
3. Wisplinghoff H, Bischoff T. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24.179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* **39**: 309-317.
4. Gallego CP, de la Torre Cisneros J. 2001. Actualización diagnóstica y terapéutica en infecciones fúngicas invasoras: de los antiguos tópicos a las nuevas evidencias. *Farm Hosp.* **25**: 345-355.
5. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J *et al.* 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: Case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* **44**: 1681-1685.
6. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV *et al.* 2005. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: 6, 5 years analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* **43**: 5848-5859.

Bibliografía

7. Weems JJ. 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*. **14**:756-766.
8. Ashford B. 1928. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg*. **8**: 507-538.
9. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk J. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Review*. **21**: 606-625.
10. Scherer S, Stevens DA. 1987. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. **25**: 675-679.
11. Tavanti A, Davison AD, Grow NAR, Maiden MCJ, and Odds FC. 2004. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. **43**: 284-292.
12. Sean F. Laffey and Geraldine Butler. 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. **151**: 1073-1081.
13. Linares MJ, Solís Cuesta F. 2001. En Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Capítulo 11: Identificación de levaduras. 1º edición. Revista Iberoamericana de Micología.
14. Kojic EM, Darouiche RO. 2003. Comparison of adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to silicone catheters in vitro and in vivo. *Clin Microbiol Infect*. **9**: 684-690.
15. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. 2006. International surveillance of *Candida* spp and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol*. **44**: 1782-1787.
16. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M *et al*. 2005. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. **43**: 1829-1835.
17. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, in comparison to the closely-related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. **46**: 2659-2664.
18. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL *et al*. 2008. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemoter*. **52**: 1506-1509.

19. Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang D. 2001. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *J Clin Microbiol.* **39**: 1258-1263.
20. Martino PC, Girmenia C, Micozzi A, Raccach R, Gentile G, Venditti M *et al.* 1993. Fungemia in patients with leukemia. *Am J Med Sci.* **306**: 225-232.
21. Patel R, Grogg KL, Edwards WD, Wrigth AJ, Schewenk NM. 2000. Death from inappropriate therapy for Lyme disease. *Clin Infect Dis.* **31**:1107-1109.
22. Benjamin DK, Jr, Ross K, McKinney RE, Jr., Benjamin DK, Auten R, Fisher RG. 2000. When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteriemia, but not Gram-positive bacteriemia. *Pediatrics.* **106**: 712-718
23. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wibling RT *et al.* 2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J.* **20**: 1119-1124.
24. Contreras I, Ponton J, Quindos G. 1994. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin Infect Dis.* **18**: 480-481.
25. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. 2005. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy host. *J Hosp Infect.* **59**: 159-162.
26. van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. 2007. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathología.* **164**: 287-293.
27. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I *et al.* 2002. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* **40**: 2363-2369.
28. Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C *et al.* 1998. *C. parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheter and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **30**: 243-249.
29. Garnacho J, Leon C. 2005. Resumen de las recomendaciones terapéuticas para infecciones fúngicas en el paciente crítico no neutropénico: una visión multidisciplinar. *Farm Hosp.* **29**: 283-289.
30. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Gentile G, Boccanera M, Monaco M *et al.* 1996. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with

- hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin Infect Dis.* **23**: 506-514.
31. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer L *et al.* 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* **37**: 1172-1177.
 32. Kossoff EH, Buescher ES, Karlowicz MG. 1998. Candidemia in a neonatal intensive care units: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr Infect Dis J.* **17**: 504-508.
 33. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA *et al.* 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* **44**: 2816-2823.
 34. Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci, V, Sood SK. 1998. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis.* **26**: 1086-1088.
 35. Garzóni C, Nobre VA, Garbino J. 2007. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **26**: 915-926.
 36. Otaki M, Kawashima M, Yamaguchi A, Kitamura N. 1992. A case report of *Candida* prosthetic endocarditis: an autopsy review. *Kyobu Geka.* **45**: 335-338.
 37. Weems JJ, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon SL. 1987. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J Clin Microbiol.* **25**: 1029-1032.
 38. Chakrabarti A. 2007. Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neuro India.* **55**: 191-197.
 39. Chesney PJ, Justman RA, Bogdanowicz WM. 1978. *Candida* meningitis in newborn infants: a review report of combined amphotericin B- flucytosine therapy. *Johns Hopkins Med J.* **142**: 155-160.
 40. Voice RA, Bradley SF, Sangeorzan JA, Kauffman CA. 1994. Chronic candidal meningitis: an uncommon manifestation of candidiasis. *Clin Infect Dis.* **19**: 60-66.
 41. Wang AY, Yu AW, Lam PK, Leung CB, Lai KN, Lui SF. 2000. Factor predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am J Kidney Dis.* **36**: 1183-1192.

42. Manzano-Gayosso P, Hernandez-Hernandez F, Mendez-Tovar LJ, Gonzalez-Monroy J, Lopez-Martinez R. 2003. Fungal peritonitis in 15 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Mycoses*. **46**: 425-429.
43. Yinnon SH, Gabay D, Raveh D, Schlesinger Y, Slotki D, Attias D *et al.* 1999. Comparison of peritoneal fluid culture results from adults and children undergoing CAPD. *Perit Dial Int*. **19**: 51-55.
44. Legout, L., M Assal, P. Rohner, D. Lew, L. Bernard, Hoffmeyer. 2006. Successful treatment of *Candida parapsilosis* (fluconazole resistant) osteomyelitis with caspofungin in a HIV patient. *Scand J Infect Dis*. **38**: 728-730.
45. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol*. **35**: 283-309.
46. Falser N. 1983. Mycotic infection of the ear: a harmless saprophyte or pathognomic risk factor? *Laryngol Rhinol Otol (Stutt)*. **62**: 140-146.
47. Vennewald I, Schonlebe J, Klemm E. 2003. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. *Mycoses*. **46**: 12-18.
48. Pichova I, Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J *et al.* 2001. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem*. **268**: 2669-2677.
49. Ruchel R, Boning B, Borg M. 1986. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*. *Infect Immun*. **53**: 411-419.
50. Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. **13**: 122-143.
51. Kantarcioglu AS, Yupei A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. **45**: 160-165.
52. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. **48**: 365-377.
53. Brockerhoff H. 1974. Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. *Lipids*. **9**: 645-650.
54. Hube B, Sther F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*. **174**: 362-374.

55. Neugnot V, Moulin G, Dubreucq E, Bigey F. 2002. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem.* **269**: 1734-1745.
56. Gacser A, Trofa D, Schafer W, Nosanchuk JD. 2007. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Investig.* **117**: 3049-3058.
57. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. 1994. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* **32**: 452-456.
58. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* **49**: 711-745.
59. Douglas LJ. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**: 30-36.
60. Baillie GS, Douglas LJ. 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemoter.* **46**: 397-403.
61. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* **11**: 753-761.
62. Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM et al. 2002. Fungal infections associated with HIV infections. *Oral Dis.* **8**: 151-160.
63. Peman J, Canton E, Valentin A. 2008. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. *Rev Iberoam Micol.* **25**:124-128.
64. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. 2009. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* **47**: 681-689.
65. Donlan RM. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* **33**: 1387-1392.
66. Al Fattani MA, Douglas LJ. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* **55**: 999-1008.
67. Al Fattani MA, Douglas LJ. 2004. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemoter.* **48**: 3291-3297.

68. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Jambon G, Ghigo J and d'Enfert C. 2004. *Candida albicans* biofilm: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell*. **3**: 536-545.
69. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot J, Wickes BL. 2002b. The filamentation pathway controlled by the *efg1* regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS. Microbiol Lett*. **214**: 95-100.
70. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as a complex differentiated communities. *Ann Rev Microbiol*. **56**: 187-209.
71. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. 2002a. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*. **68**: 5459-5463.
72. Silva S, Henriques M, Martins A, Williams D, Azeredo J. 2010. *In vitro* biofilm activity of non-*Candida albicans* species. *Curr Microbiol*. **61**: 534-540.
73. Chandra J, Khun DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. **183**: 5385-5394.
74. Allistair JP, Brown AR, Gow AR. 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*. **7**: 333-338.
75. Baillie GS, Douglas LJ. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*. **48**: 671-679.
76. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. **70**: 878-888.
77. Lott TJ, Kuykendal RJ, Welbel SF, Pramanik A, Lasker B A. 1993. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*. **23**: 463-467.
78. Enger L, Joly S, Pujol C, Simonson P, Pfaller M, Soll DR. 2001. Cloning and Characterization of a Complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*. **39**: 658-669.
79. Kerridge D, Vanden-Bossche H. 1990. Drug discovery: a biochemist approach. En: handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases. Ed: Ryley JF. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.
80. Graybill JR, Najvar LK, Gonzalez GM, Hernandez S, Bocanegra R. 2003. Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole. *J Antimicrob Chemother*. **51**: 1371-1376.

Bibliografía

81. Revankar SG, Graybill JR. 2003. Antifungal therapy. En: Clinical Mycology. Eds: Anaissie EJ, McGinnis MR; Pfaller MA. Elsevier Science, USA.
82. Carrillo-Muñoz AJ, Pemán J, Gobernado M. 1999. Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Rev Esp Quimioterap.* **12**: 181-204.
83. Pfaller MA. 2005. Antifungal susceptibility testing methods. *Curr Drug Targets.* **6**: 929-943.
84. Pappas PG, Kauffman CA, Andres D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards J *et al.* 2009. Clinical Practice guidelines for the management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* **48**: 503-535.
85. Barrett JP, Vardulaki KA, Conlon C, Cooke J, Daza-Ramirez P, Evans EG *et al.* 2003. Amphotericin B Systematic Review Study Group. A Systematic review of the antifungal effectiveness and tolerability of amphotericin B formulations. *Clin Ther.* **25**: 1295-1320.
86. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghanoum MA *et al.* 2001. Antifungal Susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin microbiol Rev.* **14**: 643-658.
87. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W *et al.* 2006. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic out come. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**: 1287-1292.
88. Rex JH, Pfaller MA. 2002. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis.* **35**: 982-989.
89. CLSI. 2008. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. Third Edition. CLSI document M27-A. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
90. Spelberg BJ, Filler SG, Edwards JE. 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* **42**: 244-251.
91. Herbrecht R. 2004. Voriconazole: therapeutic review of a new azole antifungal. *Expert Rev Infect Ther.* **2**: 485-497.
92. Chen A, Sobel JD. 2005. Emerging azole antifungals. *Expert Opin Emerg Drugs.* **10**: 21-33.
93. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S *et al.* 2004. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole and fluconazole against 4.169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during

- 2001 and 2002 in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **48**: 201-205.
94. Cuenca-Estrella M, Rodriguez D, Almirante B, Morgan J, Planis AM, Almela M *et al.* 2005. *In vitro* susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona. Spain, 2002-2003. *J Antimicrob Chemother.* **55**: 194-199.
95. Pfaller MA, Messer SA, Hollis SJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME *et al.* 1998. *In vitro* susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new azole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 3242-3244.
96. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM *et al.* 2007. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8,5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol.* **45**: 1735-1745.
97. Denning DW. 2002. Echinocandins: a new class of antifungal. *J Antimicrob Chemoter.* **49**: 889-891.
98. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2.000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemoter.* **47**: 3149-3154.
99. Messer SA, Jones RN, Moet GJ, Kirby JT, Castanheira M. 2010. Anidulafungin potency compared to nine other antifungal agents tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. and *Aspergillus* spp.: Results from the Global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008). *J Clin Microbiol.* Doi. **48**: 2984-2987.
100. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J *et al.* 2002. Comparison of caspofungina and amphotericin B for invasive candidiasis. *N England J Med.* **347**: 2020-2029.
101. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. 2001. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **20**: 276-279.
102. Scholer HJ. 1980. Flucytosine. In D. C. E. Speller (ed.), *Antifungal chemotherapy*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom. P. 35-106.

Bibliografía

103. Stiller RL, Bennett JE, Scholer HJ, Wall M, Polak A, Stevens DA. 1982. Susceptibility to 5-fluorocytosine and prevalence of serotype in 402 *Candida albicans* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* **22**: 482-487.
104. Barchiesi F, Arzeni D, Caselli F, Scalise G. 2000. Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother.* **45**: 401-412.
105. Hoban DJ, Zhanel GG, Karlowski JA. 1999. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Cryptococcus neoformans* isolates from blood cultures of neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**: 1463-1464.
106. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Huynh RJ, Diekema DJ. 2002. *In vitro* activities of 5-fluorocytosine against 8.803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob Agents Chemoter.* **46**: 3518-3521.
107. Soll DR. 2000. The ins and out of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev.***13**: 332-370.
108. Krom BP, Cohen JB, Mc Elhaley-Feser G, Busscher HJ, van der Mei HC, Cihlar RL. In 2009. Conditions for optimal *Candida* biofilm development in microtiter plates. *Methods Mol Biol.* **499**: 55-62.
109. Ramage G, López-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. From: *Methods in molecular medicine*. Vol 118: *Antifungal Agents: Methods and Protocols*. Edited by: E.J. Ernst and P.D Rogers © Humana Press. Inc. Totowa. NJ.
110. CLSI. 2008. M27-S3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard. 3rd informational Supplement. CLSI document M27-A. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
111. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP. 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States; 1980-1989. *Am J Med.* **91 (3B)**: 86S-89S.
112. Beck SC, Jarvis WR. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States; 1980-1990. *J Infect Dis.* **167**: 1247-1251.

113. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S. 1992. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of the mortality. *Clin Infect Dis.* **15**: 414-421.
114. Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR *et al.* 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med.* **100**: 617-623.
115. Pfaller MA, Diekema DJ. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* **10**: 11-23.
116. Pfaller MA, Diekema DJ. 2002. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol.* **40**: 3551-3557.
117. Pemán J, Cantón E, Orero A, Viudes A, Frasset J, Gobernado M. 2002. Estudio multicéntrico de las candidemias en España. *Rev Iberoam Micol.* **19**: 30-35.
118. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. 2002. Increasing incidence of candidemia: results from a 2 –year nationwide study in Iceland. *J Clin Microbiol.* **22**: 254-257.
119. Poikonen E, Lyytokainen O, Anttila VJ, Ruutu P. 2003. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg Infect Dis.* **9**: 985-990.
120. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison H, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA *et al.* 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* **42**: 1519-1527.
121. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS *et al.* 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis.* **29**: 1164-1170.
122. Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. 2000. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients evolution of risk factors after the administration of prophylactic fluconazole. *J Infect Dis.* **181**: 309-316.
123. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington–Skaggs BA, Brandt ME *et al.* 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol.* **42**: 4468-4472.

124. Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, Warnock DW, Soll DR, Ghannoum MA. 2004. *Candida parapsilosis*: Characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis.* **10**: 1074-1081.
125. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W *et al.* 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* **37**: 634-643.
126. Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. 1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* **33**: 1815-1821.
127. Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Soll DR, Pujol C, Pfaller MA, Richardson M *et al.* 2005. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol.* **43**: 2729-2735.
128. Rodriguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F *et al.* 2006. Candidemia in neonatal intensive care units Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis J.* **25**: 224-229.
129. Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. 1992. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* **30**: 3249-3254.
130. van Asbeck EC, Clemons KV, Markham AN, Stevens DA. 2009. Correlation of restriction fragment length polymorphism genotyping with internal transcribed space sequence, randomly amplified polymorphic DNA and multilocus sequence groupings for *Candida parapsilosis*. *Mycoses.* **52**: 493-498.
131. Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. 2007. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol.* **45**: 1455-1462.
132. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2009. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* **47**: 2392-2397.
133. Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczi I, Pesti M, Pócsi J *et al.* 2007. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J Med Microbiol.* **56**: 190-195.

134. Connel JL, Wessel AK, Parsek MR, Ellington AD, Whiteley M, Shear JB. 2010. Probing prokariotic social behaviors with bacterial “lobster traps”. *Mbio asm org.* **1**: 00202-00210.
135. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**: 34-40.
136. Tuomanen E, Durack DT, Tomasz A. 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **30**: 521-527.
137. Wentland EJ, Stewart PS, Huang CT, McFeters GA. 1996. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnol Prog.* **12**: 316-321.
138. Jorgensen JH, Turnidge JD, Washinton JA. 1999. Antibacterial susceptibility test: dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology. p. 1526-1543.
139. Douglas LJ. 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol.* **19**: 139-143.
140. Hawser SP, Douglas LJ. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun.* **62**: 915-921.
141. Hawser SP, Douglas LJ. 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 2128- 2131.
142. Jenkinson HF, Douglas LJ. 2002. Interactions between *Candida* species and bacteria in mixed infections: In: Brodgen KA; Guthmiller JM (Eds.) Polymicrobial Diseases. Washington, DC, ASM Press. 357-373.
143. Baillie GS, Douglas LJ. 1999. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Meth Enzymol.* **310**: 644-656.
144. Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. 1998. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* **47**: 253-256.
145. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. 2007. *In vitro* formation of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* **52**: 761-767.
146. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD *et al.* 2001. Antifungal resistance of *candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *J Dent Res.* **80**: 903-908.
147. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 2475-2479.

148. Linton CJ, Sherriff A, Millar MR. 1999. Use of a modified Robbins device to directly compare the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* RP62A to surfaces. *J Appl Microbiol.* **86**: 194-202.
149. Domingue G, Ellis B, Dasgupta M, Costerton JW. 1994. Testing antimicrobial susceptibilities of adherent bacteria by a method that incorporates guidelines of the National Commite for Clinical Laboratory Standars. *J Clin Microbiol.* **32**: 2564-2568.
150. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* **37**: 1771-1776.
151. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Lee SK, Suh SP *et al.* 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* **40**: 1244-1248.
152. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R *et al.* 2007. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictor of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol.* **45**: 1843-1850.
153. Song J, Shin JH, Shint DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ *et al.* 2005. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol.* **43**: 657-661.
154. Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart R, Diekema D *et al.* 2009. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol.* **300**: 265-270.
155. Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 3081-3088.
156. Ruzicka F, Hola M, Votava M, Tejkalova R. 2007. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiology.* **52**: 209-214.
157. Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. 2007. *In vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **57**: 277-281.
158. Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M *et al.* 2008. EUCAST definitive document EDef 7.1: method

- for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeast. *Clin Microbiol Infect.* **14**: 398-405.
- 159.** Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. 2002. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? *Rev Iberoam Micol.* **19**: 133-138.
- 160.** Pfaller MA, Jones RN for the Microbiology Resource Committee of the College of American Pathologists. 2006. Performance accuracy of antibacterial and antifungal susceptibility test methods: report from the college of american Pathologists (CAP) Microbiology Surveys Program (2001-2003). *Arch Pathol Lab Med.* **130**: 767-778.
- 161.** Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingoff A, Jhonson EM, Andes D *et al.* 2006. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol.* **44**: 819-826.
- 162.** Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S *et al.* 2009. Comparison of results of fluconazole and voriconazole disk diffusion testing for *Candida* spp. with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS DISK Global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **65**: 27-34.
- 163.** Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ *et al.* 2004. Further standardization of broth microdilution methodology for *in vitro* susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3.000 clinical isolates. *J Clin Microbiol.* **42**: 3117-3119.
- 164.** Roy B, Meyer SA. 1998. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* **36**: 216-218.
- 165.** Arendrup MC, García-Effrón G, Lass-florl C, Gómez-López A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M *et al.* 2010. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: Comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and IsoSensitest media. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 426-439.
- 166.** Tunkel AR, Thomas CY, Wispelwey B. 1993. *Candida* prosthetic arthritis: report of a case treated with fluconazole and review of the literature. *Am J Med.* **94**: 100-103.

167. Yalaz M, Akisu M, Hilmioglu S, Calkavur S, Cakmak B, Kultursay N. 2006. Successful caspofungin treatment of multidrug resistant *Candida parapsilosis* septicaemia in an extremely low birth weight neonate. *Mycose*. **49**: 242-245.
168. Fleck R, Diezt A, Hof H. 2007. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and E-test. *J Antimicrob Chemother*. **59**: 767-771.
169. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA. 2003. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemoter*. **52**: 679-682.
170. Baran J, Muckatira B, Khatib R. 2001. Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *Scand J Infect Dis*. **33**: 137-139.
171. Sanglard D, Odds FC. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanism and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. **2**: 73-85.
172. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L and Hollis RJ. 2003. Activities of fluconazole and voriconazole against 1.586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and E-test methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol*. **41**: 1440-1446.
173. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. 2006. Global surveillance of *in vitro* activity of Micafungin against *Candida*: a comparison with Caspofungin by CLSI-recommended methods. *J Clin Microbiol*. **44**: 3533-3538.
174. Dannaoui E, Lortholary O, Raoux D, Bougnoux ME, Galeazzi G, Lawrence C *et al*. 2008. Comparative *in vitro* activities of caspofungin and micafungin, determined using the method of the european Committee of Antimicrobial Susceptibility testing, against yeast isolates obtained in France in 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother*. **52**: 3092-3098.
175. Baixench MT, Aoun TN, Desnos-Ollivier M, García-Hermoso D, Bretagne S, Ramires S *et al*. 2007. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *Antimicrob Agents Chemother*. **59**: 1076-1083.
176. García-Effrón G, Katiyar SK, Park S, Endlind TD, Perlin DS. 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fsk in *Candida parapsilosis*,

Bibliografía

- Candida orthopsilosis* and *C. metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 2305-2312.
- 177.** van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong A, Stevens DA. 2008. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **62**: 106-109.
- 178.** Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho K, Kee SJ *et al.* 2007. Species-Specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 1520-1523.
- 179.** Katragkou A, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C *et al.* 2008. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**: 357-360.
- 180.** Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 1773-1780.
- 181.** Valentin A, Cantón E, Pemán J, Quindós G. 2007. Actividad *in vitro* de la anfotericina B y la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. *Rev Iberoam Micol.* **24**: 272-277.



Anexo I

Caracterización de *Candida parapsilosis* complex en el área del H.U Virgen del Rocío en el periodo 2003-2009

9. ANEXO I

Protocolo de recogida de datos

Filiación del paciente:

Apellidos:

Servicio:

Sexo: H/M

Nombre:

N.H.C:

Edad:

Enfermedad de base

- Trasplante órgano sólido:
- Diabetes mellitus
- Leucemia/Linfoma :
- ADVP-VIH:
- EPOC:
- Enfermedad renal :
- Trasplante médula ósea:
- Cardiocirculatoria :
- Politraumatismo:
- Enfermedad gastrointestinal:
- Hepatopatía:
- TM sólido:

Factores predisponentes

- Vía central:
- Intubación:
- Respiración asistida:
- Cirugía previa:
- Sonda vesical:
- Vía periférica:
- Drenajes quirúrgicos:
- Ingreso en UCI:
- Nutrición parenteral:
- Corticoides:
- Quimioterapia:
- Prematuridad:
- Insuficiencia renal: