



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

MAESTRÍA EN MICOLOGÍA MÉDICA

“Impacto de las infecciones por *Candida parapsilosis* complex en una institución de alta complejidad en Cali, Colombia”.

Maestrando

Luisa Fernanda Martínez Amador

Director

Claudia Marcela Parra Giraldo

Bact, MSc, Ph.D.

Codirector

Fernando Rosso

MD, MSc.

Año 2019

DEDICATORIAS

A mis hijos Isabela y Nicolás de quienes espero se sientan orgullosos y les exhorto con mi ejemplo a ser perseverantes para alcanzar sus objetivos. “No hay tiempo ni circunstancias que impidan lograr las metas”.

A mi madre, a mi hermana Gloria, a su esposo Antonio quienes siempre me han apoyado en mis proyectos.

AGRADECIMIENTOS

Me siento muy satisfecha de haber realizado y finalizado este trabajo; muchas gracias a todas las personas que me apoyaron en este proceso.

A la Dra. Claudia Parra, coordinadora de la Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá, quien aceptó ser mí directora de tesis; junto con el grupo de investigadores en micología médica me apoyó, orientó y compartió sus conocimientos incondicionalmente.

Al Dr. Fernando Rosso codirector, quien junto con el personal del Centro de Investigaciones de la Fundación Valle del Lili del cual es director, me apoyo desde el inicio hasta el final con su conocimiento y experiencia sobre el tema. Gracias por motivar y sembrar en mí el deseo de investigar.

Al Dr. Andres Ceballos estudiante de Ph.D. , integrante del grupo de investigación en micosis de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá, por estar siempre dispuesto a aportar, discutir y sugerir sobre el tema planteado. Gracias por la disposición y por el tiempo dedicado.

A la Dra. Ana Maria Saenz "Anita" por la amable disposición, por el tiempo dedicado a despejar inquietudes y a generar aportes.

Al Departamento de Patología y Medicina del Laboratorio de la Fundacion Valle del Lili, a su director Dr. Ludwing Albornoz, a la Dra. Gloria Ines Lisarazo y al Dr. Jaime Patiño, por depositar su confianza en mí y darme el apoyo para cursar y finalizar esta maestría.

Al Dr. Juan Diego Velez, médico director del comité de infecciones e infectólogo de la Fundación Valle del Lili, quien ha sido mí ejemplo académico a seguir.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	1
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. <i>Candida parapsilosis</i> complex	8
1.1.1. Generalidades	8
1.1.2. Diferencias de especies del complejo	11
1.1.3. Factores de virulencia	12
1.1.3.1. Adherencia y formación de biopelículas	12
1.1.3.1.1. Pasos y fases en la formación de biopelículas	13
1.1.3.1.2. Resistencia por formación de biopelículas	14
1.1.3.1.3. Mecanismos de resistencia de las biopelículas a los fármacos	14
1.1.3.2. Enzimas	15
1.1.3.2.1. Proteasas	15
1.1.3.2.2. Fosfolipasas	15
1.1.3.2.3. Lipasas	16
1.1.3.2.4. Adhesinas	16
1.1.4. Genética	16
1.1.5. Sensibilidad a los antifúngicos	17
1.2. Fluconazol	18
1.2.1. Mecanismos de acción	18
1.2.2. Mecanismos de resistencia al Fluconazol	19
1.3. Equinocandinas	20
1.3.1. Mecanismos de acción y complejo B (1,3) D glucano sintetasa	20
1.3.2. Mecanismos de resistencia a equinocandinas en <i>C. parapsilosis</i>	21
1.4. Infecciones por <i>Candida parapsilosis</i> complex	21

1.4.1. Infecciones superficiales	22
1.4.2. Infecciones de mucosas	22
1.4.3. Endoftalmitis	22
1.4.4. Pancreatitis	22
1.4.5. Meningitis	22
1.4.6. Trastornos articulares	22
1.4.7. Infección de tracto urinario	23
1.4.8. Endocarditis	23
1.4.9. Peritonitis	23
1.4.10. Infecciones sistémicas	23
1.5. Diagnóstico de infecciones por <i>Candida</i> spp.	24
1.5.1. Técnicas para la identificación de levaduras a partir del cultivo	24
1.5.1.1. Técnica fenotípica	24
1.5.1.2. Métodos proteómicos	25
1.5.1.3. Métodos moleculares	25
1.5.2. Diagnóstico por métodos independientes del cultivo	26
1.5.2.1. Sondas de ácido peptidonucléico PNA	26
1.5.2.2. Biomarcadores y métodos moleculares	27
1.6. Prueba de sensibilidad antifúngica	28
1.7. Tratamiento antifúngico	29
2. JUSTIFICACIÓN	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1. Diseño del estudio	33
5.2. Escenario del estudio	33

5.3. Criterios de selección de la población	33
5.3.1. Población de referencia	33
5.3.2. Criterios de inclusión	33
5.3.3. Variables del estudio	34
5.3.4. Tamaño de la muestra	34
5.4. Análisis estadísticos	34
5.5. Caracterización clínica de la población en estudio	35
5.6. Caracterización microbiológica	35
5.6.1. Identificación de especies por espectrometría de masa	37
5.6.2. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> frente al FCZ por microdilución en caldo	38
5.7. Frecuencia de infección fúngica y tipos de aislamientos	40
5.8. Desenlaces clínicos	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Características demográficas y clínicas	41
6.2. Caracterización microbiológica	43
6.3. Frecuencia de infección fúngica	50
6.4. Desenlaces clínicos	52
7. DISCUSIÓN	58
8. CONCLUSIONES	65
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10. ANEXO	74

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS	1
Figura 1. Árbol filogenético de los clados <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i>	9
Figura 2. Árbol filogenético por secuenciación del subclado <i>parapsilosis</i>	10
Figura 3. Molécula de FCZ	18
Figura 4. Fórmula química de FCZ	18
Figura 5. Transcripción responsable de la resistencia de <i>C. parapsilosis</i> al FCZ	19
Figura 6. Esquema de la región ITS para la identificación de levaduras	26
Figura 7. Tendencia de <i>C. parapsilosis</i> complex en la FVL 2013-2017	41
Figura 8. Distribución de la CMI frente al FCZ de <i>C. parapsilosis</i> complex por grupos de edades	44
Figura 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo	47
Figura 10. Dendograma de los perfiles espectrales de masas obtenidos por MALDI [®] TOF MS	49
ÍNDICE DE TABLAS	
Tabla 1. Variables (anexo)	74
Tabla 2. Técnica para la identificación de <i>Candidas</i> sp. por espectrometría de masas MALDI [®] TOF MS (anexo)	77
Tabla 3. Identificación de especies de <i>C. parapsilosis</i> complex MALDI [®] TOF MS [®] Bruker Daltonik Biotyper (anexo)	77
Tabla 4. Rangos para la lectura CMI de ATCC 22019 y ATCC 6258. Técnica microdilución CLSI, documento M27-S4	38
Tabla 5. Resumen de la técnica de microdilución para la sensibilidad antifúngica en <i>Candida</i> sp. según guía CLSI M27-A3	39
Tabla 6. Puntos de corte para la CMI al FCZ, <i>C. parapsilosis</i> complex. CLSI.	39
Tabla 7. Resultados de la microdilución para <i>C. parapsilosis</i> complex (anexo)	80
Tabla 8. Caracterización de la población	42

Tabla 9. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> al FCZ por microdilución, por especies de <i>C. parapsilosis</i> complex	44
Tabla 10. Mediana, media, moda y rangos de la CMI del FCZ	44
Tabla 11. CMIs al FCZ por la metodología automatizada Vitek®2 y microdilución en caldo CLSI	83
Tabla 12. Especies de <i>C. parapsilosis</i> complex y CMIs al FCZ por microdilución	85
Tabla 13. Especies de <i>C. parapsilosis</i> complex y CMIs al FCZ por microdilución CLSI por grupo de edades (anexo)	85
Tabla 14. Concordancia entre aislados sensibles y resistentes al FCZ por el método automatizado Vitek®2 y microdilución por CLSI	45
Tabla 15. Frecuencia de la administración previa de antifúngicos y antibióticos, sensibilidad al FCZ, estratificado por edades	51
Tabla 16. Frecuencia de la administración previa de antifúngicos vs sensibilidad al FCZ	51
Tabla 17. Frecuencia de la administración previa de antibióticos y sensibilidad al FCZ	85
Tabla 18. Frecuencia de infección fúngica y condición de egreso	52
Tabla 19. Factores de riesgo. <i>C. parapsilosis</i> complex sensible vs resistente	86
Tabla 20. Factores de riesgo para desarrollar resistencia al FCZ por <i>C. parapsilosis</i> complex	53
Tabla 21. Sensibilidad al FCZ vs condición de egreso	55
Tabla 22. Factores de riesgo para muerte por <i>C. parapsilosis</i> complex (anexo)	87
Tabla 23. Promedio días hospitalización vs sensibilidad al FCZ	56
Tabla 24. Promedio de días de hospitalización estratificada por edad vs sensibilidad al FCZ	57

ABREVIATURAS

AFLP: *Amplification fragment-length polymorphism*

AFG: anidulafungina

AMB: anfotericina

BTS: *Bacterial test Standar*

CBP: *Clinical BreakPoint*

CFS: caspofungina

CMI: concentración mínima inhibitoria

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EUCAST: *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*

FCZ: fluconazol

FVL: Fundación Valle del Lili

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

IDSA: Sociedad América de Enfermedades Infecciosas

ITC: Itraconazol

ITS: región espaciadora interna transcrita

MALDI TOF MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

MFG: micafungina

MLST: *Multilocus sequense typing*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PNA: ácido nucleico peptídico

PNA FISH: *Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridation*

PSZ: posaconazol

R: resistente

RAPD: amplificación al azar del DNA polimórfico

RVZ: ravuconazol

S: sensible

S-DD: sensible dosis dependiente

SADH: deshidrogenasa alcohólica secundaria

SAP: enzimas de secreción aspártico proteinasas

Saps: aspartil proteinasas secretadas

s.s: *Sensu stricto*

TPN: nutrición parenteral total

UCI: unidad de cuidados intensivos

VRC: voriconazol

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Candida parapsilosis complex ocupa el segundo lugar en frecuencia entre las especies de *Candida* aisladas en la Fundación Valle del Lili (FVL), hospital universitario, afiliado a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Icesi, ubicado en Cali-Colombia. Tratar las infecciones ocasionadas por esta *Candida*, en algunos casos es complicado por la sensibilidad disminuida a las equinocandinas y por la tasa de resistencia al Fluconazol (FCZ), lo cual incrementa los días de estancia hospitalaria y los costos de atención en salud.

Este es un estudio observacional prospectivo, donde se caracterizó microbiológicamente 55 aislamientos de *C. parapsilosis* complex, obtenidos de 55 pacientes hospitalizados en la FVL; se caracterizó clínicamente la población y se establecieron los desenlaces clínicos teniendo en cuenta el perfil de sensibilidad de los aislamientos al FCZ. La identificación de las especies se realizó usando el equipo MALDI[®] TOF MS Bruker, librería Biotyper 3.1; la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente al FCZ se determinó por el método de microdilución en caldo, método de referencia siguiendo la guía M27 A3 de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y se comparó con la metodología automatizada Vitek[®]2. Se realizó un análisis estadístico univariado utilizando STATA[®] (Version 15.0, StataCorp LP, College Station, TX). La concordancia entre aislamientos sensibles y resistentes al FCZ por Vitek[®]2 y microdilución fue 96.23; la especie del complejo aislada con más frecuencia fue *C. parapsilosis* s.s.; el porcentaje de resistencia al FCZ fue del 36%; los factores de riesgo para resistencia de *C. parapsilosis* complex al FCZ fueron: terapia con Ciprofloxacina, Vancomicina y uso de antifúngicos previos FCZ, CAS (casposfungina) y AMB (anfotericina); entre los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensible o resistente al FCZ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la condición de egreso muerte; el promedio de los días de estancia hospitalaria fue de

57.6 y la mortalidad de 27.3%. En la población estudiada las fungemias por *C. parapsilosis* complex estuvieron relacionadas en un 50% con las muertes de menores de 18 años que recibieron nutrición parenteral entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 en la FVL.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas por *Candida* sp. han llegado a ser un problema de salud pública debido a que han causado un incremento en la morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), inmunosuprimidos y neonatos y a que; han aumentado los días de estancia hospitalaria y por consiguiente los costos de atención en salud (1). El éxito del tratamiento en las infecciones por *Candida* es con frecuencia subóptimo, con una tasa de mortalidad bruta estimada entre el 40-75% en el caso de las candidemias, y una tasa de mortalidad atribuible entre el 25-38% a un empleando terapias antifúngicas (2). El manejo en algunos casos es complejo debido a los patrones cambiantes de la epidemiología local, la sensibilidad a los antifúngicos y a las pocas pruebas de diagnóstico disponibles para la detección temprana de estas infecciones.

Los avances en la atención en salud han resultado un ambiente propicio para el incremento de infecciones oportunistas por *Candida* sp. en pacientes con factores de riesgo; como lo son el uso de antibióticos de amplio espectro, el uso de catéteres venosos centrales, la terapia de sustitución renal, la neutropenia, el uso de dispositivos implantables, el uso de agentes inmunosupresores, la colonización del paciente por *Candida* y las cirugías previas en especial las intestinales (3). Las cirugías intestinales son importantes debido a que las sepsis por *Candida* sp. usualmente emergen de especies colonizadoras del tracto gastrointestinal o de la piel. Adicionalmente, *Candida* tiene capacidad selectiva de proliferar en soluciones para hiperalimentación intravenosa y afinidad por los dispositivos intravasculares y materiales prostéticos (3).

La población que se encuentra en especial riesgo de infección nosocomial son los neonatos prematuros de bajo peso. La colonización de la piel o del tracto gastrointestinal es frecuentemente el primer paso en la patogénesis de la candidiasis diseminada y los neonatos se encuentran especialmente propensos (4). Otro grupo importante de

pacientes en riesgo son los de diálisis peritoneal ambulatoria, en los últimos años *C. parapsilosis* complex se convirtió en el agente etiológico más prevalente de peritonitis fúngica, complicación muy común y potencialmente fatal en estos pacientes (5). *C. parapsilosis* complex posee la habilidad de adherirse fácilmente a material protésico con extensa formación de biopelículas en la superficie de catéteres plásticos (4). El elevado contenido de glucosa del dializado y la implantación del catéter constituyen importantes factores que predisponen a los pacientes que requieren de diálisis peritoneal, a adquirir peritonitis fúngica por *C. parapsilosis* complex, lo cual se asocia a una importante morbilidad y a una tasa de mortalidad por encima del 44% (4).

Durante la década de los ochenta *C. albicans* fue considerada el principal agente etiológico de candidiasis diseminada, representando más del 70% de los casos de infección por *Candida* sp.; para la década de los noventa la incidencia había disminuido cerca del 50% de todas las infecciones nosocomiales por hongos, debido a un notable cambio epidemiológico hacia otras especies que en conjunto se denominan *Candida* no-*albicans*, entre las que se encuentran: *C. parapsilosis* complex, *C. glabrata* complex, *C. tropicalis* y *C. krusei* (5,6). En el año 2008, Trofa y colaboradores (4), reportaron nuevamente el posicionamiento de *C. albicans* como principal agente etiológico de la mayor parte de fungemias alrededor del mundo, seguida por *C. parapsilosis* complex, la cual es una de las más frecuentes especies no-*albicans* responsable de fungemias en pacientes hematológicos, endocarditis en pacientes con antecedentes de uso de drogas intravenosas o enfermedad valvular preexistente, meningitis en neonatos, peritonitis en pacientes tratados previamente con antibióticos o con diálisis peritoneal ambulatoria; infecciones que pueden llegar a comprometer la vida del paciente. Esta tendencia tiene implicaciones clínicas, debido a que varias de estas especies no-*albicans* son usualmente menos susceptibles a los antifúngicos convencionales a los que responde *C. albicans*, lo cual puede requerir un abordaje terapéutico diferente (4,7).

Otros estudios muestran como pacientes inmunocomprometidos, que han recibido tratamientos antifúngicos empíricos con azoles de primera línea o equinocandinas, han desarrollado candidemia entre un 40-70% por especies de *Candida no-albicans* (8); estas medidas en la mayoría de los casos reducen la morbilidad, la mortalidad y los días de hospitalización, pero no el riesgo de toxicidad, la aparición de resistencia y el aumento de costos. Las infecciones por *C. parapsilosis* complex resistentes a los azoles representan un desafío terapéutico por presentar sensibilidad reducida a las equinocandinas y por tener opciones limitadas de tratamiento (9), por lo tanto es esencial realizar una rápida identificación de los aislamientos y determinar su perfil de sensibilidad a los antifúngicos (9,10).

La opinión de los expertos sugiere a los laboratorios realizar pruebas de sensibilidad al FCZ de rutina en aislamientos de sangre y de sitios estériles, cuando no haya habido respuesta a la terapia antifúngica inicial y cuando existan sospechas firmes de resistencia a los azoles (7). Anteriormente, la sensibilidad de las diferentes especies de *Candida* a los agentes antifúngicos solía predecirse si se conocía la especie del aislamiento que causaba la infección, sin embargo actualmente la emergencia de resistencia en diferentes aislamientos hace que sea muy importante realizar pruebas de sensibilidad antifúngica, para guiar el tratamiento de las candidiasis sistémicas, especialmente cuando falla la respuesta a la terapia antifúngica inicial (7).

En Colombia se publicó en el año 2015 datos que muestran como al igual que en otros países de América Latina, las especies de *Candida no-albicans* causan más del 50% de episodios de candidemia, entre ellas las más frecuentes fueron *C. parapsilosis* complex y *C. tropicalis* (11,12). Estudios previos a este, realizados igualmente en Colombia muestran a *C. parapsilosis* complex como la *Candida no-albicans* más frecuente aislada en infecciones en neonatos (13) y la ubican en segundo lugar entre las especies de *Candida no-albicans* aislada en pacientes hospitalizados en UCI (14).

En el año 2011 fue publicado un estudio multicéntrico que incluyó 1752 aislamientos de *C. albicans* y no-*albicans* aisladas de sangre y que mostró una sensibilidad al FCZ de 100%, a excepción de *C. glabrata* complex que es intrínsecamente resistente a este antifúngico (15), la sensibilidad que años atrás mostraba *Candida* spp. al FCZ ha ido disminuyendo paulatinamente; como lo muestran estudios realizados en países Latino Americanos como Venezuela y Colombia, donde se muestra una resistencia al FCZ de 4.3% y 5% respectivamente en *C. parapsilosis* complex (15,16).

Hasta la fecha no se han publicado datos en Colombia estudiando *C. parapsilosis* complex y sus especies, sus perfiles de sensibilidad al FCZ y los desenlaces clínicos en los pacientes hospitalizados en instituciones de alta complejidad. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación podrán contribuir a direccionar tratamientos antifúngicos terapéuticos y profilácticos en los pacientes de la FVL, mostrarán en detalle las características microbiológicas de las especies de *Candida* que pertenecen al complejo *parapsilosis* y que hacen parte de la epidemiología de la FVL.

1.1 *Candida parapsilosis* complex

1.1.1. Generalidades

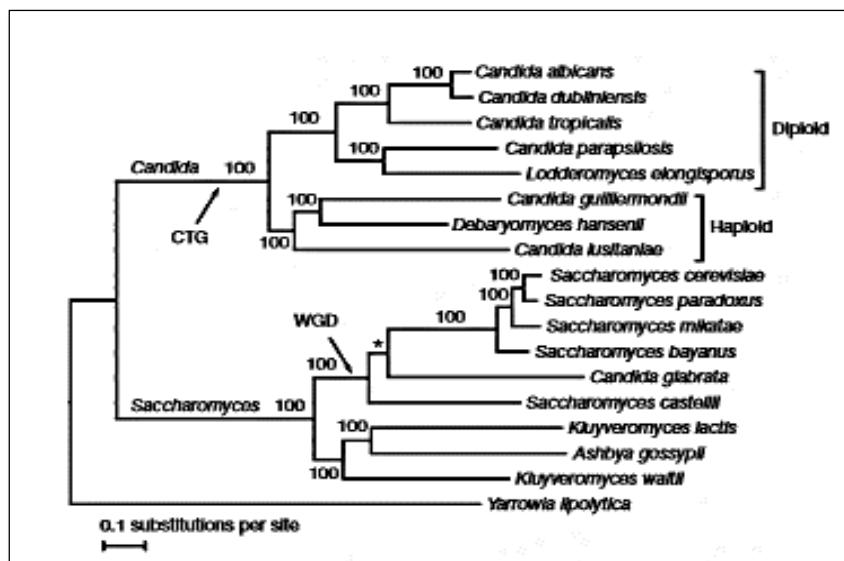
C. parapsilosis complex es un complejo de especies de levaduras que pertenece al Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Saccharomycotina, Clase Saccharomycetes, Orden Saccharomycetales, Familia Saccharomycetacea (17).

Este complejo de especies de levaduras fué aislado por primera vez en 1928 por Ashford Bailey, en un paciente de Puerto Rico que presentaba diarrea (18) y en esta época fue llamada *Monilia parapsilosis*, especie que hacía parte de la microbiota normal en individuos sanos. En 1932 fue reclasificada por Langeron en Francia como *C. parapsilosis* (19). posteriormente, en 1940 Joachim y colaboradores publicaron el caso de un paciente con endocarditis por *C. parapsilosis* que usaba drogas intravenosas (20) y, los

investigadores empezaron a asociar la infección con la entrada exógena de *C. parapsilosis* y, analizaron la relación que había entre esta *Candida*, la instrumentación médica invasiva y las soluciones de nutrición parenteral. Los estudios filogenéticos fueron hechos por Tavanti y colaboradores en el año 2005 (21), determinando la existencia de tres distintos genotipos relacionados: *C. parapsilosis sensu stricto* (s.s.), *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, de las cuales se conoce actualmente que existen diferencias en cuanto a sus patrones de sensibilidad a los antifúngicos y la virulencia (4,22).

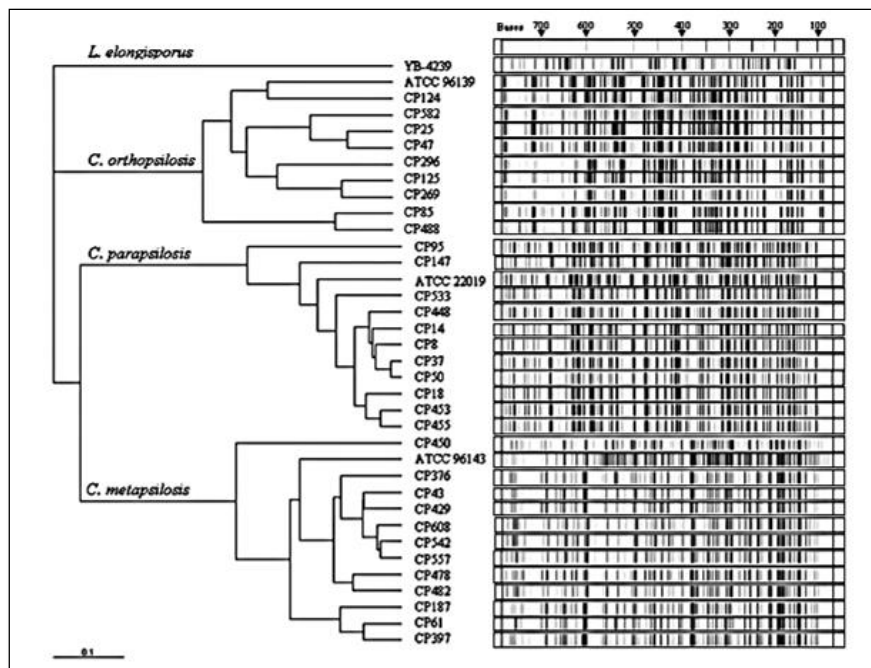
Casi todas las especies de *Candida* spp., a excepción de *C. glabrata* y *C. krusei* entre otras pertenecen al clado *Candida*, caracterizado por la traducción única de los codones CUG como serina en lugar de leucina 2; de este clado se desprenden siete subclados y de estos, siete especies de *Candida*, tres haploides y cuatro diploides. Las especies de levaduras que hacen parte del complejo *parapsilosis* pertenecen al clado CTG del género *Candida*, subclado *parapsilosis* y al grupo de especies de *Candida* diploides (23). Ver figura 1.

Figura 1. Árbol filogenético por secuenciación de los clados *Candida* y *Saccharomyces*



Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. Nature. 2009.

Figura 2. Árbol filogenético realizado por secuenciación del subclado *parapsilosis*



Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. Nature. 2009.

C. parapsilosis es una levadura unicelular de forma ovoide y/o alargada, se presenta sola o en pares, es capaz de formar pseudomicelios y no tiene la capacidad de formar hifas verdaderas. Inicialmente se nombró como *Monilia parapsilosis* y aunque en un momento se consideró que era el anamorfo del ascomiceto *Lodderomyces elongisporus*, diversos estudios probaron que este era un taxón diferente. No se le conoce forma de reproducción sexual a ninguna de las especies que forman el complejo *C. parapsilosis* (17,23,24), hacen parte de la microbiota humana, se han aislado frecuentemente de la piel y las uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales de la salud. También se han aislado de dispositivos médicos y se han asociado a entidades clínicas que van desde infecciones superficiales hasta infecciones sistémicas que pueden llegar a comprometer la vida del paciente (21).

1.1.2. Diferencias de especies del complejo *Candida parapsilosis*

Paul F. Lehmann y colaboradores en el año 1992, utilizando la amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD, por su sigla en inglés de *Random Amplification of Polymorphic DNA*) y la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS, por su sigla en inglés *Internal Transcribed Spacer*), métodos empleados actualmente en la investigación de posibles brotes y estudios de variabilidad genética en especies de *Candida*, demostraron la presencia de tres distintos grupos de *C. parapsilosis*, sugiriendo que se trataba de un complejo de especies (25). En el 2005, Tavanti y colaboradores mediante la tipificación multilocus de secuencias (MLST, por su sigla en inglés *Multilocus Sequence Typing*); reconocieron a los grupos II y III de *C. parapsilosis* como especies separadas y los designaron como diferentes especies: *C. parapsilosis* s.s (I), *C. orthopsilosis* (II) y *C. metapsilosis* (III) (21). Ver figura 2.

C. parapsilosis s.s es la especie del complejo aislada con más frecuencia en muestras clínicas, la más asociada a infecciones invasivas, a brotes hospitalarios y a formación de biopelículas. *C. orthopsilosis* es la especie más asociada a infecciones mucocutáneas, por tener la capacidad de dañar con facilidad los tejidos epiteliales y epidérmicos, porque su capacidad de formar biopelículas es reducida. *C. metapsilosis* se ha descrito como la especie que se ha aislado con menos frecuencia en muestras clínicas y es la menos virulenta de las tres especies del complejo, por tener menor capacidad de adherirse a las células epiteliales y por ser más susceptible al sistema inmune (26,27). Las diferencias que presentan en sensibilidad a los antifúngicos es poca, sin embargo *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* han mostrado CMI's más bajas para anfotericina B y equinocandinas que *C. parapsilosis* s.s (22).

Conociendo que existen complejos de especies en *Candida* como es el caso de *C. parapsilosis* complex y subespecies entre las especies como es el caso de *C. orthosilopsis* (28) la identificación fenotípica no es suficiente ni precisa para el

diagnóstico de infecciones por *Candida*; diferentes estudios han mostrado muy buena correlación entre la prueba molecular que determina polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP por su sigla en inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*) y la espectrometría de masas, para la identificación de especies del complejo *C. parapsilosis*. La espectrometría de masas es una técnica sencilla y confiable y podría ser usada de rutina en los laboratorios de micología de referencia o de instituciones hospitalarias de alta complejidad para la identificación de especies de *Candida* a nivel de género y especie (29).

1.1.3. Factores de virulencia

Las infecciones por *C. parapsilosis* complex en comparación a las causadas por otras especies como: *C. albicans* y *C. tropicalis*, ocupan el segundo lugar como la causa más común de candidemia en Europa y en América Latina, sin embargo en modelos de animales de experimentación ellas han mostrado menor virulencia comparada con otras especies de *Candida* (5).

Existen diversos factores potenciales de virulencia en *Candida* sp. como son: la morfología celular, secreción de enzimas hidrolíticas proteasas, fosfolipasas y lipasas, el cambio fenotípico y los factores de adhesión que favorecen la formación de biopelículas (4,30,31).

1.1.3.1. Adherencia y formación de biopelículas

Las biopelículas son asociaciones microbianas que se adhieren a las superficies gracias a la excreción de un exopolímero compuesto de glicocalix, formando una matriz adherente donde las formas micóticas: levaduras, hifas o pseudohifas quedan atrapadas y empiezan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos, haciéndolas más resistentes a las defensas del hospedero, a agentes antimicrobianos y a detergentes (18,30).

La colonización e infección por *C. parapsilosis* complex depende de su capacidad de adherirse a las células, a los tejidos y en especial a las mucosas. La adherencia a dispositivos médicos permanentes como catéteres intravasculares o urinarios, tubos endotraqueales, se asocian con infecciones y formación de biopelículas por *Candidas* pertenecientes al complejo *parapsilosis*; la formación de estas, limita la penetración de antifúngicos y no permite la entrada de sustancias a través de la matriz, confiriéndole protección frente a la respuesta inmune del hospedero (4,30,32). Las biopelículas formadas por *C. parapsilosis* complex son cuantitativamente menores y estructuralmente menos complejas que las formadas por *C. albicans*.

En poblaciones sésiles (poblaciones formadoras de biopelículas), las células modifican su respiración mitocondrial debido al gradiente de oxígeno y a los nutrientes disponibles, lo que genera heterogeneidad fisiológica característica que está estrechamente relacionada con la resistencia antifúngica, favoreciendo de esta manera la permanencia de *Candida* en el hospedero y ocasionando cronicidad en los procesos infecciosos (33). El material extracelular producido por *Candida* sp. contiene carbohidratos, proteínas y otras sustancias aún no estudiadas a profundidad pero diferentes al material extracelular producido por las células planctónicas (en flotación sérica) (30).

1.1.3.1.1. Pasos y fases en la formación de biopelículas

1. Adhesión inicial de las células
2. Germinación y formación de microcolonias
3. Filamentación
4. Desarrollo de monocapa
5. Proliferación y maduración

Fases

-Temprana de 0-12 horas

-Intermedia de 12 a 30 horas

-Madura de 38 a 72 horas

La verdadera morfogénesis inicia cuando la levadura entra en contacto con la superficie y empieza a formar las redes de levaduras, hifas y pseudohifas, en este proceso se presentan también aislamientos mutantes que no tienen la capacidad de hacer filamentos y por tanto son incapaces de formar biopelículas tridimensionales (30).

Se conoce que *C. albicans* tiene mayor capacidad de formar biopelículas que *C. parapsilosis* complex, no obstante esta las forma en menor proporción. De las tres especies del complejo *parapsilosis*, *C. parapsilosis* s.s y *C. orthopsilosis* tienden a formar más pseudohifas que *C. metapsilosis*, por lo tanto tienen mayor capacidad de formar biopelículas y ser más virulentas que esta última (30,34). Lo anterior se ha demostrado en estudios de investigación que muestran como la formación de pseudohifas en *C. parapsilosis* s.s. se da a las 24 horas, mientras que de cinco aislados de *C. orthopsilosis* solo dos generan pseudohifas a las 48 horas y por el contrario ninguno de los aislados de *C. metapsilosis* produce pseudohifas a las 48 horas de incubación (34).

1.1.3.1.2. Resistencia a los antifúngicos por la formación de biopelículas

La resistencia a los antifúngicos por la formación de biopelículas se demostró por primera vez en el año 1995 en el Reino Unido por Stephen Hawser y Julia Douglas gracias a trabajos experimentales realizados *in vitro* (35).

Las biopelículas formadas por *C. albicans* y *C. parapsilosis* complex han mostrado resistencia al Voriconazol (VRC) y al Ravuconazol (RVZ), una mayor sensibilidad a Anfotericina (AMB) liposomal, Micafungina (MFG) y Caspofungina (CFS) (18,30).

1.1.3.1.3. Posibles mecanismos de resistencia de las biopelículas a los fármacos

1. Penetración restringida a través de la matriz de la biopelícula.

2. Cambios de fenotipo que ocasionan disminución del crecimiento o limitación de los nutrientes.
3. Expresión de genes de resistencia inducidos por el contacto con la superficie, como los que codifican a las bombas de eflujo a los antifúngicos (30,36).

1.1.3.2. Enzimas

Las enzimas son consideradas factores de virulencia, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes para el crecimiento de los hongos, además de inactivar las defensas del organismo. Las principales enzimas relacionadas con la patogénesis de *C. parapsilosis* complex son: las proteasas (complejo enzimático de proteinasas aspárticas), fosfolipasas, lipasas y hemolisinas (30,31).

1.1.3.2.1. Proteasas

Las enzimas de secreción aspártico proteinasas (SAP) están presentes en *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* complex; en particular las aspartil proteinasas secretadas (Saps), se presentan en la fase inicial de infecciones en mucosas por *Candida* sp. pero no en la invasión de *Candida* a vasos sanguíneos. Estas enzimas tienen funciones especializadas durante el proceso infeccioso en la digestión de moléculas proteínicas para adquirir nutrientes, digerir o distorsionar las membranas del hospedero, la digestión de moléculas del sistema inmunitario del hospedero para evitar o resistir el ataque antimicrobiano de éste y por último facilitar la adhesión y la invasión a los tejidos (30,31).

1.1.3.2.2. Fosfolipasas

Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas de cuatro clases (PLA, PLB, PLC y PLD), que son secretadas y detectadas en la parte apical de las hifas durante la invasión de *Candida* a los tejidos. Cuando se presenta una delección de los genes que codifican su

expresión hay menor producción de la enzima y la virulencia se reduce hasta en un 60%, comparada con la de un aislado silvestre (4,30). El papel de las fosfolipasas en la patogénesis de *C. parapsilosis* complex aún no es claro, algunos estudios han mostrado una actividad del 51% en aislamientos provenientes de muestras sanguíneas y superficiales y, otros estudios han demostrado que no tienen actividad alguna (5,30).

1.1.3.2.3. Lipasas

Las lipasas secretadas por *C. parapsilosis* complex son codificadas por los genes CpLIP1 y CpLIP2. El patrón de expresión de estas enzimas se ha investigado en infecciones experimentales y en pacientes con candidiasis oral, demostrando que la expresión de esos genes depende del estado de la infección, más que de la localización del órgano afectado (30,31). Las funciones de las lipasas son catalizar la hidrólisis y la síntesis de triacilgliceroles, la digestión de lípidos para la adquisición nutricional, la adhesión a las células y a los tejidos del hospedero, las interacciones sinérgicas con otras enzimas y la autodefensa mediada por el lisado de la microflora competitiva presente en la microflora del hospedero. Las lipasas son estables a altas temperaturas y en presencia de solventes orgánicos, tienen elevada enantioselectividad y resistencia a la proteólisis (37).

1.1.3.2.4. Adhesinas

Los aislados adherentes de *Candida* sp. son más patógenas que las que tienen un fenotipo menos adherente, las adhesinas son biomoléculas que promueven la adherencia de las especies de *Candida* a las células del huésped o a sus ligandos específicos; existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida* sp. como: Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p (30,31).

1.1.4. Genética

Conociendo que *C. parapsilosis* complex presenta tres isoenzimas diferentes, que se correlacionan muy bien con otros marcadores genéticos, incluida la secuenciación del DNAr, varios estudios han demostrado una limitada variabilidad genética en el complejo y han permitido excluir de este a *L. elongisporus* especie originalmente reportada como teleomorfo de *C. parapsilosis* (38).

C. parapsilosis s.s. es la especie del complejo que muestra una menor diversidad genómica comparada con *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, se considera que las tres especies probablemente se originaron de un ancestro común. En *C. parapsilosis* s.s. se han descrito alelos presentes tanto en *C. metapsilosis* como en *C. orthopsilosis*, mientras que alelos específicos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* no se han identificado en *C. parapsilosis* s.s., lo anterior nos puede sugerir que esta a emergido recientemente mediante la divergencia de una subpoblación genéticamente homogénea que podría haber sido positivamente seleccionada debido algún rasgo fenotípico particular (39,40).

1.1.5. Sensibilidad a los antifúngicos

Las infecciones por *C. parapsilosis* complex han cobrado cada vez mayor importancia clínica, por el incremento de la resistencia a los antifúngicos especialmente a los derivados azólicos y en particular al FCZ. Aunque estudios recientes han mostrado que no hay diferencia entre los tratamientos empíricos realizados con FCZ o equinocandinas, estos muestran que el uso de equinocandinas para tratar esta micosis de manera empírica aumenta posteriormente las tasas de resistencia al FCZ, por tanto los estudios de sensibilidad son imprescindibles antes de instaurar un tratamiento (41,42).

Actualmente hay varios métodos para el estudio de la sensibilidad antifúngica en hongos levaduriformes del género *Candida*, sin embargo los dos métodos estandarizados para

determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) *in vitro* aceptados internacionalmente son: los recomendados por el instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI por su sigla en ingles *Clinical and Laboratory Standards Institute*) con los documentos M27-A3 y el suplemento M27-S4 (43,44) y por el comité europeo de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (EUCAST por su sigla en ingles *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) descrito en el documento EDef 7.3 (45). Ambos métodos emplean la técnica de microdilución en caldo, con algunas diferencias metodológicas. También esta el método de difusión en disco desarrollado por el CLSI con los documentos M44-A2 y M44-S2; sin embargo su uso es limitado por los problemas de difusión del antifúngico sobre el agar. Hay otras alternativas comerciales como el Sensitre Yeast One, E-test, difusión en agar con discos de Neo Sensitans de Rosco, Fungitest, ASTY, la técnica no colorimétrica basada en dilución de caldo ATB-Fungus y el método automatizado Vitek®2 (46).

1.2. Fluconazol

La estructura molecular y la fórmula química del FCZ se pueden ver en las figuras 3-4.

Figura 3. Molécula de fluconazol

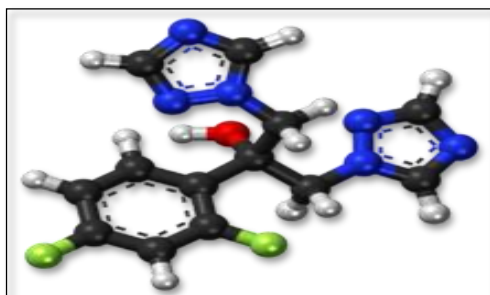
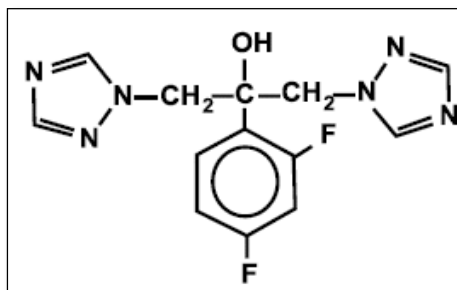


Figura 4. Fórmula química $C_{13}H_{12}N_6F_2O$



Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos Medwave 2005.

1.2.1. Mecanismos de acción

El Fluconazol fue introducido en el año 1990; al igual que los demás triazoles (Itraconazol ITC, VCR, PSZ y RVZ) tiene buena actividad contra la mayoría de especies de *Candida sp.*, excepto *C. glabrata* complex y *C. krusei*. Inhibe de forma selectiva la enzima 14- α -demetilasa en la síntesis del ergosterol, que es dependiente a su vez del citocromo p450 y esta codificada por el gen ERG11. La depleción del ergosterol, en conjunto con la acumulación de compuestos intermedios en la síntesis de este, con lleva a una pérdida de la funcionalidad de la membrana plasmática de *Candida sp.* (47,48).

1.2.2. Mecanismo de resistencia al Fluconazol

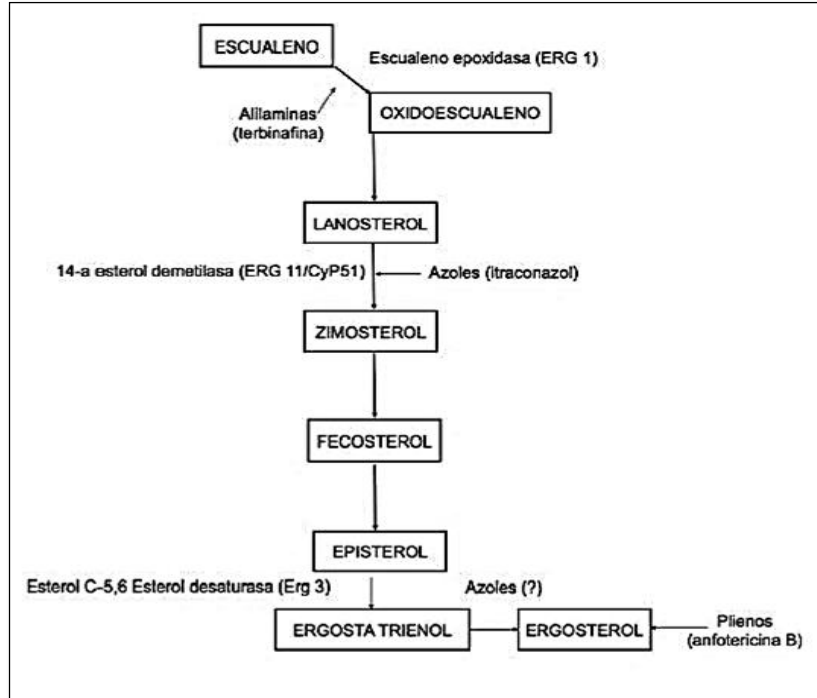
La resistencia al FCZ en aislamientos clínicos muestra una disminución en la enzima 14- α -demetilasa o la presencia de mutaciones, que pueden ser inducidas por la regulación negativa de su síntesis tras la exposición prologada al FCZ (49,50). Ver figura 5.

Utilizando métodos moleculares se demostró que la resistencia de *C. parapsilosis* complex al FCZ se debe principalmente a la disminución del antifúngico en el sitio de acción por bombas de eflujo, por la sobre expresión de los genes CDR1, CDR2, MDR1 y por mutaciones en el sitio de acción donde se incluyen los genes de la ruta de la biosíntesis del ergosterol: ERG2, ERG5, ERG6, ERG11, ERG24, ERG25 y UPC2(49,50).

Un estudio reciente de Rybak y colaboradores (51). mostró que la sustitución de G111R en ERG3 es responsable de la sensibilidad alterada a los azoles y a las equinocandinas en *C. parapsilosis* complex (52,53).

Si bien el FCZ y las equinocandinas se consideran los antifúngicos de elección para tratar infecciones por *C. parapsilosis* complex, estudios recientes han reportado resistencia a estos dos antifúngicos, lo cual nos indica que hay un problema que va en incremento y que amerita análisis para tomar medidas al respecto (47).

Figura 5. Vía metabólica de la síntesis del ergosterol, el lanosterol y sus derivados



Resistance in yeasts Int J Antimicrob Agents. 2017. Molecular basis of antifungal drug

De Colombia se conocen algunos datos sobre la epidemiología de *C. parapsilosis* complex y la resistencia al FCZ. En el año 2003 estudios de algunas instituciones hospitalarias de Colombia, Ecuador y Venezuela, mostraron que el porcentaje de resistencia al FCZ era del 5.5% (54). En el 2011, en un estudio multicéntrico donde participó Colombia, la sensibilidad al FCZ fue del 100% para *C. parapsilosis* complex (15), posteriormente en el 2014 se publicó una resistencia de 42.5% al FCZ en aislados de *C. parapsilosis* complex de instituciones hospitalarias de la ciudad de Bogotá (14). Lo anterior muestra como la resistencia al FCZ por *C. parapsilosis* complex en instituciones hospitalarias de Colombia va en aumento año tras año, por lo tanto es importante identificar correctamente las especies de *Candida* aisladas de muestras clínicas, vigilar su incidencia y perfil de sensibilidad, para poder ayudar a predecir fallas en el tratamiento y orientar una mejor terapia antifúngica.

1.3. Equinocandinas

1.3.1. Mecanismos de acción y complejo B (1,3) D glucano sintetasa

Las equinocandinas (CFS, MFG y AFG), son lipopeptidos con acción fungicida para todas las especies de *Candida* inclusive las resistentes al FCZ. Conociendo que la pared celular de las células micóticas está compuesta por proteínas y polisacáridos como glucano, manano y quitina, las equinocandinas inhiben la síntesis del D-glucano el cual representa el 50 a 60% del peso de la pared celular, este se elabora a partir de la B-1,3 glucano sintetasa que en su estructura tiene dos subunidades Rho1p y Fskp con funciones catalítica y reguladora respectivamente. El sitio de unión de las equinocandinas es el Fskp, las cuales lo inhiben ocasionando lisis de las células por edema en la membrana y en la célula (4,55). Las CMI's para las tres equinocandinas (CFS,MFG y AFG) son mucho menores para *Candida* spp., comparada con las CMI's a la AMB y al FCZ, excepto para *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii*, las cuales tienen polimorfismos constitutivos en los FKS lo que las hace menos sensibles a las equinocandinas (55–57); en publicación del 2008, donde se tomaron 5.000 aislamientos de *Candida* spp. y un 14% de estos eran *C. parapsilosis* complex, se mostró que *C. parapsilosis* complex y *C. guilliermondii* requerían mayor concentración de antifúngico (CFS, AFG, MFG) para lograr la inhibición de su crecimiento (53). Lo anterior también se ha descrito en otros estudios donde se muestra con evidencia que existen diferencias entre las tres equinocandinas frente a *C. parapsilosis* complex; MFG se comporta de manera similar a CFS pero AFG muestra CMI's más bajas *in vitro*, haciéndolo más potente frente a *C. parapsilosis* complex (19,58).

1.3.2. Mecanismos de resistencia a equinocandinas descritos en *C. parapsilosis* complex

Aunque el origen de la resistencia de *C. parapsilosis* complex a las equinocandinas aún no se encuentra claramente comprendido, se dice que puede ocurrir debido a cambios en

la subunidad Fks1/2 de la glucano sintetasa (51). El complejo *C. parapsilosis* posee frecuentemente un polimorfismo que resulta en la sustitución de una alanina en la posición 660 (*hot spot* 1) por una prolina conservada, presente en la subunidad Fsk1 (56). La cadena respiratoria mitocondrial única de *C. parapsilosis* complex podría jugar también un papel importante para su baja sensibilidad a las equinocandinas, como lo demostró Chamilos y colaboradores en el 2006 (59) donde observaron un descenso en la CMI de la caspofungina después de una inhibición simultánea de todas las vías respiratorias del microorganismo.

1.4. Infecciones por *C. parapsilosis* complex

C. parapsilosis complex se encuentra asociada a varias entidades clínicas como: infecciones en mucosas, infecciones superficiales, infecciones del tracto urinario, infecciones sistémicas, endocarditis, peritonitis, endoftalmitis, pancreatitis, meningitis y trastornos articulares (4).

1.4.1. Infecciones superficiales: lesiones en uñas de tipo subungueal distal y lesiones en la piel (4).

1.4.2. Infecciones en mucosas: la vulvovaginitis es la principal mucositis causada por *C. parapsilosis* complex, lo cual se relaciona con el uso indiscriminado de los derivados azólicos; algunos autores consideran que es una levadura comensal y otros han mostrado como los aislados de *C. parapsilosis* complex en vulvovaginitis se caracterizan por una mayor secreción de proteinasas aspárticas, enzimas que pueden hidrolizar la inmunoglobulina A de la mucosa, barrera vaginal contra la infección (4).

1.4.3. Edoftalmitis: la endoftalmitis por *C. parapsilosis* complex ha sido relacionada con la cirugía de cataratas, el trasplante de córnea, la implantación de lentes intraoculares y los tratamientos con esteroides (4).

1.4.4. Pancreatitis: la pancreatitis esta asociada al uso de antibióticos de amplio espectro, el uso de nutrición parenteral y el uso de agentes inmunosupresores; aunque no son infecciones frecuentes se destacan los abscesos pancreáticos y la necrosis (4).

1.4.5. Meningitis: Las cirugías, las terapias antibióticas, la nutrición parenteral, la foliculitis cutánea, uso de catéteres intravasculares e intraventriculares constituyen importantes factores de riesgo para desarrollar la meningitis (4).

1.4.6. Trastornos articulares: la artritis por *C. parapsilosis* complex se encuentra relacionada con prótesis articulares, inoculación directa en procedimientos de artrocentesis en individuos de edad avanzada, con diabetes mellitus e inmunosupresión (4).

1.4.7. Infecciones del tracto urinario: estas infecciones no son muy frecuentes, están asociadas al uso de sondas urinarias y a la capacidad de adherencia de *C. parapsilosis* complex a la superficie de estas sondas que, es un factor importante para la colonización y la infección (4).

1.4.8. Endocarditis: *C. parapsilosis* complex es una de las especie de *Candida non-albicans* más relacionada con endocarditis. Los factores predisponentes son: el uso de válvulas prostéticas, el uso de drogas intravenosas, la nutrición parenteral, antibioticoterapia prologada, las válvulas, episodios previos de endocarditis y cirugía cardíaca reconstructiva. El tejido cardíaco más frecuentemente afectado es la válvula aórtica y el rango de mortalidad es del 42% al 65% (4).

1.4.9. Peritonitis: la peritonitis por *C. parapsilosis* complex es una complicación de la diálisis peritoneal ambulatoria continúa. *C. parapsilosis* complex tiene la habilidad de adherirse al material prostético y formar biopelículas, el contenido de glucosa que

contiene el dializado y la implantación de catéter son importantes factores predisponentes (4).

1.4.10. Infecciones sistémicas: la candidiasis invasiva es una causa importante de mortalidad a nivel mundial, la presentación más frecuente es la candidemia cuya incidencia varía dependiendo del área geográfica, enfermedad de base y características del paciente; en pacientes con cáncer la candidemia ha oscilado entre un 12 -15% relacionándose con el manejo inadecuado de los catéteres vasculares, material quirúrgico contaminado, alimentación parenteral y transmisión horizontal por parte del personal de salud (19). En Estados Unidos el mayor porcentaje de candidemias se presenta en menores de un año debido a la prematuridad, al uso de catéteres, a la alimentación parenteral y la transmisión horizontal por trabajadores de salud. En América Latina se presenta en todas las edades de acuerdo a los datos publicados por Nucci y colaboradores en el año 2013 (5). El 35-65% de todas las candidemias son causadas por especies de *Candida* no-albicans, de estas un 20-40% son por *C. parapsilosis* complex, principalmente en neonatos, pacientes con cáncer, trasplantados de médula ósea y enfermos hematológicos, Nucci, y colaboradores, en el mismo estudio ya mencionado (5) ubican a *C. parapsilosis* complex en primer lugar como causante de candidemias en Colombia con un 38,5%.

1.5. Diagnóstico de infecciones por *Candida* spp.

La identificación de las levaduras y sus especies se puede llevar a cabo utilizando métodos fenotípicos convencionales, morfología macroscópica y microscópica, pruebas inmunológicas, técnicas de biología molecular y proteómica (58).

Considerando la variabilidad genética inherente en *C. parapsilosis* complex, los métodos microbiológicos convencionales no son de gran utilidad, por lo tanto cada vez más se

recurre a técnicas más robustas, las cuales permiten identificar de manera precisa a nivel de especie este complejo de organismos (29).

1.5.1. Técnicas para la identificación de levaduras a partir del cultivo: fenotípicas, inmunológicas, proteómica y molecular.

1.5.1.1. Técnica fenotípica: se basa en la visualización microscópica de estructuras fúngicas y en las características bioquímicas de los aislados a partir de medios de cultivo como el agar Sabouraud, Mycosel, Agar leche-Tween 80 y Cromoagar (CHROMagar Candida[®], COLOREX Candida[®], Chromogen albicans[®], Candida ID[®], y CandiSelect[™].) (58).

La identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes se fundamenta en el estudio individualizado de una batería de diferentes nutrientes, hidrocarbonados o nitrogenados, sobre un medio sintético base para determinar el crecimiento selectivo de un aislado en su presencia. Existen diversas opciones comerciales para realizar estas pruebas como el AuxaColor[™], el Uni-Yeast-Tek[®], y el API 20C AUX[®], igualmente hay sistemas automatizados para la detección del metabolismo de las levaduras: sistema Vitek[®] 2, Sistema Biolog YT MicroPlate[®], Rapid Yeast Identification Panel MicroScan[®] (58).

1.5.1.2. Métodos proteómicos

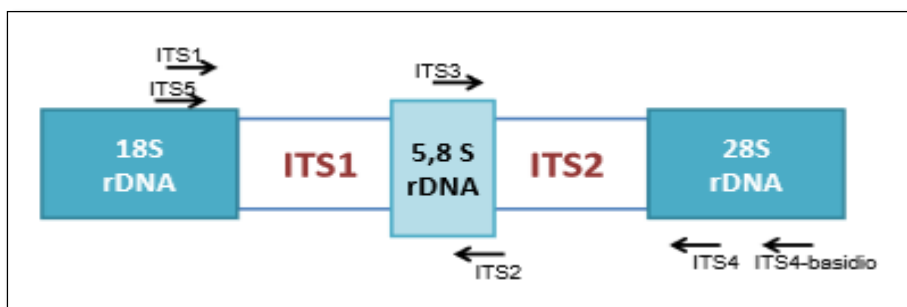
La desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz (MALDI por su sigla en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF por su sigla en inglés *Time-Of-Flight*), permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosómicas, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie. El espectro obtenido para un determinado microorganismo se compara automáticamente con la base

de datos y el resultado se emite en un rango de puntuación que está directamente relacionado con la capacidad de obtener una correcta identificación. Debido a la precisión de la técnica se ha comparado con la secuenciación genómica, obteniendo resultados favorables (29,60).

1.5.1.3. Métodos moleculares

Gracias a las pruebas moleculares el conocimiento sobre la taxonomía de los hongos se ha ido ampliando y se han descrito nuevas especies o especies crípticas dentro de complejos ya conocidos. Los ensayos moleculares usados con mayor frecuencia son: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés *polymerase chain reaction*), el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP por su sigla en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), la tecnología del ADN polimórfico aleatoriamente amplificado (RAPD por su sigla en inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*), el análisis de secuencias multilocus (MLST por su sigla en inglés *Multilocus sequence typing*), así como también la secuenciación de genes específicos, como: el gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria (SADH por su sigla en inglés *Secondary alcoholic dehydrogenase*) y los espaciadores transcripcionales internos (ITS1-ITS2 por su sigla en inglés *Internal transcribed spacer*) (29), los cuales son la diana para la identificación a nivel de género y de especie de la mayoría de las levaduras de importancia clínica (61). Ver figura 6.

Figura 6. Esquema de la región ITS y los primers usados para la amplificación e identificación de levaduras



Aislamiento e identificación molecular de levaduras. Universidad Nacional. Pedro F.B. 2014.

1.5.2. Diagnóstico por métodos independientes del cultivo

Estos métodos son usados a partir de muestras clínicas como ayuda diagnóstica en pacientes con candidiasis invasora que no tienen candidemia o para anticipar el diagnóstico en pacientes candidémicos.

1.5.2.1. Sondas de ácido peptidonucléico PNA

Las sondas de ácido nucleico peptídico (PNA por su sigla en inglés *Peptide Nucleic Acid*) ofrecen un medio para la detección y cuantificación de especies de microorganismos en muestras clínicas, productos alimenticios y otros sustratos mediante hibridación fluorescente in situ. Las sondas de PNA tienen una cadena principal peptídica a la que están unidos nucleótidos complementarios a una secuencia diana específica de especie, a esta se le adiciona un marcador fluorescente para la detección mediante microscopía de fluorescencia. Si las sondas son complementarias al rRNA, la célula complementaria de la especie objetivo fluoresce, esta técnica también permite la cuantificación por recuentos de células (60). El método de hibridación in situ fluorescente de ácidos nucleicos peptídicos (PNA FISH por su sigla en inglés *Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridation*) permite la identificación de microorganismos en aproximadamente dos horas y media; permite detectar las especies más importantes del género *Candida* incluyendo

C. albicans, *C. parapsilosis* complex, *C. tropicalis*, *C. glabrata* complex, y *C. krusei*, dependiendo del color emitido en la fluorescencia; aunque esta técnica no mejora la baja sensibilidad del hemocultivo, anticipa la identificación, lo que pudiera contribuir a la decisión de disminuir el uso de antifúngicos de amplio espectro (62).

1.5.2.2. Biomarcadores y métodos moleculares

Entre los biomarcadores más usados están la detección de el antígeno manano y/o anticuerpos antimanano, la detección de anticuerpos antimicelio (*C. albicans* germ tube antibodies CAGTA), la detección del 1,3-β-D-glucano, y la detección de ADN de *Candida* (63).

La detección de manano, antígeno predominante e inmunodominante de la pared celular de *Candida* spp. y la detección de anticuerpos antimanano frente a este antígeno, se han utilizado conjuntamente en pacientes con sospecha de candidiasis invasora y en pacientes neutropénicos por su elevado valor predictivo negativo (95%) y su capacidad de anticipar el diagnóstico. Aunque no se conoce mucho al respecto, algunos estudios muestran que la detección del antígeno manano en algunas especies de *Candida* no-*albicans* como *C. parapsilosis* complex no ha sido posible, dando como resultado falsos negativos, muy seguramente por su variabilidad genética (64,65). Considerando la alta prevalencia de anticuerpos antimanano en la población sana y/o colonizada, se han estudiado otros anticuerpos más específicos de candidiasis invasora como los CAGTA, ensayo de inmunofluorescencia que detecta anticuerpos contra el micelio de *C. albicans* y de otras especies de *Candida* no-*albicans* como: *C. parapsilosis* complex, *C. tropicalis*, *C. glabrata* complex, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* y *C. kruseii* (65).

El 1,3-β-D-glucano (componente de la pared celular fúngica que se libera durante la infección) es un biomarcador panfúngico cuya detección presenta un alto valor predictivo negativo que permite excluir la presencia de candidemia. En un estudio multicéntrico

donde se evaluó el desempeño de la prueba, se mostró una alta sensibilidad para todas las especies de *Candida* spp. excepto para algunas especies entre ellas *C. parapsilosis* complex (66).

La detección de ADN microbiano en sangre por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está todavía en debate para el diagnóstico de la candidemia comparado con el cultivo. La PCR ha demostrado disminuir los tiempos de diagnóstico y anticipar el inicio de la terapia antifúngica, la técnica tiene una sensibilidad y especificidad de 90.9 y 100% respectivamente (67). Existen técnicas comerciales como el SeptiFast (Roche Diagnostics, EE.UU.) o el FilmArray (BioFire DX, EE.UU.), que detectan ADN de bacterias y de algunas especies de *Candida* en sangre total o en líquidos estériles mediante PCR múltiplex en tiempo real o *microarray*. La mayor utilidad de estas técnicas se ha demostrado en pacientes críticos con sepsis, pero deben emplearse en combinación con el hemocultivo y nunca como sus sustitutos (67). Recientemente se ha comercializado el sistema "T2 Candida assay". Esta es una PCR comercial que utiliza la resonancia magnética para detectar la presencia de *Candida* en muestras de sangre completa de manera automatizada y rápida (3-4 horas) y tiene una sensibilidad analítica de 1 UFC/ml y valores predictivos positivos y negativos (91,7% y 99,6%, respectivamente). Detecta *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* complex, *C. parapsilosis* complex y *C. tropicalis* (68).

1.6. Pruebas de sensibilidad antifúngicas

Realizar pruebas de sensibilidad antifúngica a las levaduras del género *Candida* permite determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos y hacer vigilancia epidemiológica. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antifúngicos usados en la terapias frente a los hongos levaduriformes del género *Candida* de una manera confiable y reproducible se han utilizado los métodos de referencia del CLSI,

con los documentos: M27-A3 (*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*) (44), M27-S4 (*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Fourth Informational Supplement*) de 2012 (43), suplemento M60 (*Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast*) de 2017 (69). Y el *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing on Antifungal Susceptibility* (EUCAST-AFST) con el documento E.DEF 7.3 (45).

1.7. Tratamiento antifúngico

En algunos países americanos incluyendo Colombia los tratamientos para candidiasis se realizan de acuerdo a las guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis, de la Sociedad América de Enfermedades Infecciosas (IDSA). De acuerdo a este documento el tratamiento inicial recomendado para infecciones ocasionadas por *C. parapsilosis* complex en pacientes neutropénicos y no neutropénicos es el FCZ. Si se ha iniciado una terapia con una equinocandina y ha tenido buena respuesta se aconseja seguir el tratamiento con esta; en neonatos con candidiasis se recomienda usar AMB o FCZ, las equinocandinas en estos casos deben usarse con precaución (7). Algunos estudios muestran como el uso frecuente de equinocandinas en candidemias genera un aumento en la prevalencia de *C. parapsilosis* s.s. (70). Es importante considerar que *C. parapsilosis* complex muestra menos sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas (CFS, AFG, MFG) que la mayoría de las especies de *Candida*, sin embargo, varios estudios clínicos muestran que esta característica no interfiere en el éxito del tratamiento antifúngico cuando son usadas. *C. parapsilosis* s.s. es la especie que ha mostrado CMI's más elevadas al FCZ, CFS y AMB (71,72), considerando que las tasas de resistencia a los antifúngicos ha ido en aumento se hace necesario que los laboratorios de micología realicen las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos para direccionar el tratamiento.

2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones fúngicas por *C. parapsilosis* complex, pueden ser una amenaza para salud del paciente y requieren de una adecuada y rápida identificación del agente causal, al igual que el conocimiento oportuno del perfil de sensibilidad a los antifúngicos y de la epidemiología local, lo anterior con el fin de brindar el tratamiento más oportuno y correcto posible, disminuyendo la morbilidad y mortalidad.

En la Fundación Valle del Lili, institución prestadora de servicios de salud de alta complejidad en Santiago de Cali-Colombia, se tiene información previa que muestra a *C. parapsilosis* complex como la principal causa de fungemia. Se desconoce la real epidemiología de este agente, la frecuencia de las especies, el perfil de sensibilidad e impacto clínico que tiene en los pacientes cuando infecta sitios estériles. La población de pacientes que se atiende allí, es especialmente vulnerable por condiciones de base complejas, entre las cuales está la inmunosupresión por diferentes causas. Por esta razón, se requiere ampliar el conocimiento sobre infecciones fúngicas en general y específicamente sobre *C. parapsilosis* complex; este conocimiento generará información útil para un mejor abordaje terapéutico y preventivo.

3. HIPÓTESIS

Las infecciones fúngicas por especies de *C. parapsilosis* complex con perfil de resistencia al Fluconazol se asocian a desenlaces clínicos adversos en los pacientes hospitalizados en la Fundación Valle del Lili.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre la resistencia de *C. parapsilosis* complex al Fluconazol y los desenlaces clínicos adversos en pacientes hospitalizados en la Fundación Valle del Lili.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar clínicamente la población de estudio n=55 pacientes con candidiasis en un período comprendido entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 en la FVL.
2. Caracterizar microbiológicamente n=55 aislamientos de *C. parapsilosis* complex de la población en estudio, en un período comprendido entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 en la FVL.
3. Determinar la concordancia de sensibilidad y resistencia al FCZ entre las metodologías: microdilución en caldo y el método automatizado Vitek®2.
4. Determinar la frecuencia de infección fúngica (colonización, contaminación, infección) causada por las especies de *C. parapsilosis* complex.
5. Establecer los desenlaces clínicos de los pacientes en estudio, teniendo en cuenta el perfil de sensibilidad al FCZ de los aislamientos de *C. parapsilosis* complex y correlacionar el perfil de sensibilidad con el desenlace clínico de la infección.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño del estudio

Se desarrollo un estudio observacional prospectivo con pacientes hospitalizados en la Fundación Valle del Lili, centro hospitalario de alta complejidad, ubicado en Santiago de Cali, Colombia, durante el tiempo comprendido del 11 de noviembre de 2016 al 31 diciembre de 2017.

5.2 . Escenario del estudio

La Fundación Valle del Lili es un hospital universitario, afiliado a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Icesi, que atiende un número considerable de pacientes inmunosuprimidos por diferentes causas: trasplante de órganos sólidos y médula ósea, enfermedades hematológicas y oncológicas, pacientes con VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), neonatos y prematuros. El centro hospitalario cuenta con 90 camas UCI adultos, 30 camas UCI pediatría, 41 camas para neonatos, 290 camas en hospitalización de adultos y de pediatría. Los egresos vivos en el año 2017 por el servicio de urgencias fueron 69.756 y los egresos totales 16.251 adultos y 7.264 pediátricos.

5.3. Criterios de selección de la población

5.3.1. Población de referencia: pacientes hospitalizados en la FVL, con aislamiento de *C. parapsilosis* complex obtenidos de muestras clínicas de cavidades estériles, entre 11 de noviembre de 2016 y 31 de diciembre de 2017.

5.3.2. Criterios de inclusión: pacientes de ambos géneros, de todas las edades, hospitalizados en la FVL a los cuales se les aisló *C. parapsilosis* complex en muestras de cavidades estériles; se incluyó un aislamiento por paciente.

5.3.3. Variables del estudio: se incluyeron variables demográficas, clínicas, microbiológicas y de desenlace clínico. Ver anexo, tabla 1.

5.3.4. Tamaño de la muestra: no se realizó un muestreo, debido a que se incluyeron en el estudio todos los pacientes hospitalizados en la FVL n=55 con un aislamiento de *C. parapsilosis* complex, obtenido a partir de muestras de cavidades estériles, durante el año de estudio.

5.4. Análisis estadísticos

Las variables de interés del estudio se recolectaron a partir de la historia clínica y de la base de datos electrónica del Laboratorio de Microbiología de la FVL. Estos datos fueron registrados en una base de datos electrónica.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos, para determinar la calidad del registro y se complementaron los datos faltantes a partir de las historias clínicas. Para evaluar la calidad de los datos, se realizó un muestreo aleatorio del 10% de la base de datos; estos se compararon con los documentos fuente. Lo anterior, con el fin de verificar y corregir los datos extremos y los datos faltantes.

Una vez asegurada la calidad y total digitación de la base de datos, se realizó un análisis univariado. Para determinar el comportamiento de las variables numéricas, la normalidad de las variables se determinó a través de una prueba de Shapiro Wilk, aquellas con una $p > 0.05$ se consideran con distribución normal y que se presentaron con promedio y desviación estándar; aquellas que no fueron normales se presentaron con medianas y rangos intercuartílicos. Las variables categóricas se presentaron como proporciones.

Para la evaluación de la concordancia de la sensibilidad y resistencia al FCZ entre las metodologías Vitek®2 y microdilución en caldo, se utilizó el coeficiente de Kappa. Se realizó un análisis por subgrupos considerando resistencia vs sensibilidad. Las variables numéricas se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher, según correspondiera. Para el análisis bivariado se estimó el riesgo relativo (RR) para resistencia y mortalidad. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo para todos los análisis estadísticos. Todos los análisis fueron realizados utilizando STATA® (Version 15.0, StataCorp LP, College Station, TX).

5.5. Caracterización clínica de la población en estudio

Fueron incluidos todos los pacientes hospitalizados en la FVL (n=55) en el periodo de tiempo mencionado previamente, con cultivo positivo para *C. parapsilosis* complex. En el estudio hubo pacientes de ambos géneros y de todas las edades; la edad se categorizó de la siguiente manera: prematuros (menor a 37 semanas de gestación al momento del parto y peso ≤ 1000 gr), neonatos (0–30 días), pediátricos (30 días-17 años) y adultos (>17 años). Los diagnósticos de base se agruparon de la siguiente manera: prematuridad, sepsis, trasplante de órgano sólido, enfermedad neoplásica, enfermedad respiratoria (fibrosis quística, traqueítis, bronquiolitis, neumonía) y otros en donde se incluyó: meningitis, malformación intestinal, enterocolitis, falla intestinal, cistitis, traumatismo ocular, politrauma, parálisis cerebral, balanitis, falla multiorgánica e infección de herida.

Las patologías fueron: enfermedad neoplásica, respiratoria, cardíaca, diabetes, falla renal, catéter previo, hemodiálisis, cirugía previa, ventilación mecánica, nutrición parenteral total (TPN por su sigla en inglés *Total parenteral nutrition*) e inmunosupresión. Ver anexo, tabla 1. Variables clínicas.

5.6. Caracterización microbiológica de los aislamientos de *C. parapsilosis* complex

Se recolectaron (n=55) aislamientos de *C. parapsilosis* complex durante el tiempo comprendido entre 11 de noviembre de 2016 al 31 de diciembre de 2017 de n=55 pacientes hospitalizados en la FVL, obtenidos a partir de muestras de hemocultivo, líquido peritoneal, punta de catéter, lavado broncoalveolar, líquido pericárdico, líquido articular, orina, líquido cefalorraquídeo y secreciones de diferente origen. Las muestras se agruparon de la siguiente manera para realizar el estudio: hemocultivos, lavados broncoalveolares, líquidos peritoneales, punta de catéter y otros donde se incluyó: líquido pericárdico, líquido articular, orina, líquido cefalorraquídeo y secreciones de diferente origen; se identificaron n=55 aislamientos a nivel de complejo por espectrometría de masas utilizando el equipo MALDI[®] TOF MS[®], siguiendo el protocolo del Laboratorio de microbiología de la FVL con fin diagnóstico. Ver anexo, tabla 2 y tabla 3. Técnica de montaje MALDI[®] TOF MS[®]. Con fin diagnóstico a n=52 aislamientos se les realizó prueba de sensibilidad a los antifúngicos, utilizando el equipo Vitek[®]2 y la tarjeta AST-YS07, siguiendo las indicaciones del fabricante (bioMerieux, Francia) de la siguiente manera: partiendo de aislamientos cultivados en agar sangre, incubados 24h a 35°C, se tomaron una o dos colonias de *C. parapsilosis* complex y en un tubo de poliestireno estéril se realizó una dilución en tres ml de solución salina 0.45%, hasta obtener una turbidez equivalente a 1.8 - 2.2 de McFarland utilizando el instrumento Densichek[®] (bioMerieux), se puso la tarjeta AST-YS07 en el tubo, se introdujo el cassette en el equipo Vitek[®]2; 11,7– 26,5 h más tarde se obtuvieron las CMI correspondientes al FCZ. Los aislamientos se conservaron en caldo tripticasa soya y glicerol al 30% y se congelaron a - 80°C, cumplido el tiempo de recolección se transportaron en hielo seco, vía aérea desde la ciudad de Cali a la Unidad de Proteómica y Miosis Humanas, de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá (PUJ), donde se realizó la identificación de las especies y la

determinación de la sensibilidad al FCZ por microdilución en caldo. Para determinar la especie y la concentración mínima inhibitoria (CMI) al FCZ por el método de microdilución, los aislamientos fueron descongelados y cultivados en agar glucosado de Sabouraud, seguidos de una incubación a 37°C por 48 horas, repicados por segunda vez en agar glucosado de Sabouraud e incubadas a 37°C por 24 horas como lo indica la guía M27-A3 de CLSI (44). A los aislamientos se les realizó una segunda identificación por el equipo MALDI[®] TOF MS[®] Bruker, librería Biotyper 3.1, en la Unidad de Proteómica de la PUJ sede Bogotá, debido a que este equipo contiene en su librería las especies crípticas de *C. parapsilosis* complex como *orthopsilosis* y *metapsilosis*. Ver anexo, tabla 3. (Resultados identificación de especies de *C. parapsilosis* complex. Bruker Daltonik MALDI biotyper).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) frente al FCZ se determinó por el método de microdilución en caldo, método de referencia, siguiendo la guía M27-A3 de CLSI de 2008 (44), la interpretación de las CMIs se realizó de acuerdo al documento M27-S4 de 2012 (43) y M60 de noviembre de 2017 recomendados por CLSI (69). El estudio se realizó con los resultados obtenidos de la identificación y sensibilidad de los aislamientos de *C. parapsilosis* complex, correspondientes a n=55 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (un aislamiento por paciente). Ver anexo, tabla 1. Variables.

5.6.1. Identificación de especies de *C. parapsilosis* complex por espectrometría de masa MALDI Biotyper (BRUKER)

Una vez se obtuvo el crecimiento en fase exponencial de los n=55 aislamientos, se preparó una hoja de trabajo de la placa MALDI Biotyper con las identificaciones de las muestras, dejando las dos posiciones iniciales de la placa para la prueba estándar bacteriana (BTS por su sigla en inglés *Bacterial test estándar*) y la cepa de referencia ATCC 22019 de *C. parapsilosis*. Para estas y para los aislamientos se realizó un extendido delgado del microorganismo en la placa de acero con 96 pozos (las muestras

se procesaron por duplicado), se adiciono 1 µl de ácido fórmico al 100%, se dejó secar y luego se le adiciono 1 µl de Bruker Matrix HCCA a cada posición de la placa con las muestras, se dejó secar a temperatura ambiente y se analizó en el equipo, el cual detecta proteínas ribosomales y citosólicas presentes en la muestra, en donde se genera una huella espectral que permite determinar la identificación del microorganismo mediante el Software Biotyper 3.1, el cual hace una comparación con la librería de espectros, con un nivel de confianza que se calcula con base al porcentaje de probabilidad (0.000-1.699 no identificación, 1.700-1.999 identificación a nivel de género, 2.000-3.000 identificación a nivel de especie). Este módulo también permitió determinar la relación de los diferentes aislamientos y llevar a cabo una agrupación jerárquica de los mismos, representando los resultados en dendogramas, por el método de correlación y agrupamiento completo (73,74). Para elaborar el dendograma primero se creó una base de datos con los espectros de los aislados en estudio, posteriormente se realizó un análisis de la similitud de los espectros mediante el software (*ClinProTools, flex Analysis*), este análisis dio la información sobre la hetero/homogeneidad del juego de datos (espectros) representados en el dendograma (75).

5.6.2. Estudio de sensibilidad *in vitro* frente al FCZ en *C. parapsilosis* complex por el método de referencia de microdilución en caldo

Después de conocer el género y la especie de *C. parapsilosis* complex se realizó el estudio de sensibilidad *in vitro* al FCZ a n=55 aislamientos utilizando la técnica de microdilución en caldo (método de referencia), siguiendo la guía M27-A3 (44) del CLSI. Se utilizaron placas de microtiter previamente preparadas con concentraciones de 0.125 µg/ml a 64 µg/ml de FCZ (Sigma), conservadas en congelación a -70°C; se usó como control del procedimiento las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6528 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Tabla 4.

Tabla 4
Rangos para la lectura de la concentración mínima inhibitoria (CMI µg/ml) de *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. Técnica microdilución en caldo *in vitro*, documento M27-S4 CLSI.

Organismo	Antifúngico	24h			48 h		
		Rango	Moda	% dentro del rango	Rango	Moda	% dentro del rango
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Fluconazol	0.5-4.0	2.0	98.2	1.0- 4.0	2.0	98.1
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Fluconazol	8.0-64	16	100.0	16-128	32	100.0

Estas cepas fueron ensayadas en cada placa de sensibilidad y procesadas de la misma manera que los aislamientos del complejo *C. parapsilosis*; para determinar la CMI se tuvo en cuenta la concentración de FCZ que produjo una reducción del crecimiento de la levadura $\geq 50\%$ o Score 2, comparada con el crecimiento control sin FCZ cumplidas 48 horas de incubación. Tabla 5.

Tabla 5
Resumen de la técnica de microdilución para la sensibilidad antifúngica en *Candida* sp. según guía M27-A3 CLSI.

Parámetro	Guía/Documento M27-A3 CLSI
Medio	RPMI 1640 con glutamina, sin bicarbonato y concentración de glucosa de 0,2%
Densidad del inóculo	0,5 - 2,5 x 10 ³ UFC/ml
Lectura	Visual
Forma de la placa multipocillo	Fondo en U
Tiempo de incubación	24 y 48 horas
Punto final de lectura de CMI para azoles	Disminución del crecimiento $\geq 50\%$ en comparación con el control de crecimiento

Para la interpretación de los resultados se utilizaron los puntos de corte clínicos (CBP por su sigla en inglés *Clinical Break Point*) específicos para especie con base al documento M27-S4 (43) y el suplemento M60 de noviembre de 2017 (69), recomendados por CLSI.

Tabla 6.

Los aislados se clasificaron como sensibles (S), sensible dosis dependiente (S-DD) y resistentes (R).

Tabla 6
Puntos de corte para la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de FCZ, para *C. parapsilosis* complex después de 48 horas de incubación. De acuerdo al método descrito por el CLSI.

Antifúngico	<i>Candida</i>	CMI Rango (µg/ml)			
		S	I	SDD	R
Fluconazol	<i>C. parapsilosis</i> complex	S ≤2	-	4	R ≥8

S: sensible; I: intermedia; S-DD: sensible dosis dependiente; R: resistente
Documento M27-S4 de 2012 y suplemento M60 de 2017 CLSI
La categoría sensible no lleva implícito el éxito terapéutico
La categoría de resistente se correlaciona con un ~60% de fracaso terapéutico
La categoría S-DD para el Fluconazol se basa en los niveles de antifúngico que se alcanzan con dosis >=400 mg/día en pacientes con buen funcionamiento renal

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los resultados de sensibilidad y se calculó la CMI₅₀ y CMI₉₀ para FCZ, entendiéndose como tal a “la menor concentración de antifúngico necesario para impedir el crecimiento de *C. parapsilosis* complex *in vitro* del 50 y 90% de los n=55 aislamientos estudiados, se determinó la media geométrica, la moda y el rango. Ver anexo, tabla 7. Resultados técnica de microdilución utilizando la metodología descrita en el documento del CLSI M27-A3.

5.7. Frecuencia de infección fúngica

La información para estudiar la frecuencia de infección fúngica se obtuvo a partir de las notas del infectólogo tratante consignadas en la historia clínica de los pacientes. Los pacientes infectados por *C. parapsilosis* complex se definieron como pacientes con cuadro clínico sugestivo de infección micótica que recibieron tratamiento antifúngico antes o después del aislamiento microbiológico de *C. parapsilosis* complex. Los pacientes colonizados fueron aquellos a los que se aisló *C. parapsilosis* complex en muestras respiratorias y no recibieron manejo antifúngico, contaminados fueron aquellos pacientes

en los cuales se considero que el aislamiento de *C. parapsilosis* complex era parte de la microbiota normal.

5.8. Desenlaces clínicos

Para estudiar los desenlaces clínicos de los n=55 pacientes incluidos en el estudio se consideraron las siguientes variables sociodemográficas, las variables clínicas y microbiológicas: edad, diagnóstico de base, antecedentes patológicos, administración previa de antibióticos: Ciprofloxacina, Metronidazol, Piperacilina Tazobactam, Meropenem, Vancomicina, Ceftriazona, Cefepime, Amikacina, Ampicilina, Cefazolina y Linezolid; los antifúngicos: FCZ, AMB, CFS y AFG; coinfecciones por bacterias Gram positivas, Gram negativas fermentadoras, Gram negativas no fermentadoras e infecciones polimicrobianas; virus: citomegalovirus; el tratamiento antifúngico, la presencia de infección o colonización, el número de días en hospitalización, el ingreso a la UCI, el requerimiento de TPN, la condición de egreso (vivo o muerto), el origen de la muestra clínica cultivada, la sensibilidad o resistencia al FCZ de los aislamientos de *C. parapsilosis* s.s. y de *C. orthopsilosis*. Se compararon los casos resistentes y sensibles al FCZ de *C. parapsilosis* complex de acuerdo a las variables demográficas, clínicas y desenlaces.

6. Resultados

Se incluyeron en el estudio n=55 pacientes que cumplieron con los criterios de selección y con los resultados de la identificación de la especie y la sensibilidad al FCZ de *C. parapsilosis* complex.

6.1 Características demográficas y clínicas

La mediana de edad de la totalidad de los n=55 pacientes incluidos en el estudio fue de 3 años; el 53% de los pacientes eran de género masculino y el 47% femenino. Los pacientes prematuros, neonatos y pediátricos representaron el mayor porcentaje de la población en estudio 31 (57%), de estos 15 (50%) tenían como diagnóstico sepsis neonatal temprana o sepsis neonatal tardía.

La nutrición parenteral y cirugía previa fueron los antecedentes más frecuentes, seguidos de ventilación mecánica, inmunosupresión y enfermedad pulmonar; 50 (91%) pacientes recibieron antibiótico previo, 22 (40%) algún antifúngico previo y, de estos 17 (31%) recibieron FCZ. Del total de los pacientes en estudio 43 (78%) presentaron coinfección por otros microorganismos diferentes a *C. parapsilosis* complex; 50 (91%) requirieron manejo en UCI; 46 (84%) se consideraron infectados por *C. parapsilosis* y 15 pacientes (27%) fallecieron (Tabla 8).

Tabla 8
Caracterización de la población estudiada (n= 55 pacientes)

Característica	Neonatos	Pediátricos	Adultos	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Sexo				
Femenino	10 (56)	7 (54)	10 (42)	26 (47)
Masculino	8 (44)	6 (46)	14 (58)	29 (53)
Total	18 (33)	13 (24)	24 (43)	55 (100)
Antecedentes				
Malignidad	0	0	5	5 (9)

Enfermedad pulmonar	13	10	7	30 (55)
Enfermedad cardíaca	2	5	5	12 (22)
Diabetes	0	1	2	3 (5)
Falla renal	3	1	9	13 (24)
Catéter previo	2	4	8	14 (25)
Hemodiálisis	0	1	5	6 (11)
Cirugía previa	9	10	16	35 (64)
Ventilación mecánica	13	7	12	32 (58)
*TPN	18	8	9	35 (64)
Inmunosupresión	11	4	16	31 (56)
Diagnóstico				
Enfermedad neoplásica	0	0	4	4 (7)
Enfermedad respiratoria	3	2	2	7 (13)
Infección herida	0	0	3	3 (5)
Sepsis	8	0	4	12 (22)
Sepsis temperana	3	4	0	7 (13)
Trasplante	1	1	1	3 (5)
*Otras	3	6	10	19 (35)
Tipo de muestra				
Líquido peritoneal	3	1	4	8 (15)
Lavado broncoalveolar	1	2	4	7 (13)
Punta de catéter	0	0	3	3 (5)
Hemocultivo	14	8	8	30 (54)
♦Otros	0	2	5	7 (13)
Condición de egreso				
Vivo	13	10	17	40 (73)
Muerto	5	3	7	15 (27)
Antifúngico previo				
Ninguno	9	6	18	33 (60)
Fluconazol	8	6	3	17 (31)
Anfotericina	1	0	0	1 (2)
Caspofungina	0	1	3	4 (7)
Tipo de aislamiento				
Infección	17	12	17	46 (84)
Colonización	1	0	5	6 (11)
Contaminación	0	1	3	3 (5)
Requerimiento de UCI				
	11	4	16	50 (91)

*Otros: meningitis, malformación intestinal, enterocolitis, falla multiorgánica, cistitis, traumatismo ocular, parálisis cerebral, balanitis, politrauma e infección de herida.

*TPN nutrición parenteral.

♦Líquido sinovial, líquido pericárdico, secreción orotraqueal, urocultivo, secreción ocular, absceso peritoneal.

6.2 Caracterización microbiológica de los aislados obtenidos a partir de las muestras clínicas

La mayoría de aislamientos de *C. parapsilosis* complex se obtuvieron a partir de hemocultivos (n=30); 14 (47%) en neonatos, 8 (26%) en niños y 8 (26%) en adultos; seguidos de líquido peritoneal (n=8), 4 en menores de 18 años y 4 en adultos.

Los n=55 aislamientos se identificaron en el equipo MALDI[®] TOF MS[®] Bruker, 52 (95%) como *C. parapsilosis* s.s., 20 (36%) con CMI al FCZ superior a 4 µg/ml (5 S-DD y 15 R); tres (5%) identificados como *C. orthopsilosis* aisladas de pacientes adultos, sensibles al FCZ con CMIs entre 0.5 a 1 µg/ml. Tablas 9 y 10. Figura 8. Ver anexo, tablas 11, 12 y 13.

Tabla 9
Estudio de sensibilidad *in vitro* al FCZ por la técnica de microdilución, por especies de *C. parapsilosis* complex.

Especie	S	S-DD	R
<i>C. orthopsilosis</i>	3	0	0
<i>C. parapsilosis</i> s.s	32	5	15
Total	35	5	15

Se muestra los resultados de la identificación de especies de *C. parapsilosis* complex y el perfil de sensibilidad al FCZ por el método de microdilución, CLSI.

Tabla 10
Mediana, moda y rango de la CMI al FCZ, obtenidos para n= 55 aislamientos de *C. parapsilosis* complex.

Antifúngico	Mediana	Moda	CMI (µg/ml) rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀
FCZ	1	0,5	0.25 - 32	1	16

FCZ: Fluconazol; MG: media geométrica; CMI: concentración mínima inhibitoria; CMI₅₀: CMI donde se inhibió el crecimiento del 50% de los aislados; CMI₉₀: donde se inhibió el crecimiento del 90% de los aislados.

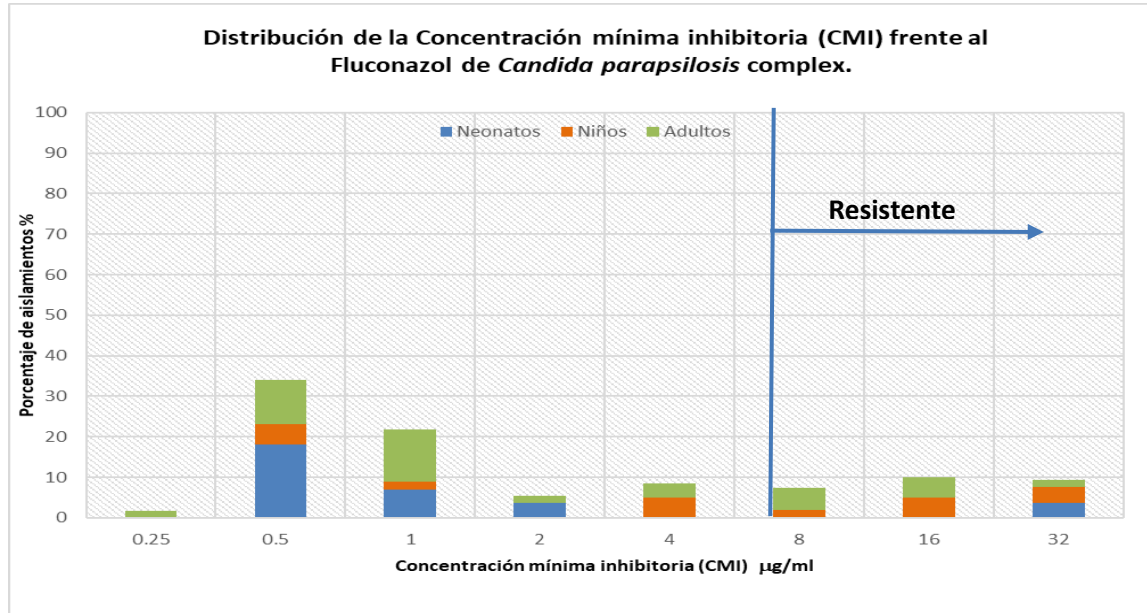


Figura 8. Distribución de la CMI frente al Fluconazol por grupo de edades, en 55 aislamientos de *C. parapsilosis complex*.

A n=53 aislamientos de n=55 se les cálculo el índice Kappa, para determinar la concordancia de sensibilidad y resistencia al FCZ entre las metodologías Vitek[®]2 y microdilución en caldo; a dos aislamientos no se les determinó previamente la sensibilidad al FCZ por Vitek[®]2 por no haber sido ordenados por el médico tratante, por lo tanto no se incluyeron en los cálculos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 51 aislamientos fueron concordantes en términos de sensible o resistente, los dos restantes mostraron falsa resistencia al FCZ por el equipo Vitek[®]2. Tabla 14.

Tabla 14
Concordancia entre aislados sensibles y resistentes al FCZ por el método automatizado Vitek2 y microdilución por CLSI. n=53 pacientes.

		Microdilución CLSI		
		Sensible	Resistente	Total
Vitek2	Sensible	31	0	31
	Resistente	2	20	22
	Total	33	20	53

Acuerdo observado	Acuerdo esperado	Kappa	Error estándar	Z	Prob > Z
96,23%	52,08%	0,9212	0,1369	6,73	0,000

Kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
>0,00 - 0,20	insignificante
0,21 - 0,40	discreto
>0,41 - 0,60	moderado
0,61 - 0,80	sustancial
0,81 - 1,00	casi perfecto

La concordancia entre aislamientos sensibles (S) y resistentes (R) fue de 96.23%, sin embargo se encontraron diferencias entre los valores de las CMI. Las concentraciones de FCZ de la tarjeta Vitek[®]2 YS07 son: ≤1, 2, 4, 8, 16, 32 y ≥64 µg/ml y las de microdilución en caldo son: 0.125, 0.25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg/ml. Las CMI de n=13 (25%) aislamientos fueron iguales, en las de los n=40 (75%) aislamientos restantes se presentaron diferencias (17 resistentes y 23 sensibles); en 4 de los 17 aislamientos resistentes la CMI al FCZ fue dos diluciones más por Vitek[®]2 con relación a la microdilución, en 10 una dilución más por Vitek[®]2 y en un aislamiento una dilución más por microdilución con relación a Vitek[®]2. Las discrepancias entre los resultados fueron categorizadas como errores muy mayores cuando el método de referencia lo clasificaba como resistente y la CMI obtenida por Vitek[®]2 como sensible; como errores mayores cuando el aislamiento era clasificado como resistente por el Vitek[®]2 y sensible por el método de referencia o viceversa y errores menores cuando el resultado de uno de los métodos era sensible o resistente y el otro era sensible dosis dependiente (S-DD). Se presentaron dos errores mayores: un aislamiento con CMI de 2 µg/ml por microdilución y ≥64 µg/ml por Vitek[®]2 y otro con CMI de 0.5 µg/ml por microdilución y 8 µg/ml por Vitek[®]2 (falsa resistencia por Vitek[®]2). Los dos aislamientos que presentaron errores mayores pertenecían a pacientes pediátricos; en uno de ellos el aislado de *C. parapsilosis* s.s se obtuvo a partir de sangre, el paciente falleció después de recibir AMB y FCZ durante tres meses; este aislamiento mostró una CMI a CFS de 1 µg/ml por la metodología

Vitek[®]2; el segundo aislado se obtuvo a partir de un lavado broncoalveolar, el paciente recibió dos días de AMB, su condición de egreso fue vivo, presentó una CMI a CFS de 4 µ/ml por la metodología Vitek[®]2 y 8 µg/ml por Etest.

De los n=23 aislamientos sensibles discordantes, 17 aislamientos procesados por Vitek[®]2 dieron una CMI ≤1 µg/ml y por microdilución CMI's entre 0.25 y 0.5 µg/ml (la tarjeta YS07 Vitek[®]2 no determina CMI's inferiores a 1 µg/ml), dos aislamientos dieron dos diluciones más por Vitek[®]2, tres una dilución más y un aislamiento una dilución más por microdilución con reacción a Vitek[®]2. Ver anexo, tabla 11.

Los resultados obtenidos en la prueba de microdilución ante FCZ para los 55 aislamientos se resume en la Figura 9. Resistencia al FCZ: 20 (36%) aislamientos.

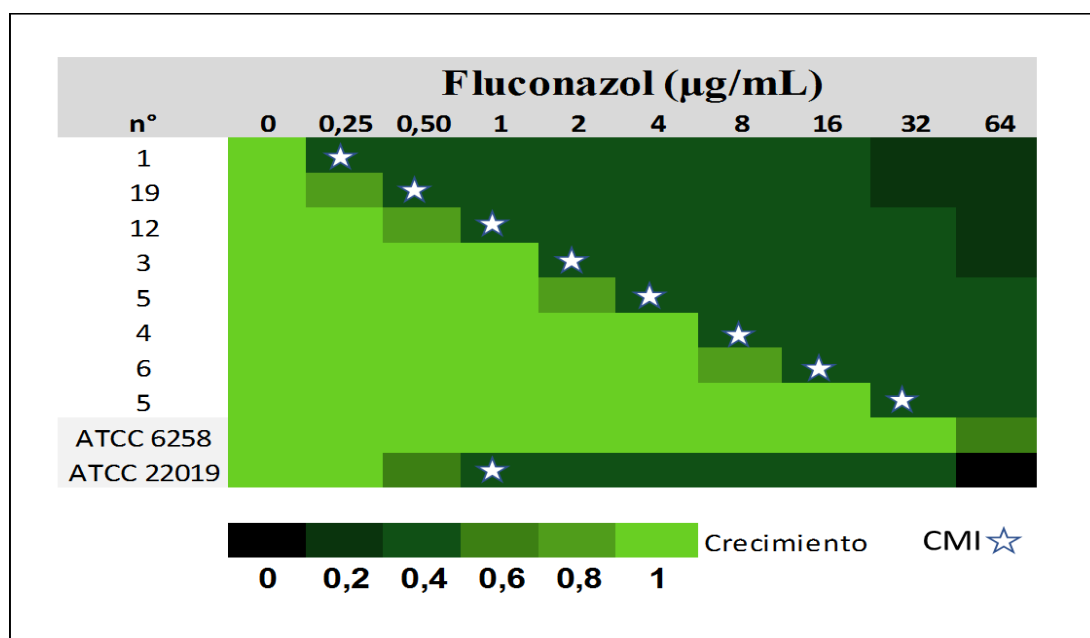


Figura 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *C. parapsilosis* complex en los n=55 aislamientos estudiados utilizando la técnica de microdilución en caldo.

Los resultados de cada uno de los ensayos se validaron en función de los datos correspondientes a las cepas ATCC control.

Con el objetivo de evaluar la diversidad de los aislamientos, fueron analizados los espectros de las masas obtenidos de los extractos citoplasmáticos de n=55 *C. parapsilosis* complex; para ello se utilizó el software de flex analysis del equipo de Bruker, donde se construyeron tres tipos de gráficos: 1. Dendograma (A), 2. Multicomponentes (PCA) (B) y 3. Mapas de calor (C), ver figura 11. En este análisis se observó la conformación de dos grandes clados (dendograma), los cuales se soportan en el PCA, donde se conforman dos grupos correspondientes a los clados; cuando se analiza el mapa de geles, de igual forma se identifica una variación en la abundancia de espectros de masas especialmente entre la relación carga/masa c/z entre 3000 y 7000. Para los análisis filogenéticos, el abordaje clásico es el estudio del análisis del gen 18S rRNA, sin embargo aunque independientes se ha documentado la correlación de estas relaciones filogenéticas con los dendogramas construidos con espectros de masas. Es así como en el análisis del grupo de *C. parapsilosis* complex del presente estudio se describen dos grupos que pueden estar relacionados o sugerir su relación clonal (76,77). Ver figura 10.

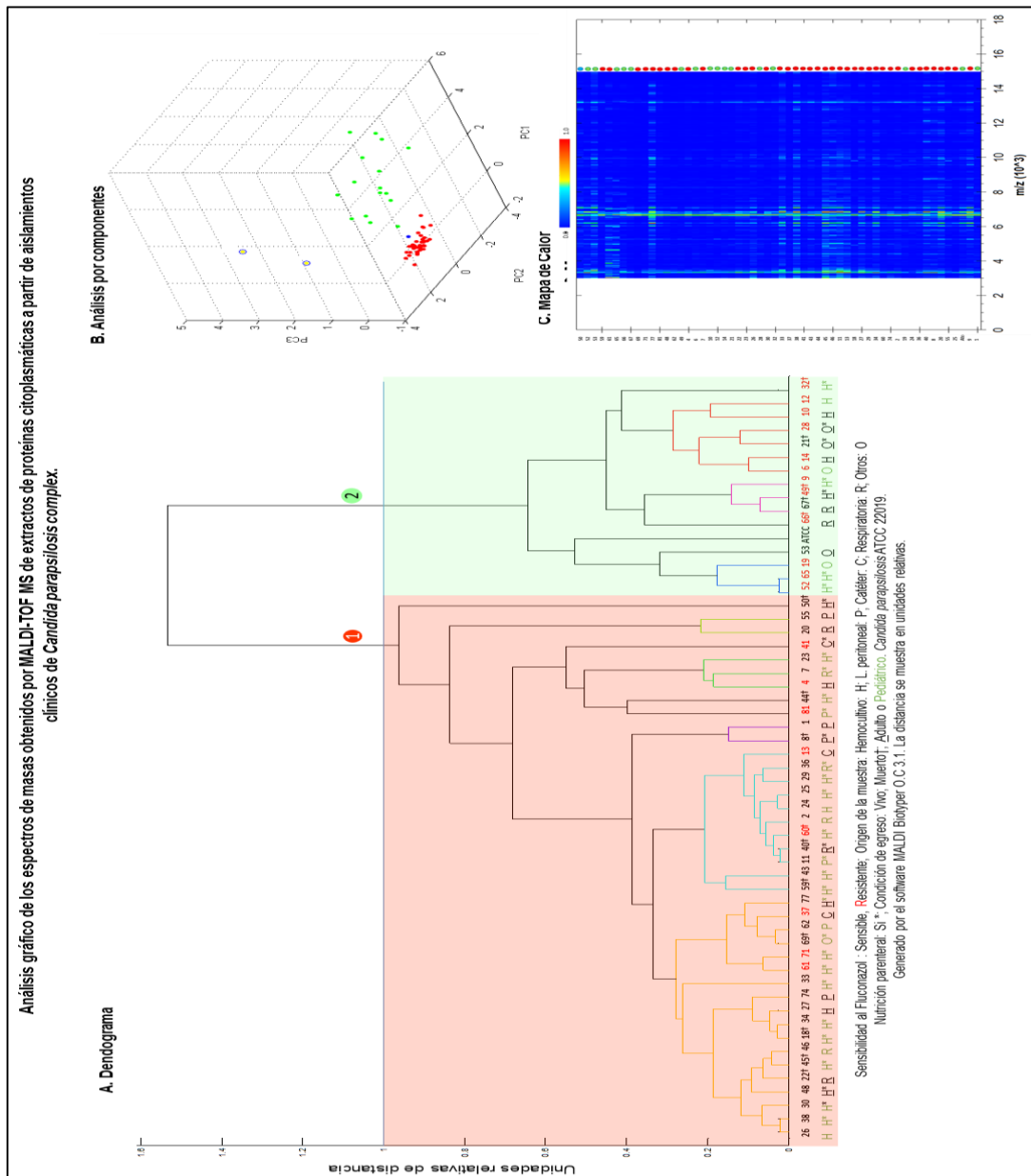


Figura 10. Dendrograma de los perfiles espectrales de masas de los n=55 a partir de 55 aislamientos estudiados de *C. parapsilosis* complex utilizando el software del equipo Bruker.

En el dendrograma que se ilustra en la figura 11 se observan dos cladros; en el número uno están incluidos 40 aislamientos, 22 obtenidos a partir de hemocultivos de 17 pacientes pediátricos y 5 adultos; 18 pacientes recibieron TPN y 6 pacientes fallecieron con aislamientos sensibles y resistentes al FCZ; en el clado número dos están incluidos los 15

aislamientos restantes, 8 aislados obtenidos a partir de hemocultivos de 5 pacientes pediátricos y tres de adultos; de los anteriores 4 pacientes pediátricos y un adulto estaban recibiendo TPN; 2 de estos pacientes fallecieron uno con un aislamiento sensible al FCZ y otro con un aislamiento resistente.

El análisis microbiológico mostró a *C. parapsilosis* s.s. como la especie más frecuente del complejo *parapsilosis* en la población estudiada; la correlación entre el método automatizado Vitek®2 y microdilución en caldo (considerada la prueba estándar de oro) para determinar la sensibilidad al FCZ fue buena, se presentaron diferencias entre los valores de las CMI; el estudio de sensibilidad mostró la menor concentración de FCZ necesaria para impedir el crecimiento de *C. parapsilosis* complex (*in vitro*) del 50% de los aislados estudiados en 1 µg/mL y del 90% de los aislados en 16 µg/mL.

6.3 Frecuencia de infección fúngica por *C. parapsilosis* complex

Del total de (n=55) pacientes en estudio, n=46 (84%) presentaron infección por *C. parapsilosis* complex (17 neonatos, 12 pediátricos y 17 adultos), n=44 (95%) de los aislamientos recuperados pertenecientes a estos pacientes se identificaron como *C. parapsilosis* s.s y 2 (5%) como *C. orthopsilosis*.; 33 (60%) pacientes no recibieron antifúngico previo, de estos pacientes 9 aislamientos presentaron resistencia al FCZ; 22 (40%) pacientes recibieron antifúngico previo (FCZ, CFS o AMB), 11 (20%) aislamientos de estos pacientes se identificaron como *C. parapsilosis* s.s y presentaron resistencia al FCZ (9 niños y 2 adultos); 50 (91%) pacientes recibieron antibiótico previo, 17 (33%) de los aislados de estos pacientes presentaron resistencia al FCZ. Tablas 15 y 16. Ver anexo, tabla 17.

Tabla 15
Frecuencia de la administración previa de antifúngicos y antibióticos, sensibilidad al FCZ estratificado por edades a n=55 pacientes incluidos en el estudio

	Sensible	Resistente (R + S-DD)
Antifúngicos previos (Si)		
Neonatos	5	2
Pediatrícos	0	7
Adultos	4	2
Antifúngico previo (No)		
Neonatos	11	0
Pediatrícos	4	2
Adultos	11	7
Antibióticos previos (Si)		
Neonatos	15	2
Pediatrícos	4	8
Adultos	14	7

Tabla 16
Frecuencia de la administración previa de antifúngicos vs sensibilidad al FCZ. (n=55)

FCZ	*Ninguno n (%)	*FCZ n (%)	*AMB n (%)	*CFS n (%)	Total n (%)
S	24 (73)	8 (47)	1 (100)	2 (50)	35 (64)
S-DD	1 (3)	3 (18)	0 (0)	1 (25)	5 (9)
R	8 (24)	6 (35)	0 (0)	1 (25)	15 (27)
Total	33 (10)	17 (100)	1 (100)	4 (100)	55 (100)

FCZ:se suministro Fluconazol previo

FCZ:Fluconazol; S: sensibles; S-DD: sensibles dosis dependientes; R: resistente.

*Ninguno: no se suministro antifungico previo

*AMB: se suministro Anfotericina previa

*CFS: se suministro Caspofungina previa

De acuerdo al criterio del médico tratante, n=6 (11%) aislados correspondientes a n=6 pacientes se consideraron colonización, de estos tres pacientes fallecieron; adicionalmente n=3 (5%) aislamientos se consideraron contaminación con microbiota normal (uno de estos pacientes falleció). Tabla 18.

Tabla 18
Frecuencia de infección fúngica y condición de egreso observadas en=55 pacientes

Neonatos	Condición de egreso		
	Vivo	Muerto	Total
Infección	12	5	17
Colonización	1	0	1
Total	13	5	18
Pedriátricos			
	Vivo	Muerto	Total
Infección	10	2	12
Contaminación	0	1	1
Total	10	3	13
Adultos			
	Vivo	Muerto	Total
Infección	13	4	17
Colonización	2	3	5
Contaminación	2	0	2
Total	17	7	24

6.4 Desenlace clínico de la infección por las diferentes especies de *C. parapsilosis* complex y el perfil de sensibilidad al FCZ

Se identificaron como factores de riesgo para resistencia de *C. parapsilosis* complex al FCZ los antecedentes de: terapia con Ciprofloxacina [RR=2.84; IC 95% (1.99-4.08); p=0.1819], Vancomicina [RR=2.60; IC 95% (1.17-5.77), p=0.0107] y uso de antifúngicos previos [RR=2.60; IC 95% (1.17-5.77), p=0.0299]. Sin embargo, el antecedente de Ciprofloxacina no fue estadísticamente significativo. Ver anexo. Tabla 19.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensibles y resistentes al FCZ, respecto a comorbilidades como la falla renal (p=0.002), el antecedente de recibir Vancomicina (p=0.011) y antifúngicos (p=0.03), uso concomitante de antibióticos (p=0.003), grupo de neonatos (p=0.005) y el aislamiento de punta de catéter (0.043). Tabla 20.

Tabla 20.

Comparación de los casos resistentes y sensibles al FCZ de n=55 aislamientos *C. parapsilosis* complex de acuerdo a las variables demográficas, clínicas y desenlaces clínicos

	Total	Resistente	Sensible	p-valor
n	55	20	35	
Sexo				
Masculino	29	11	18	0,799
Femenino	26	9	17	
Condición egreso				
Vivo	40	16	24	
Muerto	15	4	11	0.36
Comorbilidades				
Malignidad	5	2	3	1
EPOC	30	9	21	0.283
Enf. cardíaca	12	6	6	0,319
Diabetes	3	2	1	0,546
Falla renal	13	0	13	0,002
Catéter previo	14	6	8	0,559
Hemodiálisis	6	0	6	0,076
Cirugía previa	35	13	22	0.874
Ventilación mecánica	32	11	21	0,728
TPN	35	10	25	0,112
UCI	50	18	32	1
Hosp_prev_<30d	21	9	12	0,431
Antibióticos previos	50	17	33	0,249
Ciprofloxacino	1	1	0	0,365
Metronidazol	5	2	3	1
Pip/Tazo	14	4	10	0,483
Meropenem	18	7	11	0.786
Vancomicina	26	14	12	0.011
Ceftriaxona	9	4	5	0.582
Cefepime	13	5	8	1
Amikacina	18	4	14	0.128
Ampicilina	15	6	9	0.731

Cefazolina	2	1	1	1
Linezolid	1	0	1	1
Esteroides	29	10	19	0,759
Inmunosupresores	13	7	6	0,189
Antifúngicos previos	20	11	9	0,03
Co-infección	43	18	25	0,176
Edad				
Adultos	24	9	15	
Neonatos	18	2	16	0,005
Pediátricos	13	9	4	
Líquido peritoneal	8	1	7	0,129
LBA	9	1	8	0,133
Punta de catéter	3	3	0	0,043
Hemocultivo	31	13	18	0,329
Días_hospitalización*	46(17-70)	63.5 (29.5-92)	40 (15-65)	0,0863

Límite de p- valor 0.005

En pacientes pediátricos, pacientes a los cuales se suministro antifúngico previo, pacientes bajo teapia con Vancomicina o Ciprofloxacina e implantación de catéter, fue mayor la probabilidad de infección por *C. parapsilosis* complex resistente al FCZ; por el contrario en pacientes con falla renal la probabilidad mayor de infección se presentó por aislamientos sensibles. La resistencia al FCZ de *C. parapsilosis* complex en los aislados de los pacientes hospitalizados en la FVL entre el 2016 y 2017 se presentó por la suma de varios factores.

Se dio alta hospitalaria a n=40 pacientes (73%); 38 aislamientos de estos pacientes fueron *C. parapsilosis* s.s. y dos *C. orthopsilosis*; 24 sensibles (S) al FCZ y 16 resistentes (R).

Del total de pacientes incluidos en el estudio fallecieron 15 (27%) pacientes (5 neonatos, 3 pediátricos y 7 adultos), n=8 aislamientos recuperados de los pacientes que fallecieron

fueron obtenidos apartir de hemocultivo. Del total de los pacientes que fallecieron seis presentaron infección por *C. parapsilosis* s.s sensible (S) al FCZ, 4 por *C. parapsilosis* s.s. resistente (R) al FCZ , uno por *C. orthopsilosis* sensible (S) al FCZ, tres presentaron colonización por *C. parapsilosis* s.s sensible (S) al FCZ y uno se consideró contaminación por *C. parapsilosis* s.s sensible (S) al FCZ.

La tasa de mortalidad específica observada fue de 27.3%, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para condición de egreso muerte, entre los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensible y resistente al FCZ. Tablas 20 y 21.

Tabla 21
Sensibilidad al FCZ Vs condición de egreso hospitalario

Sensibilidad microdilución		Vivo	Muerto
Interpretación CMI	n (%)	n	n
S	35 (64)	24	11
SDD	5 (9)	4	1
R	15 (27)	12	3
Total	55 (100)	40	15

S: Sensible; SDD: sensible dosis dependiente; R: resistente

Se identificaron tres factores de riesgo para el desenlace en mortalidad por *C. parapsilosis* complex en la población estudiada: la enfermedad cardíaca [RR=3.14; IC 95% (1.43-6.89; p=0.0063)], la hemodiálisis [RR=2.97; IC 95% (1.38-6.41; p=0.0217)] y la falla renal [RR=2.83; IC 95% (1.27-6.3; p=0.0138)]. Ver anexo, tabla 22.

De los pacientes incluidos en el estudio n=50 (91%) requirieron estar en la UCI, el promedio de días de hospitalización de acuerdo a la edad fue: en el grupo de neonatos 53 días, en los pacientes pediátricos 82 y en el grupo de adultos 38; el promedio de días de hospitalización en pacientes con aislamientos sensibles (S) fue 43, S-DD 108 y resistentes (R) 57; el promedio de días de hospitalización por edades vs sensibilidad al

FCZ fue: en el grupo de neonatos con aislamientos sensibles (S) 52 días y resistentes (R) 60 días; en los pacientes pediátricos con aislamientos sensibles (S) 28 días, resistentes (R) 84 y (S-DD) 150 días y en el grupo de adultos con aislamientos sensibles (S) al FCZ el promedio de días de hospitalización fue 38 , resistentes (R) 34 y S-DD 45 días. Ver tablas 23 y 24.

Tabla 23
Promedio días hospitalización vs sensibilidad al FCZ en n=55 pacientes estudiados

	Media	SD	Min	Max	Mediana
Sensible	43,11	31,12	2	119	40
Resistente	57,0	43,09	7	162	52
S-DD	107,8	68,23	21	196	103

S-DD: sensible dosis dependiente; SD: desviación estándar; Min: mínimo, Max: máximo

Tabla 24
Promedio de días de hospitalización estratificada por edad vs sensibilidad al FCZ en n=55 pacientes estudiados

	Media	SD	Min	Max	Mediana
Neonatos					
Sensible	51,68	34,36	9	119	52,5
Resistente	59,50	10,60	52	67	59,5
Pediátricos					
Sensible	28	17,57	11	46	27,5
Resistente	83,67	52,09	10	162	75,5
S-DD	149,60	46,50	103	196	150
Adultos					
Sensible	38	29,05	2	113	29
Resistente	34,28	27,17	7	81	38
S-DD	45	33,94	21	69	45

S-DD: sensible dosis dependiente; SD: desviación estándar; Min: mínimo; Max:máximo

La mediana de la estancia hospitalaria de los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensible al FCZ fue 40 días, para los pacientes con aislamientos resistentes 52. La estancia hospitalaria fue

mayor para los pacientes a quienes se les aislo *C. parapsilosis* complex S-DD y R al FCZ, especialmente pacientes neonatos y pediátricos.

DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la identificación a nivel de especie de n=55 aislamientos de *C. parapsilosis* complex, correspondientes a n=55 pacientes hospitalizados en la Fundación Valle del Lili, en Cali-Colombia, entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017; se determinó la sensibilidad al FCZ por el método automatizado Vitek®2 y por microdilución en caldo (considerado el estándar de oro) de acuerdo al protocolo del CLSI. Se analizaron en los pacientes las características clínicas, la frecuencia de infección fúngica y los desenlaces clínicos de acuerdo al perfil de sensibilidad al FCZ. La población más afectada fue los menores de 18 años (57%), el 50 % de ellos con diagnóstico de sepsis neonatal temprana y sepsis neonatal tardía; cifra más alta a la reportada en el estudio de vigilancia de 23 hospitales en 8 países de América Latina incluida Colombia, donde se mostró que el 40% de las *Candidas* sp. aisladas en sangre eran de menores de 18 años. (78).

La fuente de aislamiento más frecuente fue a partir de hemocultivo (30) 55%, 22 (73%) de ellos se observaron en menores de 18 años (14 neonatos y 8 pediátricos). Al igual que en otros estudios se encontró que la presentación más común de candidiasis por *C. parapsilosis* complex es candidemia en pacientes neonatos y pediátricos (79); en varias revisiones incluyendo una Colombiana de 2015 se confirma el dato anterior, allí refieren que cerca del 70% de las candidemias en neonatos tienen foco sanguíneo (80).

Las infecciones por *C. parapsilosis* complex en los pacientes estudiados fueron de origen exógeno y endógeno; los factores poblacionales de riesgo más relevantes fueron: la antibioticoterapia previa 91% (50), la inmunosupresión 56% (31) y la enfermedad pulmonar 55% (30). Los factores de riesgo condicionantes fueron: estancia prolongada en UCI 91% (50), nutrición parenteral (TPN) 64% (35), cirugía previa 64% (35) y ventilación mecánica 58% (32). La composición de las soluciones parenterales favorece el crecimiento de *C. parapsilosis* complex, factor que se asocia con invasión sanguínea en

pacientes neonatos (6,81); los anteriores factores contribuyeron al pronóstico, tiempo de estancia hospitalaria y la sobre vida de los pacientes hospitalizados en la FVL; de allí la importancia de conocer los datos locales de los factores inherentes al huésped, su epidemiología y el perfil de resistencia a los antifúngicos antes de instaurar una profilaxis primaria o un tratamiento empírico.

En el análisis microbiológico de los n=55 aislamientos de *C. parapsilosis* complex, *C. parapsilosis* s.s fue la especie mas frecuente con un 95%, seguida de *C. orthopsilosis* con un 5%; cifras similares a las reportadas de España (Bilbao-Sevilla), Venezuela y Brasil donde *C. parapsilosis* s.s fue la especie más frecuente (89-95%), seguida de *C. orthopsilosis* (2-8%). (15,71,82,83); sin embargo estos datos son muy diferentes a los publicados en el 2018 en India, en donde la frecuencia de *C. parapsilosis* s.s fue de 57.1% y *C. orthopsilosis* 40.2 %. (84).

La concordancia de la sensibilidad al FCZ de los n=53 aislamientos procesadas por Vitek®2 y la técnica de microdilución en caldo fue de 96,23%; en n=51 aislamientos hubo concordancia, dos aislamientos fueron sensibles al FCZ por microdilución y resistentes por Vitek®2, considerándose errores mayores; el porcentaje de acuerdo obtenido fue igual al publicado por Cuenca y col de España en el 2010 (85), y un poco más alto al publicado en Buenos Aires en el 2014, donde la concordancia fue de 93.8%, con la presencia de dos errores; uno mayor (falso sensible) y un error menor (S o R y S-DD) (86). Ambos estudios concluyen que el método automatizado para determinar la sensibilidad a los antifúngicos por Vitek®2 es un alternativa para determinar la CMI al FCZ en *C. parapsilosis* complex por tener un buen desempeño.(87), pero no reemplaza el método de referencia.

Adicionalmente se comparó las CMIs al FCZ de los 53 aislados procesados por las dos metodologías antes mencionadas; las CMIs de 13 aislamientos fueron 100% concordantes, en 40 aislamientos se presentó discordancia, en un rango de \pm dos

diluciones por Vitek®2 frente a la microdilución; en 2 aislamientos (4%) se presentó un error mayor (dos falsos resistentes por Vitek®2). Los datos obtenidos de concordancia, discrepancia y errores mayores coinciden con datos publicados previamente de Buenos Aires, donde se analizaron 176 aislamientos de *Candidas* de diferentes especies y se obtuvieron resultados de la CMI determinadas con el sistema Vitek®2 y con el método de referencia de microdilución en caldo descrito por el CLSI; los errores mayores con *C. parapsilosis* complex fueron el 3.1% y la concordancia >90% (86). Las técnicas de referencia para determinar la sensibilidad al FCZ tienen un procedimiento reproducible pero son complejas comparadas con las técnicas comerciales, Vitek®2 surge como una alternativa para determinar la sensibilidad antifúngica al FCZ en *C. parapsilosis* complex contribuyendo al manejo clínico del paciente (85).

Como se dijo anteriormente, la especie más frecuente en los aislamientos estudiados fue *C. parapsilosis* s.s. 52 (95%) aislamientos; de los cuales n=20 presentaron una CMI al FCZ superior a 4 µg/ml (5 S-DD y 15 R); los aislamientos de *C. orthopsilosis* recuperados fueron n=3 (5%), todos fueron sensibles al FCZ, con CMIs entre 0.5 y 1 µg/ml, los aislamientos fueron recuperados de pacientes adultos a partir de líquido peritoneal y lavado broncoalveolar; *C. orthopsilosis* ha sido más frecuentemente aislada en pacientes adultos a partir de líquido ascítico, abscesos, catéter, líquido cefalorraquídeo, muestras de tracto respiratorio (lavados broncoalveolares, secreciones traqueales) y líquido pleural (88). Los resultados fueron similares a los reportados en un estudio multicéntrico realizado en Norte América y estudio de Argentina donde la frecuencia de *C. parapsilosis* s.s fue de 91.3% y 98% respectivamente; con una frecuencia de *C. orthopsilosis* de 1.8% y 2% (88,89); mostrando a *C. parapsilosis* s.s como la especie del complejo *parapsilosis* con CMIs más altas al FCZ como se ha reportado en Norte América, Argentina y España (88–90).

Publicaciones recientes muestran porcentajes bajos de resistencia al FCZ para las diferentes especies de *C. parapsilosis* complex; Venezuela en el 2015 y 2016 reportó 4.3% y 9% de resistencia; India en el 2018 reportó 16% (15,19,88,91), sin embargo los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una resistencia al FCZ de 36%, CMI₅₀ de 1µg/ml y CMI₉₀ de 16; porcentaje de resistencia alto comparado con los datos de las publicaciones anteriormente citadas. Hasta la fecha no hay reportes de Colombia donde se muestren las especies de *C. parapsilosis* complex, su perfil de sensibilidad al FCZ y los desenlaces clínicos en pacientes hospitalizados de alta complejidad; por lo tanto estos datos podrán ser usados para direccionar tratamientos antifúngicos profilácticos, terapéuticos y disminuir costos en la atención de salud, de los pacientes hospitalizados en la FVL en donde la incidencia de *Candida parapsilosis* complex en los años 2016 y 2017 superó el 50% de las especies de *Candida* no albicans causantes de fungemias. Cabe anotar que esta incidencia se relaciona con el área geográfica, las características de los pacientes y la enfermedad de base; adicionalmente podrá servir de guía para instaurar tratamientos antifúngicos, definir profilaxis, implementar técnicas precisas para la identificación de *C. parapsilosis* complex y técnicas para determinar el perfil de sensibilidad al FCZ en otros centros hospitalarios locales con características similares a los de la FVL. Se muestra también la necesidad de efectuar una vigilancia epidemiológica cuidadosa con el fin de conocer la frecuencia de *Candida* sp. y el perfil de sensibilidad a los antifúngicos.

Las especies de *Candida* sp., entre ellas las que pertenecen al complejo *parapsilosis* son frecuentes entre la microbiota comensal de individuos sanos; en condiciones de inmunocompromiso, de exposición a antimicrobianos e invasión de dispositivos biomédicos estas pueden llegar a causar infecciones severas (92). En la población estudiada n=46 pacientes presentaron infección por *C. parapsilosis* s.s y *C. orthopsilosis* (17 neonatos, 12 pediátricos y 17 adultos), definidos estos como pacientes con un cuadro

clínico sugestivo de infección micótica que recibieron tratamiento antifúngico antes o después del aislamiento microbiológico.

Varios autores han descrito en Norte América, China e Israel, factores de riesgo para la resistencia al FCZ en *C. parapsilosis* complex, entre ellos el uso previo de antifúngico y suministro de antibióticos como Ciprofloxacina o Vancomicina (94-96); en la población estudiada se identificaron igualmente estos dos factores de riesgo, los cuales fueron estadísticamente significativos para la resistencia al FCZ en *C. parapsilosis* complex.

En el presente estudio adicionalmente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensibles y resistentes al FCZ, respecto a comorbilidades como falla renal ($p=0.002$), antecedente de terapia con Vancomicina ($p=0.011$), antifúngicos previos ($p=0.03$), uso concomitante de antibióticos ($p=0.003$), grupo etareo ($p=0.005$) y aislamiento en punta de catéter (0.043); en ellos la probabilidad de que *C. parapsilosis* complex responsable de la infección fúngica fuera resistente al FCZ fue mayor.

La resistencia al FCZ se presentó en el 50% de los aislamientos de los pacientes que recibieron FCZ previo (11 de 22) y CSF previa (2 de 4). El uso de FCZ es un factor que contribuye a aumentar la prevalencia de especies de *Candida* no-albicans, entre ellas *C. parapsilosis* complex; las terapias antifúngicas tempranas con FCZ pueden reducir la morbilidad y la mortalidad, sin embargo el uso no controlado trae consecuencias económicas para los centros hospitalarios y estimula el desarrollo de la resistencia (92), convirtiéndolo en un factor de riesgo independiente, que aumenta la probabilidad de que el paciente presente infecciones posteriores por especies de *Candida* resistentes (93).

Los factores de riesgo más frecuentes que contribuyeron a infecciones fúngicas por *C. parapsilosis* complex en los pacientes del estudio fueron: hospitalización en UCI, antibioticoterapia previa y más de 7 días de estancia hospitalaria; aproximadamente el 10.4% de las infecciones en UCI son ocasionadas por *Candida* sp. un buen porcentaje

son de origen nosocomial con una incidencia de 6.9 episodios/1000 pacientes (94). En la UCI estuvieron internados n=50 (91%) pacientes que habían recibido previamente antibióticos de amplio espectro (Vancomicina, Meropenem, Ceftriazona, Piperacilina Tazobactam y Ciprofloxacina), este es un factor predictor de colonización o infección por *C. parapsilosis* complex resistente al FCZ, debido a que genera cambios en la microbiota intestinal favoreciendo la colonización o la infección por *Candida* sp. (95). De los 50 pacientes que recibieron antibioticoterapia previa 17 aislamientos de estos pacientes con *C. parapsilosis* complex fueron resistentes al FCZ; cuatro pacientes (tres menores de 18 años y un adulto) fallecieron con hemocultivos positivos con *C. parapsilosis* complex resistente al FCZ, con un promedio de 61,5 días de hospitalización. La mortalidad atribuible a candidiasis sistémica es cercana al 40% en las diferentes series y un poco menor cuando es por *C. parapsilosis* complex (28 a 31%) (67), porcentaje que según algunos autores aumenta si la especie de *Candida parapsilosis* complex causante de la infección es resistente al FCZ (95). En los pacientes estudiados de la FVL no se encontró diferencia estadísticamente significativa para condición de egreso muerte entre los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensible y resistente al FCZ; pero sí se identificaron tres factores de riesgo para mortalidad: la enfermedad cardíaca, hemodiálisis y la falla renal.

Aunque no hay estudios previos que muestren si hay relación entre infección por *Candida parapsilosis* complex resistente al FCZ y los días de estancia hospitalaria, se puede decir que en la población estudiada los pacientes con aislamiento de *C. parapsilosis* complex resistente al FCZ tuvieron un promedio mayor de días de estancia hospitalaria que aquellos que tenían *C. parapsilosis* complex sensibles.

Los neonatos son un grupo de pacientes vulnerables a infecciones por *C. parapsilosis* complex; estudio de candidemia en neonatos muestra una tasa de letalidad por

C. parapsilopsis complex del 68% (96)., en la población estudiada 5 de 18 neonatos con sepsis y con los mismos factores de riesgo para candidemia (hospitalización en UCI, FCZ previo, estancia hospitalaria superior a los 7 días con un promedio de 32 días, nutrición parenteral y antibióticoterapia previa de amplio espectro) fallecieron; controlar estos factores de riesgo podrían ayudar a reducir los episodios de candidemia en los neonatos hospitalizados en la FVL (97).

En la relación por espectros realizada con el equipo MALDI[®] TOF MS[®] BRUKER de los aislados, hubo homogeneidad en dos grupos; la gran mayoría aislamientos de pacientes pediátricos, con hemocultivos positivos y suministro de nutrición parenteral; esta cercanía filogenética sugirió la presencia de una relación clonal. La aplicación de MALDI[®] TOF[®] para caracterizar brotes se ha utilizado en varios estudios con resultados comparables a los métodos moleculares (77).

CONCLUSIONES

1. La población más comprometida en este estudio fueron los menores de 18 años; las fungemias por *C. parapsilosis* complex están relacionadas en un 50% con las muertes de menores de 18 años que recibieron nutrición parenteral entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017 en la FVL. Hacer seguimiento a los pacientes que reciben nutrición parenteral es importante, por ser una población vulnerable a presentar fungemias por *C. parapsilosis* complex en la FVL.
2. La hospitalización en UCI, cirugía previa, tratamiento antifúngico previo con FCZ, antibioticoterapia de amplio espectro con Ciprofloxacina y Vancomicina, estancia hospitalaria superior a 7 días y nutrición parenteral fueron los factores de riesgo más frecuentes que contribuyeron a que se presentaran infecciones por *C. parapsilosis* complex en la población estudiada. Controlar estos factores pudiera contribuir a disminuir la tasa de infecciones por *C. parapsilosis* complex y las fallas terapéuticas en pacientes hospitalizados en la FVL.
3. La especie del complejo *parapsilosis* más frecuente y resistente al FCZ, fue *C. parapsilosis* s.s. La administración previa de FCZ puede reducir la morbilidad y la mortalidad sin embargo estimula la resistencia al FCZ y aumenta los costos en la atención en salud.
4. Utilizar el análisis de los espectros de las masas, para sugerir relaciones clonales cuando hay sospecha de un brote hospitalario, podría ser útil en los hospitales donde no es posible realizar pruebas moleculares.
5. El método automatizado Vitek 2[®] es una alternativa para determinar la sensibilidad al FCZ en *C. parapsilosis* complex; sin embargo no reemplaza el método de referencia por

presentar falsas resistencias y CMI's menores o mayores con relación a la técnica de microdilución en caldo descrita por el CLSI.

6. Se identificaron como factores de riesgo para la resistencia al FCZ: terapia con Ciprofloxacina, Vancomicina y uso de antifúngicos previos, controlar estos factores contribuirá a disminuir los días de estancia hospitalaria y los costos de la atención en salud especialmente en pacientes neonatos y pediátricos.

7. La tasa de mortalidad específica observada fue de 27.3%, fallecieron 15 pacientes con aislamientos sensibles y resistentes al FCZ. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la condición de egreso muerte entre los pacientes con infecciones fúngicas por *C. parapsilosis* complex sensibles y resistentes al FCZ.

8. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con *C. parapsilosis* complex sensibles y resistentes al FCZ con respecto a comorbilidades como: la falla renal, el antecedente de recibir vancomicina y antifúngicos, el uso concomitante de antibióticos y el aislamiento de punta de catéter. En estos pacientes la probabilidad fue mayor de que *C. parapsilosis* complex fuera responsable de la infección fúngica y que fuera resistente al FCZ.

9. La información obtenida en el anterior trabajo podrá contribuir a: disminuir la tasa de infección por *C. parapsilosis* complex, las fallas terapéuticas en pacientes hospitalizados en la FVL y la tasa de resistencia al FCZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, et al. Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis*. 2004 Feb 1;38(3):311–20.
2. Márquez F, Iturrieta I, Calvo M, Urrutia M, Godoy-Martínez P. Epidemiología y susceptibilidad antifúngica de especies causantes de candidemia en la ciudad de Valdivia, Chile. *Rev Chil infectología*. 2017 Oct;34(5):441–6.
3. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis*. 2006 Dec 10;6(1):21.
4. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct 1;21(4):606–25.
5. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiología de candidemia en América Latina: Basada en encuestas de laboratorios. Andes DR, editor. *PLoS One*. 2013 Mar 19;8(3):e59373.
6. Pemán J, Salavert M. Formación médica continuada: Infección nosocomial. Fundamentos y actuación clínica epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras epidemiology and prevention of nosocomial invasive infec. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(5):328 - 41.
7. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):409–17.
8. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002 Apr;50(4):243–60.
9. De Bedout C, Gómez BL. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano *Candida* and candidiasis: the challenge continues for an early diagnosis. *Infectio*. 2010;14(S294):159–71.
10. Calvo Mackenna L, programa de formación en C, Izquierdo Copiz G, Izquierdo María Elena Santolaya G. www.sochinf.cl Infectología al día candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención. 2016.
11. Mota G, Muñoz JS, Oñate J, Pallares CJ, Hernández C, Villegas MV. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. *Rev Iberoam Micol*. 2017 Jan 1;34(1):17–22.
12. Ortiz Ruiz G, Osorio J, Valderrama S, Álvarez D, Elías Díaz R, Calderón J, et al. Factores de riesgo asociados a candidemia en pacientes críticos no neutropénicos en Colombia. *Med Intensiva*. 2016 Apr 1;40(3):139–44.
13. Orozco P. Colonización por levaduras en la unidad de neonatología del hospital universitario San Ignacio. Trabajo de grado Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá; 2006.
14. Cortés JA, Jaimes JA, Leal AL. Incidencia y prevalencia de candidemia en pacientes críticamente enfermos en Colombia. *Rev Chil infectología*. 2013 Dec;30(6):599–604.
15. Moreno X, Reviakina V, Panizo MM, Ferrara G, García N, Alarcón V, et al. Identificación molecular y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos de sangre del complejo *Candida parapsilosis* en Venezuela. *Rev Iberoam Micol*. 2017 Jul 1;34(3):165–70.
16. Cortés JA, Reyes P, Gómez CH, Cuervo SI, Rivas P, Casas CA, et al. Clinical and

- epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. *Brazilian J Infect Dis*. 2014 Nov;18(6):631–7.
17. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts : a taxonomic study*. Elsevier; 2010. 178 p.
 18. Singh R, Parija SC. *Candida parapsilosis*: An emerging fungal pathogen. Vol. 136, *Indian Journal of Medical Research*. American Society for Microbiology (ASM); 2012. p. 671–3.
 19. Moreno X, Reviákina V, Panizo MM, Ferrara G, García N, Alarcón V, et al. Frecuencia y perfil de sensibilidad in vitro de aislamientos de complejo *Candida parapsilosis* provenientes de pacientes con candidemias. 2015;35:103–10.
 20. Joachim H, Polayes SH. Suacute endocarditis and sistemic mycosis (*Monilia*). *J Am Med Assoc*. 1940 Jul 20;115(3):205.
 21. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):284–92.
 22. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina R, González-González JG, Garza-González E, González GM. *Medicina universitaria. Medicina Universitaria*. Elsevier; 157–165 p.
 23. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MAS, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009 Jun 24;459(7247):657–62.
 24. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. *Lodderomyces elongisporus* Masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan 1;46(1):374–6.
 25. Lehmann PF, Lin D, Lasker2 BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clinical Microbiol*. 1992;30(12):3249–54.
 26. García-Salazar E, Duarte-Escalante E, Del Rocío López-Álvarez M, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Del M, et al. Variabilidad genética de aislados del complejo *Candida parapsilosis* en dos servicios de un hospital terciario de la ciudad de México. *Invest Clin*. 2017;58(3):227–37.
 27. Barbedo LS, Figueiredo-Carvalho, Galindo MHG, Muniz M de M, Zancopé-Oliveira RM. The identification and differentiation of the *Candida parapsilosis* complex species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region of the rDNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Apr;111(4):267–70.
 28. Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. *Ravel J, editor. PLoS One*. 2012 Apr 26;7(4):e35750.
 29. Carolis ED, Hensgens LAM, Vella A, Posteraro B, Sanguinetti M, Senesi S, et al. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Med Mycol*. 2014 Feb 1;52(2):123–30.
 30. Estela L, Rivera C, Ramos AP, Del M, Padilla Desgarenes C. Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex Vol Dermatol Rev Mex*. 2013;5757:350–61.
 31. National Center for Infectious Diseases (U.S.) DM, Mukherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, et al. *Emerging infectious diseases*. Vol. 10, *Emerging Infectious Diseases*. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 1995. 1074–1081 p.
 32. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003 Jan 1;11(1):30–6.

33. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Medicina. M, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias de la Salud. L, Mendoza V, Ochoa M, Castrülo S, Sánchez J, et al. Revista médica de Risaralda : órgano de la Facultad de Medicina de la Universidad Tecnológica de Pereira. Vol. 23, Revista Médica de Risaralda. Facultad de Medicina; 2017. 4–9 p.
34. Gago S, García-Rodas R, Cuesta I, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. Virulence. 2014 Feb 15;5(2):278–85.
35. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Sep;39(9):2128–31.
36. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol. 2002;19:139–43.
37. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina R, González-González JG, Garza-González E, González GM. Medicina universitaria. Med Univ. 2012;14(*Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante):157–65.
38. Tavanti A, Hensgens LAM, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. 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. 2007 May 1;45(5):1455–62.
39. Fundyga RE, Kuykendall RJ, Lee-Yang W, Lott TJ. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. Infect Genet Evol. 2004 Mar;4(1):37–43.
40. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet. 2009 Oct 7;55(5):497–509.
41. Fong G, Ngo K, Russo H, Beyda N. *Candida parapsilosis* Candidemia resistance patterns and treatment outcomes: An opportunity for antifungal stewardship. Open forum infect Dis. 2017 Oct 1;4(suppl-1):S86–S86.
42. Sanabria RR, Samudio M, Fariña N, Laspina F, Figueredo L de, Aguilar G, et al. Perfil de susceptibilidad a anti fúngicos de aislados de *Candida* spp. por el método de microdilución. Nuevos puntos de cortes para fluconazol. Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud. 2014 Nov 18;12(1).
43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27-S4.2012.
44. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition;CLSI document M27-A3. Third Edit.2008.
45. Arendrup MC, Guinea J, Cuenca-Estrella M, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, et al. The subcommittee on antifungal susceptibility testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Document E.DEF 7.3 Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2012.1-21p.
46. Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Gómez-López A, Monzón A. Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013 Feb 1;31(SUPPL.1):53–8.
47. Silva AP, Miranda IM, Guida A, Synnott J, Rocha R, Silva R, et al. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jul;55(7):3546–56.
48. Morio F, Jensen RH, Le Pape P, Arendrup MC. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. Int J Antimicrob Agents. 2017 Nov;50(5):599–606.
49. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of

- fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Feb 1;59(2):1030–7.
50. Branco J, Silva AP, Silva RM, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Butler G, et al. Fluconazole and Voriconazole Resistance in *Candida parapsilosis* Is Conferred by Gain-of-Function Mutations in MRR1 Transcription Factor Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct;59(10):6629–33.
 51. Rybak JM, Dickens CM, Parker JE, Caudle KE, Manigaba K, Whaley SG, et al. Loss of C-5 Sterol Desaturase Activity Results in Increased Resistance to Azole and Echinocandin Antifungals in a Clinical Isolate of *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Sep 1;61(9):e00651-17.
 52. Cortés L JA, Russi N JA. Equinocandinas. *Rev Chil infectología.* 2011 Dec;28(6):529–36.
 53. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan 1;46(1):150–6.
 54. De Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago AR, Pabón ML, et al. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica.* 2003 Mar 1;23(1):31.
 55. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jul 1;52(7):2305–12.
 56. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5425–7.
 57. Ghannoum MA, Chen A, Buhari M, Chandra J, Mukherjee PK, Baxa D, et al. Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Mar 1;15(3):274–9.
 58. Sicilia LM, Cuesta SF. Capitulo11.pdf. *Asociacion española de micología.* 2007;capitulo 11. 11-1 al 11–9.
 59. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Inhibition of *Candida parapsilosis* mitochondrial respiratory pathways enhances susceptibility to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Feb;50(2):744–7.
 60. Kurtzman CP, Mateo RQ, Kolecka A, Theelen B, Robert V, Boekhout T. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. Nielsen J, editor. *FEMS Yeast Res.* 2015 Sep 1;15(6):fov050.
 61. Asadzadeh M, Ahmad S, Hagen F, Meis JF, Al-Sweih N, Khan Z. Simple, Low-Cost Detection of *Candida parapsilosis* Complex Isolates and Molecular Fingerprinting of *Candida orthopsilosis* Strains in Kuwait by ITS Region Sequencing and Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. Chaturvedi V, editor. *PLoS One.* 2015 Nov 18;10(11):e0142880.
 62. Harris DM, Hata DJ. Rapid identification of bacteria and *Candida* using PNA-FISH from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013 Jan 7;12:2.
 63. Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Valerio M, Alonso R, Martos C, Guinea J, et al. *Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Aug 1;70(8):2354–61.

64. Ellis M, Al-Ramadi B, Bernsen R, Kristensen J, Alizadeh H, Hedstrom U. Prospective evaluation of mannan and anti-mannan antibodies for diagnosis of invasive *Candida* infections in patients with neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2009 May 1;58(5):606–15.
65. Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Guinea J, Valerio M, Alonso R, Escribano P, et al. Potential role of *Candida albicans* germ tube antibody in the diagnosis of deep-seated candidemia. *Med Mycol*. 2014 Apr 1;52(3):270–5.
66. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter Clinical Evaluation of the (1->3) -D-Glucan Assay as an Aid to Diagnosis of Fungal Infections in Humans. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):654–9.
67. Pemán J, Zaragoza R. Hacia el diagnóstico temprano de la candidiasis invasora en el paciente crítico. *Rev Iberoam Micol*. 2012 Apr;29(2):71–5.
68. Pemán J, Quindós G. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. *Rev Iberoam Micol*. 2016 Jul;33(3):133–9.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. M60, 1 st ed. 2017.
70. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect*. 2008 Feb;56(2):126–9.
71. de Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Mar;17(3):418–24.
72. Van Asbeck E, Clemons K V., Martinez M, Tong A-J, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Sep;62(1):106–9.
73. I. Quiles-Melero, J. García-Rodríguez, A. Gómez-López, J. MIngorance. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass Spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 31 (2012), pp. 67-71.
74. Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM. Espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015 Jun;33(6):369–71.
76. Angeletti S, Dicunzo G, Lo Presti A, Cella E, Crea F, Avola A, et al. MALDI-TOF mass spectrometry and bla kpc gene phylogenetic analysis of an outbreak of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains summary. Vol. 38, *New Microbiologica*. 2015.
77. M^a Dolores Rojo Martín, Servicio de Microbiología HV de las, Nieves G. MALDI-TOF MS en la detección de resistencias bacterianas y estudios epidemiológicos.
78. Santolaya ME, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Colombo AL, Zurita J, Tiraboschi IN, et al. Recomendaciones para el manejo de la candidemia en neonatos en América Latina. *Rev Iberoam Micol*. 2013 Jul 1;30(3):158–70.
79. Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, Rovira M, et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Med Clin (Barc)*. 2011;29:345–61.
80. Arias D, Md F, Carlos J, Md JS. Manejo de la infección por *Candida* en el recién nacido. *Infection*. Vol. 24 (2). *Repert.med.cir*. 2015;123-130.
81. Villalobos JM, Castro JA, Avilés A, Peláez MC, Somogyi T, Sandoval L. *Candida parapsilosis*: principal causa de candidemia en un hospital de referencia para adultos de Costa Rica. *Rev Chil infectología*. 2016 Apr;33(2):159–65.

82. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernandez-Almaraz JL, Lopez-Soria LM, Carrillo-Munoz AJ, Hernandez-Molina JM, et al. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Oct 1;66(10):2315–22.
83. Ataides FS, Costa CR, Souza LKH e, Fernandes O de Fátima L, Jesuino RSA, Silva M do RR, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* complex species isolated from culture collection of clinical samples. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Aug;48(4):454–9.
84. Maria S, Barnwal G, Kumar A, Mohan K, Vinod V, Varghese A, et al. Species distribution and antifungal susceptibility among clinical isolates of *Candida parapsilosis* complex from India. *Rev Iberoam Micol.* 2018 Jul;35(3):147–50.
85. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1782–6.
86. Ochiuzzi ME, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R, Maldonado I, et al. Evaluación de las tarjetas AST-YSO1 del sistema Vitek 2 para determinar la sensibilidad a antifúngicos de levaduras del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol.* 2014 Apr 1;46(2):111–8.
87. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar 1;45(3):796–802.
88. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. 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.* 2008;46(8):2659–64.
89. Emilia Cattana M, Dudiuk C, Fernández M, Rojas F, Alegre L, Córdoba S, et al. Identification of *Candida parapsilosis* Sensu Lato in Pediatric Patients and Antifungal Susceptibility Testing. 2017.
90. García-Rodríguez J, Cantón E, Pemán J, Alvarez M, Ezpeleta G, Gómez-Nieto A, et al. Incidencia etaria y geográfica y patrón de sensibilidad a los antifúngicos de las especies de *Candida* causantes de candidemia en la población pediátrica española. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013 Jun 1;31(6):363–8.
91. García LT, Luna LJ, Velasco TK, Guerra BE, García LT, Luna LJ, et al. A new multiplex PCR for species-specific diagnosis of human candidiasis. *Biomédica.* 2017 Jun 1;37(2):200–8.
92. Tobar A E, Silva O F, Olivares C R, Gaete G P, Luppi N M. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev Chil infectología.* 2011 Feb;28(1):41–9.
93. Garnacho-Montero J, Díaz-Martín A, García-Cabrera E, Ruiz Pérez de Pipaón M, Hernández-Caballero C, Aznar-Martín J, et al. Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Aug;54(8):3149–54.
94. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horiz Med (Barcelona).* 2017 Dec 31;18(1):75–85.
95. Gomez Q C H. Resistencia de levaduras del genero *Candida* al fluconazol. *Asociación Colombiana de Infectología. Revista Infectio.* 2010; 14 (S2):S 172-S180.

96. Caparó Ingram E, Vásquez Vega M, Norero X, Sáez-Llorens X, DeAntonio R, Rodríguez Barría E, et al. Factores de riesgo y letalidad asociados a candidemia neonatal. Un estudio caso-control. Rev Chil pediatría. 2019;(AHEAD):0–0.
97. San Miguel A, San Miguel Rodríguez M, Sánchez Martín MA, Pastor MR, Pachón J. Importancia de las infecciones por *Candida* en neonatología. Rev del Lab Clínico. 2019 Jan;12(1):53–7.

10. Anexos

**Tabla.1
VARIABLES**

MÓDULO SOCIODEMOGRÁFICO					
Identificación del aislamiento	Número del aislamiento de acuerdo al consecutivo interno del laboratorio	Cualitativa	N/A	N/A	HC
Identificación	Numero de historia clínica	Cualitativa	N/A	N/A	HC
Iniciales del nombre	Primera letra de el o los nombres del paciente y de los dos apellidos	Cualitativa	N/A	N/A	HC
Edad	Tiempo en años desde el nacimiento hasta procedimiento	Cuantitativa Discreta	0-101	Medidas de tendencia central	HC
Sexo	Según documento de identidad	Cualitativa nominal	0: Femenino 1: Masculino	Proporción (%)	HC
VARIABLES CLÍNICAS					
Número de días de hospitalización	Número de días durante el cual el paciente recibió manejo intrahospitalario	Cuantitativa discreta	0-101	Medidas de tendencia central	HC
Condición de egreso	Condición del paciente al momento del alta hospitalaria (vivo o muerto)	Cualitativa nominal	0: vivo, 1: muerto	Proporción (%)	HC
Fecha de muestra MES-DIA- AÑO	Fecha en la cual se tomó la muestra de aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Fecha	Día/mes/año	NA	HC
Líquido peritoneal	Muestra para cultivo tomada de líquido peritoneal	Cualitativa nominal	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Lavado broncoalveolar	Muestra para cultivo tomada de lavado broncoalveolar	Cualitativa nominal	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Punta de catéter	Muestra para cultivo tomada de punta de catéter	Cualitativa nominal	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Hemocultivo	Muestra para cultivo tomada en sangre	Cualitativa nominal	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Otros	Muestra para cultivo tomada en otra secreción diferente a líquido peritoneal, lba o sangre	Cualitativa nominal	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Diagnóstico de base	Clasificación de diagnóstico por el cual fue hospitalizado el paciente	Cualitativa nominal	1: Infección herida 2: Trasplante 3: Cáncer 4: Sepsis 5: Sepsis Recién nacido 6: Sepsis Prematuro 7: Enfermedad respiratoria	Proporción (%)	HC
Malignidad	Antecedente de enfermedad neoplásica	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Enfermedad pulmonar	Antecedente de enfermedad pulmonar	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Enfermedad cardíaca	Antecedente de enfermedad cardíaca	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Diabetes	Antecedente de diabetes	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Falla renal	Antecedente de falla renal	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC

Catéter previo	Antecedente de requerimiento de catéter venoso o arterial	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Hemodiálisis	Antecedente de requerimiento de hemodiálisis previo o durante hospitalización	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Cirugía previa	Antecedente de cirugía previa al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Ventilación mecánica	Requerimiento de VMI durante hospitalización	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
TPN	Requerimiento de nutrición parenteral durante hospitalización	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
UCI	Requerimiento de manejo en Unidad de Cuidado Intensivo durante Hospitalización	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Previo uso de antibióticos	Uso de antibióticos en los últimos tres meses previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Ciprofloxacina previa	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Metronidazol previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Piperacilina tazobactam previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Meropenem Previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Vancomicina previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Ceftriaxona previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Cefepime previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Amikacina previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Ampicilina previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Cefazolina previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Linezolid previo	Recibió este ATB previos al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Uso de esteroides	Recibió esteroides durante hospitalización	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Medicamentos inmunosupresores	Antecedente de uso de inmunosupresores	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Inmunosuprimido	inmunosupresión por medicamento /enfermedad	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Drogas antifúngicas previa	Uso de antifúngico previo al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC

Droga antifúngica previa	Medicamento antifúngico utilizado previo al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Categoría	1: Fluconazol 2: Anfotericina 3: Caspofungina No aplica	Proporción (%)	HC
Fluconazol previo	Uso de Fluconazol previo al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Manejo antifúngico utilizado	Manejo antifúngico administrado al paciente posterior al aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> complex	Categoría	0: Ninguno 1: Anfotericina B 2: Fluconazol 3: Anidafungina 4: Caspofungina 5. Nistatina	Proporción (%)	HC
Manejo antibiótico	Requerimiento de manejo antibiótico concomitante	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Tipo de aislamiento	Tipo de aislamiento de <i>C. parapsilosis</i> de acuerdo a condiciones clínicas del paciente	Categoría	1: Infección 2: Colonización 3:Contaminación	Proporción (%)	HC
Coinfecciones	Evidencia de coinfección (Bacteriana, viral) de acuerdo a otros aislamientos	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC
Especificar coinfección	Clasificación de microorganismo detectado como coinfección	Categoría	0=otros 1= Gram positivos 2=Gram negativos fermentadores 3=Gram negativos no fermentadores 4= > 2 gérmenes aislados 5= Viral	Proporción (%)	HC
VARIABLES MICROBIOLÓGICAS					
Especie de <i>Candida</i>	Especie de <i>Cándida</i> aislada	Categoría	0: <i>C. parapsilosis</i> 1: <i>C. orthopsilosis</i>	Proporción (%)	HC
CMI Fluconazol (Vitek)	Concentración inhibitoria mínima de <i>C. parapsilosis</i> medida por Vitek	Cuantitativa	0 - 64	Medidas de tendencia central , Proporciones	Laboratorio
Sensibilidad Fluconazol (Vitek)	Perfil de sensibilidad de <i>C. parapsilosis</i> por vitek	Categoría	0: Sensible 1: Resistente 2: Sensible dosis dependiente	Proporción (%)	HC
Resultado microdilución CMI	Concentración inhibitoria mínima de <i>C. parapsilosis</i> medida por microdilución	Cuantitativa	0 - 64	Medidas de tendencia central , Proporciones	Laboratorio
Sensibilidad Fluconazol microdilución	Perfil de sensibilidad de <i>C. parapsilosis</i> por microdilución	Categoría	0: Sensible 1: Resistente 2: Sensible dosis dependiente	Proporción (%)	HC
Múltiples hongos en cultivo	Asilamiento de otros hongos en cultivo	Dicotómica	0: No 1: Si	Proporción (%)	HC

*TPN: nutrición parenteral total

* UCI: unidad de cuidados intensivos

Tabla 2

Técnica para la identificación de *Candida* sp. por el sistema Vitek® MS software V2. (espectrometría de masas MALDI TOF).

1.	Tomar una porción de la colonia de <i>Candida</i> sp. en estudio, con un asa estéril de 1 µl.
2.	Realizar un extendido delgado con movimiento circular en la placa de MALDI TOF, por duplicado.
3.	Adicionar 0.5 µl de ácido fórmico al 100%, a cada posición de la placa con las muestras, dejar secar a temperatura ambiente.
4.	Adicionar 0.5 microlitros de matriz HCCA a cada posición de la placa con las muestras.
5.	Dejar secar a temperatura ambiente
6.	Analizar en el equipo, Vitek® MS software V2. (espectrometría de masas MALDI TOF).

Tabla 3

Identificación de especies de n=55 *C. parapsilosis* complex usando el equipo: Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results

Project Info:

Project Name: **06-04-18-LFM**
 Project Description: *Candida parapsilosis* complex. FVL
 Project Owner: Luisa Fernanda Martinez Amador
 Project Creation Date/Time: 2018-04-06T16:33:36.118
 Project Analyte Count: 96

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
Control (+++) (A)	ATCC	<i>Candida parapsilosis</i>	2.346
1 (++) (A)	1	<i>Candida parapsilosis</i>	2.212
2 (++) (A)	2	<i>Candida parapsilosis</i>	2.277
4 (++) (A)	4	<i>Candida parapsilosis</i>	2.135
6 (++) (A)	6	<i>Candida parapsilosis</i>	2.11
7 (+) (B)	7	<i>Candida parapsilosis</i>	1.943
8 (++) (A)	8	<i>Candida orthopsilosis</i>	2.001
9 (++) (A)	9	<i>Candida parapsilosis</i>	2.029
10 (+) (B)	10	<i>Candida parapsilosis</i>	1.924
11 (++) (A)	11	<i>Candida parapsilosis</i>	2.182
12 (++) (A)	12	<i>Candida parapsilosis</i>	2.022
13 (++) (A)	13	<i>Candida parapsilosis</i>	2.001
14 (++) (A)	14	<i>Candida parapsilosis</i>	2.076
18 (++) (A)	18	<i>Candida parapsilosis</i>	2.103
19 (+++) (A)	19	<i>Candida parapsilosis</i>	2.301
20 (++) (A)	20	<i>Candida orthopsilosis</i>	2.271
21 (++) (A)	21	<i>Candida parapsilosis</i>	2.114

22 (+++)(A)	22	<i>Candida parapsilosis</i>	2.313
23 (++)(A)	23	<i>Candida parapsilosis</i>	2.268
24 (++)(A)	24	<i>Candida parapsilosis</i>	2.158
25 (+++)(A)	25	<i>Candida parapsilosis</i>	2.393
26 (++)(A)	26	<i>Candida parapsilosis</i>	2.026
27 (++)(A)	27	<i>Candida parapsilosis</i>	2.165
28 (++)(A)	28	<i>Candida parapsilosis</i>	2.091
29 (++)(A)	29	<i>Candida parapsilosis</i>	2.107
30 (++)(A)	30	<i>Candida parapsilosis</i>	2.259
32 (+)(B)	32	<i>Candida parapsilosis</i>	1.936
33 (++)(A)	33	<i>Candida parapsilosis</i>	2.176
34 (++)(A)	34	<i>Candida parapsilosis</i>	2.142
36 (++)(A)	36	<i>Candida parapsilosis</i>	2.097
37 (++)(A)	37	<i>Candida parapsilosis</i>	2.249
38 (++)(A)	38	<i>Candida parapsilosis</i>	2.143
40 (++)(A)	40	<i>Candida parapsilosis</i>	2.272
41 (++)(A)	41	<i>Candida parapsilosis</i>	2.012
43 (++)(A)	43	<i>Candida parapsilosis</i>	2.207
44 (++)(A)	44	<i>Candida parapsilosis</i>	2.258
45 (++)(A)	45	<i>Candida parapsilosis</i>	2.106
46 (++)(A)	46	<i>Candida parapsilosis</i>	2.166
48 (++)(A)	48	<i>Candida parapsilosis</i>	2.218
49 (++)(A)	49	<i>Candida parapsilosis</i>	2.194
50 (++)(A)	50	<i>Candida parapsilosis</i>	2.228
52.1 (++)(A)	52.1	<i>Candida parapsilosis</i>	2.203
53 (++)(A)	53	<i>Candida parapsilosis</i>	2.214
55 (++)(A)	55	<i>Candida orthopsilosis</i>	2.161
59 (++)(A)	59	<i>Candida parapsilosis</i>	2.172
60 (+)(B)	60	<i>Candida parapsilosis</i>	1.978
61 (++)(A)	61	<i>Candida parapsilosis</i>	2.144
62 (++)(A)	62	<i>Candida parapsilosis</i>	2.24
65 (++)(A)	65	<i>Candida parapsilosis</i>	2.277
66 (++)(A)	66	<i>Candida parapsilosis</i>	2.008
67 (++)(A)	67	<i>Candida parapsilosis</i>	2.044
69 (++)(A)	69	<i>Candida parapsilosis</i>	2.175

71 (++) (A)	71	<i>Candida parapsilosis</i>	2.012
74 (++) (A)	74	<i>Candida parapsilosis</i>	2.11
77 (+) (B)	77	<i>Candida parapsilosis</i>	1.999
81 (++) (A)	81	<i>Candida parapsilosis</i>	2.089

Range	Description	Symbols	Color
2.000 ... 3.000	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or

Tabla 7

Resultados de la técnica de microdilución utilizando la metodología descrita por CLSI en los n=55 aislamientos de *C. parapsilosis* complex, aislados en los pacientes de la FVL.

Microdilución en caldo - <i>C. parapsilosis</i> complex-abril de 2018													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Muestra	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	Cto	RPMI	CMI
Control ATCC 6258													32
Control ATCC 22019													1
1													1
2													0,5
4													16
6													16
Control ATCC 6258													32
7													0,5
8													0,5
9													16
10													16
11													0,5
12													16

13													8
Control ATCC 6258													64
14													8
18													0,5
19													16
20													1
21													2
22													0,5
23													1
Control ATCC 22019													1
24													0,5
25													0,5
26													1
27													1
28													4
29													0,5
30													2
Control ATCC 22019													1
32													32
33													0,5
34													0,5
36													0,5
37													8
Control ATCC 22019													1
38													1
40													0,5
41													4
Control ATCC 6258													64
43													1
44													0,5
45													2
46													0,5
48													0,5
Control ATCC 6258													64
49													4
50													1
52.1													8
53													0,25
Control ATCC 6258													64
55													0,5
59													0,5

60													4
61													32
Control ATCC 6258													64
62													0,5
65													4
66													32
67													1
69													1
Control ATCC 6258													64
71													32
74													1
Control ATCC 22019													1
77													1
81													32

Tabla 11

CMI_s al FCZ de n= 53 aislamientos de *C. parapsilosis* complex aislados en los pacientes de la FVL, usando la metodología automatizada Vitek2 y la técnica de microdilución en caldo descrita por el CLSI.

Número del aislamiento	CMI FCZ (Vitek2)	Sensibilidad (Vitek2) (0: S, 1: R, 2: SDD)	CMI FCZ Microdilución	Sensibilidad Microdilución (0: S; 1: R ; 2: S- DD)
1	2	0	1	0
2	<=1	0	0,5	0
4	32	1	16	1
6	>=64	1	16	1
7	<=1	0	0,5	0
8	2	0	0,5	0
9	16	1	16	1
10	>=64	1	16	1
11	2	0	0,5	0
12	>=64	1	16	1
13	16	1	8	1
14	8	1	8	1
18	<=1	0	0,5	0
19	>=64	1	16	1
20	<=1	0	1	0
22	<=1	0	0,5	0
23	<=1	0	1	0

24	<=1	0	0,5	0
25	<=1	0	0,5	0
26	<=1	0	1	0
27	<=1	0	1	0
28	8	1	4	2
29	<=1	0	0,5	0
30	<=1	0	2	0
32	>=64	1	32	1
33	<=1	0	0,5	0
34	<=1	0	0,5	0
36	8	1	0,5	0
37	8	1	8	1
38	<=1	0	1	0
40	<=1	0	0,5	0
41	8	1	4	2
43	<=1	0	1	0
44	<=1	0	0,5	0
45	>=64	1	2	0
46	<=1	0	0,5	0
48	<=1	0	0,5	0
49	8	1	4	2
50	2	0	1	0
52	4	2	8	1
53	<=1	0	0,25	0
55	<=1	0	0,5	0
59	<=1	0	0,5	0
60	8	1	4	2
61	>=64	1	32	1
62	<=1	0	0,5	0
65	4	2	4	2
66	>=64	1	32	1
69	2	0	1	0
71	>=64	1	32	1
74	<=1	0	1	0
77	<=1	0	1	0
81	32	1	32	1

Tabla 12
Especies de *C. parapsilosis* complex y CMI al FCZ por la técnica microdilución descrita por el CLSI n=55 aislamientos.

Especie	CMI ($\mu\text{g/ml}$) n (%)								Total
	0.25 n (%)	0.5 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	4 n (%)	8 n (%)	16 n (%)	32 n (%)	
<i>C. orthopsilosis</i>	0	2 (4)	1 (2)	0	0	0	0	0	3(5)
<i>C. parapsilosis</i> s.s	1 (2)	17 (31)	11 (20)	3 (5)	5 (9)	4 (7)	6 (11)	5 (9)	52 (95)
Total	1 (2)	19 (35)	12 (22)	3 (5)	5 (9)	4 (7)	6 (11)	5 (9)	55 (100)

Se muestran los resultados de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) de cada una de las especies identificadas de *C. parapsilosis* complex. Uno de los aislamientos de *C. orthopsilosis* fue recuperado de un líquido peritoneal y el otro de un Lavado broncoalveolar.

Tabla 13. Especies de *C. parapsilosis* complex y CMI al FCZ por la técnica de microdilución descrita por el CLSI, por grupo de edades, en n=55 aislamientos estudiados.

	CMI ($\mu\text{g/ml}$) n (%)								Total
	0.25 n (%)	0.5 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	4 n (%)	8 n (%)	16 n (%)	32 n (%)	
Neonatos									
<i>C. parapsilosis</i> s.s	0	10	4	2	0	0	0	2	18
<i>C. orthopsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pedriáticos									
<i>C. parapsilosis</i> s.s	0	3	1	0	3	1	3	2	13
<i>C. orthopsilosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adultos									
<i>C. parapsilosis</i> s.s	1	4	6	1	2	3	3	1	21
<i>C. orthopsilosis</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	3
TOTAL	1 (2)	19 (35)	12 (22)	3 (5)	5 (9)	4 (7)	6 (11)	5 (9)	6 (11)

Tabla 17
Frecuencia de la administración previa de antibióticos a n=55 pacientes y sensibilidad al FCZ
de los n=55 aislamientos estudiados.

	S n (%)	R n (%)	Total n (%)
ATBs previos al aislamiento			
Neonatos			
Piperacilina tazobactam	4	0	4
Meropenem	5	2	7
Vancomicina	5	2	7
Cefepime	4	0	4
Amikacina	11	1	12
Ampicilina	8	1	9
Pediatricos			
Metronidazol	0	1	1
Piperacilina tazobactam	1	3	4
Meropenem	1	2	3
Vancomicina	1	7	8
Ceftriaxona	1	1	2
Cefepime	3	4	7
Amikacina	2	3	5
Ampicilina	0	4	4
Cefazolina	0	1	1
Adultos			
Ciprofloxacina	0	1	1
Metronidazol	3	1	4
Piperacilina tazobactam	5	1	6
Meropenem	5	3	8
Vancomicina	6	5	11
Ceftriaxona	4	3	7
Cefepime	1	1	2
Amikacina	1	0	1
Ampicilina	1	1	2
Cefazolina	1	0	1
Linezolid	1	0	1

S: sensible; R: resistente.

Tabla 19.
Factores de riesgo para la resistencia al FCZ por *C. parapsilosis* complex. n (55)

	RR resistencia	IC95%	p-valor	
n (55)				
Condición egreso				
Vivo				
Muerto	0,6363636	0,2332004	1,736527	
Comorbilidades				
Malignidad	1,1111111	0,3570102	3,458075	0,8593
EPOC	0,6818182	0,3375339	1,377272	0,2825
Enfermedad cardíaca	1,535714	0,7544538	3,125994	0,2667
Diabetes	1,925926	0,7964057	4,657414	0,2618
Falla renal	0	-	-	
Catéter previo	1,255102	0,5992522	2,628745	0,5586
Hemodiálisis	0	-	-	0,0498
Cirugía previa	1,061224	0,5080949	2,21651	0,8737
Ventilación mecánica	0,8784722	0,4365524	1,767745	0,7176
TPN	0,5714286	0,2886338	1,131297	0,112
UCI	0,9	0,2891783	2,80104	
Hosp_prev_<30d	1,324675	0,6624865	2,648755	0,4314
Antibióticos previos	0,5666667	0,2512748	1,277928	0,2492
Ciprofloxacina	2,842105	1,978908	4,081828	0,1819
Metronidazol	1,1111111	0,3570102	3,458075	0,8593
Pip/Tazo	0,7321429	0,2940152	1,823148	0,4827
Meropenem	1,106838	0,5355465	2,28755	0,786
Vancomicina	2,602564	1,173501	5,771906	0,0107
Ceftriaxona	1,277778	0,5567659	2,9325	0,5816
Cefepime	1,076923	0,4846717	2,392884	0,8572
Amikacina	0,5138889	0,2007801	1,315279	0,1284
Ampicilina	1,142857	0,5398477	2,419428	0,7314
Cefazolina	1,394737	0,3331285	5,83946	0,683
Linezolid	0	-	-	
Esteroides	0,8965517	0,4458262	1,802956	0,7594
Inmunosupresores	1,739645	0,8846433	3,421	0,1337
Inmunosuprimido	1,437788	0,6801618	3,039328	0,3289
Antifúngicos	2,138889	1,074277	4,258535	0,0299
Fluconazol	1,828877	0,935787	3,574308	0,0874
Atb concomitante				
Mult_hongo	0,5701357	0,1979101	1,642436	
Co-infección	2,511628	0,6754731	9,339046	

Tabla 22
Factores de riesgo para el desenlace mortalidad por *C. parapsilosis* complex

	RR muerte	IC		Valor-p
n (55)				
Comorbilidades				
Malignidad	0,7142857	0,1170695	4,35813	0,7017
EPOC	1,25	0,5152698	3,032392	0,6188
Enfermedad cardíaca	3,135417	1,427145	6,888464	0,0063
Diabetes	1,238095	0,2349932	6,52308	0,8085
Falla renal	2,826923	1,268631	6,299304	0,0138
Catéter previo	1,064935	0,4035731	2,810114	0,8994
Hemodiálisis	2,969697	1,376754	6,40572	0,0217
Cirugía previa	0,8571429	0,3573883	2,05573	0,7314
Ventilación mecánica	1,4375	0,567027	3,644282	0,4347
TPN	2,28514	0,7312782	7,144325	0,1224
UCI				
Hosp_prev_<30d	1,079365	0,4485277	2,597452	0,865
Antibióticos previos	1,4	0,2294562	8,541935	0,7017
Ciprofloxacina	0	-	-	0,5366
Metronidazol	0	-	-	0,151
Pip/Tazo	1,064935	0,4035731	2,810114	0,8994
Meropenem	1,798611	0,7736599	4,181427	0,1773
Vancomicina	2,230769	0,8767061	5,676168	0,0777
Ceftriaxona	0,7863248	0,2129961	2,902902	0,7099
Cefepime	1,174825	0,4495915	3,06993	0,746
Amikacina	0,7474747	0,2760363	2,024076	0,5575
Ampicilina	0,969697	0,3644858	2,579832	0,9507
Esteroides	1,344828	0,5538922	3,265186	0,5083
Inmunosupresores	1,174825	0,4495915	3,06993	0,746
Inmunosuprimido	0,6774194	0,285764	1,60586	0,3745
Antifúngicos	1,53125	0,6527006	3,592346	0,3307
Fluconazol	1,490196	0,6304432	3,522418	0,3716

TPN: nutrición parenteral