

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN MICOLOGÍA MÉDICA

“Candida parapsilosis sensu lato.
Identificación molecular de especies y estudio del
perfil de sensibilidad a los antifúngicos”

Tesista: Cattana Maria Emilia
Director: Guillermo García-Effron

Instituto de Medicina Regional - UNNE
Resistencia, Chaco. Argentina

AÑO 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Medicina

**Tesis de posgrado para optar por el título de
Magíster en Micología Médica**

***“Candida parapsilosis sensu lato.
Identificación molecular de especies y
estudio del perfil de sensibilidad a los
antifúngicos”***

**Tesista: Cattana Maria Emilia
Director: Guillermo García-Effron**

**Instituto de Medicina Regional - UNNE
Resistencia, Chaco. Argentina
AÑO 2016**

A mi compañero, por el amor, el apoyo y el estímulo
A mamá y papá, por ser incondicionales
A Julia, que le cambió el sentido a mi vida

Agradecimientos

A Guillermo quién aceptó ser mi Director, y me acompañó y brindó su conocimiento en la elaboración de esta tesis. A sus colaboradoras, sin quienes habría sido imposible la concreción de este proyecto.

A Gustavo Giusiano que me apoyó en este y en todos los proyectos que quise emprender en estos años de trabajo en el Área de Micología del Instituto de Medicina Regional.

A Lili, Florencia, Mariana, Tina, Javier, compañeros y amigos que siempre me ayudaron y apoyaron en todo.

Al Instituto de Medicina Regional, lugar de trabajo y segunda casa.

Al Laboratorio de Antifúngicos del Dpto. Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Muchas gracias

CONTENIDO

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS Y TABLAS.....	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
<i>Factores de virulencia</i>	<i>6</i>
<i>Manifestaciones clínicas</i>	<i>7</i>
<i>Sensibilidad a los antifúngicos</i>	<i>8</i>
<i>Ecología.....</i>	<i>9</i>
<i>Características bioquímicas y fisiológicas</i>	<i>10</i>
<i>Identificación por métodos no convencionales</i>	<i>11</i>
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS.....	15
<i>Objetivo general</i>	<i>15</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>15</i>
MATERIALES Y METODOS.....	16
<i>Identificación fenotípica.....</i>	<i>16</i>
<i>Identificación genotípica.....</i>	<i>17</i>
<i>Estudio in vitro de la sensibilidad a los antifúngicos</i>	<i>18</i>
<i>Análisis estadístico de resultados de sensibilidad</i>	<i>20</i>
RESULTADOS.....	21
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO.....	39

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS Y TABLAS

Fotografía 1. <i>C. parapsilosis sensu lato</i> en agar leche – Tween 80.....	21
Fotografía 2. Electroforesis en gel de agarosa de PCR-REA de <i>FKS1</i> y digestión con <i>EcoR1</i>	22
Fotografía 3. Electroforesis en gel de agarosa de PCR-REA de <i>FKS1</i> y digestión con <i>EcoR1</i>	22
Fotografía 4. CIM para AMB por el método de referencia M27-A3 de la CLSI.	24
Fotografía 5. CIM para FLC por el método de referencia M27-A3 de la CLSI	24
Fotografía 6. CIM para ITC por el método de referencia M27-A3 de la CLSI	25
Fotografía 7. CIM para VRC por el método de referencia M27-A3 de la CLSI	25
Tabla 1. Puntos de corte para FLC, ITC y VRC establecidos por la CLSI	20
Tabla 2. Puntos de corte para ANF y CSF establecidos por EUCAST	20
Tabla 3. Media geométrica, moda y rangos de concentración obtenidos para 59 aislamientos de <i>C. parapsilosis s.s.</i>	23
Tabla 4. Aislamientos sensibles, sensibles dependiente de dosis y resistentes, para cada droga ensayada para los aislamientos de <i>C. parapsilosis s.s.</i>	23
Tabla 5. Estudios previos sobre prevalencia de las especies de <i>C. parapsilosis sensu lato</i> en sangre.....	27
Tabla 6. CIM 50 y CIM 90 de trabajos previos sobre <i>C. parapsilosis s.s.</i> por método de microdilución.....	29
Tabla 7. Distribución de <i>C. parapsilosis s. s.</i> por tipo de muestra y sus valores de CIM.....	39

RESUMEN

Candida parapsilosis sensu lato (*C. parapsilosis sensu lato*) es un complejo que incluye 3 especies íntimamente relacionadas: *C. parapsilosis sensu stricto* (s.s.), *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Varios estudios han demostrado que las mismas presentan virulencia y perfiles de sensibilidad diferenciales. Este complejo se asocia a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, siendo la fungemia la más importante por su frecuencia de aparición y morbilidad asociada. En la actualidad, la incidencia de *C. parapsilosis sensu lato* ha aumentado drásticamente, y es la segunda especie fúngica aislada con mayor frecuencia de hemocultivos en Latinoamérica; en Argentina es el primer agente etiológico de candidemia en unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales, con una prevalencia hasta 10 veces mayor que en adultos. Se propaga en los nosocomios a través de las manos del personal, siendo esta vía de infección horizontal una de las más comunes. Además, tienen la capacidad de colonizar la piel, proliferar en soluciones que contienen azúcar y adherirse a los dispositivos médicos plásticos y otras herramientas utilizadas en la clínica formando biopelículas.

El objetivo del trabajo fue conocer la prevalencia y el perfil de sensibilidad a los antifúngicos de las distintas especies del complejo *C. parapsilosis* implicadas en candidemias de pacientes pediátricos, debido a que no existe información en la región noreste del país.

Se estudiaron cepas de *C. parapsilosis sensu lato*, provenientes de hemocultivos y catéteres de pacientes pediátricos internados en nosocomios públicos y privados de las ciudades de Resistencia y Corrientes. Los aislados fueron identificados mediante una *PCR-based restriction endonuclease analysis* (PCR-REA), en la que se amplificó una región del gen *FKS1*, que luego se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a fluconazol, itraconazol,

voriconazol y anfotericina B y se interpretaron los resultados según el método de microdilución del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). La actividad *in vitro* y la interpretación de los resultados para caspofungina y anidulafungina se realizó mediante el método de microdilución del *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Se estudiaron 60 aislados de *C. parapsilosis sensu lato*, recuperados de neonatos y de niños de 6 años de edad. De las 60 cepas estudiadas, 59 (98%) fueron identificadas como *C. parapsilosis* s.s. y sólo 1 (2%) como *C. orthopsilosis*. Entre los aislados de *C. parapsilosis* s.s. se encontró un amplio rango de CIM para las equinocandinas, pero no se encontraron aislados resistentes. Con respecto a la anfotericina B, se encontró un 15% de aislados con sensibilidad reducida (CIM > 1 µg/mL); y en el grupo de los azólicos, el que mayor amplitud de rango presentó fue el fluconazol. Sin embargo, más del 90% de los aislados fueron sensibles a fluconazol, itraconazol y voriconazol, y no se encontraron aislados resistentes a este grupo de drogas. La única cepa de *C. orthopsilosis* fue sensible a todas las drogas ensayadas.

La mayoría de los aislados en nuestro estudio correspondieron a *C. parapsilosis* s. s., y presentaron un alto porcentaje de sensibilidad al fluconazol, pero también un porcentaje considerable de aislamientos resistentes a la anfotericina B. Por otro lado, las equinocandinas no mostraron una buena actividad a diferencia del voriconazol y el itraconazol.

Si bien la discriminación de especies crípticas dentro del complejo *C. parapsilosis* no tendría una gran utilidad clínica, es importante el monitoreo sistemático para conocer cambios en la distribución de especies y detectar resistencias.

Se trata del primer estudio de prevalencia de las especies del complejo *C. parapsilosis* y sus perfiles de sensibilidad a los antifúngicos en pacientes pediátricos con diagnóstico de candidemia en nuestro país.

INTRODUCCIÓN

La candidemia es la cuarta infección nosocomial más prevalente del torrente sanguíneo y la infección intrahospitalaria por hongos más frecuente. En las últimas décadas, su incidencia tuvo un aumento sostenido, en especial en los pacientes hospitalizados, probablemente debido a una mayor prevalencia de huéspedes susceptibles, que reciben tratamientos inmunosupresores asociados con trasplantes, y antibióticos de amplio espectro, es significativa la mortalidad atribuible y la morbilidad asociada a la hospitalización en todos los grupos de edad (1–3).

En los niños hospitalizados, la fungemia es un problema creciente, especialmente en aquellos que están en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y neonatales. Todo recién nacido debe considerarse un individuo inmunodeficiente funcional porque tanto los componentes de su sistema inmunitario como su estructura epitelial son inmaduros. El grado de inmunosupresión está inversamente relacionado con la edad gestacional y el peso al nacer (1,2,4–6).

En las décadas pasadas, la mayor parte de estas infecciones estaba causada por *C. albicans*. Actualmente, la epidemiología de las candidemias está cambiando, y la proporción de infecciones causadas por *C. no-albicans* ha aumentado en forma exponencial. Hoy se considera que más del 50% de las candidemias son causadas por otras especies del género *Candida*. Dada la inherente menor sensibilidad de muchas de estas especies a los antifúngicos disponibles, las especies emergentes han alcanzado notoria relevancia clínica (5–9).

Aunque la incidencia y la prevalencia de las especies de *Candida* involucradas varía según la región geográfica, las características de los pacientes que se atienden y la complejidad del centro asistencial, en la última década, el complejo *C. parapsilosis* ha aumentado su incidencia posicionándose como la segunda especie de *Candida* aislada

con mayor frecuencia de los hemocultivos en Asia, Latinoamérica y algunos países de Europa, incluso llega a superar a *C. albicans* según informan las estadísticas de algunos hospitales pediátricos (5,10–15).

C. parapsilosis es un complejo de especies (*C. parapsilosis sensu lato* o complejo *C. parapsilosis*) que incluye 3 especies íntimamente relacionadas: *C. parapsilosis sensu stricto* (s.s.), *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (16). Este complejo pertenece al Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Saccharomycotina, Clase Saccharomycetes, Orden Saccharomycetales, Familia Saccharomycetaceae. Son hongos diploides que morfológicamente se presentan como levaduras con algunas células ovoide y otras alargadas, solas o en pares, y pseudomicelio, sin la capacidad de formar hifa verdadera (17,18). Si bien en un principio se propuso que *Lodderomyces elongisporus* era el teleomorfo de alguna de las especies del complejo, luego se demostró que se trata de dos géneros diferentes, y hasta el momento no se conoce reproducción sexual en ninguna de las especies del complejo *C. parapsilosis* (19).

C. parapsilosis sensu lato fue descrita por primera vez en 1928 por Ashford, quién la aisló de las heces de un paciente con diarrea en Puerto Rico. Fue llamada *Monilia parapsilosis* para diferenciarla del aislamiento más común, *Monilia psilosis*, hoy *C. albicans* (10,20). La cepa tipo de la especie ATCC 22019, es ampliamente utilizada como cepa control, y es el aislamiento original de Ashford (20) que luego fue reclasificada en 1932 a *C. parapsilosis* por Langeron y Talice (21).

C. parapsilosis s.s. posee enzimas tales como aspártico proteasas, lipasas, carbonilo reductasa, y xilosa reductasa, cuyas propiedades biocatalíticas tienen diversas aplicaciones industriales, como la síntesis estéreo-específica de alcoholes quirales, o producción del edulcorante natural xilitol. Otra característica fisiológica interesante de esta levadura es su capacidad de degradar diversos compuestos aromáticos (22).

C. parapsilosis sensu lato es agente causal de múltiples patologías tanto en huéspedes inmunocomprometidos como inmunocompetentes, y son los recién nacidos de bajo peso los más afectados. La alta incidencia de este complejo como patógeno humano se puede relacionar con su capacidad de colonizar la piel, proliferar en las soluciones que contienen azúcar y adherirse a los dispositivos médicos plásticos y otras herramientas utilizadas en la clínica formando biopelículas (10,23,24).

FACTORES DE VIRULENCIA

Adherencia y formación de biopelículas. La capacidad de adherencia es una característica importante de este complejo. El establecimiento de la colonización y la infección del complejo *C. parapsilosis* dependen en parte de la capacidad del hongo para adherirse a las células y tejidos del huésped, en particular a las superficies mucosas. Además, la formación de biopelícula está precedida por la adhesión a los tejidos o dispositivos médicos (10,25).

Aunque, *C. parapsilosis sensu lato* produce cuantitativamente menos biopelícula y estructuralmente de menor complejidad que *C. albicans* (26), ciertos fenotipos de *C. parapsilosis sensu lato*, con mayor capacidad de formar pseudohifa, generan mayores cantidades de biopelícula y son más invasivas que las cepas en las cuales predomina la forma levaduriforme. Aunque esto se ve con mayor frecuencia en los aislamientos de *C. parapsilosis s.s.* y *C. orthopsilosis* (27–30), las tres especies que conforman el complejo son capaces de formar biopelículas con una topografía de la superficie y arquitectura similares (31).

La formación de biopelículas limita la penetración de antifúngicos a través de la matriz, confiriendo resistencia significativa a la terapia antifúngica, además de brindar protección frente a la respuesta inmune del hospedero (10).

Secreción de enzimas. Cada vez cobra mayor importancia el estudio de la secreción extracelular de enzimas por parte de los microorganismos patógenos, ya que las mismas tendrían un rol en su potencial patogénico y también podrían ser blancos de nuevas terapias. En *C. parapsilosis sensu lato* se encuentran principalmente el complejo enzimático de proteinasas aspárticas, fosfolipasas, lipasas y hemolisinas. Aunque no está del todo esclarecido su rol en la patogénesis de las especies del complejo, se demostró que las mismas enzimas están involucradas como determinantes de virulencia en *C. albicans* (10,32–36).

Si bien las 3 especies fueron halladas causando patología, existen numerosos estudios que muestran que hay diferencias en la expresión de los distintos factores de virulencia de estas especies. Varios autores coinciden en que *C. metapsilosis* es la especie menos virulenta, e incluso lo demostraron en modelos de infección celular, por lo tanto, fue la especie que se aisló con menor frecuencia en infecciones (28,36–39).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

C. parapsilosis sensu lato se asocia a un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde infecciones superficiales como son la onicomicosis, la otomicosis; infecciones oculares (10,40–44); infecciones de las mucosas como vulvovaginitis (10,23); infecciones del tracto urinario (10,23,45); hasta infecciones sistémicas que comprometen la vida del paciente por ejemplo endocarditis, meningitis o peritonitis, pero la forma clínica más importante por su frecuencia de aparición y morbilidad asociada es la fungemia. *C. parapsilosis sensu lato* se encuentra dentro de las principales especies de *Candida* causantes de enfermedad invasiva en todo el mundo (10,23,46,47).

En contraste con las infecciones por *C. albicans*, las producidas por *C. parapsilosis sensu lato* pueden ocurrir sin la colonización previa, especialmente en niños pequeños (5).

La presentación de las fungemias por *C. parapsilosis sensu lato* en los recién nacidos puede ser clínicamente sutil con la presencia sólo de trombocitopenia y leucopenia. Afortunadamente, las fungemias por causadas por especies de este complejo tienen una mortalidad cruda atribuible del 30%, mucho más baja que las infecciones del torrente sanguíneo debido a otras especies de *Candida* (23). Las fungemias relacionadas a catéter causadas por estas especies tienen una mayor tasa de resolución espontánea y una tasa mucho más baja de establecimiento en sitios secundarios (23,48).

SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

Los métodos de referencia del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) mediante su documento M27-A3 (49) y el suplemento M27-S4 (50) de 2012 para la interpretación de los resultados y del *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing on Antifungal Susceptibility Testing* (EUCAST-AFST) y su documento E.DEF 7.2 (51) permiten determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) frente a las hongos levaduriformes del género *Candida* de manera fiable y reproducible, y resultan muy útiles para la vigilancia epidemiológica. De esta manera, permiten determinar el perfil de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de *C. parapsilosis sensu lato*, ya que ambas metodologías tienen recomendaciones, como es el caso de anfotericina B (AMB), o puntos de corte determinados para este complejo de especies para las drogas fluconazol (FLC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC), micafungina (MCF), anidulafungina (ANF), caspofungina (CSF) y 5-fluorocitosina (5-FC). En el caso de caspofungina (CSF), EUCAST-AFST ha decidido no utilizarla en sus pruebas de microdilución debido a la significativa variabilidad interlaboratorio en la CIM, y para un aislado de esta especie se extrapola la categoría de sensibilidad obtenida para ANF y MCF (52). CLSI establece puntos de corte para esta droga en su documento M27-S4 (50), aunque con la aclaración

de la variación significativa de la prueba, debida principalmente a la variabilidad en la potencia de CSF.

Los aislados de *C. parapsilosis* s.s. generalmente son los que muestran CIM más elevadas, sobre todo a la AMB, azoles y equinandinas, en comparación con *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (11,53–55). Algunos autores informan CIM superiores de *C. metapsilosis* a los azoles, aunque en general estos no entran en la categoría de resistentes y hay que tener en cuenta que el número de aislamientos estudiados de esta especie siempre es significativamente menor que los de *C. parapsilosis* s.s. y *C. orthopsilosis* (12,53,55–57)

Las equinocandinas son las drogas de elección para el tratamiento de las candidemias, a no ser que el agente causal sea alguna especie del complejo *C. parapsilosis* (58). Esto se debe a que los estudios *in vitro* demostraron que las tres especies del complejo muestran CIM elevadas para las tres equinocandinas, CSF, MCF y ANF, en relación con otras especies de *Candida*. Esto se atribuye a la sustitución que se da naturalmente de una prolina por una alanina en la posición del aminoácido 660 (*hot spot 1*) en el gen *FKS1* (55,59–61). Algunos autores indican que a partir del uso de las equinocandinas como tratamiento de las candidemias se registró un aumento en la prevalencia de *C. parapsilosis sensu lato* como agente de infección (62).

ECOLOGÍA

C. parapsilosis sensu lato es una levadura ubicua, que se encuentra en el aire, en el intestino de aves y mamíferos, y es comensal habitual de la piel del ser humano. Está ampliamente distribuida en la naturaleza y puede recuperarse del ambiente en suelos, agua de mar, plantas e insectos. Además es parte de la flora comensal del hombre y otros mamíferos, donde se la puede aislar de la superficie de las mucosas, piel y uñas. Su patogenicidad es limitada cuando los tegumentos se encuentran intactos (5,17,23,63,64).

Estas especies tienen capacidad para colonizar catéteres, materiales y equipamiento biomédico, materiales plásticos, látex y soluciones antisépticas. Se ha demostrado su presencia en fluidos intravenosos, bombas de vacío utilizadas para la producción de nutrición parenteral y las cremas o pomadas empleadas en la piel. Se la ha relacionado ampliamente tanto con la nutrición parenteral como con el uso prolongado de catéteres y otros dispositivos implantados, ya que presenta capacidad de adherencia y formación de biopelículas en la superficie interna de los mismos (10,23,65,66).

Se propaga en los nosocomios a través de las manos del personal y persiste en el ambiente hospitalario, y esta es una de las vías de infección horizontal más comunes; constituye una importante fuente exógena de contagio, causando brotes nosocomiales. En diferentes estudios se destaca que *C. parapsilosis sensu lato* se aísla de la piel del personal asistencial con un rango de portación del 17% al 75% (10,23,24,64,67).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS

En los medios de cultivo comunes, luego de 3-5 días de crecimiento a 28 °C – 35 °C, su macromorfología se presenta como colonias blancas, generalmente lisas, con márgenes bien determinados que desprenden un ligero olor butírico. Sin embargo, se pueden observar otros fenotipos de colonias como crepé, concéntricas, o crateriformes (17,27,68). En medio de agar leche – Tween 80 (69) *C. parapsilosis sensu lato* presenta pseudomicelio abundante, que forma ramificaciones de cadenas de células elongadas en forma de “árbol de navidad”, artemisia o zig-zag, con ramificaciones laterales que gradualmente se vuelven más cortas hacia el ápice de la hifa, y la presencia de hifas grandes (células gigantes) (17,70). El grado de formación de pseudohifas varía en cada aislado, aunque varios grupos de investigación han encontrado la incapacidad de formar pseudohifas en aislados de *C. metapsilosis* (28,30,71,72).

Las especies del complejo *Candida parapsilosis* crecen a 37 °C; desarrollan en medios con un 50% de glucosa; también son capaces de desarrollar en medios con 0,01% de cicloheximida, aunque *C. parapsilosis* s.s. lo hace en forma variable, y ninguna especie del complejo desarrolla en medios con cicloheximida al 0,1% (17).

En CHROMagar *Candida*®, las colonias son de color marfil a rosa lavanda, y algunas son de aspecto rugosas (17). Existen métodos comerciales y con diferentes niveles de automatización para la identificación fenotípica como API® ID32C, Vitek2® o RapID™ levadura Plus, pero no son capaces de diferenciar las especies de *C. parapsilosis sensu lato*. Debido a que los métodos microbiológicos convencionales no son de utilidad para la diferenciación de las especies que conforman el complejo, se han implementado diversas metodologías de identificación molecular.

IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS NO CONVENCIONALES

Desde principio de la década del 90' se demostró, por diferentes técnicas moleculares, que los aislamientos identificados fenotípicamente como *C. parapsilosis* eran genéticamente más heterogéneos que los de otras especies de *Candida*. Sobre la base de las diferencias encontradas a partir del análisis de la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), secuenciación de diferentes genes y la tipificación morfológica se postuló que *C. parapsilosis* era un complejo formado por 3 grupos genéticamente distintos a los que se denominó grupos I, II y III (67,68,73–77).

En 2005 Tavanti y col. sugirieron que estos tres grupos eran en realidad 3 especies distintas íntimamente relacionadas, por lo que se propuso reemplazar la denominación de *C. parapsilosis* del grupo II y grupo III por *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* respectivamente, y conservar el término *C. parapsilosis* s.s. para el grupo I (16).

A partir de ese momento se han utilizado un gran número de técnicas para diferenciar las 3 especies del complejo *C. parapsilosis*, ya que no es posible su diferenciación por

métodos fenotípicos. Así, se utilizaron técnicas de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (78,79), secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 (80), PCR simple con iniciadores derivados de la región ITS1 (81), análisis por pirosecuenciación de nucleótidos de la región ITS2 (82), marcadores microsatélite (83), amplificación al azar de AND polimórfico (RAPD) (84), y PCR-análisis basado en endonucleasas de restricción (PCR-REA) (85), PCR en tiempo real utilizando las temperaturas de *melting* para la diferenciación (86) y usando como blanco ADN mitocondrial (87), utilización de la técnica de proteómica de matriz asistida por láser de desorción / ionización - tiempo de vuelo espectrometría de masas (MALDI-TOF) (88), entre otras.

Los mejores métodos para diferenciar las especies de *C. parapsilosis sensu lato* son la secuenciación de la región ITS1-5.8 S-ITS2 y MALDI-TOF, ninguno de ellos necesita una identificación fenotípica anterior. El primero, es el método de referencia para la identificación taxonómica, pero requiere de muchos pasos y queda limitado a laboratorios de referencia. Por el contrario, MALDI-TOF es un método más rápido, más fácil y disponible en un número de laboratorios clínicos cada vez mayor; y aunque actualmente existen inexactitudes en las bases de datos y el equipo es muy costoso, la mejoría en las bases de datos es una cuestión de tiempo.

JUSTIFICACIÓN

C. parapsilosis sensu lato fue aumentando su incidencia a lo largo del tiempo, transformándose en la segunda especie fúngica aislada con mayor frecuencia de hemocultivos (15,23,89). En Argentina, la prevalencia podría ser aún mayor. Por ejemplo, en el Hospital Nacional de Pediatría de la Argentina “Prof. Dr. J. Garrahan”, *C. parapsilosis sensu lato* se ha convertido en la especie más prevalente aislada a partir de hemocultivos de pacientes con fungemias. De igual modo, en otros hospitales pediátricos de Argentina, este complejo de especies es el primer o segundo agente etiológico de candidemia (11,14,15,90). Por otro lado, se ha establecido que la prevalencia de *C. parapsilosis sensu lato* en candidemias en población pediátrica-neonatal puede llegar al 60% mientras que en la población adulta la frecuencia puede ser de hasta 10 veces menor (5-12%) (9,23,91–93).

Respecto a las especies crípticas de este complejo, se ha demostrado que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* presentan virulencia y perfiles de sensibilidad diferenciales frente a equinocandinas y fluconazol (15,53,55,57,94,95).

Se propone este trabajo debido a que las especies del complejo *C. parapsilosis* son ubicuas en la naturaleza, son importantes patógenos oportunistas, presentan perfiles de sensibilidad diferenciales frente a los antifúngicos y que además existe escasa información sobre su epidemiología en el país.

HIPÓTESIS

Entre los aislados del complejo *C. parapsilosis*, provenientes de hemocultivos de pacientes pediátricos, *C. parapsilosis* s.s. es la especie más prevalente.

La resistencia a azoles, polienos y equinocandinas en *C. parapsilosis sensu lato* tiene una baja prevalencia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer la prevalencia y el perfil de sensibilidad a los antifúngicos de las distintas especies del complejo *C. parapsilosis* implicadas en candidemias de pacientes pediátricos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❑ Determinar la prevalencia de cada especie del complejo *C. parapsilosis* aisladas a partir de hemocultivos y catéteres de pacientes pediátricos.
- ❑ Determinar la concentración inhibitoria mínima de cada especie por el método de microdilución en caldo.
- ❑ Comparar el perfil de sensibilidad de cada droga frente a las diferentes especies encontradas.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron especímenes de *C. parapsilosis sensu lato*, almacenados en la Colección de Cultivos del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste. Los mismos fueron oportunamente identificados por métodos bioquímicos con API® *ID32C* (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y micromorfológicos con la siembra en medio de agar leche – Tween 80 (69).

Se seleccionaron los aislados provenientes de hemocultivos y catéteres de pacientes recién nacidos (RN) (\leq de 1 mes de edad) y pediátricos (hasta 15 años) internados en nosocomios públicos y privados de las ciudades de Resistencia y Corrientes, entre los años 2009 y 2014. Los aislamientos fueron remitidos oportunamente al área de Micología de dicho instituto para su identificación y estudio de sensibilidad antifúngica.

Previo a la identificación definitiva por métodos genotípicos y la realización del perfil de sensibilidad frente a los antifúngicos, se realizó una nueva identificación presuntiva rápida mediante el estudio de su micromorfología.

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Las cepas seleccionadas se encontraban conservadas en agua con glicerol al 20% a -20 °C. Los aislamientos fueron descongelados rápidamente a 37 °C, cultivados en medio de Sabouraud dextrosa e incubados a 37 °C durante 48 horas. Una vez obtenidos los cultivos puros en dicho medio de cultivo, se les realizó la observación micromorfológica por la técnica de microcultivo en medio de agar leche – Tween 80, incubado a 28 °C durante 3 días (69) para corroborar en forma presuntiva que pertenecían al complejo *C. parapsilosis*.

IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

Para la identificación genotípica, el ADN fue enviado al Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

La extracción de ADN se realizó mediante métodos químicos y se purificó utilizando alcoholes, siguiendo los pasos que se detallan a continuación.

A partir de un cultivo puro de levadura de 48 horas en medio de Sabouraud, se realizó una suspensión densa de la misma en un microtubo de 1,5 ml, el cuál contenía 500 µl de una solución detergente de Bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) con 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA (Promega), 100 mM TRIS-HCl, 0.2 % β-mercapto etanol, 2% CTAB (Sigma-Aldrich, Argentina), y se incubó a 65°C durante 45 minutos. Luego se agregaron 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío, se mezcló por inversión y centrifugó 15 minutos en microcentrífuga a 12.000 rpm. Del centrifugado se recuperó la fase acuosa, y se agregaron 250 µl de etanol absoluto frío e incubó 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó 15 minutos a 10.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se realizó el lavado del precipitado con 700 µl de etanol 70% frío, centrifugó 15 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet durante toda la noche a 37 °C. Luego de la purificación, se realizó la digestión del ARN con enzima ARNasa (Fermentas) durante 1 hora a 37 °C.

Los aislamientos fueron identificados mediante una PCR-REA, en la cual se amplifica una región del gen *FKS1* utilizando los iniciadores universales REA-F (5'-GAT GAC CAA TTY TCA AGA GT-3') y REA-R (5'-GTC AAC ATA AAT GTA GCA TTC TAG AAA TC-3'). El programa de ciclado consistió en un ciclo de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 58 °C, y 90 segundos a 72 °C seguido de un ciclo final de 10 minutos a 72 °C. El fragmento de PCR así amplificado fue luego digerido con

10 U de la enzima de restricción *EcoRI* (New England BioLabs, Beverly, MA) siguiendo el protocolo descrito por García-Effron y cols. (85).

De la reacción de PCR se obtuvo un amplicón de 1032 pb para cualquiera de las especies de *C. parapsilosis sensu lato*. *C. metapsilosis* presenta un sitio de corte con *EcoRI* en el fragmento *FKS1* amplificado en la posición 474; *C. orthopsilosis* presenta un sitio de corte *EcoRI* en la posición 474 y otro en la posición 778; mientras que *C. parapsilosis sensu stricto* no presenta sitios de corte con esta enzima en el fragmento *FKS1* amplificado. De esta manera, la electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos digeridos muestra 3 bandas para *C. orthopsilosis* (474 pb, 306 pb, y 258 pb), 2 bandas para *C. metapsilosis* (474 pb y 564 pb), y 1 banda (sin digestión) para *C. parapsilosis s.s.* Se utilizaron como control del procedimiento de identificación genotípica las cepas de referencia *C. parapsilosis s.s.* ATCC 22019, *C. metapsilosis* ATCC 96144 y *C. orthopsilosis* ATCC 96139. Estas cepas se incluyeron en cada grupo de reacciones de PCR-REA realizadas.

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS

Se determinó la CIM y se interpretaron de los resultados de los antifúngicos fluconazol (FLC) (Pfizer-USA), itraconazol (ITC) (Sigma-Aldrich Argentina), voriconazol (VRC) (Pfizer-USA) y anfotericina B (AMB) (Sigma-Aldrich Argentina) según el método de microdilución del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M27-A3 (49) y su reciente documento suplementario M27-S4 (50). Las soluciones de las drogas fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Argentina) a excepción de FLC que fue preparado en agua tridestilada estéril, y almacenadas a -70 °C hasta su uso. La concentración final para las drogas AMB, ITC y VRC fue de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL, y para FLC 0,125 µg/mL a 64 µg/mL. La CIM para AMB es la concentración más baja del fármaco que impide cualquier crecimiento discernible a ojo desnudo; para los azólicos la

CIM es la concentración más baja de la droga que da lugar a una inhibición de crecimiento $\geq 50\%$ de la del control de crecimiento libre de droga. Los puntos de corte utilizados se observan en la tabla 1. Aunque no hay establecido puntos de corte para AMB, según el documento M27-A3, se concluye que si un aislamiento de *Candida* spp. tiene CIM $> 1 \mu\text{g/mL}$ es probable que sea resistente (49).

La actividad *in vitro* y la interpretación de los resultados para caspofungina (CSF) (Merck, Co, USA) y anidulafungina (ANF) (Pfizer S.A., Argentina) se realizó mediante el método de microdilución del *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) según el documento E.DEF 7.2 y los nuevos puntos de corte para estas drogas establecidos en 2014 (52). Los puntos de corte utilizados se observan en la tabla 2. Las soluciones de las drogas fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Argentina) y almacenadas a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. La concentración final para ANF y CSF fue $0,015$ a $8 \mu\text{g/mL}$. La CIM de equinocandinas es la concentración más baja de la droga que da lugar a una inhibición de crecimiento $\geq 50\%$ de la del control de crecimiento libre de droga. Para estas determinaciones las cepas fueron enviadas al Laboratorio de Antifúngicos del Dpto. Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, quienes utilizan la metodología EUCAST. En el Instituto de Medicina Regional no se cuenta con las drogas (CSF y ANF). Para los dos métodos de microdilución se utilizaron como control de procedimiento las cepas de referencia *C. krusei* ATCC 6528 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Estas cepas fueron ensayadas en cada placa de sensibilidad y procesadas de la misma manera que las cepas del complejo *C. parapsilosis* estudiadas.

Tabla 1. Puntos de corte para FLC, ITC y VRC establecidos por la CLSI

	FLC ^b	ITC ^a	VRC ^b
CIM	S ≤ 2	S ≤ 0,125	S ≤ 0,125
(µg/mL)	SDD 4	SDD 0,25 - 0,5	SDD 0,25 - 0,5
	R ≥ 8	R ≥ 1	R ≥ 1

FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol.

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

^a Documento M27-A3

^b Documento suplementario M27-S4

Tabla 2. Puntos de corte para ANF y CSF establecidos por EUCAST

	ANF	CSF
CIM	S ≤ 0,002	ND*
(µg/mL)	I = 0,004-4	ND*
	R > 4	ND*

CSF: caspofungina; ANF: anidulafungina

S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente; ND: no determinado.

*Los aislamientos sensibles a anidulafungina se consideran sensibles a caspofungina. Del mismo modo, los aislamientos de *C. parapsilosis* que resulten con sensibilidad intermedia a anidulafungina puede considerarse con sensibilidad intermedia a caspofungina. Los puntos de corte EUCAST para caspofungina aún no han sido establecidos, debido a la significativa variación entre laboratorios en los rangos de CIM de caspofungina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS DE SENSIBILIDAD

Los datos obtenidos fueron presentados como media geométrica, moda, rangos, y la CIM donde se inhibió el crecimiento del 50% y del 90% de los aislamientos (CIM 50 y CIM 90), para cada droga. También se calculó el porcentaje de aislamientos sensibles (S), resistentes (R), o con sensibilidad intermedia (I) para el caso de las equinocandinas y sensibles dependiente de dosis (SDD) para las otras drogas ensayadas.

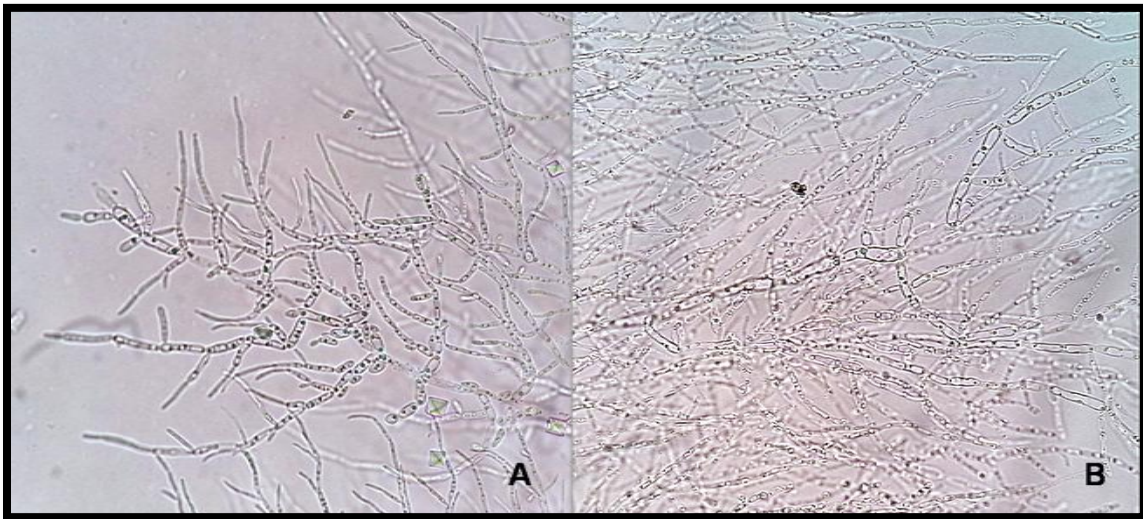
RESULTADOS

Se estudiaron 60 aislamientos con identificación presuntiva de *C. parapsilosis sensu lato* obtenidos de 40 pacientes.

Los aislamientos incluidos en este estudio fueron recuperados de pacientes desde neonatos (\leq de 1 mes de edad) hasta niños de 6 años de edad. Se encontró que 23 (57,5%) pacientes pertenecían al género masculino.

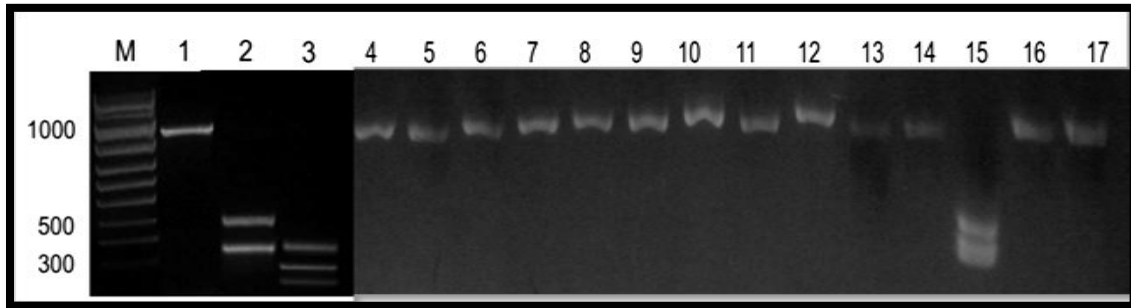
Del total de levaduras, 29 provenían de hemocultivos y 31 de catéteres. De estos últimos, sólo se incluyeron los provenientes de pacientes que también tenían un hemocultivo positivo.

Los 60 aislados de *C. parapsilosis sensu lato* (fotografía 1) fueron estudiados mediante PCR-REA de una región del gen *FKS1*, de los cuáles 59 (98%) resultaron *C. parapsilosis* s.s. y sólo 1 (2%) *C. orthopsilosis*. En las fotografías 2 y 3 se observan los patrones de banda de algunas de las cepas estudiadas.



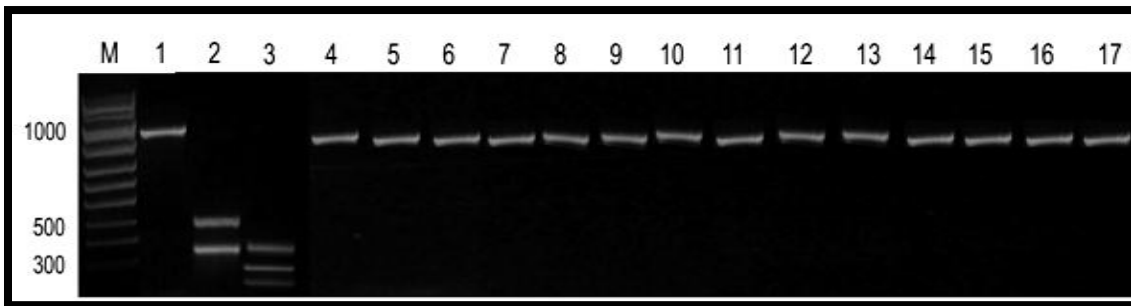
Fotografía 1. *C. parapsilosis sensu lato* en agar leche – Tween 80

Se observa pseudomicelio abundante, que forma ramificaciones de cadenas de células elongadas en forma de "árbol de navidad" o artemisia, con ramificaciones laterales que gradualmente se vuelven más cortas hacia el ápice de la hifa (A), y la presencia de hifas grandes o "células gigantes" (B).



Fotografía 2. Electroforesis en gel de agarosa de PCR-REA de *FKS1* y digestión con *EcoR1*

Fragmentos de PCR de 1032 pb. de *FKS1* utilizando los iniciadores REA-F y REA-R publicados por Garcia-Effron y cols. (85) y posteriormente digeridos con *EcoR1* **Línea M:** marcador de peso molecular 100 pb. **1:** *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019. **2:** *C. metapsilosis* ATCC 96144. **3:** *C. orthopsilosis* ATCC 96139. **4-14:** *C. parapsilosis* s.s.. **15:** *C. orthopsilosis*. **16-17:** *C. parapsilosis* s.s..



Fotografía 3. Electroforesis en gel de agarosa de PCR-REA de *FKS1* y digestión con *EcoR1*

Fragmentos de PCR de 1032 pb. de *FKS1* utilizando los iniciadores REA-F y REA-R publicados por Garcia-Effron y cols. (85) y posteriormente digeridos con *EcoR1*. **Línea M:** marcador de peso molecular 100 pb. **1:** *C. parapsilosis* s.s. ATCC 22019. **2:** *C. metapsilosis* ATCC 96144. **3:** *C. orthopsilosis* ATCC 96139. **4-17:** *C. parapsilosis* s.s..

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos para los 59 aislamientos de *C. parapsilosis* s.s. se resumen en la tabla 3; en la tabla 4 se muestra la distribución por categorías de sensibilidad de estos mismos aislados frente a cada droga ensayada.

Tabla 3. Media geométrica, moda y rangos de concentración obtenidos para 59 aislamientos de *C. parapsilosis* s.s.

Drogas	MG	Moda	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
			Rango	CIM 50	CIM 90
AMB	1	1	0,5 - 2	1	2
FLC	1,5	2	0,25 - 4	2	2
ITC	0,1	0,06	$\leq 0,03$ - 0,25	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$
VRC	0,06	0,06	$\leq 0,03$ - 0,125	$\leq 0,03$	0,06
ANF	1,1	2	0,015 - 4	1	2
CSF	1	1	0,125 - 2	1	1

AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; CSF: caspofungina; ANF: anidulafungina.
MG: media geométrica; CIM 50: CIM donde se inhibió el crecimiento del 50% de los aislados; CIM 90: CIM donde se inhibió el crecimiento del 90% de los aislados.

Tabla 4. Aislamientos sensibles, sensibles dependiente de dosis y resistentes, para cada droga ensayada para los aislamientos de *C. parapsilosis* s.s.

Droga	S % (n)	SDD % (n)	R % (n)
AMB*	85 (50)	-	15 (9)
FLC	91,5 (54)	8,5 (5)	-
ITC	97 (57)	3 (2)	-
VRC	100 (59)	-	-
ANF	-	100 (59)	-
CSF	-	100 (59)	-

AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; CSF: caspofungina; ANF: anidulafungina.

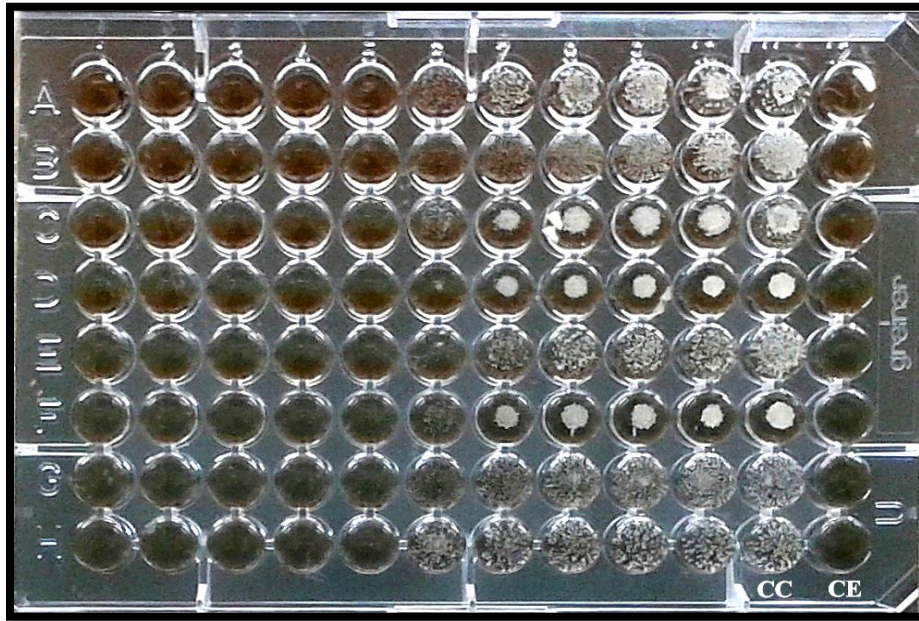
S: sensibles; SDD: sensibles dependiente de dosis; R: resistentes.

* Los aislados con CIM >1 $\mu\text{g/mL}$ son tomados como resistentes (49)

En aquellos pacientes con más de un aislamiento, no se observó variación en la categoría de sensibilidad; excepto en el paciente 2 con 6 aislados sucesivos (tabla 7 ANEXO), donde la última cepa recuperada de un hemocultivo, la sensibilidad frente a FLC fue sensible dependiente de dosis, mientras que en las 5 anteriores la categoría fue sensible.

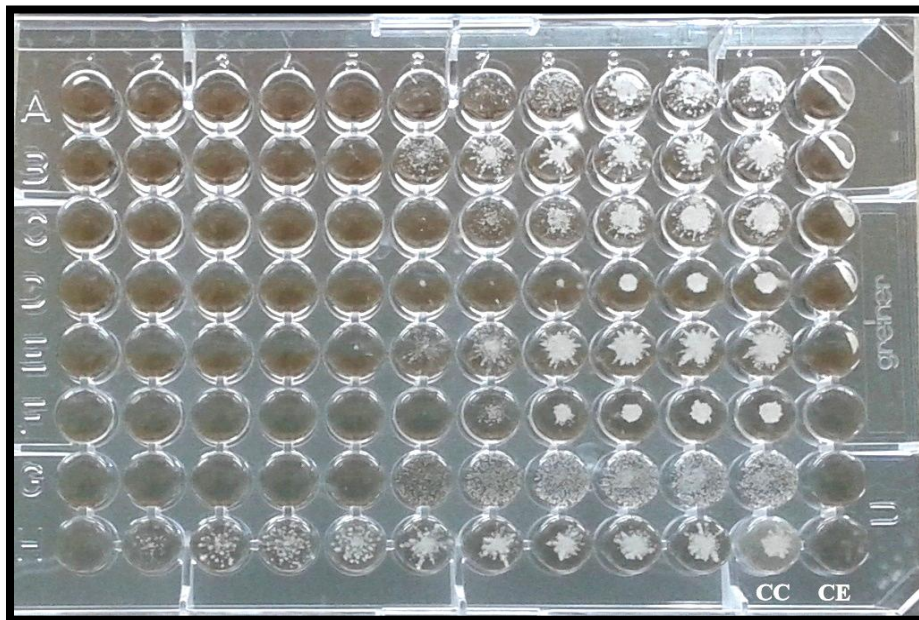
La CIM para la única cepa identificada como *C. orthopsilosis* fue de 1 $\mu\text{g/mL}$ para AMB, 1 $\mu\text{g/mL}$ para FLC, 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para ITC, 0,06 $\mu\text{g/mL}$ para VRC, determinada por el método de CLSI; y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para ANF y 1 $\mu\text{g/mL}$ para CSF, determinada por el método de EUCAST.

En las fotografías 4 a la 7 se muestran las CIM obtenidas para AMB, FLC, ITC y VRC frente a algunos de los aislados de *C. parapsilosis* s.s..



Fotografía 4. CIM para AMB por el método de referencia M27-A3 de la CLSI.

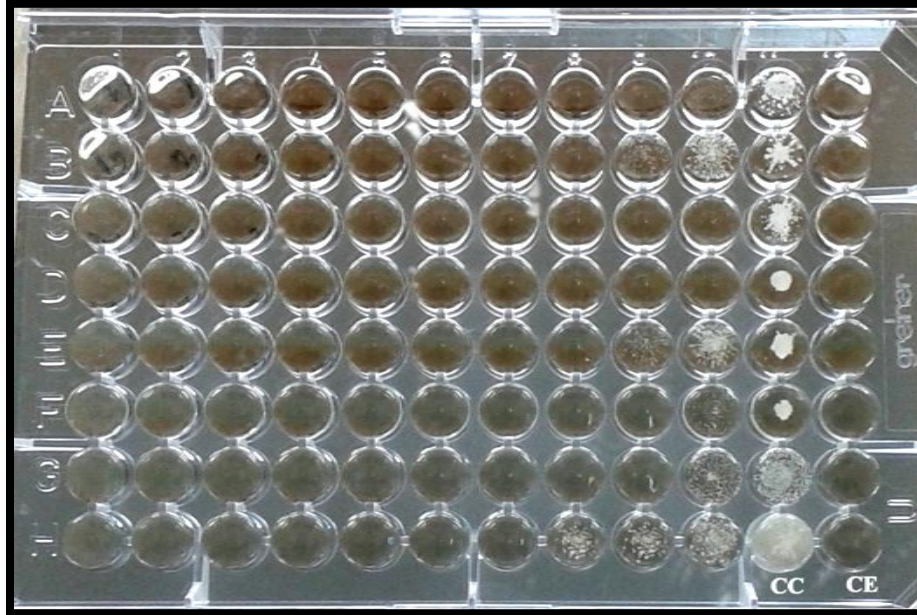
CE: control de esterilidad; CC: control de crecimiento. Filas A-G: *C. parapsilosis* s.s. con CIM ($\mu\text{g/mL}$) de 1; 1; 2; 1; 1; 2; 2. Fila H: *C. krusei* ATCC 6258 CIM 1 $\mu\text{g/mL}$.



Fotografía 5. CIM para FLC por el método de referencia M27-A3 de la CLSI

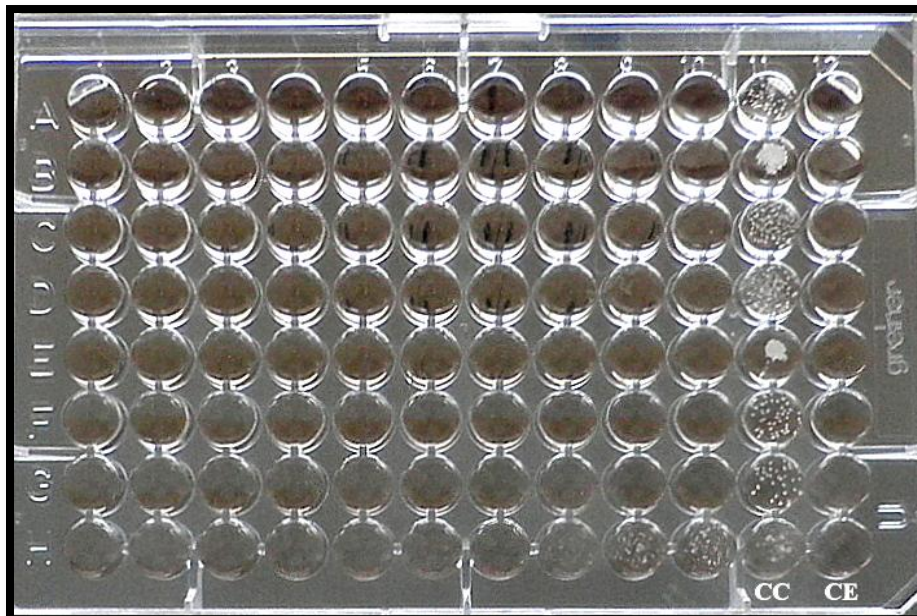
CE: control de esterilidad; CC: control de crecimiento. Filas A-G: *C. parapsilosis* s.s. con CIM ($\mu\text{g/mL}$) de 1; 2; 1; 0,5; 1; 1; 2. Fila H: *C. krusei* ATCC 6258 CIM 32 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS



Fotografía 6. CIM para ITC por el método de referencia M27-A3 de la CLSI

CE: control de esterilidad; CC: control de crecimiento. Filas A-G: *C. parapsilosis* s.s. con CIM ($\mu\text{g/mL}$) de $\leq 0,03$; 0,06; $\leq 0,03$; $\leq 0,03$; 0,06; $\leq 0,03$; 0,06. Fila H: *C. krusei* ATCC 6258 CIM 0,25 $\mu\text{g/mL}$.



Fotografía 7. CIM para VRC por el método de referencia M27-A3 de la CLSI

CE: control de esterilidad; CC: control de crecimiento. Filas A-G: *C. parapsilosis* s.s. todas con CIM ($\mu\text{g/mL}$) $\leq 0,03$. Fila H: *C. krusei* ATCC 6258 CIM 0,125 $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS

DISCUSION

Antes de la década del 90, *C. albicans* era el principal agente etiológico de candidiasis diseminada, luego, su incidencia fue disminuyendo a expensas del aumento de otras especies que se denominaron *Candida* no-*albicans*, muchas de las cuales son usualmente menos sensibles a los antifúngicos convencionales que *C. albicans*, lo cual implica un abordaje terapéutico diferente (10,15,23,96).

En los últimos años, la frecuencia de candidiasis diseminada debida a *C. parapsilosis sensu lato* se ha incrementado, sobretodo en América Latina, posicionándose como la segunda especie más encontrada en fungemias después de *C. albicans*, y en algunos centros llega a ser la especie más frecuente (14,23,97).

Con la definición de 3 especies dentro del complejo *C. parapsilosis*, surgieron interrogantes sobre la prevalencia de cada una de ellas en cuanto a la posible variación según el grupo etario y los sitios anatómicos de los cuales se aíslan pero, en especial, si existen diferencias en los perfiles de sensibilidad a los antifúngicos entre las especies.

Aunque en los últimos años se ha detectado un gran incremento en el número de fungemias causadas por *C. orthopsilosis* tal como lo demuestran los estudios de Lockhart y cols. (53), García-Effron y cols. (94), Tay y cols. (84) entre otros, *C. parapsilosis* s.s. sigue siendo la más prevalente, seguida por *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. Esto queda reflejado en numerosos estudios donde se ve que tanto en el ambiente como entre los aislados de origen clínico, incluso sin importar la serie de pacientes en estudio o el sitio anatómico de aislamiento, *C. parapsilosis* s.s. es la de mayor frecuencia (1,11,29,39,53,56,80,94,95,98–100). Como se ve en la tabla 5, esto se cumple también en las fungemias para todos los grupos de edad.

Tabla 5. Estudios previos sobre prevalencia de las especies de *C. parapsilosis sensu lato* en sangre

Autor (referencia)	Lugar del estudio	N. de cada especie obtenida (%)		
		<i>C. parapsilosis s.s.</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
García-Effron (94)	España	218 (74,4)	69 (23.5)	6 (2.1)
Gonçalves (56)	Brasil	124 (88)	13 (9)	4 (3)
Gómez-López (80)	España	76 (87.3)	5 (5.7)	6 (6.9)
González (101)	México	121 (95,3)	4 (3,15)	2 (1,6)
Cantón (11)	España	330 (90.7)	30 (8.2)	4 (1.1)
Silva (95)	Portugal	60 (100)	0 (0)	0 (0)
Chen (100)	Taiwán	54 (92)	2 (3)	3 (5)
García-Rodríguez (90)	España	78 (90.7)	8 (10.2)	0 (0)
Blyth (1)	Australia	180 (94.2)	7 (3.7)	4 (2.1)
Kocsubé (102)	Hungría	12 (92)	0 (0)	1 (8)
de Toro (98)	España	56 (90.3)	6 (9.6)	0 (0)
da Silva Ruiz (12)	Brasil	41 (83.7)	5 (10.2)	3 (6.1)

Los trabajos sobre aislados obtenidos de hemocultivos de pacientes neonatos y niños, cómo los realizados en España por Cantón y cols. (11), García-Effron y cols. (94) y García-Rodríguez y cols. (90) muestran una prevalencia de *C. parapsilosis s.s.* entre el 91% y el 72%, y de *C. orthopsilosis* entre el 9% y el 27%. En este estudio se encontró un porcentaje *C. parapsilosis s.s.* mayor a lo informado por esos autores, pero comparables con lo encontrado por Blyth y cols., en Australia y González y cols., en México (tabla 5) (1,101).

Se han observado diferencias en la frecuencia de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, de acuerdo a la edad del grupo de pacientes que se estudia, siendo en general poco frecuente hallarlas en paciente pediátricos y, menos aún en neonatos (11,90). Según un estudio de alcance mundial realizado por Lockhart y cols. (53), el porcentaje de aislamiento de *C. orthopsilosis* en Sudamérica es de 10,9% aunque, según el país del que se trate, los valores varían entre 16,5% en Venezuela a un 3,1% en Argentina (1,11,53). En concordancia con esto, en este estudio se encontró un único aislado de *C. orthopsilosis* en un paciente pediátrico, y no se hallaron aislados de *C. metapsilosis*.

Si bien la mayoría de los estudios informa que *C. parapsilosis* s.s. es la de menor sensibilidad (90,94,95), algunas investigaciones muestran resultados diferentes donde *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* presentan CIM más elevadas que *C. parapsilosis* s.s. (53,55). En nuestro estudio, más del 80% de los aislados se categorizaron como sensibles frente a AMB y los azoles, según lo establecido en los documentos de referencia. Todos los aislados fueron categorizados como sensible dependiente de dosis frente a las equinocandinas, no encontrándose aislados con CIM mayores a 4 µg/mL para estas drogas.

Basándonos en las categorías de sensibilidad, resulta difícil la comparación de los resultados con los de otros autores, ya que esta categorización depende de los puntos de corte disponibles al momento de la publicación. En el año 2012 la CLSI propuso nuevos puntos de cortes para FLC, VRC (tabla 1), y en 2014 EUCAST hizo lo mismo para *C. parapsilosis sensu lato* respecto de las equinocandinas, siendo difícil encontrar aislados sensibles con esos nuevos puntos de corte (tabla 2). Por lo tanto, resulta más conveniente el análisis a partir de los valores de CIM.

Para las equinocandinas se encontró un amplio rango de CIM (0,015-4 µg/mL para ANF y 0,125-2 µg/mL para CSF), similar a lo observado en otros estudios (53,80,94,95,100,101,103,104), no encontrándose aislados resistentes. García-Effron y cols. (94), estudiando la CIM a equinocandinas y las regiones *hot spot* 1 y 2 de una del gen *FKS1* observaron que todos los aislamientos de *C. parapsilosis sensu lato* presentaban la característica sustitución prolina-alanina en el *hot spot* 1 que se relaciona con la sensibilidad reducida a este grupo de drogas y, aunque estos aislamientos tenían un genotipo similar, también encontraron la misma amplitud en los rangos que nuestro estudio. Esto indicaría que existen otros factores que determinan la variabilidad de la CIM además de esta mutación en este complejo de especies.

En la tabla 6 se observa que la CIM 90 para ANF obtenida en este estudio fue la misma que la obtenida por otros autores, sólo Silva y cols. Informan la CIM 90 con una dilución por encima. Sin embargo, para CSF se observa mayor disparidad de resultados debido a la inestabilidad de esta droga y la consecuente variabilidad interlaboratorio. Esto motivó a EUCAST a no recomendar su uso para la realización de pruebas *in vitro* y propone extrapolar las categorías dadas por los resultados obtenidos con ANF (52).

Tabla 6. CIM 50 y CIM 90 de trabajos previos sobre *C. parapsilosis* s.s. por método de microdilución

Autores (referencia)	CIM 50 ($\mu\text{g/mL}$)						CIM 90 ($\mu\text{g/mL}$)					
	AMB	FLC	ITC	VRC	CSF	ANF	AMB	FLC	ITC	VRC	CSF	ANF
Cantón (11)	0,25	1	0,06	0,016	0,5	1	0,5	2	0,12	0,06	1	2
de Toro (98)	1	-	-	$\leq 0,03$	-	2	1	-	-	0,03	-	2
García-Effron (94)	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2
García-Rodríguez (90)	0,5	1	-	0,06	0,06	-	0,5	2	-	0,03	0,5	-
Gonçalves (56)	1	1	0,03	0,03	1	-	1	2	0,06	0,03	1	-
Lockhart (53)	1	0,5	-	-	0,5	2	4	2	-	-	1	2
Odds(105)	0,5	0,5	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	-	1	1	0,12	0,06	2	-
Silva (95)	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	4	4
Treviño (54)	-	1	-	-	0,5	1	-	2	-	-	1	2
Ziccardi (29)	0,03	0,25	0,03	0,016	0,25	-	0,25	0,5	0,03	0,03	0,5	-
Este estudio	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1	2	2	0,03	0,06	1	2

CIM 50: CIM donde se inhibió el crecimiento del 50% de los aislados; CIM 90: CIM donde se inhibió el crecimiento del 90% de los aislados; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; CSF: caspofungina; ANF: anidulafungina.

Las guías de práctica clínica para el manejo de candidiasis de la *Infectious Diseases Society of America* (58), frente a una candidemia por *C. parapsilosis sensu lato*, las equinocandinas no son el tratamiento de elección, como sí lo son en candidemias ocasionadas por otras especies de *Candida* y, en el caso de que el paciente haya recibido una equinocandina de inicio, se continúa utilizando este antifúngico sólo cuando el paciente muestre mejoría clínica y resultados de cultivos de seguimiento negativos. Si bien en Argentina las equinocandinas están disponibles para el tratamiento, en las ciudades en las cuales fueron atendidos estos pacientes, estas drogas no se encuentran dentro de las opciones de tratamiento ni de profilaxis, por lo que los pacientes incluidos en

este trabajo no han estado previamente expuestos a este grupo de drogas. Sin embargo todos los aislamientos presentaron sensibilidad intermedia tanto a CSF como ANF.

Con respecto a la AMB, se encontró el 15% de los aislados con sensibilidad reducida (CIM > 1 µg/mL) coincidiendo con los resultados obtenidos por Lockhart y cols. quienes informa valores de CIM 90 similares (53). Diferentes autores coinciden en que los aislados menos sensibles se encuentran entre los de *C. parapsilosis* s.s. (11,53,95); sin embargo, otros encuentran que todos los aislados de *C. parapsilosis sensu lato* son sensibles a AMB, con CIM 90 menor o igual a 1 µg/mL (tabla 6). La AMB-desoxicolato es la droga de primera línea en el tratamiento de la candidiasis diseminadas en los neonatos, junto con la remoción de cualquier catéter intravascular (58). Los rango de CIM 90 encontrados en la bibliografía son amplios (0,25 µg/mL – 4 µg/mL) (tabla 6), lo que enfatiza la importancia de conocer el perfil de sensibilidad a los antifúngicos en cada centro, en especial donde se atienden pacientes pediátricos para los cuales las opciones terapéuticas son más limitadas.

Entre los azoles, el FLC presentó la mayor amplitud de rangos (0,25 – 4 µg/mL) y el mayor número de aislados con sensibilidad dependiente de dosis o resistentes, coincidiendo con lo hallado por otros autores (11,53,55,80,95). A pesar de esta variabilidad, el 90% de los aislados resultaron sensibles, similar a lo obtenido en otros trabajos (tabla 6). En relación a esta droga, en un paciente con sucesivos aislados de *C. parapsilosis* s.s. sensibles a FLC, se encontró que el último aislado resultó sensible dependiente de dosis. También, se encontraron dos aislados SDD a ITC (ambos con CIM 0,25 µg/mL); estos también lo fueron a FLC (CIM 4 µg/mL) y si bien el 100% de los aislados fueron sensibles a VRC, los mismos presentaron las CIM más altas a esta droga en la serie aquí presentada (0,125 µg/mL) (tabla 7 – ANEXO). Esta situación es de esperar entre las especies de *Candida* debido a que existen mecanismos que, por un lado sólo generan resistencia a FLC, y por otro lado, mecanismos que generan resistencia

cruzada entre los azoles. Habitualmente comienzan con resistencia a FLC y luego se incrementa gradualmente la CIM a las otras drogas del grupo (106,107). El FLC es de elección para el tratamiento de la candidiasis diseminada en pacientes no neutropénicos y neonatos (58).

El tratamiento que reciben estos pacientes es FLC y/o AMB-desoxicolato, únicos antifúngicos usados en nuestro medio (región nordeste de Argentina) para el tratamiento de pacientes RN y pediátricos.

En cuanto al perfil de sensibilidad a los antifúngicos de *C. orthopsilosis*, si bien no se pueden sacar conclusiones debido a que se trató de un solo aislado, este fue sensible a todos las drogas ensayadas.

CONCLUSIONES

- ✓ Se trata del primer estudio de prevalencia de las especies del complejo *C. parapsilosis* y sus perfiles de sensibilidad a los antifúngicos en pacientes pediátricos con diagnóstico de candidemia en nuestro país.
- ✓ La mayoría de los aislados en nuestro estudio correspondieron a *C. parapsilosis sensu stricto*, los cuales presentaron un alto porcentaje de sensibilidad al FLC pero también un porcentaje considerable de aislamientos fueron categorizados como resistentes a la AMB. Esto es importante considerar dado que, tanto el FLC como la AMB son de uso frecuente en nuestro medio, FLC por su menor toxicidad y costo y AMB por ser la droga de elección para el tratamiento de los casos más graves de estos pacientes pediátricos. Por otro lado, las equinocandinas no mostraron una buena actividad a diferencia del VRC y el ITC.
- ✓ Si bien la discriminación de especies crípticas dentro del complejo *C. parapsilosis* no tendría una gran utilidad clínica, es importante el monitoreo sistemático de este complejo para conocer cambios en la distribución de especies y detectar cepas resistentes, más aún en pacientes pediátricos cuyas opciones terapéuticas son escasas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blyth CC, Chen SC, Slavin M, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, et al. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics*. 2009;123(5):1360–8.
2. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin J, Walsh TJ, Feudtner C. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis*. 2005;41(9):1232–9.
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1–53.
4. Almirante B, Rodríguez D, Almela M, Sanchez F, Alonso-tarres C, Rodriguez-Tudela JL, et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1681–5.
5. Singh N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7 Supl 2:1–7.
6. Giusiano GE. Caracterización de la epidemiología de las infecciones por hongos levaduriformes en pacientes pediátricos hospitalizados. Universidad de Buenos Aires; 2004.
7. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):78–81.
8. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1829–35.
9. Pemán J, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(1):23–30.
10. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606–25.
11. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, et al. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5590–6.
12. da Silva Ruiz L, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VKP, Gandra RF, et al. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2013;175(3-4):231–9.
13. Neu N, Malik M, Lunding A, Whittier S, Alba L, Kubin C, et al. Epidemiology of candidemia at a Children's hospital, 2002 to 2006. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(9):806–9.
14. Santos PE, Córdoba S, Carrillo-Muñoz A, Rodero L, Rubaglio E, Soria M. Epidemiology of fungaemia in a paediatric hospital of high complexity. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(4):200–2.
15. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat ME, Taverna C, Szusz W, Murisengo O, et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2011;43(3):176–85.
16. 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;43(1):284–92.
17. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T. The Yeasts A taxonomic Study. Fifth Ed. Kurtzman C, Fell J, Boekhout T, editors. Elsevier; 2011.
18. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos M, Sakthikumar S, Munro C, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009;459(7247):657–62.
19. Lockhart SR, Messer S a, Pfaller M a, Diekema DJ. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):374–6.

20. Ashford B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am J Trop Med Hyg.* 1928;8:507–38.
21. Langeron M, Talice RV. Nouvelles méthodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes. *Ann Parasitol Hum Comparée.* 1932;10:1–80.
22. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet.* 2009;55(5):497–509.
23. van Asbeck EC, Clemons K V, Stevens D a. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283–309.
24. Huang Y-C, Lin T-Y, Leu H-S, Peng H-L, Wu J-H, Chang H-Y. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection.* 1999;27(2):97–102.
25. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranyake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses.* 2001;44(1-2):29–35.
26. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immunity.* 2002;70(2):878–88.
27. Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology.* 2005;151:1073–81.
28. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis Sensu Lato* species. *PLoS One.* 2013;8(7):1–10.
29. Ziccardi M, Souza LOP, Gandra RM, Galdino ACM, Baptista ARS, Nunes APF, et al. *Candida parapsilosis (sensu lato)* isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *Int J Med Microbiol.* 2015;1–12.
30. 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;5(2):1–8.
31. Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, et al. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(4):265–70.
32. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 2001;147(Pt 8):1997–2005.
33. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses.* 2002;45(5-6):160–5.
34. Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses.* 2005;48(5):321–6.
35. Gácser A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest.* 2007;117(10):3049–58.
36. Gácser A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol.* 2007;44(12):1336–41.
37. Treviño-Rangel RDJ, González JG, González GM. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol.* 2012;1–5.
38. Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the “*C. parapsilosis*” complex. *Med Mycol.* 2010;48(8):1024–33.
39. Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol.* 2011;11(1):180.
40. Mügge C, Hausteil U-F, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis--a retrospective study. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006;4(3):218–28.
41. Gautret P. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. *Mycoses.* 2000;43:1999–2001.
42. Vennewald I, Schönlebe J, Klemm E. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. *Mycoses.* 2003;46(1-2):12–8.

43. Dorko E, Jenca A, Orencák M, Virágová S, Pilipcinec E. Otomycoses of candidal origin in eastern Slovakia. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004;49(5):601–4.
44. Martin TJ, Kerschner JE, Flanary VA. Fungal causes of otitis externa and tympanostomy tube otorrhea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005;69(11):1503–8.
45. Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, De Aquino Lemos J, et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:925–8.
46. Garzoni C, Nobre V a, Garbino J. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(12):915–26.
47. Chen K-H, Chang C-T, Yu C-C, Huang J-Y, Yang C-W, Hung C-C. *Candida parapsilosis* peritonitis has more complications than other *Candida* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*. 2006;28(3):241–6.
48. Weems JJ. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1992. p. 756–66.
49. 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. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Wayne, Pennsylvania. USA; 2008.
50. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI Document M27-S4. Wayne, Pennsylvania. USA; 2012.
51. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, The Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Document E.DEF 7.2: Method for the determination of broth dilution of antifungal agents for fermentative yeasts. 2012. 1-21 p.
52. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW, Testing TEC on ASTS on AS. EUCAST technical note on *Candida* and micafungin, anidulafungin and fluconazole. *Mycoses*. 2014;57(6):377–9.
53. Lockhart SR, Messer S, Pfaller M, 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.
54. Treviño-Rangel R, Garza-González E, González G, Bocanegra-García V, Llaca JM, González GM. Molecular characterization and antifungal susceptibility of the *Candida parapsilosis* species complex of clinical isolates from Monterrey, Mexico. *Med Mycol*. 2012;50:781–4.
55. van Asbeck E, Clemons K V, Martinez M, Tong A-J, Stevens D. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(1):106–9.
56. Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, Padovan ACB, Briones MRS, Melo AS, et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):885–7.
57. Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S, et al. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):283–8.
58. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis : actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. *CID*. 2009;48:1–35.
59. Földi R, Kovács R, Gesztelyi R, Kardos G, Berényi R, Juhász B, et al. Comparison of in vitro and vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia*. 2012;174(4):311–8.
60. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):2194–7.
61. 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;52(7):2305–12.
62. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect.* 2008;56(2):126–9.
 63. Levy I, Rubin LG, Vasishtha S, Tucci V, Sood SK. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis.* 1998;26(5):1086–8.
 64. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect.* 2005;59(2):159–62.
 65. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-chalberg J, Frempong T. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. 1994;32(2):452–6.
 66. Pemán J, Cantón E, Linares-Sicilia MJ, Roselló EM, Borrell N, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4158–63.
 67. Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, et al. Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis.* 1995;171(4):967–75.
 68. Enger L, Joly S, Pujol C, Simonson P, Pfaller M, Soll DR, et al. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):658–69.
 69. Jitsurong S, Kiamsiri S, Pattararangrong N. New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 1993;123(2):95–8.
 70. Forbes BA. V Parte: Micología. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana; 2009. p. 1160.
 71. De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Ascomycetous yeasts. *Candida parapsilosis*. In: De Hoog GS, editor. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Amer Society for Microbiology; 2001. p. 212–4.
 72. Abi-chacra É a., Souza LOP, Cruz LP, Braga-Silva L a., Gonçalves DS, Sodré CL, et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(8):831–48.
 73. Lehmann PF, Lin D, Lasker B. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3249–54.
 74. Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF, Lin D, Wu L, et al. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1815–21.
 75. Roy B, Meyer SA. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):1–4.
 76. Nosek J, Ryc A, Fukuhara H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1283–9.
 77. Kato M, Ozeki M, Kikuchi a, Kanbe T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene.* 2001;272(1-2):275–81.
 78. Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PHM. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(4):1357–62.
 79. Tavanti A, Hensgens L a M, 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;45(5):1455–62.
 80. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, et al. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1506–9.
 81. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan ZU. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 6):745–52.
 82. Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Odds FC, et al. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2307–10.

83. Sabino R, Sampaio P, Rosado L, Stevens DA, Clemons KV, Pais C. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis sensu stricto* isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1677–82.
84. Tay ST, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 2):185–91.
85. Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis sensu lato* species. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3257–61.
86. Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol.* 2011;60(Pt4):477–80.
87. Souza ACR, Ferreira RC, Gonçalves SS, Quindós G, Eraso E, Bizerra FC, et al. Accurate identification of *Candida parapsilosis (sensu lato)* by use of mitochondrial DNA and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2310–4.
88. Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71(3):304–8.
89. Pfaller M a., Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer S a., 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;46(9):3184–5.
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;31(6):363–8.
91. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis.* 1999;29(2):253–8.
92. Benjamin DJ, Ross K, McKinney RJ, Benjamin D, Auten R, Fisher R. When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics.* 2000;106(4):712–8.
93. Rodriguez D, Almirante B, Park B, Cuenca-Estrella M, Planes A, Sanchez F, et al. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis.* 2006;25(3):224–9.
94. Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis sensu lato* species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2739–48.
95. Silva A, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2009;47(8):2392–7.
96. Dotis J, Prasad PA, Zaoutis T, Roilides E. Epidemiology, risk factors and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children. *Pediatr Infect Dis.* 2013;31:557–60.
97. Nucci M, Queiroz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortes J, Zurita J, et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One.* 2013;8(3):e59373.
98. de Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(3):418–24.
99. Diekema DJ, Messer S a, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, et al. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3170–7.
100. Chen Y-C, Lin Y-H, Chen K-W, Lii J, Teng H-J, Li S-Y. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(3):284–92.
101. González GM, Treviño-Rangel RDJ, Palma-Nicolás JP, Martínez C, Lez JGG, Ayala J, et al. Species distribution and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: A nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2847–51.

102. Kocsubé S, Tóth M, Vágyölgyi C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I, et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis sensu lato* in Hungary. *J Med Microbiol.* 2007;56(Pt 2):190–5.
103. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):325–34.
104. Ghannoum M, 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;15(3):274–9.
105. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte J a., et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol.* 2007;56(8):1066–75.
106. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology.* 1997;143(2):405–16.
107. Perea S, López-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1695–703.

ANEXO

Tabla 7. Distribución de *C. parapsilosis* s. s. por tipo de muestra y sus valores de CIM

Nº de Paciente	MUESTRA	CIM ($\mu\text{g/ml}$) de <i>C. parapsilosis</i> s. s.					
		AMB	FLC	ITC	VRC	ANF	CSF
Paciente 1	HEMO1	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5	1
	CAT2	1	1	$\leq 0,03$	0,06	2	1
	HEMO2	1	2	$\leq 0,03$	0,06	1	1
Paciente 2	HEMO1	2	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
	CAT1	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,015	0,13
	HEMO2	1	2	$\leq 0,03$	0,06	0,5	1
	CAT2	1	2	$\leq 0,03$	0,06	1	1
	HEMO3	1	2	$\leq 0,03$	0,06	2	1
	HEMO4	1	4	$\leq 0,03$	0,06	1	1
Paciente 3	HEMO1	0,5	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	CAT1	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	HEMO2	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 4	HEMO	1	4	0,25	0,125	0,5	1
	CAT	1	4	0,25	0,125	0,5	1
Paciente 5	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	CAT	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	4	1
Paciente 6	CAT	0,5	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
Paciente 7	HEMO	2	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
	CAT	2	0,25	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
Paciente 8	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	CAT	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 9	HEMO1	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	HEMO2	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	CAT2	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 10	HEMO1	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
	HEMO2	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1

ANEXO

Nº de Paciente	MUESTRA	CIM ($\mu\text{g/ml}$) de <i>C. parapsilosis</i> s. s.					
		AMB	FLC	ITC	VRC	ANF	CSF
Paciente 11	HEMO1	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5	1
	CAT1	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
	HEMO2	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
	HEMO3	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 12	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5	1
Paciente 13	HEMO	2	1	0,06	0,06	1	1
Paciente 14	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	2
Paciente 15	HEMO	2	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
Paciente 16	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 17	HEMO	1	0,5	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 18	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
Paciente 19	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
Paciente 20	HEMO	0,5	2	$\leq 0,03$	0,06	0,5	1
Paciente 21	HEMO	0,5	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,015	1
Paciente 22	HEMO	0,5	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,5	1
Paciente 23	HEMO	1	4	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 24	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	0,06	2	1
Paciente 25	HEMO	2	1	$\leq 0,03$	0,06	1	1
Paciente 26	HEMO	0,5	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 27	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 28	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 29	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1

Nº de Paciente	MUESTRA	CIM ($\mu\text{g/ml}$) de <i>C. parapsilosis</i> s. s.					
		AMB	FLC	ITC	VRC	ANF	CSF
Paciente 30	HEMO	2	0,5	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	4	2
Paciente 31	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 32	HEMO	2	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	1	1
Paciente 33	HEMO	1	0,5	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	2
Paciente 34	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 35	HEMO	0,5	4	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 36	HEMO	1	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 37	HEMO	0,5	2	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 38	HEMO	1	1	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	2	1
Paciente 39	HEMO	2	2	0,06	0,06	1	1

HEMO: hemocultivo; CAT: catéter; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; ANF: anidulafungina; CSF: caspofungina.