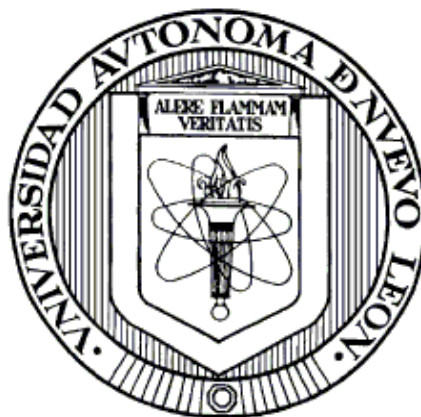


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA
DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis***

Por

Q.F.B. ROGELIO DE JESÚS TREVIÑO RANGEL

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA en
CIENCIAS con especialidad en Microbiología Médica**

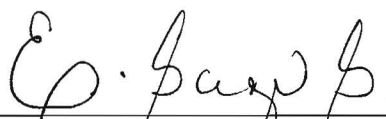
Julio, 2011

"Identificación molecular y caracterización fenotípica de aislamientos clínicos del complejo Candida parapsilosis"

Aprobación de la Tesis:



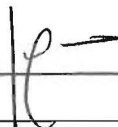
Dr. C. Gloria María González González
Director de Tesis



Dr. C. Elvira Garza González
Co-director de Tesis



Dr. Virgilio Bocanegra García
Miembro de la Comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA
DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis*”

Presentado por: Q.F.B. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular así como en el Laboratorio de Micología, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Gloria María González González.



Dra. C. Gloria María González González
Director de Tesis

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico con todo mi amor a mis padres.

Rogelio

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios todopoderoso por siempre iluminar el sendero de mi vida y permitirme cumplir una meta más.

A toda mi familia por su enorme paciencia, apoyo incondicional y amor verdadero.

A mi comisión de tesis: la Dra. Gloria González por creer en mí y confiarme este trabajo, así como la Dra. Elvira Garza y el Dr. Virgilio Bocanegra por su sabia guía y valiosos consejos.

A las químicas Lydia Oviedo y Diana Rodríguez por su amable y desinteresada asesoría en el laboratorio.

A todos los profesores del Departamento de Microbiología Médica, quienes me inculcaron el respeto y amor hacia esa fascinante disciplina, además de enseñarme a ser un mejor profesionalista.

A todo el personal técnico del departamento, en especial a Lucy Acevedo, Carlos Paz y Ángeles Quijano por todo el apoyo brindado y por su invaluable amistad.

A mis compañeros y amigos: Carolina Rojas, Christian Campos, Jazmín Márquez, Merab Ríos, Pablo Villarreal y Samantha Flores, que definitivamente hicieron más divertida esta gran aventura.

Al CONACyT por el soporte económico otorgado.

A todos... ¡muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes históricos	1
1.2 Características microbiológicas de <i>C. parapsilosis</i>	1
1.3 Factores de virulencia de <i>C. parapsilosis</i>	3
1.3.1 Adherencia	4
1.3.2 Formación de biopelícula	4
1.3.3 Secreción de enzimas	5
1.3.3.1 Proteinasa aspárticas	6
1.3.3.2 Fosfolipasas	6
1.3.3.3 Lipasas	7
1.3.4 Formación de pseudohifas/“cambio fenotípico”	7
1.4 Epidemiología de la candidosis	8
1.4.1 Prevalencia	8
1.4.2 Factores de riesgo	13
1.5 Espectro clínico de la candidosis	15
1.5.1 Infecciones superficiales	15
1.5.2 Infecciones en mucosa	16
1.5.3 Infecciones del tracto urinario	16
1.5.4 Infecciones sistémicas	17
1.5.5 Endocarditis	17
1.5.6 Peritonitis	18
1.5.7 Endoftalmitis	18
1.5.8 Enfermedades articulares	19
1.5.9 Pancreatitis	19
1.5.10 Meningitis	19
1.6 Diagnóstico de laboratorio	20
1.6.1 Métodos microbiológicos convencionales	20

1.6.1.1 API 20C AUX	20
1.6.1.2 MicroScan	22
1.6.1.3 Vitek	22
1.6.2 Ensayos moleculares	23
1.7 Tratamiento y susceptibilidad antifúngica	23
1.7.1 Anfotericina B	23
1.7.2 Fluconazol	24
1.7.3. Otros azoles	25
1.7.4 Flucitosina	25
1.7.5 Equinocandinas	26
1.8 Variabilidad genética de <i>C. parapsilosis</i>	27
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo general	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL Y MÉTODOS	33
4.1 Estrategia general	33
4.2 Aislamientos del complejo <i>C. parapsilosis</i>	33
4.3 Identificación molecular	34
4.3.1 Obtención del ADN	34
4.3.2 Evaluación de la funcionalidad del ADN	35
4.3.3 Amplificación del gen <i>SADH</i>	36
4.3.4 Digestión enzimática de los productos de PCR	37
4.4 Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	40
4.4.1 Agentes antifúngicos	40
4.4.2 Preparación del inóculo	41
4.4.3 Prueba de Macrodilución	42

5. RESULTADOS	44
5.1 Identificación molecular	44
5.2 Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	47
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIONES	57
8. PERSPECTIVAS	58
9. REFERENCIAS	59
APÉNDICES	81
Apéndice A. Preparación de reactivos	81

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Rangos de susceptibilidad establecidos por el CLSI para las cepas control frente al antifúngico fluconazol (método de macrodilución en tubo)	43
2.	Identificación molecular de los aislamientos clínicos del complejo <i>C. parapsilosis</i>	47
3.	Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i> de los aislamientos clínicos del complejo <i>C. parapsilosis</i>	49
4.	Fenotipos de resistencia antifúngica de los aislamientos drogoresistentes	50

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Microfotografía de <i>C. parapsilosis</i>	2
2.	“Cambio fenotípico” en <i>C. parapsilosis</i>	3
3.	Porcentajes de aislamientos de <i>Candida</i> spp. en sangre a nivel mundial (1991-2008)	10
4.	Reportes mundiales de candidosis (1992-2006)	11
5.	Comparación de la distribución de <i>Candida</i> spp. entre Brasil y México	12
6.	Galería API 20C AUX	21
7.	Metodología para la identificación molecular	39
8.	Patrones de restricción del gen <i>SADH</i> característicos de las especies del complejo <i>C. parapsilosis</i>	40
9.	Metodología para los ensayos de susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	43
10.	Amplificación del gen <i>SADH</i>	45
11.	Digestión enzimática del gen <i>SADH</i>	46

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AFLP:	Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica
ANI:	Anidulafungina
APD:	Agar papa dextrosa
ATCC:	American Type Culture Collection
CAS:	Casposfungina
CLSI:	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
°C:	Grados celsius
DMSO:	Dimetilsulfóxido
dNTP's:	Desoxirribonucleótidos tri-fosfato
FLU:	Fluconazol
g:	Gramos
h:	Horas
ITS:	Espaciador transcripcional interno
L:	Litros
µg:	Microgramos
µL:	Microlitros
MG:	Media geométrica
MIC:	Micafungina
min:	Minutos
mL:	Mililitros
MLST:	Análisis de secuencias multi-locus
mM:	Milimolar
nm:	Nanómetros
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
pH:	Potencial de hidrógeno

pMol:	Picomolar
%:	Por ciento
RAPD:	ADN polimórfico aleatoriamente amplificado
RFLP:	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
SADH:	Deshidrogenasa alcohólica secundaria
U:	Unidad de actividad enzimática
UV:	Ultravioleta

RESUMEN

Q.F.B. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Fecha de Graduación: Julio, 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del Estudio: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DEL COMPLEJO *Candida parapsilosis*

Número de páginas: 82

Candidato al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con especialidad en Microbiología Médica

Área de estudio: Micología Médica.

Propósito y Método de estudio: La candidosis es la micosis oportunista de mayor incidencia a nivel mundial, siendo *Candida parapsilosis* una de las especies no-*albicans* más frecuentemente responsable de cuadros fungémicos en varias partes del mundo, incluida Latinoamérica. Recientemente, y con base en diversos ensayos moleculares, se demostró que *C. parapsilosis* es un complejo, el cual requiere la identificación precisa de sus especies. En México se carece de información referente a la incidencia, distribución y perfiles de susceptibilidad antifúngica de las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis*. El principal objetivo de este estudio fue identificar mediante herramientas moleculares 344 aislamientos clínicos convencionalmente identificados como *C. parapsilosis*, así como caracterizarlos en base a sus fenotipos de susceptibilidad a ciertos antifúngicos. Para realizar este estudio se utilizó la técnica molecular RFLP con la finalidad de identificar de manera precisa a nivel de especie los aislamientos clínicos. Por otra parte, los perfiles de susceptibilidad antifúngica se efectuaron utilizando el método de macrodilución en tubo, de acuerdo al documento M27-A3 del CLSI de los Estados Unidos de América y los antifúngicos probados fueron: fluconazol, caspofungina, anidulafungina y micafungina.

Contribuciones y Conclusiones: *C. parapsilosis* en sentido estricto fue el organismo más frecuente, siendo particularmente habitual en sangre, piel y uñas; mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* representaron menos del 10% del total de los aislamientos estudiados y procedieron principalmente de sangre y piel, respectivamente. Con respecto a los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro*, *C. parapsilosis* en sentido estricto y *C. orthopsilosis* fueron igualmente susceptibles a fluconazol (CMI_{90%} de 8 µg/mL) y a caspofungina (CMI_{90%} de 0.5-1 µg/mL), así como a anidulafungina y micafungina, con una CMI_{90%} de 2 µg/mL, límite máximo de susceptibilidad de acuerdo al CLSI. Un 11% de los aislamientos identificados como *C. parapsilosis* en sentido estricto presentó resistencia a ciertos antifúngicos.



Dra. C. Gloria María González González
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos

Candida parapsilosis es un hongo levaduriforme que fue aislado por primera vez en 1928 por Ashford como una especie de *Monilia*, incapaz de fermentar la maltosa, a partir de las heces de un paciente con diarrea en Puerto Rico (8, 194). La especie fue nombrada originalmente *Monilia parapsilosis* para distinguirla del aislamiento más común, *Monilia psilosis*, mejor conocida hoy en día como *Candida albicans*.

1.2 Características microbiológicas de *C. parapsilosis*

Las células de *C. parapsilosis* pueden adoptar formas ovales, redondeadas o incluso cilíndricas (Figura 1). Cuando crece en agar dextrosa de Sabouraud, las colonias normalmente se tornan blanquecinas, cremosas, brillantes y de textura lisa o rugosa (185). A diferencia de *Candida tropicalis* y *C. albicans*, que pueden existir en múltiples formas morfogénicas, *C. parapsilosis* no forma hifas verdaderas, por lo que puede existir ya sea en fase levaduriforme, generando fenotipos coloniales que van desde texturas lisas hasta con forma de “copos de nieve”, o bien en su forma pseudohifal, dando lugar a colonias con estructuras peculiares que pueden ser concéntricas o bien con forma de

“crepé”, mediante un fenómeno conocido como “cambio fenotípico” (55, 102) (Figura 2). Las pseudohifas se han observado en agar harina de maíz y pueden ser identificadas fácilmente con microscopía de luz (102). La formación de pseudohifas en *C. parapsilosis* se encuentra vinculada de manera importante a un conjunto específico de aminoácidos, particularmente citrulina, la cual origina cambios importantes en la morfología celular y colonial del organismo (94).

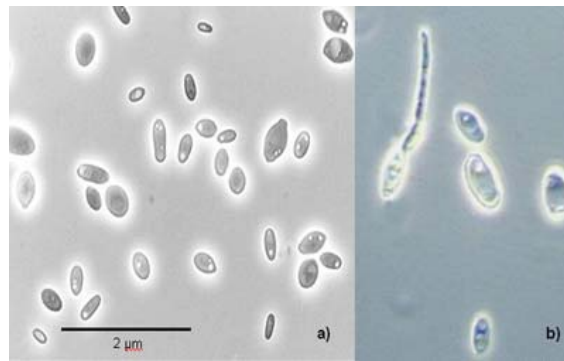


Figura 1. Microfotografía de *C. parapsilosis* (121). a) fase levaduriforme, b) forma pseudohifal.

En comparación con otras especies del género anamórfico *Candida*, *C. parapsilosis* presenta un extenso patrón de distribución en la naturaleza, a diferencia de *C. albicans* y *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* no es un patógeno antropofílico obligado, ya que ha sido aislada de diversas fuentes no humanas (194) como animales domésticos, insectos, tierra, así como ambientes marinos (57). *C. parapsilosis* es un comensal humano normal y es uno de los hongos frecuentemente aislados del lecho ungueal de manos de seres humanos (185). Su colonización transitoria del integumento humano es base de numerosos debates en cuanto a si *C. parapsilosis* es un patógeno o sólo un espectador (“bystander”) en ciertas infecciones (185).

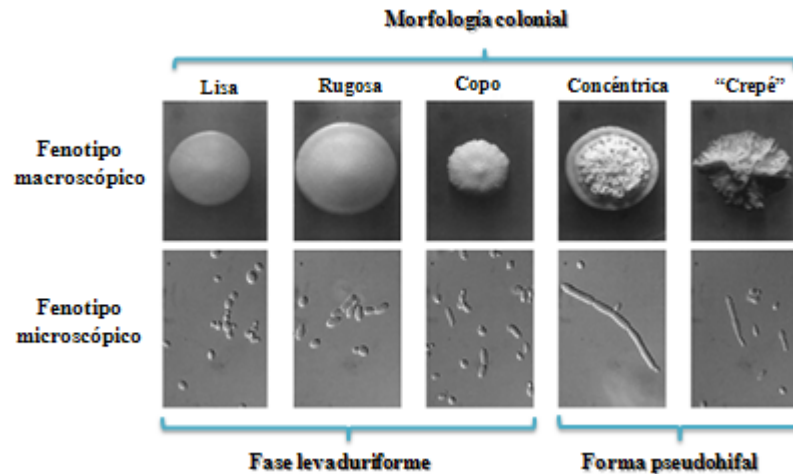


Figura 2. “Cambio fenotípico” en *C. parapsilosis* (55).

En años recientes y con base en una amplia batería de ensayos moleculares, se reportó que *C. parapsilosis* es un complejo, el cual se encuentra integrado por tres distintas especies genéticamente heterogéneas entre sí.

1.3 Factores de virulencia de *C. parapsilosis*

La patogénesis de la candidosis invasiva debida a *C. parapsilosis* se basa en diversos factores de virulencia del organismo, primordialmente su adherencia a las células del hospedero, su capacidad de producir biopelículas extensivas, así como la secreción de ciertas enzimas hidrolíticas (185). Adicionalmente, se ha señalado la capacidad de *C. parapsilosis* para la generación de pseudohifas/“cambio fenotípico” como otro importante factor de virulencia de este organismo (189). A pesar de intensos esfuerzos encaminados a la elucidación de los mecanismos de patogenicidad inherentes en hongos, particularmente en *C. albicans*, se conoce relativamente poco acerca de los factores de virulencia de *C. parapsilosis* (185).

1.3.1 Adherencia

La colonización e infección por *C. parapsilosis* dependen de la habilidad del hongo para adherirse a las células y tejidos del hospedero, particularmente superficies mucosas (185). La adherencia a dispositivos médicos facilita la formación de biopelículas y ocasiona daño en el hospedero (185). La hidrofobicidad de la superficie celular se ha asociado con la adherencia inicial de *C. parapsilosis* a superficies (129), así como la producción de limo se ha relacionado con la tendencia del organismo para adherirse a catéteres plásticos (22).

1.3.2 Formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos asociadas a superficies dentro de una matriz extracelular, y son el tipo más prevalente de crecimiento microbiano (99). La generación de biopelículas en *C. albicans* está asociada con el cambio dimórfico de levadura a crecimiento hifal, y la estructura de la biopelícula generada involucra dos capas distintas: una delgada, capa basal constituida básicamente de levaduras, y una gruesa, capa hifal menos compacta (9). En contraste, *C. parapsilosis* produce cuantitativamente menos biopelícula y de menor complejidad que *C. albicans* (77, 98). Ciertos fenotipos filamentosos (pseudohifales) de *C. parapsilosis*, sin embargo, generan más biopelícula y son más invasivos en agar que cepas que predominantemente permanecen en fase levaduriforme (102).

La formación de biopelículas se encuentra precedida por la adherencia a tejidos o dispositivos médicos, resultando presumiblemente en un cambio en la morfología y comportamiento del organismo (185). Las biopelículas de *C. parapsilosis* pueden

presentarse en diversos dispositivos médicos, incluyendo catéteres venosos centrales y periféricos, catéteres de hemodiálisis y diálisis peritoneal, dispositivos prostéticos intracardiacos y articulaciones prostéticas (150). Como comensal de la piel humana, el organismo puede adquirirse por contacto directo con dispositivos médicos previo o durante el uso del paciente, particularmente en ambientes hospitalarios donde ocurren lapsos en la higiene propia de las manos (185). Aislamientos de *C. parapsilosis* con gran producción de biopelícula han sido asociados con brotes nosocomiales (100).

La formación de biopelículas es un importante factor de virulencia para varias especies de *Candida*, ya que confiere resistencia significativa a la terapia antifúngica convencional, la cual incluye anfotericina B y compuestos azólicos, limitando la penetración de sustancias a través de la matriz y protegiendo así las células de la respuesta inmune del hospedero (185). Las capacidades de diferentes aislamientos de *C. parapsilosis* para causar enfermedad en varios tejidos pueden estar influenciadas por su habilidad para formar biopelículas (185).

1.3.3 Secreción de enzimas

En años recientes las enzimas de patógenos microbianos secretadas extracelularmente han ganado interés debido a su papel potencial en la patogénesis y como posibles blancos terapéuticos para el diseño de inhibidores sintéticos de aplicación en el manejo clínico de la infección (185). Estas incluyen principalmente las proteinasas aspárticas, fosfolipasas y lipasas.

1.3.3.1 Proteineras aspárticas. Las proteineras aspárticas facilitan la invasión y colonización de los tejidos del hospedero por disrupción de las membranas mucosas del mismo (158) y degradando importantes proteínas de defensa inmunológica y estructural, tales como las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G, macroglobulina α_2 , proteína C3, β -lactoglobulina, lactoperoxidasa, colágeno y fibronectina (148).

Se ha reportado particularmente en *C. parapsilosis* tres proteineras aspárticas, dos de las cuales permanecen en gran parte sin caracterizar (114). La isoenzima Sapp1p recientemente se caracterizó bioquímicamente (53, 62, 148). Aunque inicialmente se le clasificó como un pseudogen, *sapp2p* produce una proteinera funcional (Sapp2p), la cual constituye cerca del 20% de las Saps aisladas a partir del sobrenadante del organismo en cultivo (63). Adicionalmente, la actividad proteolítica del producto del gen *sapp2p* posee diferentes mecanismos de activación que aquella del producto de *sapp1p* (114). Actualmente permanece sin caracterizarse *sapp3* y su producto (185).

La producción de proteineras aspárticas varía entre aislamientos de *C. parapsilosis* y su papel en la patogénesis aún permanece sin esclarecerse (185). Sin embargo, hay cierta tendencia que relaciona la producción de estas enzimas y el sitio de aislamiento de *C. parapsilosis*, ya que las proteineras aspárticas parecen ser menos importantes en la patogénesis de infecciones del torrente sanguíneo que en la enfermedad invasiva localizada, particularmente en infecciones de la mucosa vaginal (30, 44-45, 47, 199).

1.3.3.2 Fosfolipasas. Las fosfolipasas son enzimas capaces de hidrolizar uniones tipo éster en glicerosfosfolípidos (185). La función de las fosfolipasas durante el proceso

infeccioso debido a *C. parapsilosis* aún no se comprende del todo, aunque se hipotetiza se encuentran involucradas en la disrupción de las membranas del hospedero (68, 90).

1.3.3.3 Lipasas. Las lipasas catalizan tanto la hidrólisis como la síntesis de triacilgliceroles y se caracterizan por su estabilidad a altas temperaturas y en solventes orgánicos, elevada enantioselectividad y resistencia a la proteólisis (25). Algunos de los papeles más importantes de estas enzimas microbianas extracelulares incluyen desde la digestión de lípidos para adquisición nutricional, adhesión a células y tejidos del hospedero, interacciones sinérgicas con otras enzimas, hasta la autodefensa mediada por el lisado de la microflora competitiva (166, 176).

En *C. parapsilosis* se identificaron dos genes relacionados con las lipasas, CpLIP1 y CpLIP2, aunque sólo CpLIP2 codifica para una proteína activa (27, 120). Recientemente y de acuerdo a los resultados del proyecto de secuenciación del ADN genómico de *C. parapsilosis* se sugiere la existencia de dos genes LIP adicionales (185), que eventualmente podrían estar vinculados con la virulencia del organismo.

1.3.4 Formación de pseudohifas/“cambio fenotípico”

La baja virulencia de *C. parapsilosis* comparada con *C. albicans* puede ser atribuida a su incapacidad de formar hifas verdaderas (189). Muchas especies de *Candida*, incluyendo *C. parapsilosis* existen como blastoconidias esféricas u ovoides, o bien como células levaduriformes (102) y son capaces, en diversos grados, de producir cadenas de blastoconidias elongadas, llamadas pseudohifas, tanto *in vivo*, como bajo ciertas condiciones, *in vitro* (189). Por otra parte, las hifas verdaderas son más difíciles

de ingerir y las paredes celulares pueden ser más resistentes a la digestión. Adicionalmente, las hifas verdaderas se definen como más adhesivas a las células huésped que las pseudohifas (82).

El “cambio fenotípico” es un fenómeno de inestabilidad fenotípica específica, que permite a las cepas cambiar su fenotipo colonial sin afectar su genotipo identificable (58, 174) y aunque ha sido ampliamente estudiado en *C. albicans*, recientemente se ha determinado que este fenómeno también ocurre en *C. parapsilosis* (55, 109). Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan dicho fenómeno aún se desconocen. Diversos reportes indican que existe cierta correlación entre el “cambio fenotípico” y la formación de biopelícula (102). En este sentido, los fenotipos concéntricos generan dos veces más biopelícula que aquellos con forma de “crepé” o cráter, así como los lisos producen la menor cantidad de biopelícula de los cuatro posibles fenotipos reportados para *C. parapsilosis* (102).

1.4 Epidemiología de la candidosis

1.4.1 Prevalencia

Actualmente la candidosis se encuentra clasificada en cinco distintas presentaciones clínicas: mucocutánea, cutánea, sistémica, alérgica y miscelánea (19). De las cuales, la modalidad sistémica, particularmente la fungemia, se encuentra ampliamente estudiada en muchos aspectos y a todos los niveles. Un estudio epidemiológico reciente de sepsis reveló que el número anual de casos de sepsis fúngica

en los Estados Unidos incrementó en más del 200% entre 1979 y 2000 (113). La morbilidad y mortalidad asociada con estas infecciones es sustancial, quedando claro que las enfermedades fúngicas han emergido como problemas importantes de salud pública (139). En este sentido, las infecciones ocasionadas por *Candida* spp., *Aspergillus* spp. y *Cryptococcus* spp. son las causas más importantes de morbi-mortalidad en los seres humanos y representan un 90% de todas las infecciones fúngicas (139, 193). En el caso particular de *Candida* spp., desde la década de los ochenta las tasas de candidosis se han incrementado en todo el mundo y representan la cuarta causa de infecciones nosocomiales en el torrente sanguíneo en los Estados Unidos y en otros países. La candidosis se encuentra asociada con una alta tasa de mortalidad (del 46 al 75%) y una prolongada estancia hospitalaria (139, 196).

Durante la década de los noventa, en muchos países se reportó que *C. albicans* ocasionó entre el 50 y el 60% de todas las infecciones nosocomiales por hongos, razón por la cual se describió un notable cambio epidemiológico hacia otras especies que en conjunto se han denominado como *Candida no-albicans* (entre las que se encuentran: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, entre otras). Esta tendencia tiene implicaciones clínicas obvias, debido a que muchas de estas especies son usualmente menos susceptibles a los antifúngicos triazólicos que *C. albicans*, lo cual puede requerir un manejo clínico diferente (139).

En 2008 Trofa y cols. (185) publicaron un estudio retrospectivo y descriptivo en el cual reportaron que, a nivel mundial, *C. albicans* se posicionó como el principal agente etiológico de la mayor parte de las fungemias alrededor del mundo, por lo menos en los últimos 17 años, con un 49.8% de aislamientos, encontrándose precedido con tan

sólo 19% por *C. parapsilosis*, una de las principales especies no-*albicans* responsable de fungemia (Figura 3). Adicionalmente, este estudio aporta evidencias clínico-epidemiológicas que demuestran el incremento en la tasa de incidencia de candidosis invasivas debidas a especies no-*albicans* (particularmente *C. parapsilosis*) en ciertas regiones geográficas, principalmente en algunos países del continente asiático como Japón y Malasia (Figura 4).

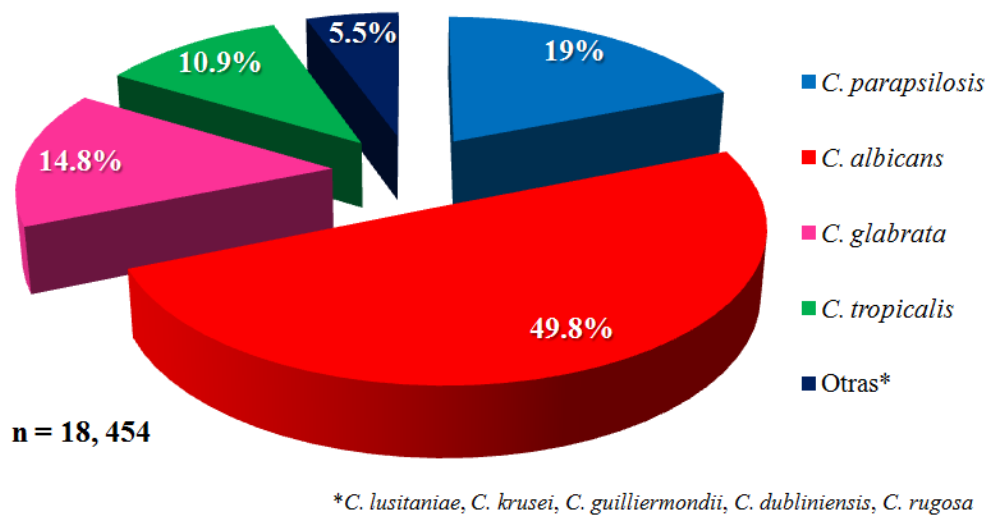


Figura 3. Porcentajes de aislamientos de *Candida* spp. en sangre a nivel mundial (1991-2008).

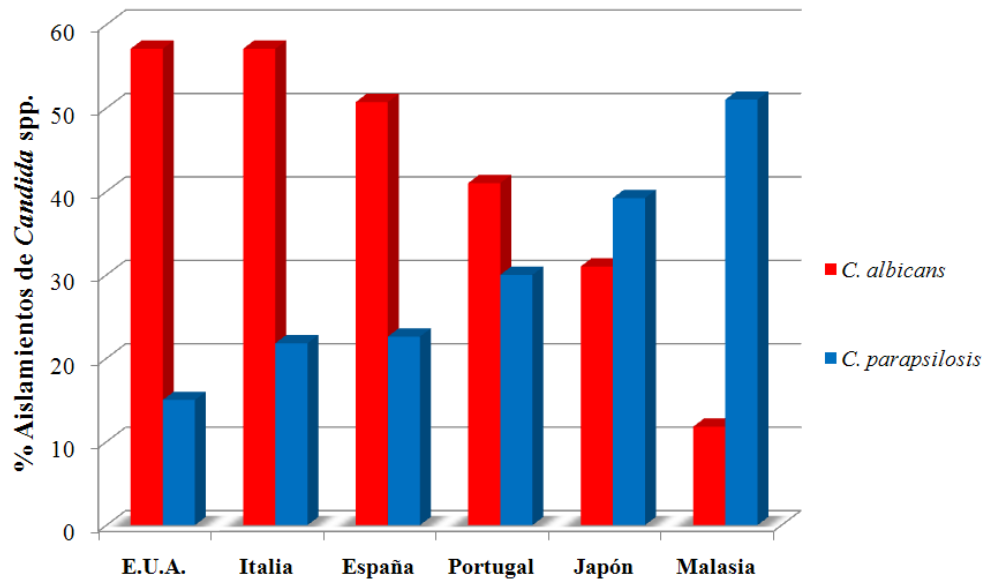


Figura 4. Reportes mundiales de candidosis (1992-2006).

Los programas de vigilancia epidemiológica como el SENTRY han proporcionado sistemas de monitoreo de la emergencia de especies de *C. no-albicans* como una causa importante de infecciones nosocomiales y han seguido la tendencia en la resistencia de diversos antifúngicos en esos aislamientos (144). En algunos hospitales del tercer nivel dentro del grupo de *C. no-albicans*, *C. glabrata* ha sido la especie más frecuentemente aislada de las candidosis (3-35%), sobretodo en pacientes mayores de 60 años (17, 139). Por otro lado, *C. parapsilosis* es la causa más importante de candidosis en infantes y neonatos (139, 155).

La frecuencia de candidosis invasiva debida a *C. parapsilosis* se incrementó en los últimos años, sobretodo en América Latina (33, 105), en donde actualmente se cuenta con dos importantes estudios de vigilancia epidemiológica de candidosis (Figura 5).

Un estudio efectuado de Marzo de 2003 a Diciembre de 2004 por Colombo y cols. (32) en Brasil, en el cual se analizaron 712 casos de candidosis, encontrándose que, con un 40.9% de incidencia, *C. albicans* se posicionaba con el principal agente etiológico de candidosis en dicha nación, siendo precedida por *C. tropicalis* y por *C. parapsilosis* con un 20.9 y 20.5% de incidencia, respectivamente. Por otra parte, en México (particularmente Monterrey, Nuevo León) González y cols. (74) analizaron de Julio de 2004 a Julio de 2007 un total de 398 candidosis, y encontraron que, con un 37.9% de incidencia, *C. parapsilosis* es el principal agente etiológico de candidosis en dicha región, siendo seguida con un 31.9 y 14.8% de incidencia por *C. albicans* y por *C. tropicalis*, respectivamente. Por otro lado, los investigadores encontraron que en pacientes \leq a 1 año de edad y hasta los 24 años el principal agente etiológico de candidosis era *C. parapsilosis*, así como la tendencia de adquirir candidosis debida a *C. glabrata* incrementaba notablemente con la edad de los pacientes afectados.

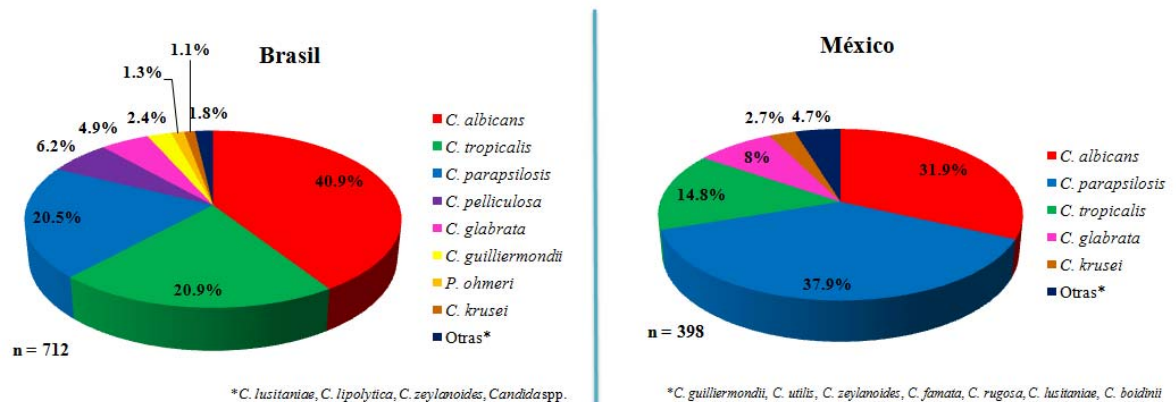


Figura 5. Comparación de la distribución de *Candida* spp. entre Brasil y México.

Con respecto a ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro*, en ambos estudios se reportó un elevado porcentaje de susceptibilidad por parte de los aislamientos

convencionalmente identificados como *C. parapsilosis* frente a anfotericina B, así como también frente a los triazoles: fluconazol, itraconazol y voriconazol. Sin embargo, González y cols. reportaron además el hallazgo de elevadas concentraciones mínimas inhibitorias ($\text{CMI}_{90\%} = 2 \mu\text{g/mL}$) frente a la equinocandina caspofungina, siendo más que imperativa la necesidad en la promoción de programas de vigilancia clínico-epidemiológica para el monitoreo de este importante organismo.

Afortunadamente, las infecciones del torrente sanguíneo debidas a *C. parapsilosis* se asocian con una tasa de mortalidad significativamente baja que aquellas infecciones debidas a otras especies de *Candida* (4, 75, 131). Dado el origen exógeno de *C. parapsilosis*, las infecciones del torrente sanguíneo debidas a esta especie pueden prevenirse gracias a la implementación de buenas prácticas de control de infecciones, incluyendo la higiene de manos y la apropiada colocación y cuidado de catéteres intravasculares.

1.4.2 Factores de riesgo

La enfermedad invasiva debida a *C. albicans* y *C. tropicalis* se encuentra normalmente precedida por previa colonización, siendo la transmisión vertical, típicamente de madre a hijo durante el trabajo de parto, la más común para estos hongos (185). En contraste, la enfermedad invasiva causada por *C. parapsilosis* puede ocurrir sin previa colonización y es frecuentemente transmitida horizontalmente a través de fuentes externas contaminadas, como dispositivos médicos o fluidos, las manos de los trabajadores del área de la salud, dispositivos prostéticos y catéteres (185).

El incremento en la frecuencia de infecciones por *C. parapsilosis* se ha atribuido a varios factores de riesgo, incluyendo las capacidades selectivas del organismo para proliferar en soluciones para hiperalimentación y su afinidad por dispositivos intravasculares y materiales prostéticos (185). Los individuos inmunocomprometidos, como pacientes con VIH/SIDA y aquellos recientemente sometidos a procedimientos quirúrgicos, particularmente cirugía del tracto gastrointestinal, se encuentran en alto riesgo de infección con *C. parapsilosis*. Adicionalmente, pacientes que requieren el uso prolongado de catéteres venosos centrales o dispositivos médicos, como pacientes oncológicos, se encuentran en elevado riesgo de infección con dicho organismo (185).

La nutrición parenteral, en particular, facilita la infección con *C. parapsilosis* debido a que la levadura posee una ventaja de crecimiento selectivo en soluciones para hiperalimentación con elevadas concentraciones de glucosa (173, 195). Además, algunos estudios de nutrición parenteral total muestran que puede incrementarse hasta en un 40% el peso seco de biopelículas, un factor de virulencia importante del patógeno (100).

La población que se encuentra en especial riesgo de infección nosocomial por *C. parapsilosis* son los neonatos prematuros de muy bajo peso (185). La colonización de la piel o del tracto gastrointestinal es frecuentemente el primer paso en la patogénesis de la candidosis invasiva y los neonatos se encuentran especialmente propensos a la enfermedad dada la comprometida integridad de su piel, susceptibilidad frente a infecciones del tracto gastrointestinal, necesidad de catéteres venosos centrales por largo tiempo e intubación endotraqueal prolongada (16).

Las manos de los trabajadores del área de la salud son los principales vectores en la adquisición exógena de *C. parapsilosis*. Como un comensal normal de la piel humana,

este organismo plantea una grave amenaza para aquellos pacientes que interactúan con trabajadores del área de la salud colonizados, particularmente cuando se violan los protocolos estándar para la higiene apropiada de las manos (185). Aunque los porcentajes varían de un estudio a otro, múltiples trabajos reportan a *C. parapsilosis* como la levadura más comúnmente aislada a partir de las manos de trabajadores del área médica (18, 163).

1.5 Espectro clínico de la candidosis

C. parapsilosis es un patógeno oportunista importante, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, el cual abarca desde infecciones superficiales, las cuales afectan principalmente lecho ungueal de uñas, folículos e incluso oído medio, hasta infecciones sistémicas, que pueden llegar a comprometer de manera importante la vida del paciente. Eventualmente se han reportado casos esporádicos de peritonitis, endoftalmítis, trastornos articulares, pancreatitis y meningitis debidos a *C. parapsilosis*, sin embargo estos son poco frecuentes en la práctica clínica (189).

1.5.1 Infecciones superficiales

C. parapsilosis frecuentemente es responsable de lesiones patológicas en uñas y piel, con onicomicosis de tipo subungueal distal (47, 59, 119, 146, 168, 178). Dentro de los factores de riesgo significativamente asociados con colonización en pacientes se encuentran: inmunosupresión, antibioticoterapia prolongada, nutrición parenteral,

alargadas estancias hospitalarias, cirugía, así como la utilización de dispositivos médicos, diabetes mellitus y obesidad (15, 52, 59, 86).

1.5.2 Infecciones en mucosa

La principal mucositis debida a *C. parapsilosis* es la vulvovaginitis (189). Después de la vaginosis bacteriana, la candidosis vaginal es la segunda infección vaginal más común en los Estados Unidos (171) y *C. albicans* se encuentra asociada con el 85 al 95% de los casos. Sin embargo, recientemente hubo un incremento en el número de casos de vulvovaginitis debida a especies de *C. no-albicans*, particularmente *C. parapsilosis*, lo cual se asoció principalmente al uso indiscriminado de derivados azólicos tanto orales como de aplicación tópica (123, 152, 171-172).

El papel de *C. parapsilosis* como un patógeno vaginal y su relevancia como agente causal de vulvovaginitis normalmente tiende a ser cuestionable, particularmente por su papel como levadura comensal (123, 152). Sin embargo, las cepas vaginopáticas se caracterizan por una mayor secreción de proteinasas aspárticas (3), lo cual conlleva una importante implicación clínica, ya que las Saps pueden comprometer especialmente la integridad normal de la vagina por hidrólisis de la inmunoglobulina A de la mucosa (46), una de las más efectivas barreras vaginales contra la infección.

1.5.3 Infecciones del tracto urinario

Las infecciones urinarias originadas por *C. parapsilosis* no son frecuentes (185). Sin embargo, han aumentado notablemente en los últimos años y se encuentran asociadas principalmente con la utilización de sistemas de drenaje urinario (29, 133,

179). La adherencia del organismo a la superficie de los mismos es un factor determinante en la colonización e infección (179).

1.5.4 Infecciones sistémicas

C. parapsilosis se encuentra entre las especies de *Candida* causales más comunes de enfermedad invasiva en todo el mundo, asociada a una tasa de mortalidad promedio cercana al 30% (185). Las enfermedades subyacentes que predisponen a la infección son: cáncer (162), anormalidades hematológicas, trasplantes y trastornos crónico-degenerativos, particularmente la diabetes mellitus. Comparada con *C. albicans*, *C. parapsilosis* es aislada con mayor frecuencia de neonatos, pacientes con catéteres intravasculares, individuos que estén recibiendo nutrición parenteral y trasplantados (185).

1.5.5 Endocarditis

Entre las endocarditis relacionadas con levaduras, *C. parapsilosis* es la especie no-*albicans* más comúnmente aislada (67, 92). Los factores de predisposición más relevantes son: la utilización de válvulas prostéticas, el consumo de drogas intravenosas, nutrición parenteral, antibioticoterapia prolongada, enfermedad preexistente de válvulas cardíacas, episodios previos de endocarditis y cirugía cardiovascular reconstructiva (23, 67, 92, 157, 164, 183, 194).

El tejido cardíaco más comúnmente afectado es la válvula aórtica (56.9%), seguida de la válvula mitral (29.1%), válvula tricúspide (4.1%), pared ventricular (2.8%) y válvula pulmonar (1.4%), principalmente (67). El rango de mortalidad comprende del

42 (64) al 65% (194). Las complicaciones más comunes de endocarditis por *C. parapsilosis* son embolia periférica y eventos hemorrágicos (44%) (67).

1.5.6 Peritonitis

La peritonitis fúngica se asocia a una seria morbilidad y posee una tasa de mortalidad por encima del 44% (192), se trata de una complicación poco común pero potencialmente fatal de la diálisis peritoneal ambulatoria continua (5, 24, 40-41, 88-89) y *C. parapsilosis* se convirtió en los últimos años en el patógeno etiológico más prevalente de dicha entidad clínica (41), este organismo posee la habilidad, bajo elevadas concentraciones de glucosa, de adherirse fácilmente a material prostético por formación extensiva de biopelícula en la superficie de catéteres plásticos (189). El elevado contenido de glucosa del dializado y la implantación del catéter constituyen importantes factores que predisponen a pacientes de diálisis peritoneal a peritonitis fúngica debida a *C. parapsilosis* (41).

1.5.7 Endoftalmitis

C. parapsilosis se encuentra infrecuentemente vinculada con enfermedades oculares invasivas. Sin embargo, se cuenta con escasos reportes de endoftalmitis, particularmente infección post-operatoria, y queratitis (185). La endoftalmitis causada por *C. parapsilosis* ha sido relacionada con extracción quirúrgica de catarata, trasplante de córnea, implantación de lentes intraoculares y tratamiento con esteroides (70, 154, 177).

1.5.8 Enfermedades articulares

La artritis fúngica es poco frecuente y comúnmente asociada a *Candida* spp. (185), siendo particularmente habitual entre consumidores de droga intravenosa (190). La artritis causada por *C. parapsilosis* se encuentra asociada principalmente con prótesis articulares, probablemente debido a la habilidad del organismo para adherirse al plástico (26, 36, 79, 191), así como también a la inoculación directa del hongo en procedimientos de artrocentesis (35). La artritis fúngica es esporádica en individuos de edad avanzada y dentro de los factores de predisposición se encuentran: diabetes mellitus, utilización de drogas intravenosas, así como inmunosupresión (35).

1.5.9 Pancreatitis

La pancreatitis fúngica debida a *C. no-albicans* ha incrementado su incidencia en los últimos años y es atribuible a diversos factores, entre los que destacan: el uso de antibióticos de amplio espectro, nutrición parenteral, así como el uso de agentes inmunosupresores (153). Sólo unos pocos casos de infecciones pancreáticas (necrosis pancreática infectada y abscesos pancreáticos) ocasionadas por *C. parapsilosis* han sido descritas (84, 101).

1.5.10 Meningitis

Las infecciones fúngicas del sistema nervioso central conllevan riesgos serios y potencialmente fatídicos y pueden ser causadas por una amplia gama de hongos (185), siendo las especies del género *Candida* las típicamente relacionadas con cuadros clínicos de meningitis neutrofilica aguda (37). *C. parapsilosis* es un agente poco frecuente de

meningitis fúngica (185). La cirugía, terapia antibiótica, nutrición parenteral, foliculitis cutánea y el uso de catéteres intravasculares e intraventriculares constituyen importantes factores de riesgo para adquirir la enfermedad (83, 87, 194).

1.6 Diagnóstico de laboratorio

Para llevar a cabo la identificación de *C. parapsilosis* en el laboratorio de diagnóstico clínico se cuenta con diversos métodos microbiológicos convencionales, cuyos criterios de identificación requieren un enfoque similar a la identificación bacteriana debido a que las morfologías macroscópica y microscópica de las levaduras son muy homogéneas, por lo que un limitado número de pruebas morfológicas son importantes para la identificación de estos organismos.

1.6.1 Métodos microbiológicos convencionales

La caracterización rigurosa de levaduras se efectúa principalmente por sus características fisiológicas o bioquímicas, mediante la utilización de ciertos métodos, los cuales se pueden clasificar de manera general, por una parte en sistemas de identificación manual, siendo el sistema API 20C AUX el más importante y por otro lado, en sistemas de identificación automatizada, de entre los que destacan: MicroScan y Vitek (186).

1.6.1.1 API 20C AUX. El sistema API 20C AUX de la compañía bioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia) es un micrométodo de asimilación de carbohidratos

especialmente diseñado para la identificación de levaduras de relevancia clínica. Como se muestra en la Figura 6, el sistema consiste en una galería de 20 microcúpulas, 19 de las cuales poseen diferentes carbohidratos y un testigo, que carece de carbohidrato. El sistema se basa en la capacidad del organismo para asimilar diferencialmente los distintos carbohidratos, generándose así un perfil bioquímico característico, distintivo del organismo en estudio. Una suspensión de la levadura joven (24 h de incubación), preparada en solución salina y ajustada a una turbidez conocida es transferida a un medio especial de enriquecimiento, del cual se tomará para hidratar las microcúpulas de la galería, la cual se incuba posteriormente a 30°C por 24 a 72 h. Todas las reacciones son comparadas contra el testigo y los resultados son leídos y convertidos a un biotipo numérico de seis dígitos con el cual es posible llevar a cabo la identificación manual (tabla de códigos) o electrónicamente (base de datos).



Figura 6. Galería API 20C AUX (186).

Este sistema para la identificación de levaduras se considera como uno de los más utilizados en los laboratorios de diagnóstico y es quizá el más ampliamente evaluado y publicado de todos los sistemas comerciales actualmente disponibles en el mercado, por lo que frecuentemente se le considera como el “estándar de oro” contra el cual se hacen comparaciones frente a la implementación de nuevos sistemas de identificación (186).

1.6.1.2 MicroScan. El sistema MicroScan de la compañía Dade Behring (West Sacramento, CA, E.U.A.) se encuentra compuesto de pruebas cromogénicas, así como de ensayos convencionales modificados para la identificación de hongos levaduriformes a partir de muestras clínicas (186). Se trata de una placa de 96 pocillos, los cuales contienen 27 distintos sustratos cromogénicos deshidratados. Una suspensión de la levadura joven, preparada en agua y ajustada a una turbidez conocida es posteriormente utilizada para hidratar los pocillos de las placas, y se incuba a 35 – 37°C por 4 h. Las lecturas cromogénicas pueden efectuarse de manera visual o automatizada (Autoscan). La interpretación de los perfiles bioquímicos tiene lugar transformando los resultados obtenidos en un biotipo numérico de 9 dígitos, el cual es comparado frente a una base de datos, o bien una tabla de códigos para llevar a cabo la identificación.

1.6.1.3 Vitek. El sistema Vitek de la compañía bioMérieux (Durham, NC, E.U.A.) utiliza una tarjeta compuesta de varias celdillas con sustratos deshidratados para una amplia gama de pruebas bioquímicas (186). Se prepara una suspensión de la levadura joven en agua estéril, los tubos se colocan hasta la marca del sello de la tarjeta, para que posteriormente, por vacío, sea succionada la muestra dentro de la tarjeta a través de un conducto estéril. La unidad de lectura-incubación mantiene un ambiente controlado mientras las tarjetas se incuban, este sistema rota las tarjetas, permitiendo con ello que las lecturas puedan ser efectuadas por una unidad láser y el fotodetector. Los resultados obtenidos son analizados en el equipo por comparación frente a su base de datos antes de arrojar la identificación del organismo en estudio.

1.6.2 Ensayos moleculares

Debido a la elevada variabilidad genética inherente en *C. parapsilosis*, los métodos microbiológicos convencionales no son de gran utilidad, motivo por el cual cada vez más se recurre a diversas herramientas moleculares, las cuales permiten identificar de manera precisa a nivel de especie este complejo de organismos, entre los principales ensayos moleculares destacan: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), la tecnología del ADN polimórfico aleatoriamente amplificado (RAPD), análisis de secuencias multilocus (MLST), así como la secuenciación de ciertos genes, como: el gen de la deshidrogenasa alcohólica secundaria (*SADH*) y los espaciadores transcripcionales internos ITS1-ITS2.

1.7 Tratamiento y susceptibilidad antifúngica

Actualmente no hay consenso respecto al tratamiento de la enfermedad invasiva originada por *C. parapsilosis*, aunque el manejo terapéutico habitualmente incluye la extracción de cualquier cuerpo extraño removible, así como la administración de antifúngicos sistémicos (185), entre los que se encuentran: anfotericina B, ciertos compuestos azólicos, flucitosina y las equinocandinas.

1.7.1 Anfotericina B

Históricamente, la anfotericina B ha sido el antifúngico poliénico mayormente utilizado. Sin embargo, la administración de éste fármaco puede complicarse con

nefrotoxicidad, requiriendo necesariamente un ajuste en la dosis del fármaco o la suspensión de la terapia (117). El riesgo significativo de toxicidad, especialmente en pacientes con falla renal (10) llevó al desarrollo de formulaciones lipídicas del fármaco, las cuales poseen efectividad similar con una reducción en sus efectos tóxicos (2, 107, 126). Se han publicado diversos reportes de casos individuales que documentan resistencia a anfotericina B en cepas infectantes (187, 198), así como también estudios que reportan una resistencia *in vitro* de *C. parapsilosis* a anfotericina B en una tasa del 2 al 3% (128). Los valores promedio de CMI_{50%} y CMI_{90%} documentados para *C. parapsilosis* son de 0.13 a 1 µg/mL y de 0.5 a 1 µg/mL, respectivamente (60, 99, 111, 114, 128, 144). Por tanto, aunque se ha presentado resistencia en cepas individuales de *C. parapsilosis* durante el tratamiento, el principal problema de la terapia convencional con anfotericina B radica en su baja solubilidad en agua y por ende, en su toxicidad (54).

1.7.2 Fluconazol

El fluconazol es comúnmente administrado como alternativa a la anfotericina B y aunque es altamente efectivo para el tratamiento de candidosis sistémica, hay reportes de resistencia *in vitro* entre especies de *C. no-albicans*, especialmente *C. glabrata* y *C. krusei* (60, 147, 184). Ensayos de susceptibilidad *in vitro* revelaron un índice de resistencia del 0 al 4.6% (6, 128, 141, 145, 147), con valores promedio de CMI_{50%} y CMI_{90%} de 0.5 a 1 µg/mL y de 1 a 2 µg/mL, respectivamente (60, 99, 111, 114, 128, 144).

1.7.3 Otros azoles

Se reportó resistencia *in vitro* a itraconazol en aislamientos de *C. parapsilosis*, con un índice del 1.5 (6) al 4% (128). Por otra parte, voriconazol presenta valores más bajos de CMI_{50%} ($\leq 0.03 \mu\text{g/mL}$) y CMI_{90%} (≤ 0.03 a $0.12 \mu\text{g/mL}$) con respecto a la anfotericina B y azoles viejos usualmente utilizados contra *C. parapsilosis* (60, 110-111, 115, 128, 147). La resistencia *in vitro* a voriconazol es rara, con reportes tempranos que muestran un 100% de susceptibilidad (143). Recientemente, un análisis de 9, 371 aislamientos de *C. parapsilosis* mostró que sólo el 1.9% fue resistente a voriconazol y que el 36.7% de los aislamientos resistentes a fluconazol fueron susceptibles a voriconazol (141), quedando de manifiesto la resistencia cruzada entre los compuestos azólicos. Adicionalmente, se reportó resistencia a voriconazol entre cepas clínicas previamente expuestas a fluconazol (118) y se identificaron cepas causantes de brotes nosocomiales con susceptibilidades reducidas a fluconazol y voriconazol (31).

1.7.4 Flucitosina

Aunque actualmente ya no es muy utilizada, la flucitosina o 5-fluorocitosina (5-FC) se administra en combinación con anfotericina B o azoles, especialmente en el manejo de la meningitis por *Candida* spp. (56, 170). La monoterapia se encuentra contraindicada debido al riesgo de surgimiento de resistencia, particularmente durante administración prolongada como en el caso de endocarditis (81). Aunque un estudio publicado en 1975 reportó tasas de resistencia *in vitro* del 23% para *C. parapsilosis*, publicaciones recientes reportan tasas de resistencia a flucitosina del 2 al 6.4% (128, 149).

1.7.5 Equinocandinas

Las equinocandinas son una nueva línea de agentes antifúngicos e incluyen la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina. Estos fármacos interfieren en la síntesis de la pared celular por inhibición no competitiva de la β -1,3-D-glucano sintetasa, una enzima que genera polímeros de glucano, el principal componente de la pared celular fúngica (185). La caspofungina posee una potente actividad antifúngica y ha mostrado ser tan efectiva y de menor toxicidad que la anfotericina B en el tratamiento de la candidosis invasiva causada por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* y *C. rugosa* (116, 175). Sin embargo, las CMI's de caspofungina para *C. parapsilosis* son altas en comparación de otras especies de *Candida*, con valores promedio de CMI_{50%} y CMI_{90%} comprendidos entre 0.85 a 2 $\mu\text{g/mL}$ y 2 a 2.33 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (11-12, 60, 99, 128). Esta tendencia en susceptibilidad de *C. parapsilosis* se extiende también a otras equinocandinas. Por ejemplo, micafungina posee una CMI_{50%} promedio de 1 $\mu\text{g/mL}$ y una CMI_{90%} promedio ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis* (103, 128), mientras que anidulafungina tiene una CMI_{50%} promedio de 2 $\mu\text{g/mL}$ y una CMI_{90%} promedio ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ (111, 128, 137).

Aunque el origen de la resistencia de *C. parapsilosis* a las equinocandinas aún no se encuentra claramente comprendido, se hipotetiza que puede ocurrir debido a cambios en la subunidad Fks1 de la glucano sintetasa (132, 151). El complejo *C. parapsilosis* posee frecuentemente un polimorfismo que resulta en la sustitución de una alanina en la posición 660 por una prolina conservada, presente en la subunidad Fsk1 de otros hongos (66). La cadena respiratoria mitocondrial única de *C. parapsilosis* podría jugar también un papel importante para su baja susceptibilidad a las equinocandinas, como lo demostró

Chamilos y cols. (39) en un estudio publicado en 2006 donde observaron un decremento en la CMI de caspofungina después de una inhibición simultánea de todas las vías respiratorias del organismo.

1.8 Variabilidad genética de *C. parapsilosis*

En 1987, Scherer y Stevens (167) establecieron que los métodos moleculares de identificación microbiana ofrecían ventajas potencialmente importantes por encima de los métodos microbiológicos convencionales, motivo por el cual propusieron la aplicación de la técnica RFLP para el análisis de 19 aislamientos clínicos identificados convencionalmente por medio del sistema API 20C AUX como *C. parapsilosis*. En este estudio se descubrieron tres distintos patrones de restricción no reportados previamente en la literatura, con lo cual se sugirió que *C. parapsilosis* poseía una elevada variabilidad genética, mayor incluso que la reportada hasta entonces para *C. albicans* y *C. tropicalis*. Posteriormente, en 1992, Lehmann y cols. (104) utilizando RAPD para el estudio de 8 aislamientos clínicos identificados de manera convencional con sistemas API 20C AUX como *C. parapsilosis*, encontraron tres distintos patrones, los cuales fueron clasificados dentro de tres grupos diferentes bajo la misma especie *parapsilosis* (*C. parapsilosis* grupo I, *C. parapsilosis* grupo II y *C. parapsilosis* grupo III). En el estudio se concluyó que había al menos tres “especies” fenotípicamente indistinguibles caracterizadas como *C. parapsilosis* cuando ésta levadura era identificada por medio de procedimientos microbiológicos convencionales.

Por su parte, en 1995 Lin y cols. (106) basados en perfiles de actividad enzimática, particularmente de las enzimas: estearasa, superóxido dismutasa y glucosa-

6-fosfato deshidrogenasa, además de la secuenciación del ITS1; y Roy y Meyer (156) en 1998, apoyados en estudios de homología del ADN y patrones de restricción, confirmaron la existencia de tres distintos genotipos de *C. parapsilosis* pobremente relacionados a nivel de especie, apoyando con esto su división temprana en tres especies separadas, independientes filogenéticamente una de la otra.

Encontrando ya de manifiesto la heterogeneidad genética existente en *C. parapsilosis*, en 2004, Rycovska y cols. (160) estudiaron la variabilidad polimórfica del ADN mitocondrial entre los distintos grupos del complejo *C. parapsilosis*, encontrando que dicho genoma se componía de una secuencia génica semejante en los tres grupos de *C. parapsilosis*, pero poseía además importantes modificaciones en la arquitectura molecular particular de cada grupo. Los investigadores descubrieron que el ADN mitocondrial de *C. parapsilosis* grupo I y *C. parapsilosis* grupo III era linearizado y presentaba en sus extremos telómeros mitocondriales de 738 pb en el grupo I y 620 pb en el grupo III. Por otro lado, *C. parapsilosis* grupo II poseía ADN mitocondrial circularizado de un tamaño aproximado a las 23 kilobases. Estos hallazgos permitieron la caracterización de los tres grupos de *C. parapsilosis*, por lo que el análisis de perfiles de ADN mitocondrial vino a representar una poderosa herramienta molecular con aplicaciones potenciales en la genotipificación de *C. parapsilosis*.

Finalmente, en 2005 Tavanti y cols. (180) tras analizar 32 aislamientos clínicos identificados convencionalmente con sistemas API-20C AUX como *C. parapsilosis* con diversas técnicas moleculares tales como RAPD, MLST, RFLP (con la amplificación del gen *SADH* y su posterior digestión con *BanI*) y secuenciación de los ITS's, encontraron que tras comparar la secuencia del ITS1 de los tres grupos de *C. parapsilosis* con la de

otras 15 distintas especies de *Candida* y *Saccharomyces cerevisiae*, *C. parapsilosis* grupo II y *C. parapsilosis* grupo III se encuentran más relacionadas filogenéticamente con respecto a *C. parapsilosis* grupo I y que la distancia filogenética que separa a *C. dubliniensis* de *C. albicans* es la misma que separa los tres grupos de *C. parapsilosis*. Motivo por el cual fue necesaria una re-estructuración del complejo *C. parapsilosis*, para lo cual los investigadores propusieron que todos los organismos anteriormente conocidos como *C. parapsilosis* grupo I se designen únicamente como *C. parapsilosis* en sentido estricto y propusieron la creación de dos nuevas especies: *Candida orthopsilosis*, para designar a aquellos organismos anteriormente conocidos como *C. parapsilosis* grupo II y *Candida metapsilosis*, para designar a aquellos organismos conocidos con anterioridad como *C. parapsilosis* grupo III. Dichos nombres asignados fueron irónicamente elegidos por la manera en la cual los prefijos “ortho”, que originalmente significaba “derecho” o “correcto” y “meta”, “con” o “después”, han sido utilizados por los químicos, junto con “para” para denotar las diferentes posiciones que pueden tomar diversas funciones químicas en un anillo aromático (180).

También en 2005, Iida y cols. (85) reportaron haber encontrado en cinco aislamientos clínicos procedentes de Brasil secuencias de la región ITS diferentes a lo reportado hasta entonces, por lo que sugirieron la presencia de un genotipo distinto y de esta manera, propusieron un nuevo grupo genético (IV) dentro del complejo *C. parapsilosis*. Los porcentajes de homología en la región ITS1 del grupo propuesto con respecto al grupo I, II y III fueron del 87.4%, 94.7% y 87.3%, respectivamente.

Desde que *C. parapsilosis* se reestructuró como un complejo de especies, se han implementado diversas metodologías de identificación molecular, basadas

principalmente en RFLP (7, 180), secuenciación de la región no codificante ITS (21, 72), perfiles de ADN mitocondrial (122) y la utilización de marcadores microsatelitales (161). Por otro lado, el método de AFLP también se ha utilizado no sólo para confirmar la identificación de especie, sino también para evaluar la relación genética de *C. parapsilosis* (182), *C. orthopsilosis* (181) y *C. metapsilosis* (80). Sin embargo, pese a su elevada sensibilidad y robustez todas estas técnicas consumen mucho tiempo, haciéndolas poco prácticas y difícilmente adaptables a la rutina actual de diagnóstico clínico, por lo que en 2008 se desarrolló una PCR en tiempo-real con análisis de temperatura *melting* con la finalidad de identificar 6 especies clínicamente relevantes de *Candida*, incluyendo *C. parapsilosis* (93). Sin embargo, esta técnica no se optimizó para permitir la identificación precisa a nivel de especie del complejo *C. parapsilosis*, razón por el cual en 2010, Hays y cols. (78) desarrollaron una prueba rápida utilizando la misma técnica molecular, capaz de discriminar mediante análisis de curvas *melting* las tres especies estrechamente relacionadas del complejo, por lo que este nuevo enfoque podría resultar muy útil para futuras investigaciones clínicas y epidemiológicas.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La candidosis es la micosis oportunista de mayor incidencia a nivel mundial, representando un importante problema de salud pública y siendo *C. parapsilosis* una de las especies *no-albicans* más frecuentemente responsable de cuadros fungémicos en varias partes del mundo, incluida Latinoamérica. Recientemente, y con base en hallazgos moleculares, se ha demostrado que *C. parapsilosis* es un complejo, el cual requiere la identificación precisa de sus especies. En México, se carece de información referente a la incidencia, distribución y perfiles de susceptibilidad antifúngica de las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis*, motivo por el cual es imperativa la necesidad de estudiar el comportamiento epidemiológico de las mismas en nuestro país.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar con base en pruebas moleculares aislamientos clínicos previamente tipificados de manera convencional como *C. parapsilosis*, así como caracterizarlos en base a sus perfiles de susceptibilidad antifúngica.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar, mediante métodos moleculares, aislamientos clínicos previamente identificados de manera convencional como *C. parapsilosis*.
2. Determinar los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos clínicos frente a distintos antifúngicos.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

Para dar cumplimiento al objetivo del trabajo se estableció la siguiente estrategia general: a partir de una colección de 344 aislamientos de origen clínico identificados convencionalmente como *C. parapsilosis* mediante el sistema API 20C AUX y sometidos a reactivación metabólica, se llevó a cabo su genotipificación mediante la técnica molecular RFLP para su identificación precisa a nivel de especie. Para lo cual se obtuvo el ADN de los aislamientos mediante el método de lisis térmica, se amplificó el gen *SADH* y el producto obtenido se sometió a digestión enzimática con la enzima de restricción *BanI*. Adicionalmente, los aislamientos también se caracterizaron fenotípicamente en base a sus perfiles de susceptibilidad frente a los antifúngicos: fluconazol, caspofungina, anidulafungina y micafungina.

4.2 Aislamientos del complejo *C. parapsilosis*

Se analizaron 344 aislamientos del complejo *C. parapsilosis*, las cepas fueron recolectadas de 1999 a 2010 y enviadas al Laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología Médica de

la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los aislamientos fueron identificados convencionalmente mediante la utilización del sistema API 20C AUX y se mantuvieron en suspensión en agua estéril para su almacenamiento a temperatura ambiente hasta su utilización.

Todos los aislamientos analizados fueron de procedencia clínica, 197 hemocultivos (109 pediátricos), 29 aislamientos procedentes de cavidades estériles (17 de orina, 7 de líquido peritoneal, 2 de lavado bronquio-alveolar, 1 de líquido cefalorraquídeo, 1 de bilis y 1 de secreción ótica) y 118 de infecciones superficiales (54 de uñas, 52 de piel y 12 de mucosas).

4.3 Identificación molecular

Para la identificación precisa a nivel de especie de los aislamientos, se utilizó la técnica molecular RFLP. En la Figura 7 se presenta la metodología que se siguió para la identificación molecular.

4.3.1 Obtención del ADN

Para llevar a cabo la obtención del material genético de los aislamientos, éstos se sembraron en placas de agar papa-dextrosa (APD), las cuales se incubaron (Incubadora American Gold Series, modelo IS-81) a 37°C por espacio de 24 h, posterior a esto las células se sometieron a un proceso de lisis térmica, dicho proceso consistió en ajustar una suspensión celular de los aislamientos a una turbidez equiparable con el tubo número 1 del nefelómetro de McFarland (equivalente a 3×10^8 células/mL),

posteriormente se tomó 1 mL de la suspensión y se centrifugó por 5 minutos a 14, 000 r.p.m. (Centrífuga Labnet, modelo Hermle Z 233 MK-2), a continuación se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el paquete celular en 100 µL de agua destilada estéril. Finalmente, la suspensión se sometió a ebullición llevándola a 100°C por 10 min (Baño de agua LAB-LINE, modelo Imperial IV), se centrifugó por 5 minutos a 14, 000 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante. Los lisados celulares obtenidos se almacenaron en congelación a -20°C (Congelador SANYO Biomedical Freezer) hasta su utilización.

4.3.2 Evaluación de la funcionalidad del ADN

La funcionalidad del ADN obtenido se evaluó mediante la amplificación del fragmento génico que comprende el espaciador transcripcional interno 1 (ITS1), el gen ribosomal 5.8S y el espaciador transcripcional interno 2 (ITS2), utilizando los iniciadores previamente reportados en 1990 por White y cols. (197). Los iniciadores fueron sintetizados por la compañía Bioselec, S.A. de C.V. y sus secuencias son: ITS5 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'. A partir de los stocks ajustados a 50 pMol/µL se efectuaron diluciones 1:10 con agua estéril grado biología molecular (Mediatech, Inc., Manassas, VA, E.U.A.) para utilizarse posteriormente como soluciones de trabajo.

Las condiciones de amplificación de la PCR punto final utilizada fueron las siguientes: 1 ciclo de 4 min a 95°C para la desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1.30 min y extensión a 72°C por 1.30 min. La extensión final fue a 72°C por 5 min (Termocicladores: "PCR Sprint", Hybaid y PxE 0.2 Thermal Cycler, Thermo Electron

Corporation). Por otro lado, la mezcla de reacción de volumen final de 25 μ L estuvo conformada como sigue: 5 μ L de lisado celular, buffer de reacción NH_4 pH 8.8 (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.), compuesto de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16 mM, Tris-HCl 67 mM y Tween-20 0.01%, MgCl_2 2 mM (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.), dNTP's 0.8 mM (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.), 0.2 pMol/ μ L de cada iniciador, albúmina sérica bovina 0.02% (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japón) y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.).

Posteriormente, y con la finalidad de verificar la presencia del amplicón esperado, de aproximadamente 500 a 600 pb, se montó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.5% (Cámara de electroforesis Thermo Maxicel Primo EC 340), el gel se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/mL) y finalmente se reveló en un transiluminador UV (Fotodocumentador UVP Bioluming Systems. EpiChemi 3 Darkroom).

4.3.3 Amplificación del gen *SADH*

El ADN obtenido se empleó como templado para la amplificación del gen *SADH* mediante la utilización de los iniciadores reportados previamente en 2005 por Tavanti y cols. (180). Los iniciadores se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y sus secuencias son las siguientes: *SADH*-Forward 5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' y *SADH*-Reverse 5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3'. La concentración de ambos iniciadores se ajustó a 50 pMol/ μ L (stocks), a partir de la cual se efectuaron diluciones 1:10 con agua estéril grado biología molecular para utilizarse posteriormente como soluciones de trabajo.

Se estandarizó una PCR de punto final, cuyas condiciones óptimas de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 3 min a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. La extensión final fue a 72°C por 5 min. Por otra parte, las condiciones estandarizadas de la mezcla de reacción de volumen final de 25 µL fueron las siguientes: 7.5 µL de lisado celular, buffer de reacción NH₄ pH 8.8 (Bioline, USA Inc., Boston, MA, E.U.A.), compuesto de: (NH₄)₂SO₄ 16 mM, Tris-HCl 67 mM y Tween-20 0.01%, MgCl₂ 6 mM, dNTP's 0.8 mM, 0.35 pMol/µL de cada iniciador, albúmina sérica bovina 0.03% y 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa.

Finalmente, se montó una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (2 µg/mL), con la finalidad de verificar, tras observar el gel a través de un transiluminador UV, la presencia del amplicón esperado, de aproximadamente 716 pb.

4.3.4 Digestión enzimática de los productos de PCR

Después de la amplificación del gen *SADH*, el siguiente paso para la identificación molecular de los aislamientos es la digestión enzimática de los productos de PCR con la enzima de restricción *BanI*. Las condiciones utilizadas de la mezcla de digestión de volumen final de 20 µL fueron las siguientes: 16.8 µL de producto de PCR, buffer NE 4 pH 7.9 (New England *BioLabs* Inc., Country Road, Ipswich, MA, E.U.A.), compuesto de: acetato de potasio 55 mM, acetato de Tris 22 mM, acetato de magnesio 11 mM y ditiotreitól 1.1 mM, albúmina sérica bovina 1.1 mg/mL (New England *BioLabs* Inc., Country Road, Ipswich, MA, E.U.A.) y 10 U de *BanI* (New England

BioLabs Inc., Country Road, Ipswich, MA, E.U.A.). Las digestiones se incubaron por toda una noche a 37°C.

Por último, los fragmentos de restricción generados se separaron en base a su relación masa-carga mediante una electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2.5%, el gel se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/mL) y finalmente se reveló en un transiluminador UV.

Como se muestra en la Figura 8, está reportado que *C. parapsilosis* se identifica por un patrón de restricción compuesto de una banda cercana a las 521 pb y otra más de 196 pb, mientras que *C. metapsilosis* presenta un patrón integrado por 4 bandas cuyos tamaños comprenden desde los 370 pb hasta los 60 pb (370, 188, 93 y 60 pb); por otro lado, *C. orthopsilosis* no posee sitios de escisión para *BanI*, por lo que en el gel únicamente se observará el producto amplificado originalmente. Se utilizaron como controles de calidad las cepas: *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139 y *C. metapsilosis* ATCC 96144.

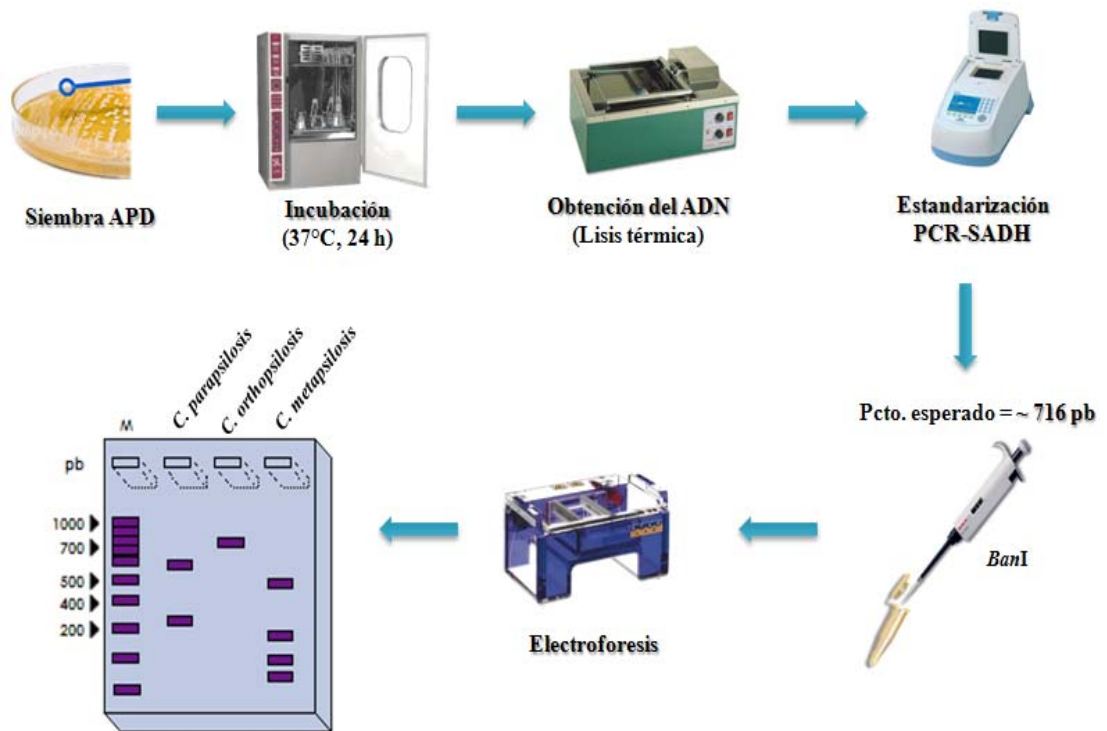


Figura 7. Metodología para la identificación molecular.

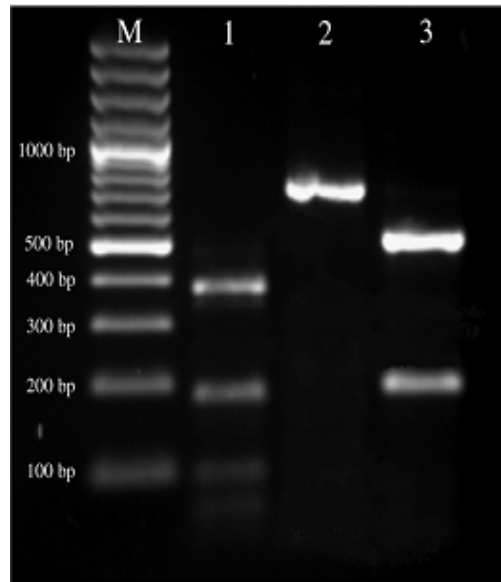


Figura 8. Patrones de restricción del gen *SADH* característicos de las especies del complejo *C. parapsilosis* (169). Carril 1: *C. metapsilosis* ATCC 96144, carril 2: *C. orthopsilosis* ATCC 96139, carril 3: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.

4.4 Susceptibilidad antifúngica *in vitro*

Los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* se efectuaron utilizando el método de macrodilución en tubo, de acuerdo con los lineamientos estipulados en el documento M27-A3 del CLSI de los Estados Unidos de América (28). En la Figura 9 se esquematiza la metodología seguida para las pruebas de susceptibilidad antifúngica.

4.4.1 Agentes antifúngicos

Los fármacos antifúngicos utilizados en el trabajo fueron obtenidos de sus respectivas compañías farmacéuticas, siendo los siguientes: fluconazol (Diflucan®);

Pfizer, Amboise, Cedex, Francia), caspofungina (Cancidas[®]; Merck & Co, Inc., Whitehouse Station, N.J., E.U.A.), anidulafungina (Equaltha[®]; Ben Venve Laboratories, Inc., Northfield Road Bedford, OH, E.U.A.) y micafungina (Mycamine[®]; Astellas Pharma Inc., Tokio, Japón).

Se efectuó una serie de diluciones de los antifúngicos utilizando agua destilada estéril como disolvente, a excepción de anidulafungina, con la cual se utilizó DMSO al 100% (Merck Schuchardt OHG, Hohenbruun, Alemania). Posteriormente, se colocó 0.1 mL de cada concentración en tubos de poliestireno de 5 mL de fondo redondo con tapón de doble tope estériles, a excepción de anidulafungina, de la cual se dispensaba 0.01 mL. Los tubos se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización. El rango de concentraciones que se manejó para los antifúngicos utilizados fue el siguiente: 0.125-64 µg/mL para el fluconazol y 0.015-8 µg/mL para las tres equinocandinas ensayadas (caspofungina, anidulafungina y micafungina).

4.4.2 Preparación del inóculo

Cada aislamiento se sembró en APD y se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente, se tomaron 5 colonias aisladas de aproximadamente 5 milímetros de diámetro y se suspendieron en solución salina al 0.85% estéril. La concentración de la suspensión celular resultante se ajustó a una transmitancia del 85% \pm 1 (Espectrofotómetro Sequoia-Turner, modelo 340) a una longitud de onda de 530 nm, lo que corresponde a una concentración de inóculo de $1-5 \times 10^6$ células/mL.

4.4.3 Prueba de Macrodilución

Para llevar a cabo el método de macrodilución en tubo, se preparó una dilución 1:100 con solución salina al 0.85% estéril y la suspensión del inóculo previamente ajustado (9.9 mL de solución salina + 0.1 mL del inóculo) y posterior a esta dilución, se realizó una dilución 1:20 con el medio RPMI 1640 (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, E.U.A.) estéril en tubos Falcon estériles de 50 mL (47.5 mL del medio RPMI 1640 + 2.5 mL de la dilución 1:100). Se agregó 0.9 mL de esta dilución a los tubos con las diferentes concentraciones del fármaco, con excepción de anidulafungina, en la cual se adicionó 0.99 mL. Se incluyó un tubo control libre de fármaco, así como un tubo control que contenía sólo inóculo y DMSO al 100%, únicamente en el caso de anidulafungina. Los tubos se incubaron a 37°C y pasadas 24 y 48 h se efectuaron lecturas para el 50% de inhibición del crecimiento microbiano.

La CMI se definió como la concentración más baja de antifúngico que no presentó crecimiento del organismo.

Para el control de calidad se emplearon las cepas: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258. Los límites de las CMI's recomendados para las cepas control en las pruebas de susceptibilidad para los antifúngicos correspondientes se muestran en la Tabla 1 (135).

Tabla 1. Rangos de susceptibilidad establecidos por el CLSI para las cepas control frente al antifúngico fluconazol (método de macrodilución en tubo).

	Cepa control	Fluconazol ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	2.0-8.0
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	16.0-64.0

Se determinó el rango, media geométrica (MG), $\text{CMI}_{50\%}$ y $\text{CMI}_{90\%}$ de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad.

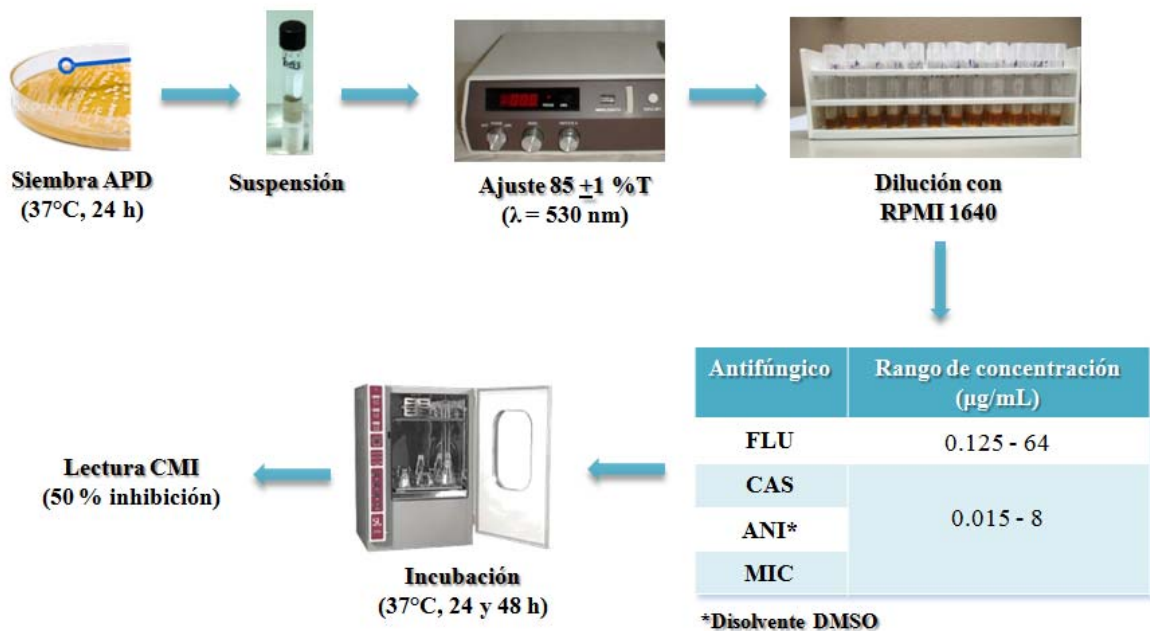


Figura 9. Metodología para los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro*.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Identificación molecular

En la Figura 10 se muestra la imagen de un gel de agarosa al 1.5%, donde se evidencia la amplificación del gen *SADH* de las 3 cepas control utilizadas y 3 aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis*. Por otra parte, en la Figura 11 se observa, en un gel de agarosa al 2.5%, los patrones de restricción generados tras la digestión de los amplicones anteriores con la enzima de restricción *BanI*.

Los resultados obtenidos de la identificación molecular de los aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis* se presentan en la Tabla 2, los datos se encuentran clasificados en base a la procedencia clínica de los aislamientos y a la identificación precisa de los mismos mediante la técnica molecular RFLP. *C. parapsilosis* en sentido estricto fue el organismo más frecuente, siendo particularmente habitual en sangre, piel y uñas; mientras que *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* representaron menos del 10% del total de los aislamientos estudiados y procedieron principalmente de sangre y piel, respectivamente.

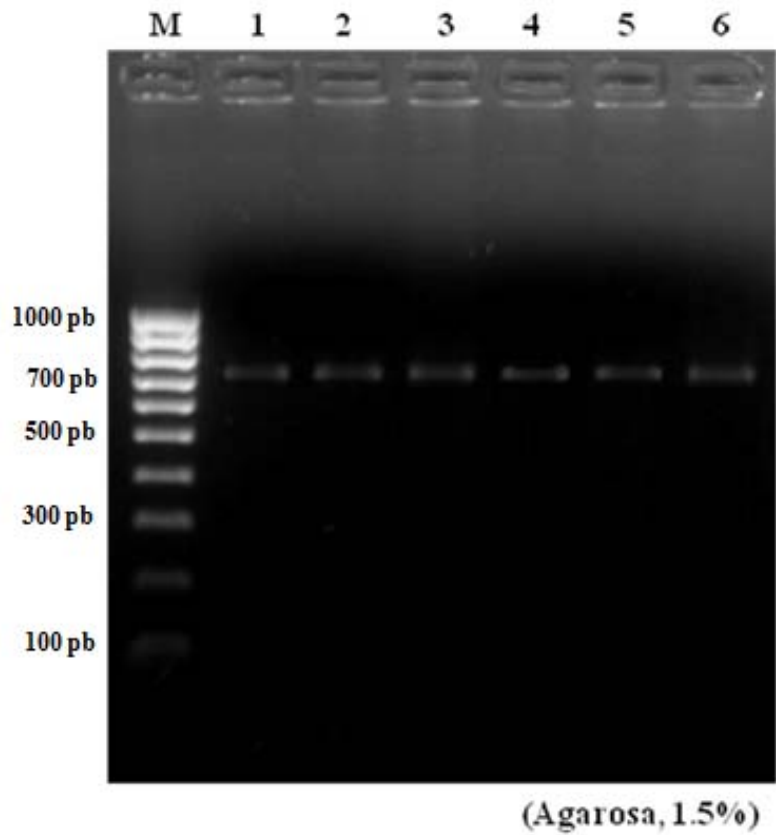


Figura 10. Amplificación del gen *SADH*. Carril 1: *C. parapsilosis* ATCC 22019, carril 2: *C. orthopsilosis* ATCC 96139, carril 3: *C. metapsilosis* ATCC 96144, carriles 4 a 6: aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis* y carril M: marcador de peso molecular de 100 pb (HyperLadder IV, Bioline, MA, E.U.A.).

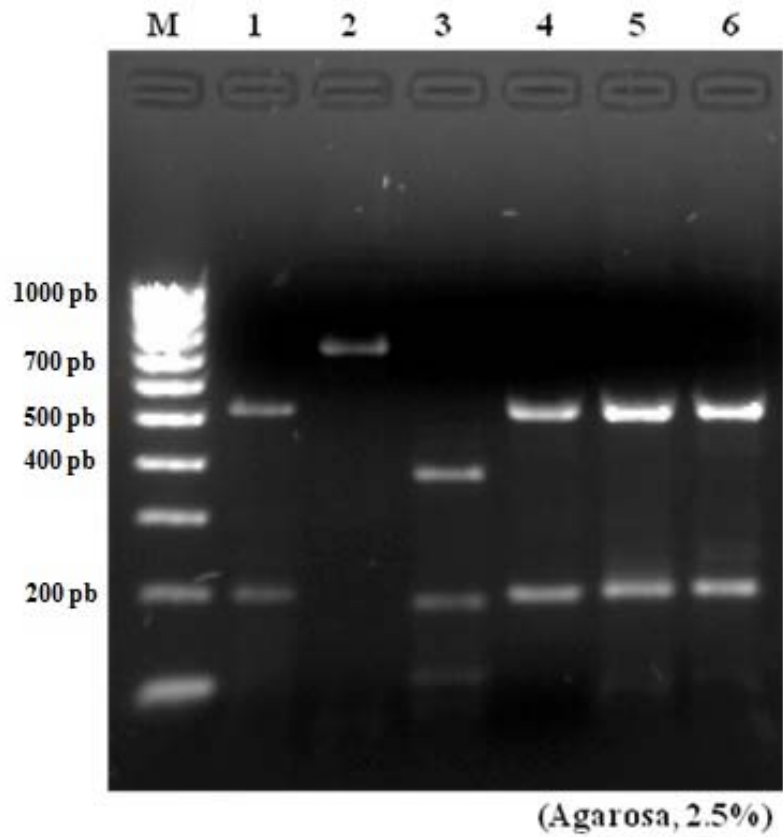


Figura 11. Digestión enzimática del gen *SADH*. Carril 1: *C. parapsilosis* ATCC 22019, carril 2: *C. orthopsilosis* ATCC 96139, carril 3: *C. metapsilosis* ATCC 96144, carriles 4 a 6: aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis* y carril M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Tabla 2. Identificación molecular de los aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis*.

Espécimen clínico	n	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. metapsilosis</i>
Hemocultivos	197	176	20	1
Uñas	54	48	6	0
Tomas de piel	52	50	0	2
Orinas	17	16	1	0
Mucosas	12	11	0	1
Líquidos peritoneales	7	5	2	0
Lavados bronquio-alveolares	2	2	0	0
Líquido cefalorraquídeo	1	1	0	0
Bilis	1	1	0	0
Secreción ótica	1	1	0	0
TOTAL	344	311	29	4

5.2 Susceptibilidad antifúngica *in vitro*

La Tabla 3 concentra los resultados de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los 344 aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis*, analizados por el método de macrodilución en tubo. Los datos se presentan como rango, media geométrica y CMI ($\mu\text{g/mL}$) necesaria para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos ensayados. *C. parapsilosis* en sentido estricto y *C. orthopsilosis* mostraron perfiles de susceptibilidad antifúngica muy semejantes entre sí frente a los fármacos probados. Por otra parte, debido al reducido número encontrado de aislamientos de *C. metapsilosis*, no fue posible establecer patrones de susceptibilidad antifúngica estadísticamente válidos.

Tomando como base que un aislamiento es considerado resistente a fluconazol con una CMI \geq a 64 $\mu\text{g/mL}$ y resistente a cualesquiera de las equinocandinas con una CMI \geq a 8 $\mu\text{g/mL}$, el 10% del total de los aislamientos analizados, todos identificados como *C. parapsilosis* en sentido estricto, presentó resistencia a ciertos antifúngicos. La Tabla 4 reúne los fenotipos de resistencia antifúngica de los aislamientos drogoresistentes, presentados como resistencia única frente a cada una de las cuatro drogas ensayadas y resistencia cruzada a las equinocandinas.

Tabla 3. Susceptibilidad antifúngica *in vitro* de los aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis*.

Organismo (n)	Antifúngico	CMI (µg/mL)			
		Rango	MG ^a	50% ^b	90% ^c
<i>C. parapsilosis</i> (311)	FLU	0.5-64	2.37	2	8
	CAS	0.125-8	0.53	0.5	1
	ANI	0.06-8	1.21	1	2
	MIC	0.06-8	1.22	1	2
<i>C. orthopsilosis</i> (29)	FLU	0.5-32	3.23	4	8
	CAS	0.125-2	0.45	0.5	0.5
	ANI	0.5-2	1.07	1	2
	MIC	0.25-2	0.98	1	2
<i>C. metapsilosis</i> (4)	FLU	2-16	4.76	---	---
	CAS	0.125-0.5	0.25	---	---
	ANI	0.5-1	0.59	---	---
	MIC	0.25-0.5	0.35	---	---

^a Media Geométrica

^b CMI en la cual el 50% de los aislamientos fueron inhibidos

^c CMI en la cual el 90% de los aislamientos fueron inhibidos

Tabla 4. Fenotipos de resistencia antifúngica de los aislamientos drogoresistentes.

Organismo (n Total)	n Aislamientos resistentes (% resistencia)				Resistencia cruzada
	FLU	CAS	ANI	MIC	
<i>C. parapsilosis</i> (311)	9 (2.9%)	2 (0.6%)	12 (3.9%)	7 (2.3%)	4 (1.3%) ^a

^a 3 aislamientos resistentes a ANI y MIC, 1 a CAS y ANI

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

La candidosis es una micosis oportunista importante cuya prevalencia se ha incrementado en los últimos años, debido principalmente al aumento en la población inmunocomprometida. Recientemente, y con base en diversos estudios epidemiológicos, se sabe que ocurrió un cambio importante entre las especies responsables de candidosis, siendo actualmente las especies de *C. no-albicans* los principales agentes etiológicos de dicha entidad clínica en varias partes del mundo (185). En México, específicamente Monterrey, Nuevo León, *C. parapsilosis* es la principal especie causal de candidosis sistémica, asociada a una elevada tasa de morbi-mortalidad, además de una prolongada estancia hospitalaria (74). Por otra parte, evidencias moleculares reconocieron la existencia de tres grupos distintos de *C. parapsilosis* (grupos I, II y III), estudios subsecuentes enfocados en los niveles de heterocigocidad y en las formas lineal y circular del genoma mitocondrial en *C. parapsilosis* apoyaron la existencia de estas distintas especies (160). En 2005, tras un exhaustivo análisis de secuenciación de varios genes, los grupos II y III fueron reclasificados como dos nuevas especies separadas de *C. parapsilosis* y fueron nombradas *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente (180). En años recientes se han hecho descripciones de nuevas especies en algunos otros

hongos antropofílicos patógenos, como por ejemplo: *Pneumocystis carinii* (14), *Coccidioides immitis* (96), *Sporothrix schenckii* (112) y *Pseudallescheria boydii* (71).

En este estudio, después del análisis molecular de una extensa colección de aislamientos clínicos del complejo *C. parapsilosis*, se encontró que el 90.4% correspondió a *C. parapsilosis* en sentido estricto, mientras que el 8.4% y 1.2% correspondieron a *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, respectivamente. Es importante resaltar la relevancia de complementar los métodos bioquímicos convencionales de identificación microbiana con ensayos moleculares como la PCR, ya que estos últimos proveen mayor poder discriminatorio. Los resultados obtenidos proporcionarán conocimiento referente a la distribución local de *C. parapsilosis* en sentido estricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* en Monterrey, Nuevo León, México. Los valores encontrados en este trabajo concuerdan con información reportada por un estudio global de carácter internacional, el cual reportó un 91.3% de aislamientos de *C. parapsilosis* en sentido estricto, 6.1% de aislamientos de *C. orthopsilosis* y 1.8% de aislamientos de *C. metapsilosis* (108).

Este trabajo soporta la suposición de que *C. parapsilosis* en sentido estricto es predominante en aislamientos clínicos, especialmente de pacientes con infección sistémica. De manera interesante, los aislamientos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron obtenidos también a partir de otros especímenes biológicos, tales como uñas, líquido peritoneal, piel y superficies mucosas. La elevada prevalencia de *C. parapsilosis* en sentido estricto puede encontrarse relacionada a su naturaleza ubicua, dado que éste organismo es comúnmente aislado de diversas fuentes ambientales, y eventualmente éstas fuentes pueden representar rutas potenciales para la transmisión nosocomial (95,

105) y/o puede relacionarse a un amplio conjunto de factores de virulencia a comparación de las otras dos especies (47, 65, 159). De hecho, en 2007, Gácsér y cols. (65) publicaron un estudio acerca de la virulencia de las tres recientemente reestructuradas especies del complejo *C. parapsilosis*, particularmente en tejido humano epitelial y epidérmico, encontrando que *C. orthopsilosis* causó un daño tisular similar al originado por *C. parapsilosis*, mientras que *C. metapsilosis* fue la especie menos virulenta. Si bien, se cuenta con información inicial pertinente a la virulencia de estas especies de *Candida* en tejidos humanos reconstituidos, en 2010 Orsi y cols. (127) estudiaron la interacción de estos organismos con células del sistema inmune, empleando un modelo de infección *in vitro* en células de microglia y encontraron que los aislamientos de *C. metapsilosis* fueron más susceptibles a la actividad antifúngica mediada por microglia, que aquellos aislamientos de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*; por lo que, en conjunto, dichos trabajos señalan a *C. metapsilosis* como el miembro menos virulento del complejo *C. parapsilosis*.

Se evaluó la actividad *in vitro* del fluconazol y las equinocandinas: caspofungina, anidulafungina y micafungina contra *C. parapsilosis* en sentido estricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*. El establecimiento de perfiles de susceptibilidad provee información relevante para la implementación de recomendaciones en estrategias antifúngicas terapéuticas, ya sea profilácticas o empíricas (97, 140, 142), particularmente a nivel local.

Aunque dentro del complejo se encontraron CMI's elevados frente a las equinocandinas, los aislamientos de *C. parapsilosis* en sentido estricto fueron igualmente susceptibles *in vitro* a la caspofungina, así como a la anidulafungina y

micafungina, que los aislamientos de *C. orthopsilosis*. Pese a los elevados niveles de CMI ya reportados para las equinocandinas, hay reportes de sus actividades *in vitro* e *in vivo* contra *C. parapsilosis* (1, 13, 49-50, 76, 99, 125), particularmente en casos clínicos que involucran aislamientos resistentes a anfotericina B, fluconazol o ambos (198). Sin embargo, se cuenta con información insuficiente que apoye una correlación entre los ensayos de susceptibilidad a equinocandinas (91) y resultados clínicos, además de variaciones inter-laboratorio (124). La eficacia de las equinocandinas puede verse importantemente comprometida durante el tratamiento de infecciones sistémicas por *C. parapsilosis* cuando las CMI's para las equinocandinas utilizadas sea bajo (0.25 µg/mL) (43). De hecho, a concentraciones por encima de la CMI para las equinocandinas, estos fármacos pueden paradójicamente promover el crecimiento *in vitro* de algunos aislamientos de *C. parapsilosis* y otras especies de *Candida* (38). Adicionalmente, estudios epidemiológicos recientes reportaron una asociación entre el incremento en el uso de caspofungina y un aumento en la tasa de incidencia de candidosis por *C. parapsilosis* (61). Por lo tanto, las equinocandinas se deben utilizar con cautela en infecciones sistémicas originadas por *C. parapsilosis*.

Los perfiles de susceptibilidad antifúngica de las equinocandinas probadas frente a los aislamientos del complejo *C. parapsilosis* incluidos en este trabajo son diferentes de aquellos descritos en otros reportes, como el estudio de Pfaller y cols. (138), por lo que estos hallazgos requieren especial atención. Se ha reportado repetidamente que las CMI's de las equinocandinas son considerablemente elevadas para el complejo *C. parapsilosis* que para *C. albicans* o *C. glabrata*, cuando éstas son ensayadas mediante el método de microdilución en placa (34, 128, 136, 138, 141, 165), sugiriendo así que las

especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* son menos susceptibles a esta clase de agentes antifúngicos. La susceptibilidad reducida de *C. parapsilosis* a las equinocandinas se ha asociado a polimorfismos en el gen *FSK1* (130, 134). van Asbeck y cols. (188) sugirieron que diferencias inter-especie respecto a la susceptibilidad a caspofungina resultan de la combinación de diferencias estructurales en los componentes de la pared celular, una baja afinidad por el complejo proteico de la glucano sintetasa o variaciones en el sistema de regulación de éste último. Se detectó resistencia a fluconazol únicamente en nueve aislamientos de *C. parapsilosis* en sentido estricto. Las diferencias en cuanto a la susceptibilidad al fluconazol por parte de las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* reflejan la distinta afinidad del triazol por la enzima clave en la síntesis del ergosterol, el cual es el principal esteroide de la membrana celular fúngica, la 14- α -esteroide-desmetilasa (188).

Pese a que hay reportes en la literatura que señalan la existencia de fenotipos de *C. parapsilosis* multiresistentes a las equinocandinas y a derivados azólicos (69, 117, 169), en este estudio no se encontró ninguno. Todos los aislamientos de *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* fueron susceptibles frente a las cuatro drogas probadas.

Aunque el fluconazol mostró una buena actividad contra *C. parapsilosis* en sentido estricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, un monitoreo local de rutina de los perfiles de susceptibilidad de estos organismos puede ser altamente recomendable. El bajo perfil de susceptibilidad a las equinocandinas reportado en este estudio representa una cuestión que, al menos en Nuevo León, México, puede tornarse problemática. Además, la habilidad de *C. parapsilosis* para formar biopelículas extensivas en catéteres venosos centrales y otros dispositivos médicos puede, eventualmente, también ser crítico

en el entorno clínico (51, 98, 100, 105). En más del 50% de los episodios de fungemia por *C. parapsilosis*, la fuente es un catéter vascular y muchas infecciones comúnmente se desarrollan en pacientes que han recibido previamente tratamiento antifúngico (4). Así, una respuesta adecuada al fluconazol o a cualquier otro agente antifúngico puede no ser completamente obtenida. La administración de antifúngicos debe ir acompañada de la pronta remoción del catéter, para asegurar una respuesta óptima al tratamiento (130).

La información aquí recabada representa el único estudio realizado a la fecha en México, acerca de la incidencia y perfiles de susceptibilidad antifúngica de *C. parapsilosis* en sentido estricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* y el noveno a nivel mundial. Además, es preciso señalar el importante volumen de especímenes clínicos analizados, ya que la mayor parte de los trabajos publicados no sobrepasan los 180 aislamientos (20, 42, 48, 72-73, 169, 188).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

C. parapsilosis en sentido estricto fue el organismo más frecuente en todos los especímenes biológicos analizados, siendo particularmente habitual en sangre, piel y uñas. Por otra parte, de los 29 aislamientos clínicos identificados como *C. orthopsilosis*, la mayoría procedieron de hemocultivos y en menor proporción de uñas y líquido peritoneal. Finalmente, y con tan sólo 4 aislamientos, *C. metapsilosis* fue la especie menos frecuente, con únicamente 2 aislamientos de piel, 1 de sangre y otro más de mucosas.

C. parapsilosis en sentido estricto y *C. orthopsilosis* fueron igualmente susceptibles a fluconazol (CMI_{90%} de 8 µg/mL) y a caspofungina (CMI_{90%} de 0.5-1 µg/mL), así como a anidulafungina y micafungina, con una CMI_{90%} de 2 µg/mL, límite máximo de susceptibilidad de acuerdo a los lineamientos del CLSI. Un 11% de los aislamientos identificados como *C. parapsilosis* en sentido estricto presentó resistencia frente a los antifúngicos probados, del cual 2.9% fue resistente al fluconazol, 6.8% fue resistente a ciertas equinocandinas y 1.3% mostró resistencia cruzada a éstas últimas.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Pese a la creciente incidencia de infecciones debidas a *C. parapsilosis* y a numerosos reportes que señalan elevadas CMI's de éste organismo frente a las equinocandinas, aún no se ha logrado comprender la discrepancia existente en estudios de correlación *in vitro-in vivo*.

Los resultados obtenidos en éste trabajo dan pie a estudios posteriores que permitan evaluar la correlación entre los ensayos de susceptibilidad *in vitro* de las especies que conforman el complejo *C. parapsilosis* y el tratamiento antifúngico en un modelo murino de candidosis sistémica. Además, sería factible también estudiar y corroborar con reportes existentes las bases moleculares que rigen los mecanismos de resistencia antifúngica y de patogénesis en *C. parapsilosis* en sentido estricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*, ya que actualmente se cuenta únicamente con estudios basados en modelos de infección *in vitro* en cultivos celulares y tisulares; todo lo anterior con la finalidad de sentar las bases para un mejor entendimiento de la infección por estos patógenos oportunistas de inminente importancia en el entorno clínico contemporáneo.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

1. Abruzzo, G. K., A. M. Flattery, C. J. Gill, L. Kong, J. G. Smith, V. B. Pikounis, J. M. Balkovec, A. F. Bouffard, J. F. Dropinski, H. Rosen, H. Kropp, and K. Bartizal. 1997. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2333-2338.
2. Adler-Shohet, F., H. Waskin, and J. M. Lieberman. 2001. Amphotericin B lipid complex for neonatal invasive candidiasis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 84:F131-133.
3. Agatensi, L., F. Franchi, F. Mondello, R. L. Bevilacqua, T. Ceddia, F. De Bernardis, and A. Cassone. 1991. Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. *J Clin Pathol* 44:826-830.
4. Almirante, B., D. Rodriguez, M. Cuenca-Estrella, M. Almela, F. Sanchez, J. Ayats, C. Alonso-Tarres, J. L. Rodriguez-Tudela, and A. Pahissa. 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 44:1681-1685.
5. Amici, G., S. Grandesso, A. Mottola, G. Virga, G. Calconi, and C. Bocci. 1994. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: critical review of six cases. *Adv Perit Dial* 10:169-173.
6. Arias, A., M. P. Arevalo, A. Andreu, C. Rodriguez, and A. Sierra. 1994. *In vitro* susceptibility of 545 isolates of *Candida* spp. to four antifungal agents. *Mycoses* 37:285-289.

7. Asadzadeh, M., S. Ahmad, N. Al-Sweih, and Z. U. Khan. 2009. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol* 58:745-752.
8. Ashford, B. 1928. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8:507-538.
9. Baillie, G. S., and L. J. Douglas. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 48:671-679.
10. Baley, J. E., C. Meyers, R. M. Kliegman, M. R. Jacobs, and J. L. Blumer. 1990. Pharmacokinetics, outcome of treatment, and toxic effects of amphotericin B and 5-fluorocytosine in neonates. *J Pediatr* 116:791-797.
11. Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, A. Della Vittoria, D. Arzeni, E. Manso, and G. Scalise. 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2719-2727.
12. Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, D. Giannini, and G. Scalise. 2007. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:941-945.
13. Bartizal, K., C. J. Gill, G. K. Abruzzo, A. M. Flattery, L. Kong, P. M. Scott, J. G. Smith, C. E. Leighton, A. Bouffard, J. F. Dropinski, and J. Balkovec. 1997. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 41:2326-2332.
14. Beard, C. B., J. L. Carter, S. P. Keely, L. Huang, N. J. Pieniazek, I. N. Moura, J. M. Roberts, A. W. Hightower, M. S. Bens, A. R. Freeman, S. Lee, J. R. Stringer, J. S. Duchin, C. del Rio, D. Rimland, R. P. Baughman, D. A. Levy, V. J. Dietz, P. Simon, and T. R. Navin. 2000. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 6:265-272.
15. Bendel, C. M. 2003. Colonization and epithelial adhesion in the pathogenesis of neonatal candidiasis. *Semin Perinatol* 27:357-364.

16. Benjamin, D. K., Jr., K. Ross, R. E. McKinney, Jr., D. K. Benjamin, R. Auten, and R. G. Fisher. 2000. When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics* 106:712-718.
17. Bodey, G. P., M. Mardani, H. A. Hanna, M. Boktour, J. Abbas, E. Girgawy, R. Y. Hachem, D. P. Kontoyiannis, and Raad, II. 2002. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med* 112:380-385.
18. Bonassoli, L. A., M. Bertoli, and T. I. Svidzinski. 2005. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* 59:159-162.
19. Bonifaz, A. 2010. Candidosis, p. 279-300. En *Micología Médica Básica*, Mc Graw Hill, 3 ed, México.
20. Borghi, E., R. Sciota, R. Iatta, C. Biassoni, M. T. Montagna, and G. Morace. 2011. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
21. Borman, A. M., C. J. Linton, D. Oliver, M. D. Palmer, A. Szekely, F. C. Odds, and E. M. Johnson. 2009. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol* 47:2307-2310.
22. Branchini, M. L., M. A. Pfaller, J. Rhine-Chalberg, T. Frempong, and H. D. Isenberg. 1994. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 32:452-456.
23. Brandstetter, R. D., and B. D. Brause. 1980. *Candida parapsilosis* endocarditis. Recovery of the causative organism from an addict's own syringes. *JAMA* 243:1073.
24. Bren, A. 1998. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:839-843.
25. Brockerhoff, H. 1974. Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. *Lipids* 9:645-650.

26. Brooks, D. H., and F. Puppato. 1998. Successful salvage of a primary total knee arthroplasty infected with *Candida parapsilosis*. *J Arthroplasty* 13:707-712.
27. Brunel, L., V. Neugnot, L. Landucci, H. Boze, G. Moulin, F. Bigey, and E. Dubreucq. 2004. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 111:41-50.
28. Clinical & Laboratory Standards Institute. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. C.L.S.I. document M27-A3, Vol. 28 No. 14.
29. Camacho, D. P., A. Gasparetto, and T. I. Svidzinski. 2007. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia* 163:261-266.
30. Cassone, A., F. De Bernardis, E. Pontieri, G. Carruba, C. Girmenia, P. Martino, M. Fernandez-Rodriguez, G. Quindos, and J. Ponton. 1995. Biotypic diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis* 171:967-975.
31. Clark, T. A., S. A. Slavinski, J. Morgan, T. Lott, B. A. Arthington-Skaggs, M. E. Brandt, R. M. Webb, M. Currier, R. H. Flowers, S. K. Fridkin, and R. A. Hajjeh. 2004. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol* 42:4468-4472.
32. Colombo, A. L., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouer, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. Warnock, and J. Morgan. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 44:2816-2823.
33. Colombo, A. L., M. Nucci, R. Salomao, M. L. Branchini, R. Richtmann, A. Derossi, and S. B. Wey. 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:281-286.
34. Costa-de-Oliveira, S., C. Pina-Vaz, D. Mendonca, and A. Goncalves Rodrigues. 2008. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:365-374.

35. Cuende, E., C. Barbadillo, E. M. R, C. Isasi, A. Trujillo, and J. L. Andreu. 1993. *Candida* arthritis in adult patients who are not intravenous drug addicts: report of three cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 22:224-241.
36. Cushing, R. D., and W. R. Fulgenzi. 1997. Synovial fluid levels of fluconazole in a patient with *Candida parapsilosis* prosthetic joint infection who had an excellent clinical response. *J Arthroplasty* 12:950.
37. Chakrabarti, A. 2007. Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neurol India* 55:191-197.
38. Chamilos, G., R. E. Lewis, N. Albert, and D. P. Kontoyiannis. 2007. Paradoxical effect of Echinocandins across *Candida* species *in vitro*: evidence for echinocandin-specific and *candida* species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2257-2259.
39. Chamilos, G., R. E. Lewis, and D. P. Kontoyiannis. 2006. Inhibition of *Candida parapsilosis* mitochondrial respiratory pathways enhances susceptibility to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 50:744-747.
40. Chen, C. M., M. W. Ho, W. L. Yu, and J. H. Wang. 2004. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients: effect of fluconazole treatment and use of the twin-bag disconnect system. *J Microbiol Immunol Infect* 37:115-120.
41. Chen, K. H., C. T. Chang, C. C. Yu, J. Y. Huang, C. W. Yang, and C. C. Hung. 2006. *Candida parapsilosis* peritonitis has more complications than other *Candida* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Ren Fail* 28:241-246.
42. Chen, Y. C., Y. H. Lin, K. W. Chen, J. Lii, H. J. Teng, and S. Y. Li. 2010. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 68:284-292.
43. Cheung, C., Y. Guo, P. Gialanella, and M. Feldmesser. 2006. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* 34:345-348.
44. Dagdeviren, M., N. Cerikcioglu, and M. Karavus. 2005. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 48:321-326.

45. De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schafer, and A. Cassone. 1999. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* 179:201-208.
46. De Bernardis, F., R. Lorenzini, R. Verticchio, L. Agatensi, and A. Cassone. 1989. Isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. *J Clin Microbiol* 27:2598-2603.
47. De Bernardis, F., F. Mondello, R. San Millan, J. Ponton, and A. Cassone. 1999. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 37:3481-3486.
48. De Toro, M., M. J. Torres, R. Maite, and J. Aznar. 2011. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect* 17:418-424.
49. Denning, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362:1142-1151.
50. Deshpande, K. 2003. *Candida parapsilosis* fungaemia treated unsuccessfully with amphotericin B and fluconazole but eliminated with caspofungin: a case report. *Crit Care Resusc* 5:20-23.
51. Diekema, D. J., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. P. Wenzel, and M. A. Pfaller. 1997. An outbreak of *Candida parapsilosis* prosthetic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 29:147-153.
52. Dorko, E., Z. Baranova, A. Jenca, P. Kizek, E. Pilipcinec, and L. Tkacikova. 2005. Diabetes mellitus and candidiasis. *Folia Microbiol (Praha)* 50:255-261.
53. Dostal, J., H. Dlouha, P. Malon, I. Pichova, and O. Hruskova-Heidingsfeldova. 2005. The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol Chem* 386:791-799.
54. Ellis, D. 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1:7-10.
55. Enger, L., S. Joly, C. Pujol, P. Simonson, M. Pfaller, and D. R. Soll. 2001. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 39:658-669.

56. Faix, R. G. 1984. Systemic *Candida* infections in infants in intensive care nurseries: high incidence of central nervous system involvement. *J Pediatr* 105:616-622.
57. Fell, J. W., and S. A. Meyer. 1967. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl* 32:177-193.
58. Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12:80-96.
59. Figueiredo, V. T., D. de Assis Santos, M. A. Resende, and J. S. Hamdan. 2007. Identification and *in vitro* antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. *Mycopathologia* 164:27-33.
60. Fleck, R., A. Dietz, and H. Hof. 2007. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J Antimicrob Chemother* 59:767-771.
61. Forrest, G. N., E. Weekes, and J. K. Johnson. 2008. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J Infect* 56:126-129.
62. Fusek, M., E. A. Smith, M. Monod, B. M. Dunn, and S. I. Foundling. 1994. Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry* 33:9791-9799.
63. Fusek, M., E. A. Smith, M. Monod, and S. I. Foundling. 1993. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS Lett* 327:108-112.
64. Gacser, A., S. Salomon, and W. Schafer. 2005. Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* 245:117-121.
65. Gacser, A., W. Schafer, J. S. Nosanchuk, S. Salomon, and J. D. Nosanchuk. 2007. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 44:1336-1341.
66. Garcia-Effron, G., S. K. Katiyar, S. Park, T. D. Edlind, and D. S. Perlin. 2008. 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 52:2305-2312.

67. Garzoni, C., V. A. Nobre, and J. Garbino. 2007. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26:915-926.
68. Ghannoum, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 13:122-143, table of contents.
69. Ghannoum, M. A., A. Chen, M. Buhari, J. Chandra, P. K. Mukherjee, D. Baxa, A. Golembieski, and J. A. Vazquez. 2009. Differential *in vitro* activity of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. Clin Microbiol Infect 15:274-279.
70. Gilbert, C. M., and M. A. Novak. 1984. Successful treatment of postoperative *Candida* endophthalmitis in an eye with an intraocular lens implant. Am J Ophthalmol 97:593-595.
71. Gilgado, F., J. Cano, J. Gene, and J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J Clin Microbiol 43:4930-4942.
72. Gomez-Lopez, A., A. Alastruey-Izquierdo, D. Rodriguez, B. Almirante, A. Pahissa, J. L. Rodriguez-Tudela, and M. Cuenca-Estrella. 2008. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. Antimicrob Agents Chemother 52:1506-1509.
73. Goncalves, S. S., C. S. Amorim, M. Nucci, A. C. Padovan, M. R. Briones, A. S. Melo, and A. L. Colombo. 2010. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. Clin Microbiol Infect 16:885-887.
74. Gonzalez, G. M., M. Elizondo, and J. Ayala. 2008. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. J Clin Microbiol 46:2902-2905.
75. Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F.

- Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock. 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 42:1519-1527.
76. Hanada, M., H. Imaoka, Y. Oshita, T. Rikimaru, and H. Aizawa. 2005. [Successful treatment with micafungin in a case of candidemia associated with pneumonia]. *Kansenshogaku Zasshi* 79:284-289.
77. Hawser, S. P., and L. J. Douglas. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun* 62:915-921.
78. Hays, C., C. Duhamel, V. Cattoir, and J. Bonhomme. 2010. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol*.
79. Hennessy, M. J. 1996. Infection of a total knee arthroplasty by *Candida parapsilosis*. A case report of successful treatment by joint reimplantation with a literature review. *Am J Knee Surg* 9:133-136.
80. Hensgens, L. A., A. Tavanti, S. Mogavero, E. Ghelardi, and S. Senesi. 2009. AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: evidence for recombination. *Fungal Genet Biol* 46:750-758.
81. Hoeprich, P. D., J. L. Ingraham, E. Kleker, and M. J. Winship. 1974. Development of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida parapsilosis* during therapy. *J Infect Dis* 130:112-118.
82. Hostetter, M. K. 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 7:29-42.
83. Huttova, M., K. Kralinsky, J. Horn, I. Marinova, K. Iligova, J. Fric, S. Spanik, J. Filka, J. Uher, J. Kurak, and V. Kremery, Jr. 1998. Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children-report of 10 cases. *Scand J Infect Dis* 30:485-487.
84. Ibanez, R., and R. Serrano-Heranz. 1999. Pancreatic infection with *Candida parapsilosis*. *Scand J Infect Dis* 31:415-416.

85. Iida, S., T. Imai, T. Oguri, K. Okuzumi, A. Yamanaka, M. L. Moretti-Branchini, K. Nishimura, and Y. Mikami. 2005. Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S rRNA genes among the clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 46:133-137.
86. Jautova, J., S. Viragova, M. Ondrasovic, and E. Holoda. 2001. Incidence of *Candida* species isolated from human skin and nails: a survey. *Folia Microbiol (Praha)* 46:333-337.
87. Jimenez-Mejias, M. E., I. Moreno-Maqueda, C. Regordan, and J. L. Artola-Igarza. 1993. [External cerebrospinal fluid diversion and *Candida parapsilosis* meningitis. Treatment with fluconazole]. *Med Clin (Barc)* 100:156.
88. Johnson, R. J., P. G. Ramsey, N. Gallagher, and S. Ahmad. 1985. Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis: incidence, clinical features and prognosis. *Am J Nephrol* 5:169-175.
89. Kaitwatcharachai, C. 2002. *Candida parapsilosis* peritonitis in patients on CAPD. *Mycopathologia* 154:181-184.
90. Kantarcioglu, A. S., and A. Yucel. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45:160-165.
91. Kartsonis, N., J. Killar, L. Mixson, C. M. Hoe, C. Sable, K. Bartizal, and M. Motyl. 2005. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3616-3623.
92. Khan, M. U., S. Ali, M. A. Baig, M. A. Rafiq, B. C. Vasavada, and I. A. Khan. 2007. *Candida parapsilosis* endocarditis 8 months after transient candidemia. *Int J Cardiol* 118:e58-59.
93. Khan, Z., A. S. Mustafa, and F. F. Alam. 2009. Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect* 42:290-295.
94. Kim, S. K., K. El Bissati, and C. Ben Mamoun. 2006. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 152:2885-2894.

95. Kojic, E. M., and R. O. Darouiche. 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17:255-267.
96. Koufopanou, V., A. Burt, T. Szaro, and J. W. Taylor. 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol Biol Evol* 18:1246-1258.
97. Kremer, V., and A. J. Barnes. 2002. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50:243-260.
98. Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70:878-888.
99. Kuhn, D. M., T. George, J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1773-1780.
100. Kuhn, D. M., P. K. Mukherjee, T. A. Clark, C. Pujol, J. Chandra, R. A. Hajjeh, D. W. Warnock, D. R. Soil, and M. A. Ghannoum. 2004. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* 10:1074-1081.
101. Kull, E., M. P. Ripault, P. Gautret, C. Kauffman-Lacroix, and C. Silvain. 1999. [Pancreatic necrosis infection by *Candida parapsilosis* associated with fungemia]. *Gastroenterol Clin Biol* 23:978-980.
102. Laffey, S. F., and G. Butler. 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151:1073-1081.
103. Laverdiere, M., D. Hoban, C. Restieri, and F. Habel. 2002. *In vitro* activity of three new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. *J Antimicrob Chemother* 50:119-123.
104. Lehmann, P. F., D. Lin, and B. A. Lasker. 1992. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 30:3249-3254.

105. Levin, A. S., S. F. Costa, N. S. Mussi, M. Basso, S. I. Sinto, C. Machado, D. C. Geiger, M. C. Villares, A. Z. Schreiber, A. A. Barone, and M. L. Branchini. 1998. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30:243-249.
106. Lin, D., L. C. Wu, M. G. Rinaldi, and P. F. Lehmann. 1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 33:1815-1821.
107. Linder, N., G. Klinger, I. Shalit, I. Levy, S. Ashkenazi, G. Haski, O. Levit, and L. Sirota. 2003. Treatment of candidaemia in premature infants: comparison of three amphotericin B preparations. *J Antimicrob Chemother* 52:663-667.
108. Lockhart, S. R., S. A. Messer, M. A. Pfaller, and D. J. Diekema. 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 46:2659-2664.
109. Lott, T. J., R. J. Kuykendall, S. F. Welbel, A. Pramanik, and B. A. Lasker. 1993. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 23:463-467.
110. Mallie, M., J. M. Bastide, A. Blancard, A. Bonnin, S. Bretagne, M. Cambon, J. Chandenier, V. Chauveau, B. Couprie, A. Datry, M. Feuilhade, R. Grillot, C. Guiguen, V. Lavarde, V. Letscher, M. D. Linas, A. Michel, O. Morin, A. Paugam, M. A. Piens, H. Raberin, E. Tissot, D. Toubas, and A. Wade. 2005. *In vitro* susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* spp. to voriconazole and other antifungal agents using Etest: results of a French multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 25:321-328.
111. Marco, F., C. Danes, M. Almela, A. Jurado, J. Mensa, J. P. de la Bellacasa, M. Espasa, J. A. Martinez, and M. T. Jimenez de Anta. 2003. Trends in frequency and *in vitro* susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates. Results from a six-year study (1996-2001). *Diagn Microbiol Infect Dis* 46:259-264.
112. Marimon, R., J. Cano, J. Gene, D. A. Sutton, M. Kawasaki, and J. Guarro. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 45:3198-3206.

113. Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546-1554.
114. Merkerova, M., J. Dostal, M. Hradilek, I. Pichova, and O. Hruskova-Heidingsfeldova. 2006. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res* 6:1018-1026.
115. Messer, S. A., R. N. Jones, and T. R. Fritsche. 2006. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol* 44:1782-1787.
116. Mora-Duarte, J., R. Betts, C. Rotstein, A. L. Colombo, L. Thompson-Moya, J. Smietana, R. Lupinacci, C. Sable, N. Kartsonis, and J. Perfect. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 347:2020-2029.
117. Moudgal, V., T. Little, D. Boikov, and J. A. Vazquez. 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 49:767-769.
118. Mugge, C., U. F. Haustein, and P. Nenoff. 2006. [Causative agents of onychomycosis--a retrospective study]. *J Dtsch Dermatol Ges* 4:218-228.
119. Mujica, M. T., J. L. Finkelievich, V. Jewtuchowicz, and C. A. Iovannitti. 2004. [Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999-2001]. *Rev Argent Microbiol* 36:107-112.
120. Neugnot, V., G. Moulin, E. Dubreucq, and F. Bigey. 2002. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269:1734-1745.
121. Nosek, J., Z. Holesova, P. Kosa, A. Gacser, and L. Tomaska. 2009. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 55:497-509.
122. Nosek, J., L. Tomaska, A. Rycovska, and H. Fukuhara. 2002. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 40:1283-1289.

123. Nyirjesy, P., A. B. Alexander, and M. V. Weitz. 2005. Vaginal *Candida parapsilosis*: pathogen or bystander? *Infect Dis Obstet Gynecol* 13:37-41.
124. Odds, F. C., M. Motyl, R. Andrade, J. Bille, E. Canton, M. Cuenca-Estrella, A. Davidson, C. Durussel, D. Ellis, E. Foraker, A. W. Fothergill, M. A. Ghannoum, R. A. Giacobbe, M. Gobernado, R. Handke, M. Laverdiere, W. Lee-Yang, W. G. Merz, L. Ostrosky-Zeichner, J. Peman, S. Perea, J. R. Perfect, M. A. Pfaller, L. Proia, J. H. Rex, M. G. Rinaldi, J. L. Rodriguez-Tudela, W. A. Schell, C. Shields, D. A. Sutton, P. E. Verweij, and D. W. Warnock. 2004. Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 42:3475-3482.
125. Odio, C. M., R. Araya, L. E. Pinto, C. E. Castro, S. Vasquez, B. Alfaro, A. Saenz, M. L. Herrera, and T. J. Walsh. 2004. Caspofungin therapy of neonates with invasive candidiasis. *Pediatr Infect Dis J* 23:1093-1097.
126. Oppenheim, B. A., R. Herbrecht, and S. Kusne. 1995. The safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion in the treatment of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* 21:1145-1153.
127. Orsi, C. F., B. Colombari, and E. Blasi. 2010. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the '*C. parapsilosis*' complex. *Med Mycol* 48:1024-1033.
128. Ostrosky-Zeichner, L., J. H. Rex, P. G. Pappas, R. J. Hamill, R. A. Larsen, H. W. Horowitz, W. G. Powderly, N. Hyslop, C. A. Kauffman, J. Cleary, J. E. Mangino, and J. Lee. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3149-3154.
129. Panagoda, G. J., A. N. Ellepola, and L. P. Samaranyake. 2001. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 44:29-35.
130. Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin, Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards, Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, J. H. Rex, T. J. Walsh, and J. D. Sobel. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:503-535.
131. Pappas, P. G., J. H. Rex, J. Lee, R. J. Hamill, R. A. Larsen, W. Powderly, C. A. Kauffman, N. Hyslop, J. E. Mangino, S. Chapman, H. W. Horowitz, J. E. Edwards, and W. E. Dismukes. 2003.

A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 37:634-643.

132. Park, S., R. Kelly, J. N. Kahn, J. Robles, M. J. Hsu, E. Register, W. Li, V. Vyas, H. Fan, G. Abruzzo, A. Flattery, C. Gill, G. Chrebet, S. A. Parent, M. Kurtz, H. Tepler, C. M. Douglas, and D. S. Perlin. 2005. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3264-3273.
133. Passos, X. S., W. S. Sales, P. J. Maciel, C. R. Costa, K. C. Miranda, A. Lemos Jde, A. Batista Mde, and R. Silva Mdo. 2005. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:925-928.
134. Perlin, D. S. 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 10:121-130.
135. Pfaller, M. A., M. Bale, B. Buschelman, M. Lancaster, A. Espinel-Ingroff, J. H. Rex, M. G. Rinaldi, C. R. Cooper, and M. R. McGinnis. 1995. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 33:1104-1107.
136. Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema. 2008. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 46:150-156.
137. Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema. 2005. *In vitro* activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J Clin Microbiol* 43:5425-5427.
138. Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema. 2006. *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol* 44:760-763.
139. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20:133-163.

140. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2002. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 40:3551-3557.
141. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, J. F. Meis, I. M. Gould, W. Fu, A. L. Colombo, and E. Rodriguez-Noriega. 2007. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 45:1735-1745.
142. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, S. A. Messer, and R. J. Hollis. 2002. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol* 40:852-856.
143. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, and R. J. Hollis. 2003. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by Broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J Clin Microbiol* 41:1440-1446.
144. Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, R. J. Hollis, and S. A. Messer. 1998. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol* 36:1886-1889.
145. Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. 2003. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol* 41:5729-5731.
146. Pfaller, M. A., S. A. Messer, and R. J. Hollis. 1995. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 21:9-14.
147. Pfaller, M. A., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones, G. V. Doern, M. E. Brandt, and R. A. Hajjeh. 1998. *In vitro* susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3242-3244.

148. Pichova, I., L. Pavlickova, J. Dostal, E. Dolejsi, O. Hruskova-Heidingsfeldova, J. Weber, T. Ruml, and M. Soucek. 2001. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem 268:2669-2677.
149. Quindos, G., M. T. Ruesga, E. Martin-Mazuelos, R. Salesa, R. Alonso-Vargas, A. J. Carrillo-Munoz, S. Brena, R. San Millan, and J. Ponton. 2004. *In vitro* activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. Rev Iberoam Micol 21:63-69.
150. Ramage, G., J. P. Martinez, and J. L. Lopez-Ribot. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 6:979-986.
151. Reboli, A. C., C. Rotstein, P. G. Pappas, S. W. Chapman, D. H. Kett, D. Kumar, R. Betts, M. Wible, B. P. Goldstein, J. Schranz, D. S. Krause, and T. J. Walsh. 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. N Engl J Med 356:2472-2482.
152. Richter, S. S., R. P. Galask, S. A. Messer, R. J. Hollis, D. J. Diekema, and M. A. Pfaller. 2005. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol 43:2155-2162.
153. Robbins, E. G., 2nd, N. H. Stollman, P. Bierman, L. Grauer, and J. S. Barkin. 1996. Pancreatic fungal infections: a case report and review of the literature. Pancreas 12:308-312.
154. Rosen, R., and A. H. Friedman. 1973. Successfully treated postoperative *Candida parakrusei* endophthalmitis. Am J Ophthalmol 76:574-577.
155. Rowen, J. L., J. M. Tate, N. Nordoff, L. Passarell, and M. R. McGinnis. 1999. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility. J Clin Microbiol 37:3735-3737.
156. Roy, B., and S. A. Meyer. 1998. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 36:216-218.
157. Rubinstein, E., E. R. Noriega, M. S. Simberkoff, R. Holzman, and J. J. Rahal, Jr. 1975. Fungal endocarditis: analysis of 24 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 54:331-334.

158. Ruchel, R., F. de Bernardis, T. L. Ray, P. A. Sullivan, and G. T. Cole. 1992. *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1:123-132.
159. Ruzicka, F., V. Hola, M. Votava, and R. Tejkalova. 2007. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol (Praha)* 52:209-214.
160. Rycovska, A., M. Valach, L. Tomaska, M. Bolotin-Fukuhara, and J. Nosek. 2004. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 150:1571-1580.
161. Sabino, R., P. Sampaio, L. Rosado, D. A. Stevens, K. V. Clemons, and C. Pais. 2010. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. *J Clin Microbiol* 48:1677-1682.
162. Safdar, A., D. S. Perlin, and D. Armstrong. 2002. Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:11-16.
163. Saiman, L., E. Ludington, J. D. Dawson, J. E. Patterson, S. Rangel-Frausto, R. T. Wiblin, H. M. Blumberg, M. Pfaller, M. Rinaldi, J. E. Edwards, R. P. Wenzel, and W. Jarvis. 2001. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 20:1119-1124.
164. San Miguel, L. G., J. Cobo, E. Otheo, I. Martos, A. Muriel, J. Fortun, and S. Moreno. 2006. Candidemia in pediatric patients with congenital heart disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55:203-207.
165. Sanguinetti, M., P. Posteraro, and B. Posteraro. 2010. Echinocandin antifungal drug resistance in *Candida* species: a cause for concern? *Curr Infect Dis Rep* 12:437-443.
166. Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48:365-377.
167. Scherer, S., and D. A. Stevens. 1987. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 25:675-679.

168. Segal, R., A. Kimchi, A. Kritzman, R. Inbar, and Z. Segal. 2000. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. *Mycoses* 43:349-353.
169. Silva, A. P., I. M. Miranda, C. Lisboa, C. Pina-Vaz, and A. G. Rodrigues. 2009. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 47:2392-2397.
170. Smego, R. A., Jr., J. R. Perfect, and D. T. Durack. 1984. Combined therapy with amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida* meningitis. *Rev Infect Dis* 6:791-801.
171. Sobel, J. D. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369:1961-1971.
172. Sobel, J. D., and J. A. Vazquez. 1996. Symptomatic vulvovaginitis due to fluconazole-resistant *Candida albicans* in a female who was not infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 22:726-727.
173. Solomon, S. L., R. F. Khabbaz, R. H. Parker, R. L. Anderson, M. A. Geraghty, R. M. Furman, and W. J. Martone. 1984. An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. *J Infect Dis* 149:98-102.
174. Soll, D. R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 5:183-203.
175. Spellberg, B. J., S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr. 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 42:244-251.
176. Stehr, F., A. Felk, A. Gacser, M. Kretschmar, B. Mahnss, K. Neuber, B. Hube, and W. Schafer. 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 4:401-408.
177. Stransky, T. J. 1981. Postoperative endophthalmitis secondary to *Candida parapsilosis*. A case treated by vitrectomy and intravitreal therapy. *Retina* 1:179-185.
178. Strausbaugh, L. J., D. L. Sewell, T. T. Ward, M. A. Pfaller, T. Heitzman, and R. Tjoelker. 1994. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* 32:2299-2300.

179. Tamura, N. K., A. Gasparetto, and T. I. Svidzinski. 2003. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathologia* 156:269-272.
180. Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43:284-292.
181. Tavanti, A., L. A. Hensgens, E. Ghelardi, M. Campa, and S. Senesi. 2007. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol* 45:1455-1462.
182. Tavanti, A., L. A. Hensgens, S. Mogavero, L. Majoros, S. Senesi, and M. Campa. 2010. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol* 10:203.
183. Tonomo, K., T. Tsujino, Y. Fujioka, S. Nakao, H. Yao, H. Yasoshima, A. Kubota, T. Iwasaki, and M. Ohyanagi. 2004. *Candida parapsilosis* endocarditis that emerged 2 years after abdominal surgery. *Heart Vessels* 19:149-152.
184. Tortorano, A. M., A. L. Rigoni, E. Biraghi, A. Prigitano, and M. A. Viviani. 2003. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans* *Candida* isolates from blood. *J Antimicrob Chemother* 52:679-682.
185. Trofa, D., A. Gacser, and J. D. Nosanchuk. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:606-625.
186. Truant, A. L. 2002. Commercial Methods for Identification and Susceptibility Testing of Fungi, p. 225-248. En *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
187. Tunkel, A. R., C. Y. Thomas, and B. Wispelwey. 1993. *Candida* prosthetic arthritis: report of a case treated with fluconazole and review of the literature. *Am J Med* 94:100-103.

188. van Asbeck, E., K. V. Clemons, M. Martinez, A. J. Tong, and D. A. Stevens. 2008. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:106-109.
189. van Asbeck, E. C., K. V. Clemons, and D. A. Stevens. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 35:283-309.
190. Vasquez, J. C., M. Hart, C. F. Denney, R. Pedowitz, and E. J. Ziegler. 2002. Fungal arthritis of the knee caused by *Candida parapsilosis* in a kidney transplant recipient. *J Clin Rheumatol* 8:147-150.
191. Wada, M., H. Baba, and S. Imura. 1998. Prosthetic knee *Candida parapsilosis* infection. *J Arthroplasty* 13:479-482.
192. Wang, A. Y., A. W. Yu, P. K. Li, P. K. Lam, C. B. Leung, K. N. Lai, and S. F. Lui. 2000. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am J Kidney Dis* 36:1183-1192.
193. Warnock, D. W. 1998. Fungal infections in neutropenia: current problems and chemotherapeutic control. *J Antimicrob Chemother* 41 Suppl D:95-105.
194. Weems, J. J., Jr. 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 14:756-766.
195. Weems, J. J., Jr., M. E. Chamberland, J. Ward, M. Willy, A. A. Padhye, and S. L. Solomon. 1987. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J Clin Microbiol* 25:1029-1032.
196. Wey, S. B., M. Mori, M. A. Pfaller, R. F. Woolson, and R. P. Wenzel. 1988. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* 148:2642-2645.
197. White TJ, B. T., Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. En G. D. Innis MA, Sninsky JJ, White TJ, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA.

198. Yalaz, M., M. Akisu, S. Hilmioglu, S. Calkavur, B. Cakmak, and N. Kultursay. 2006. Successful caspofungin treatment of multidrug resistant *Candida parapsilosis* septicaemia in an extremely low birth weight neonate. *Mycoses* 49:242-245.
199. Yamamoto, T., K. Nohara, K. Uchida, and H. Yamaguchi. 1992. Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 36:637-641.

APÉNDICES

Apéndice A. Preparación de reactivos

BaCl₂ al 1%

Disolver 1 g de BaCl₂ en 100 mL de agua destilada.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura y aforar a 50 mL. Almacenar a 4°C protegido de la luz en recipiente de vidrio ámbar. Para preparar la solución de trabajo (2 µg/mL) se efectúa una dilución 1:250 de la solución stock (1 mL del stock + 249 mL de agua ultrapura).

EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 500 mM pH 8.0

Disolver 9.306 g de Na₂EDTA·2H₂O en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.

Gel de agarosa al 1.5%

Disolver 1.5 g de agarosa grado biología molecular en 100 mL de TBE 0.5x, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 10 µL de bromuro de etidio 2 µg/mL, mezclar y vaciar en la cámara de electroforesis.

H₂SO₄ al 1%

Diluir 1 mL de H₂SO₄ concentrado en 100 mL de agua destilada.

Jugo azul 6x (Buffer de carga para electroforesis)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1x pH 8.0 y aforar a 10 mL. No esterilizar.

Solución salina al 0.85%

Disolver 0.85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 10x (Stock)

Disolver 54 g de Tris-base y 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 500 mM y en agua ultrapura, aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave. Para preparar la solución de trabajo (0.5x) se mezclan 50 mL del stock en agua destilada estéril y se afora a 1L.

TE (Tris-EDTA) 1x pH 8.0

Mezclar 500 μ L de Tris-HCl 500 mM pH 8.0 y 50 μ L de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL. Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl 500 mM pH 8

Disolver 30.3 g de Tris-base en 300 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Tubo No. 1 del nefelómetro de McFarland

Añadir 0.1 mL de BaCl₂ al 1% a 9.9 mL de H₂SO₄ al 1%.