



TESIS DOCTORAL

**Etioepidemiología y factores de virulencia  
en *Candida* spp.  
aisladas de hemocultivos**

Departamento de Ciencias Biomédicas.

**Conformidad de los Directores:**

**Antonio Cándido Gómez García**

**M Carmen Lozano Domínguez**

**Cipriano Hurtado Manzano**



*A mi padre, por todo lo que me has enseñado.  
Porque gran parte de lo que soy te lo debo a ti.*



## **Agradecimientos**

Gracias al apoyo y ayuda que siempre he tenido ha sido posible realizar esta tesis.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Puerta Del Mar donde por caprichos del destino empecé mi contactoto con la microbiología clínica, fue una suerte encontrarme con tan buenos compañeros que se convirtieron en parte de mi familia durante cuatro maravillosos años. Gracias a Ana y Manolo por su dedicación y trabajo en el inicio de esta tesis.

A mis compañeros de la Facultad de Medicina donde aparezco y desaparezco y siempre me reciben con los brazos abiertos. Donde he encontrado cariño, ayuda y dedicación. Muchas gracias Miguel, María, Coro y Lupe por extenderme siempre cariñosamente vuestra ayuda.

A Ciro y mis directores, Cipriano, M<sup>a</sup> Carmen y Antonio Cándido, que me animaron en la realización de esta tesis. Cipriano con su cariño y sus consejos prácticos, M<sup>a</sup> Carmen que además de codirectora fue una magnífica tutora que me acompañó en la recogida de datos día a día. Antonio Cándido que desde el principio me acogió y a quién le robé gran parte de sus horas de trabajo de forma incondicional.

A Gonzalo por estar siempre a mi lado, mi gran apoyo. A mis hijos, los motores de mi vida. A mi hermano quien siempre puso una nota de humor en momentos de estrés. Y a quien siempre me ha animado a llegar con todo hasta el final, mi madre.

Gracias a todos.



**D. ANTONIO CÁNDIDO GÓMEZ GARCÍA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA, D. CIPRIANO HURTADO MANZANO, PROFESOR TITULAR DE MICROBIOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA Y D<sup>a</sup> M CARMEN LOZANO DOMÍNGUEZ, F. E. A. DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA**

**CERTIFICAN**

Que D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> TERESA BLANCO BLANCO ha realizado bajo nuestra dirección, en el Servicio de Microbiología del Hospital Puerta del Mar de Cádiz y en el Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología) el trabajo de TESIS DOCTORAL titulado: **“Etioepidemiología y factores de virulencia en *Candida* spp. aisladas de hemocultivos”** y que el mismo reúne, a nuestro juicio, méritos suficientes para poder optar al grado de Doctor por esta Universidad, por lo que damos la oportuna autorización para su presentación, con el V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> del Director del Departamento.

Y para que así conste, firmamos el presente CERTIFICADO, en Badajoz a 13 de Mayo de 2014.

AC Gómez García      MC Lozano Domínguez      C Hurtado Manzano

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>  
EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: Dr. Guillermo Sánchez Salgado



Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida por:  
El proyecto de Investigación PRI09A021 (2009-2011)  
de la Consejería de Economía, Comercio e  
Innovación de la Junta de Extremadura “Estudio  
del papel de la formación de biocapa como  
mecanismo de resistencia de *Candida* spp. a  
antimicrobianos”.  
La ayuda a grupo GR10031 de la Junta de  
Extremadura y FEDER.

*Índice*

## **INDICE**

## *Índice*

	Página	
I- INTRODUCCIÓN		
1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS CANDIDEMIAS	19	
2. ESPECIES RESPONSABLES DE CANDIDEMIAS	21	
3. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>CANDIDA</i> SPP.	26	
4. ANTIFÚNGICOS	37	
II- OBJETIVOS	47	
III- MATERIAL Y MÉTODOS		45
1. Equipos y aparatos	55	
2. Medios de cultivo	56	
3. Reactivos y otros componentes	58	
4. Pacientes con candidemia	60	
5. Microorganismos	61	
5.1-Aislamiento e identificación	61	
A) Criterios morfológicos	63	
B) Métodos bioquímicos	64	
C) Técnicas de biología molecular para identificación del grupo- <i>psilosis</i>	65	
6. Sensibilidad a antifúngicos de las especies aisladas	71	
7. Estudio de factores de virulencia	73	
7.1 Medida de la actividad enzimática	73	
-Actividad aspartilproteasa	74	

## Índice

-Actividad hemolítica en placa	75
7.2. Hidrofobicidad de la superficie celular	77
7.3. Capacidad de adherencia a plástico	79
7.4 Capacidad de formación de biocapa	80
8. Estudios de biología molecular.	83
8.1. Expresión del gen ALS-1 en células de la biocapa en <i>Candida tropicalis</i> .	83
8.2- Análisis de la configuración de los alelos de MTL $\alpha$ y MTLalfa en <i>C. tropicalis</i> y <i>C. albicans</i>	86
9. Métodos estadísticos	90
10. FICHAS	
Hoja1- Datos personales	91
Hoja 2- Factores de riesgo	93
Hoja 3- Datos de las cepas aisladas	95

## IV- RESULTADOS

A. RESULTADOS ETIOEPIDEMIOLÓGICOS	99
1. Pacientes con candidemia	99
2. Prevalencia y epidemiología de las especies aisladas	111
2.1 Presencia de factores de riesgo según la especie aislada	115
3. Antifúngicos	116
3.1 Sensibilidad a antifúngicos de las especies aisladas	116
3.2. Pauta terapéutica antifúngica	119

B. ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA	121
1. Hidrofobicidad de la superficie celular	121
2. Adherencia a poliestireno	124
3. Formación de biocapa	128
4. Producción de aspartil proteasas	132
C. ESTUDIO COMPARATIVO POR ESPECIES	134
1. <i>Candida albicans</i>	134
2. <i>Candida</i> grupo- <i>psilosis</i>	141
3. <i>Candida tropicalis</i>	151
4. <i>Candida glabrata</i>	159
5. <i>Candida krusei</i>	162
6. <i>Candida lusitaniae</i>	164
V- DISCUSIÓN	167
VI- CONCLUSIONES	187
VII- BIBLIOGRAFÍA	191
VIII- PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL	207

## *Índice*

## INDICE DE TABLAS

	Página
I- INTRODUCCIÓN	
<b>Tabla 1.</b> Diferencias entre la metodología EUCAST y CLSI	43
III- MATERIAL Y MÉTODOS	
<b>Tabla 2.</b> Cepas de colección utilizadas	62
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los primers utilizados para identificación de las especies de <i>Candida</i> grupo- <i>psilosis</i>	69
<b>Tabla 4.</b> Preparación de la muestra para digestión.	69
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de los antifúngicos ensayados en Sensitrite YeastOne	72
<b>Tabla 6.</b> Primers utilizados para ALS-1 y para los housekeeping.	85
<b>Tabla 7.</b> Primers utilizados para alelos $\alpha$ y alfa del gen MTL de <i>C. tropicalis</i>	88
<b>Tabla 8.</b> Primers utilizados para alelos $\alpha$ y alfa del gen MTL de <i>C. albicans</i> .	89
IV- RESULTADOS	
<b>Tabla 9.</b> Especies aisladas simultáneamente en hemocultivo y otra localización	102

## Índice de tablas

<b>Tabla 10.</b> Pacientes con aislamiento en cultivo mixto levadura y bacteria en el hemocultivo	103
<b>Tabla 11.</b> Número de pacientes fallecidos en las distintas especies aisladas. Porcentaje en relación a las candidemias por esa especie (N) y al total de fallecimientos (T=16)	108
<b>Tabla 12.</b> Pacientes fallecidos: Patología de base, servicio de procedencia, especie aislada, edad, sexo y tratamiento antifúngico recibido, si existe	109
<b>Tabla 13.</b> Patologías en los 52 pacientes con candidemia	110
<b>Tabla 14.</b> Especies aisladas durante el periodo del estudio	111
<b>Tabla 15.</b> Distribución de las especies de <i>Candida</i> por sexo	113
<b>Tabla 16.</b> Especies aisladas según grupos de edad considerando neonatos de 0-4 semanas; niño >4 semanas ≤14 años; adulto >14 años ≤69 años	113
<b>Tabla 17.</b> Factores de riesgo en relación con la especie aislada, considerando los porcentajes dentro de cada especie. Tabla de contingencia	115
<b>Tabla 18.</b> Puntos de corte según EUCAST documento Edef 7.2 (CMI en mg/L)	117
<b>Tabla 19.</b> Puntos de corte de los antifúngicos según el CLSI	117
<b>Tabla 20.</b> Sensibilidad de las distintas especies aisladas a caspofungina, voriconazol, fluconazol y anfotericina B liposomal, valorada por Sensititre YeastOne (CMI en mg/L)	118
<b>Tabla 21.</b> Tratamiento instaurado por el Informe Previo (IP)	119
<b>Tabla 22.</b> Tratamiento y evolución de los 52 pacientes con candidemia	120

<b>Tabla 23.</b> Porcentaje de HSC de las especies aisladas, indicando el número de aislados (N), la media y el intervalo de confianza.	124
<b>Tabla 24.</b> Capacidad de adherencia a poliestireno de las distintas especies aisladas, valorada en densidad óptica (DO)	127
<b>Tabla 25.</b> Correlación entre HSC y adherencia en las 56 cepas (Pearson).	128
<b>Tabla 26.</b> Capacidad de formación de biocapa de las distintas especies de <i>Candida</i> aisladas de hemocultivos.	131
<b>Tabla 27.</b> Actividad aspartil proteasa: Distribución de las especies según nivel de actividad y valor medio del índice Pz obtenido a los 6 días de incubación, comparando los dos halos obtenidos.	133
<b>Tabla 28.</b> Datos epidemiológicos de los 15 pacientes con candidemia por <i>C. albicans</i> .	135
<b>Tabla 29.</b> Primers utilizados para el genotipado de <i>MTL</i> en <i>C. albicans</i>	139
<b>Tabla 30.</b> Primers utilizados en la repetición de la PCR para comprobación de A1- <i>MTL</i> genotipado	139
<b>Tabla 31.</b> Datos epidemiológicos de los pacientes con candidemia por <i>Candida</i> grupo- <i>psilosis</i> y candidemia por <i>C. albicans</i> .	143
<b>Tabla 32.</b> Factores de riesgo en los pacientes con candidemia por <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto y <i>C. orthopsilosis</i>	143
<b>Tabla 33.</b> Aislados clínicos de <i>C. parapsilosis</i> sensu strictu. Valoración de la hidrofobicidad, adherencia a plástico y formación de biocapa	146

## Índice de tablas

<b>Tabla 34.</b> Aislados clínicos de <i>C. orthopsilosis</i> . Valoración de la hidrofobicidad, adherencia a plástico y formación de biocapa	146
<b>Tabla 35.</b> Actividad enzimática de <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto, según Índice Pz (diámetro colonia/diámetro colonia+halo) a las 48h y a los 6 días de incubación	150
<b>Tabla 36.</b> Datos epidemiológicos de los pacientes con candidemia por <i>C. tropicalis</i>	152
<b>Tabla 37.</b> Factores de riesgo en los pacientes con candidemia por <i>C. tropicalis</i> , comparativamente con <i>C. albicans</i>	152
<b>Tabla 38.</b> Cuantificación relativa de la adhesina ALS-1 en las cepas de <i>C. tropicalis</i> creciendo en biofilm respecto a las células planctónicas	154
<b>Tabla 39.</b> HSC, adherencia, biocapa y actividad Saps de las cepas de <i>C. tropicalis</i> aisladas, en las cepas heterocigotas, cepa homocigota y en los controles	156
<b>Tabla 40.</b> Datos epidemiológicos de los pacientes con candidemia por <i>C. glabrata</i>	160
<b>Tabla 41.</b> Estudio comparativo de los factores de riesgo de <i>C. glabrata</i> con <i>C. albicans</i>	160
<b>Tabla 42.</b> Características de los pacientes y factores de riesgo con <i>C. krusei</i> aislada de hemocultivos	163
<b>Tabla 43.</b> Sensibilidad a antifúngicos y determinantes de patogenicidad de las cepas de <i>C. krusei</i> aisladas	163

*Índice de tablas*

## INDICE DE FIGURAS

	Página
I- INTRODUCCIÓN	
<b>Figura 1.</b> Desarrollo de una biocapa: Diferentes procesos y fases en los que ocurren (Blankenship y Mitchell, 2006)	29
<b>Figura 2.</b> Mating en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y switching y mating en <i>C. albicans</i> .	35
<b>Figura 3.</b> Evolución histórica de los antifúngicos (Catalán & Montejo, 2006)	37
III- MATERIAL Y MÉTODOS	
<b>Figura 4.</b> Crecimiento en el medio cromogénico CHROMOagar Candida de <i>C. albicans</i> verde, <i>C. tropicalis</i> azul, <i>C. glabrata</i> violeta.	64
<b>Figura 5.</b> Galería API 32C para identificación de levaduras	65
<b>Figura 6.</b> Esquema y resultados de la electroforesis (tomado de Tavanti et al, 2005)	70
<b>Figura 7.</b> Lectura de la actividad aspartil proteasa en el medio YCB-BSA, sin teñir (A) y teñido con negro amido al 1% (B).	70
<b>Figura 8.</b> Lectura de la actividad hemolisina en medio Agar Sabouraud Sangre de cepas <i>C.parapsilosis</i> a 37°C	76
<b>Figura 9.</b> Método bifásico agua/hidrocarburo para valoración del porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular.	78
<b>Figura 10.</b> Valoración de la adherencia a plástico en una placa de microtitulación.	80
<b>Figura 11.</b> Medida de la biocapa por reducción del XTT	82

## Índice de figuras

### IV- RESULTADOS

<b>Figura 12.</b> Distribución de las candidemias por Servicios.	104
<b>Figura 13.</b> Prevalencia según sexo de los 52 pacientes con candidemia.	105
<b>Figura 14.</b> Candidemias por grupos de edad: neonatos, 0-4 semanas; niño, >4 semanas a ≤14 años; adulto, >14 a ≤69 años	105
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de exitus en relación al servicio de procedencia de las candidemias.	106
<b>Figura 16.</b> Porcentajes de pacientes que fallecen respecto a la prevalencia de la especie (■ fallecidos especie/aislados de esa especie) y porcentajes de pacientes que fallecen respecto al total de exitus (■ fallecidos especie/ total de fallecidos)	108
<b>Figura 17.</b> Prevalencia de candidemias por <i>C. albicans</i> y <i>Candida no-albicans</i>	112
<b>Figura 18.</b> Prevalencia de las distintas especies de <i>Candida</i> por grupos de edad	114
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de cada grupo de edad en el total de candidemias	114
<b>Figura 20.</b> HSC por el método MATH en especies de <i>Candida</i> grupo <i>psilosis</i> .	123
<b>Figura 21.</b> Valores de HSC (rango y media) de cada una de las especies	124
<b>Figura 22.</b> Adherencia a poliestireno en microplacas Greiner de 96 pocillos.	126
<b>Figura 23.</b> Capa adherente de diferentes levaduras al microscopio (40x)	127

<b>Figura 24.</b> Valores de adherencia (intervalo y media) de cada una de las especies	128
<b>Figura 25 .</b> Formación de la biocapa en microplaca Greiner de 96 pocillos, cada prueba por cuadruplicado	130
<b>Figura 26.</b> Biocapa de <i>C. albicans</i> observada al microscopio óptico (40x) en el pocillo de la microplaca	130
<b>Figura 27.</b> Valores de la DO de la biocapa formada (intervalo y media) de cada una de las especies	131
<b>Figura 28.</b> Valoración de la actividad aspartil-proteasa en el medio YCB-BSA. Lectura de los halos con tinción con negro amido (1%) a los 6 días de incubación en CO <sub>2</sub> en <i>C. albicans</i> (cepa 13) y <i>C. parapsilosis</i> (cepa 11)	132
<b>Figura 29.</b> Actividad enzimática por especies según índice Pz del halo transparente	133
<b>Figura 30.</b> Correlación entre adherencia e HSC en las cepas de <i>C. albicans</i>	136
<b>Figura 31.</b> Biocapa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 en microplaca, al microscopio óptico (40x)	137
<b>Figura 32.</b> Actividad Saps en dos cepas de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> , en medio YCB-BSA teñido con negro amido al 1%.	137
<b>Figura 33.</b> Estudio del locus <i>MTL</i> en <i>C. albicans</i> . La cepa 13 es homocigota <i>MTL</i> alfa/alfa.	140
<b>Figura 34.</b> Repetición de la PCR con nuevos primers para confirmar la banda A1 del locus <i>MTL</i> en la cepa 13 de <i>C. albicans</i> .	140
<b>Figura 35.</b> Fragmentos ITS identificativos de <i>C. orthopsilosis</i> .	141
<b>Figura 36.</b> Mediana del porcentaje de HSC de 13 cepas de <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto y 6 cepas de <i>C. orthopsilosis</i>	144
<b>Figura 37.</b> Relación entre adherencia (DO, eje de las x) y porcentaje de HSC (eje de las y)	147

## Índice de figuras

<b>Figura 38.</b> Actividad hemolítica de <i>C. orthopsilosis</i> (2) y <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (3) en incubación aeróbica (A) y en atmósfera de CO <sub>2</sub> (B)	148
<b>Figura 39.</b> Actividad aspartil proteasa de <i>C. orthopsilosis</i> y <i>C. parapsilosis</i> sensu stricto en YCB-BSA, teñida con negro amido	149
<b>Figura 40.</b> Capacidad de filamentación de <i>C. tropicalis</i> . Foto del borde de una colonia en YCB-BSA (40x)	153
<b>Figura 41.</b> Crecimiento característico de dos cepas hidrofóbicas de <i>C. tropicalis</i> en RPMI 1640	153
<b>Figura 42.</b> <i>C. tropicalis</i> adherida a microplaca (40x)	153
<b>Figura 43.</b> Expresión del gen <i>ALS-1</i> en células del biofilm de <i>C. tropicalis</i> en relación a la expresión en planctónicas. Cepas 34, 36 y 56 son muy productoras de biofilm.	155
<b>Figura 44.</b> Proporción de las cepas de <i>C. tropicalis</i> muy productoras y poco productoras de biofilm	155
<b>Figura 45.</b> Resultados del estudio del locus <i>MTL</i> de las cepas de <i>C. tropicalis</i> . Todas las cepas heterocigotas <i>MTL</i> a/alfa excepto la cepa 36 es homocigota <i>MTL</i> a	157
<b>Figura 46.</b> <i>C. tropicalis</i> cepa 36 (homocigota). Adherencia y formación de biocapa en pocillo de placa de poliestireno	158
<b>Figura 47.</b> Actividad Saps en dos cepas de <i>C. glabrata</i> (20) y <i>C. albicans</i> (21), en medio YCB-BSA teñido con negro amido al 1%	161
<b>Figura 48.</b> Switching de <i>C. lusitaniae</i> en medio YPD dando lugar a colonias lisas y colonias estrelladas. Presencia de filamentos en la colonia estrellada (A) y formas levaduriformes en la colonia lisa (B)	165

## **INTRODUCCIÓN**

## *Introducción*

Las especies de *Candida* son una causa importante de infecciones invasoras y diseminadas por vía hematológica. **La candidemia** es una infección nosocomial de elevada mortalidad, que se cifra entre el 40-60% (Gómez et al, 2010). Si bien la incidencia global de las infecciones nosocomiales se ha incrementado en los últimos años, las producidas por el género *Candida* han presentado un aumento muy superior, siendo la candidemia la infección por levaduras más frecuente en nuestro medio. A principios de los años 60 se habían comunicado en la literatura sólo 48 casos de candidemia, en cambio, en la década de los 80 se comunicaron más de 25000 mil sepsis en 124 hospitales estadounidenses, en el sistema de vigilancia National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS). Estas fungemias presentaron 29% de mortalidad atribuida, frente al 17% del resto de los patógenos, diferencia estadísticamente significativa. Es cierto que algunos episodios de candidemia pueden ser transitorios y autolimitados, pero al no existir posibilidad de discernir cuál de ellos se asociará a complicaciones tardías (endocarditis, osteomielitis o endoftalmitis) debe tratarse siempre por vía intravenosa a todos los pacientes con candidemia (Bennet, 2006), y su inicio debe ser precoz ya que su retraso en el inicio del mismo se asocia a una mayor mortalidad.

## Introducción

Las infecciones fúngicas se han convertido en un importante factor de morbilidad y mortalidad, representando una importante carga al sistema sanitario. *Candida* spp. es considerado el cuarto agente etiológico de sepsis hospitalaria (Perlroth et al, 2007; Guery et al, 2009; Rueping et al, 2009). Este aumento en la incidencia de la infección fúngica está relacionado con numerosos factores como la existencia de una mayor población de pacientes con factores predisponentes, pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos y de órgano sólido, el uso de nuevos quimioterápicos y la utilización de elevadas dosis de corticoides. Además, otros factores de riesgo como el ingreso en unidades de cuidados intensivos y algunas intervenciones quirúrgicas contribuyen a este incremento de incidencia (Rodríguez Tudela et al, 2008a). El desarrollo científico y tecnológico de la medicina también influye en éste incremento, ya que ofrece alternativas a pacientes con edades avanzadas y con procesos que antes carecían de tratamiento.

Las especies del **género *Candida*** pueden causar una gran diversidad de formas clínicas. El género *Candida* incluye alrededor de 150 especies, aunque pocas son patógenas para el ser humano. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, y *Candida lusitaniae* son las especies que con mas frecuencia, se aíslan como agentes etiológicos de infecciones por *Candida*.

Es necesario profundizar en los mecanismos por los que estas levaduras pasan de comensales a patógenas, originando procesos de elevada morbilidad y mortalidad.

## 1-EPIDEMIOLOGÍA DE LAS CANDIDEMIAS

La incidencia de candidemia varía ampliamente oscilando entre 5% y 25%, según el tipo de hospital. Actualmente las candidemias están clasificadas como la cuarta causa de procesos infecciosos sistémicos nosocomiales (Bougnoux et al, 2008).

**El origen** es principalmente endógeno, previa colonización de la piel o de las mucosas, aunque también puede transmitirse a través de material infectado, personal sanitario o desde otros pacientes (Pemán & Salavert, 2013); los pacientes críticos son muy susceptibles y sus síntomas son inespecíficos. Así como la colonización de mucosas no constituye causa directa de mortalidad, la entrada en el torrente circulatorio se asocia a tasas de mortalidad que varían del 10 al 49% según los estudios, principalmente entre pacientes con quemaduras, dispositivos médicos, cirugía abdominal, neutropenia o bien prematuros de bajo peso.

Los **pacientes de mayor riesgo** de desarrollar candidiasis, son en general pacientes críticos admitidos en la UCI y pacientes onco-hematológicos, principalmente por la inmunosupresión, por el uso frecuente de dispositivos médicos y por el consumo de antimicrobianos de amplio espectro. La supresión de la flora bacteriana habitual del tracto gastrointestinal facilita la proliferación de levaduras en el tubo digestivo y el riesgo del paso al torrente sanguíneo a través del epitelio intestinal. El tracto intestinal es la puerta de entrada más común en pacientes neutropénicos. En UCIs la puerta de entrada más probable

## *Introducción*

son los catéteres intravasculares colonizados por la microbiota del paciente o de los cuidadores (Bouza & Muñoz, 2008).

La mortalidad asociada a las infecciones fúngicas es muy elevada, condicionada por el tipo de enfermedad y el perfil del huésped. En general, se estima que la mortalidad de candidemia es del 44% (Almirante et al, 2005)

En España se han realizado diferentes estudios multicéntricos (Pemán et al, 2012; Almirante et al, 2005) para conocer la epidemiología de las infecciones del torrente sanguíneo por *Candida* spp., su incidencia, factores de riesgo, distribución de las especies causantes y su sensibilidad antifúngica. El estudio FUNGEMYCA, realizado en España en 2009, concluye que la incidencia y etiología de las candidemias varía geográficamente, según el tipo de hospital, la población estudiada y la práctica clínica (Pemán et al, 2012); el estudio CANDIPOP realizado en los años 2010 y 2011 (Puig-Asensio et al, 2013) también observa diferencias entre los hospitales participantes así como en las diferentes unidades de hospitalización.

En general, la distribución de las especies está cambiando. Aumenta la frecuencia de las especies resistentes o con sensibilidad disminuida a fluconazol, haciendo necesaria la actualización de las recomendaciones para el tratamiento empírico (Aguado et al, 2011). Aunque la mortalidad ha descendido algo en los últimos años, sigue siendo muy elevada, y un tercio de los pacientes infectados fallece (Almirante & Cuenca-Estrella, 2011).

El conocimiento de la epidemiología de las candidemias permitirá mejorar el manejo de los enfermos en aspectos como tratamiento empírico antifúngico más adecuado, retirada precoz de catéter en enfermos infectados y mejor control de los factores de riesgo (Salavert et al, 2006).

## 2-ESPECIES RESPONSABLES DE CANDIDEMIAS

Las especies de *Candida* spp. representan casi el 80% de todos los hongos patógenos causantes de infecciones nosocomiales y constituyen la cuarta causa de aislamientos en hemocultivos (candidemia). A partir de la mitad de la década 1990 se comienza a observar un cambio etiológico continuo en los agentes que causan candidemia, de modo que *Candida albicans* comienza a ser desplazada por la emergencia de otras especies del mismo género. Paralelamente, se ha aislado cepas resistentes o menos susceptibles a los antimicóticos, fundamentalmente en el grupo de las *Candida no albicans*.

- En 1984, *C. albicans* era causante de 80% de las candidemias, seguida por *C. tropicalis* y muy atrás, por *C. parapsilosis*.
- En la década de 1990, la frecuencia de *C. albicans* bajó a 60%, *C. tropicalis* aumentó levemente, *C. parapsilosis* aumentó al doble y comenzó a aparecer *C. glabrata*.
- A partir de 2000, *C. albicans* se mantiene cerca de 50%, *C. tropicalis* bajó de manera significativa, *C. parapsilosis* disminuyó levemente y hubo un aumento explosivo de *C. glabrata*, siendo actualmente una de las principales especies de *Candida no albicans* causante de infecciones invasoras.

## *Introducción*

La identificación mediante pruebas morfológicas y bioquímicas o kits comerciales de las especies más frecuentes es satisfactoria. Sin embargo, al aplicar técnicas moleculares, se han encontrado especies crípticas dentro de algunas especies como *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. La identificación de los hongos a nivel de especie es indispensable para que el antifúngico administrado tenga la máxima actividad frente al patógeno causante, consiguiendo un correcto manejo de la infección. La especie de *Candida* spp. aislada en el hemocultivo puede determinar la existencia de una serie de factores relacionados.

## *C. albicans*

Las candidemias por *C. albicans*, permanecen de manera general como primera causa de fungemia, al seguir siendo la especie más comunmente aislada, aunque la presencia en hemocultivos de otras especies de *Candida* no *albicans* se ha incrementado notablemente (Pemán et al, 2012). En ello influye el grupo de población estudiado. Así en población pediátrica, *C. albicans* ocupa un segundo lugar en los aislamientos, detrás de *C. parapsilosis* sensu stricto, no así en neonatos donde existe predominio de *C. albicans* (García-Rodríguez et al, 2013). Además, se han descrito brotes nosocomiales por *C. albicans* o *C. parapsilosis* en unidades de neonatos que pueden condicionar el patrón local de distribución.

En cuanto a los factores predisponentes para desarrollar candidemia, se ha analizado una posible asociación con la especie aislada. Así la prematuridad y la presencia de catéteres se asocian con un mayor riesgo de candidemia por *C. albicans*. Algunos autores han

señalado que en áreas de cuidados críticos hay más riesgo de desarrollar candidemia por *C. albicans* (Cheng et al, 2005).

En general la distribución de especies puede variar de unas áreas a otras dentro de un mismo hospital, reflejando su actividad (Davis et al, 2007). Este hecho refuerza la necesidad de un conocimiento preciso de la epidemiología de las especies aisladas no solo de cada CCAA o cada hospital, sino también de cada unidad asistencial.

### *C. parapsilosis*

Las candidemias por *C. parapsilosis* son frecuentes, variando la incidencia de unos hospitales a otros. *C. parapsilosis* se asocia con el 25% de las infecciones por *Candida* en los hospitales europeos, siendo actualmente la segunda especie del género *Candida* en el número de aislamientos en nuestros hospitales. La incidencia de infecciones por *C. parapsilosis* varía ampliamente de unos estudios a otros, en base fundamentalmente al tipo de población estudiada. En hospitales infantiles alcanza hasta un 60% de las candidiasis aisladas (Durán et al, 2005; Rodríguez et al, 2006) mientras que en adultos los datos son inferiores encontrándose referencias que hablan de un 20-30% (Almirante et al, 2006; Pfaller et al, 2008). *C. parapsilosis* se asocia a menudo con un origen en los catéteres vasculares y tiene una mortalidad inferior a otras especies de *Candida*. La alta incidencia de *C. parapsilosis* en la población pediátrica ha sido descrita en numerosos estudios epidemiológicos (Pfaller et al, 2004; Hajjeh et al, 2004)

A diferencia de las otras especies de *Candida*, *C. parapsilosis* se ha

## *Introducción*

aislado de las manos del personal sanitario, lo que parece ser es el resultado de subsecuentes infecciones nosocomiales asociadas a catéter. Su capacidad de formar biocapas le confiere una característica de supervivencia y de resistencia a antifúngicos (Kuhn et al, 2004).

Las cepas de *C. parapsilosis* se clasificaban en Gupos I, II y III (Lin et al, 1995). En 2005, basándose en la secuencia de DNA, se diferenció *C. parapsilosis* en tres especies morfológica y fisiológicamente indistinguibles: *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (Tavanti et al, 2005). El perfil de sensibilidad de estas especies a los antifúngicos no difiere de manera significativa del de *C. parapsilosis*, aunque hay datos epidemiológicos que tradicionalmente se atribuían a *C. parapsilosis* y pueden ser desplazados hacia las nuevas especies (Blanco-Blanco et al, 2013).

## *C. tropicalis*

Las infecciones por *C. tropicalis* son consideradas emergentes, dando origen entre otros procesos, a candidemia y candidurias nosocomiales (Galán-Ladero et al, 2013). Su frecuencia varía ampliamente de unos hospitales a otros, encontrándose datos que fluctúan desde un 2,4% a un 37,1% (Pfaller et al, 2012). Las candidemias por *C. tropicalis* se suelen asociar a pacientes con cáncer, con cateterismos prolongados o a tratamientos previos con antimicrobianos de amplio espectro (Negri et al, 2010). *C. tropicalis* presenta características similares a *C. albicans* recientemente descritas como la capacidad de filamentación (Silva et al, 2011) y la capacidad de conjugación (Porman et al, 2011).

*C. glabrata*

Las infecciones por *C. glabrata* han aumentado notablemente en la última década, constituyendo en la actualidad una causa importante de morbi-mortalidad. Esta especie es muy ubicua en la cavidad oral, vagina, piel y otras áreas anatómicas de sujetos sanos. Es una levadura que se aísla cada vez con mayor frecuencia en vulvovaginitis, infección del tracto urinario e infecciones sistémicas graves en enfermos críticos, inmunodeprimidos y neoplásicos (Almirante et al, 2005; Trick et al, 2002).

El interés clínico de *C. glabrata* radica especialmente en su resistencia a los derivados azólicos (Sanguinetti et al, 2005; Ruan et al, 2008). Posaconazol es un nuevo triazol de segunda generación de estructura similar a itraconazol, con amplio espectro sobre levaduras y hongos filamentosos; frente a *C. glabrata* posaconazol parece presentar una actividad inferior a la observada en otras especies (Blanco et al, 2009).

Otras especies muy relacionadas con *C. glabrata* se han descrito recientemente: *C. nivariensis* y *C. bracarensis*. Ambas dan colonias blancas en CHROMagar *Candida* medium, y tienen patrones de asimilación de carbohidratos diferentes (glicerol, xylose, *N*-acetylglucosamina, y trehalosa), aunque aún no se contempla su identificación en la base de datos de API 20C system (Bishop et al, 2008).

## *Introducción*

### *C. krusei*

Es una levadura oportunista multirresistente que cada vez con mayor frecuencia se aísla en hemocultivos de pacientes con leucemia, en pacientes adultos neutropénicos con cáncer y en trasplantados de médula ósea. Esto posee una importante relevancia clínica y terapéutica, dada su resistencia intrínseca a fluconazol, en algunos casos combinada con una disminución de la sensibilidad a 5-fluorocitosina y anfotericina B.

A pesar de estas características, se han realizado pocos estudios epidemiológicos y sus mecanismos de virulencia no son muy conocidos.

### *C. lusitaniae*

Es una especie que rara vez se aísla en clínica humana, aunque suele tener importante repercusión clínica debido a su posibilidad de desarrollar resistencia a anfotericina B durante el tratamiento (Bariola & Saccente, 2008).

## **3- FACTORES DE VIRULENCIA DE *CANDIDA* SPP.**

La capacidad de los hongos para adherirse y colonizar tejidos humanos y plásticos (implantes, catéteres...) utilizados en el tratamiento de la enfermedad infecciosa está considerado un importante factor de virulencia (Koga-Ito et al, 2006). La capacidad de

colonización ha recibido especial atención como mecanismo de patogenicidad (Sullivan et al, 2004), estando relacionada con características de la capa externa, como hidrofobicidad de la superficie celular, capacidad de adherencia a materiales inertes y formación de biocapa.

### **Formación de biocapa**

La capacidad de formación de biocapa de los microorganismos se considera un importante factor de virulencia (Perumal et al, 2007), ya que los capacita para dar lugar a infecciones asociadas a dispositivos médicos (catéteres, prótesis, marcapasos, sondas, etc.), responsables de complicaciones severas y de difícil erradicación al ofrecer una mayor resistencia a antimicrobianos y permitir la persistencia de células viables dentro de la biocapa después del tratamiento. Es un mecanismo de patogenicidad complejo en el que intervienen factores como adhesión, crecimiento y variaciones morfológicas. La formación de biocapas sobre superficies mucosas así como sobre la superficie de implantes, prótesis y catéteres es un proceso que va a facilitar infecciones sistémicas, ya que los depósitos en la superficie de catéteres venosos centrales, favorecen la rápida diseminación de la infección (Douglas, 2003).

Las biocapas están formadas por los microorganismos adheridos a las superficies, embebidos en una matriz extracelular (Figura 1). Esta matriz está formada por hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fósforo y ácidos nucleicos, está altamente hidratada y confiere a la biopelícula un aspecto gelatinoso. La matriz es el soporte principal de la

## Introducción

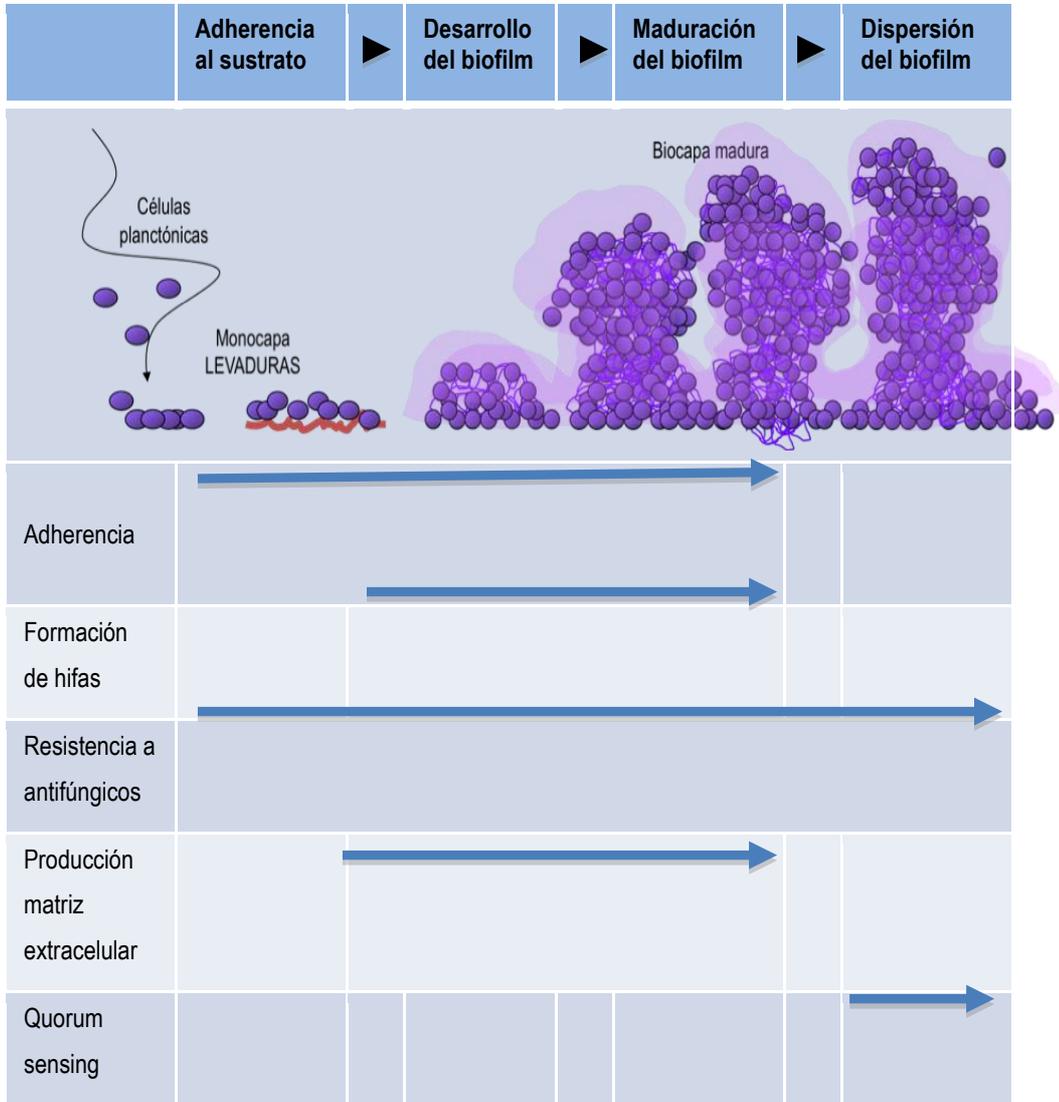
biopelícula y su producción aumenta con el tiempo de maduración. Su composición varía según la especie: así, en las biopelículas de *C. albicans* está presente de forma mayoritaria la glucosa (32%), mientras que en las de *C. tropicalis* abunda la hexosamina (27%) (Al-Fattani & Douglas 2006)

Se ha demostrado en *Candida albicans*, que era considerada asexual, la **capacidad de conjugación** (Hull & Johnson, 1999; Finkel & Mitchell, 2011), determinando el locus *MTL* (mating-type-like) dicha capacidad.

Se ha encontrado relación entre la formación de biocapa y la estructura del locus *MTL*. Las cepas homocigotas, *MTLa/a* y *MTL $\alpha$ / $\alpha$* , pueden originar colonias Opaque con capacidad de conjugación, mientras que las cepas heterocigotas *MTLa/ $\alpha$*  no pueden hacerlo. El proceso de mating es inducido por feromonas que secreta la levadura homocigota.

La formación de biofilm, donde existen condiciones de anaerobiosis, podría facilitar la conjugación al estabilizar la forma Opaque. Por otro lado el tipo de biofilm formado por las células White y por las células Opaque presenta diferencias en su estructura (Yi et al, 2011).

Es necesario establecer unas condiciones de trabajo muy definidas para valorar la capacidad de formación de biocapa en diferentes especies de *Candida*, poder realizar estudios comparativos así como estudiar la repercusión sobre la misma de la hidrofobicidad de la superficie celular y de la capacidad de adherencia a plástico.



**Figura 1.** Desarrollo de una biocapa: Diferentes procesos y fases (Adaptada de Blankenship & Mitchell, 2006).

## **Capacidad de adherencia**

La capacidad de adherencia, favorece la colonización y posterior infección, y está influida inicialmente por diversos parámetros tanto de la pared celular de las levaduras como de la propia superficie (Imbert et al, 2003). La adhesión ocurre en varias fases. La primera, inespecífica, basada en fuerzas de atracción repulsión entre las que destaca la hidrofobicidad de las superficies (Jabra-Risk et al, 2001), y a continuación se establecen interacciones específicas entre las levaduras y los receptores de las células epiteliales (Vidotto et al, 2003).

Constituye el primer paso para el establecimiento de la biocapa y la **hidrofobicidad de la superficie celular** (HSC) de las levaduras juega un papel crucial en la primera fase de la adherencia, existiendo una relación directa entre las características hidrofóbicas de la pared celular de las levaduras y su **capacidad de adherencia a plástico** (Blanco et al, 1997). La mayor capacidad de adhesión de las moléculas más hidrofóbicas está en relación con un aumento de la energía libre de superficie; si el cambio de energía es negativo la reacción transcurre espontáneamente y no requiere receptores específicos. Por tanto, los perfiles de adherencia dependerán de las características del microorganismo y de la superficie a considerar.

Una vez adheridos, muchos microorganismos son capaces de formar biocapa estableciendo un sistema de vida que les protege y favorece su supervivencia. Las condiciones en las que crecen en esta biocapa suelen ser diferentes a las ensayadas in vitro.

**Las adhesinas** son proteínas responsables de la adhesión específica a los receptores celulares. Están localizadas en la superficie de la pared celular de la levadura, y participan en cambios en la formación de colonias y en el desarrollo de biocapas entre otros procesos.

Las adhesinas Als constituyen una familia de proteínas de la pared celular, de las que se han descrito 8 miembros en *C. albicans*, 16 en *C. tropicalis* y 5 en *C. parapsilosis* (Butler et al, 2009). Se asocian con la virulencia, estando principalmente relacionadas con la adhesión al epitelio del huésped, agregación y formación de biofilm (Dranginis et al, 2007). Se ha observado relación entre la expresión de adhesinas en las hifas y la formación de biocapas (Nobile et al, 2006). Los genes *ALS* (Agglutinin-Like Sequence) codifican proteínas de la superficie celular implicadas en los mecanismos de adhesión; pueden ser regulados por condiciones ambientales (Verstrepen & Fink, 2009). Als1 y Als3, están implicadas en la formación de las biocapas (Nobile et al, 2008). Existen numerosos trabajos realizados con *C. albicans*, pero muy pocos en especies de *Candida* no-*albicans*. La utilización de la PCR a tiempo real permite realizar su cuantificación (Nailis et al, 2010).

### **Hidrofobicidad de la superficie celular**

La pared celular de *Candida* spp. es una estructura compleja y variable según las condiciones ambientales y según la fase vital del hongo (levadura/filamento). Según la especie y dependiendo de esos factores, la hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) presenta una gran variabilidad.

Los estudios realizados indican que las interacciones hidrofóbicas pueden jugar un papel en la adherencia de *Candida* spp. a plásticos, pero el grado de intervención dependerá de las características de la superficie tanto del plástico como del hongo (Sánchez-Sousa et al, 2001) y de la presencia de sustancias que las altere. El mecanismo operativo o dominante dependerá del estado hidrofóbico de la pared celular del hongo, así como de las características de la superficie del sustrato.

Las condiciones medioambientales, al igual que las condiciones de crecimiento del hongo, influyen en su adhesividad. Las condiciones de cultivo, en relación al medio utilizado, a la temperatura de incubación, el tipo de tampón etc., son determinantes para valorar la capacidad de adherencia, lo que podría explicar los resultados variables encontrados en la literatura (Blanco et al, 1997)

Existen estudios referentes a la relación entre HSC de *C. albicans* y adhesión a acrílicos (Samaranayake et al, 1995). Aunque los resultados obtenidos respecto a la relación entre HSC y adhesión a poliestireno son dispares, muchos autores coinciden que la adhesión a acrílicos de levaduras de *Candida* es mayor si los niveles de HSC son altos (Blanco et al, 2006). Cuando las células crecen a 37<sup>o</sup> C con altos niveles de glucosa, galactosa o sucrosa, aumenta la adherencia a acrílicos. Esto puede ser debido a que los niveles elevados de galactosa o glucosa inducen altos niveles de HSC en *C. albicans* (Hazen, 1988).

El conjunto de resultados sugiere que la HSC está involucrada en la adhesión de *C. albicans* a acrílicos. Estas diferencias pueden

explicarse considerando el grado de hidrofobicidad de los sólidos que interaccionan y a la diferente metodología utilizada.

### **Transición dimórfica**

Se define este proceso, como el paso de levadura a hifa a través de la formación de tubo germinal, siendo este, un proceso reversible y multifactorial, donde participan factores como pH, temperatura, la fuente de carbono utilizada o la presencia de hemina (Jacobsen et al, 2012).

En ocasiones y fundamentalmente en tejidos infecciosos, *C. albicans* adquiere formas estructurales filamentosas, las hifas, de longitud variable. La forma filamentosa es una estructura microscópica tubular, con múltiples unidades celulares divididas por septos, que pueden surgir a partir de blastosporas o hifas ya existentes y que presentan un crecimiento apical. También se pueden observar pseudohifas, que son células alargadas de levaduras que permanecen unidas entre sí.

La capacidad de germinación era una característica atribuida exclusivamente a *C. albicans*. Actualmente se admite en otras especies como *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*. La transición levadura a hifa ha sido muy estudiada, ambas formas tienen su protagonismo en la colonización e infección e influyen sobre el resto de factores de virulencia (Jacobsen et al, 2012).

Las hifas son **más hidrofóbicas** que las levaduras, detectándose una alta composición en proteínas hidrofóbicas en la capa fibrilar

## Introducción

externa de la pared celular de las hifas y una alta adherencia a plásticos (Tronchin et al, 2008). Se ha demostrado relación entre la formación de tubo germinal y el **incremento de la adhesión** a células epiteliales (Kimura & Pearsall, 1980), en parte por modificar la composición antigénica de la superficie del hongo y en parte porque la transformación en hifas pasa por un proceso de cambio morfogénico, que confiere a las mismas mayor capacidad de adhesión (Chaffin et al, 1998).

La morfogénesis es también importante en la maduración de las biocapas, dando origen a formaciones más robustas frente a biofilm más rudimentarios originados por levaduras mutantes incapaces de filamentar (Blankenship & Mitchell, 2006).

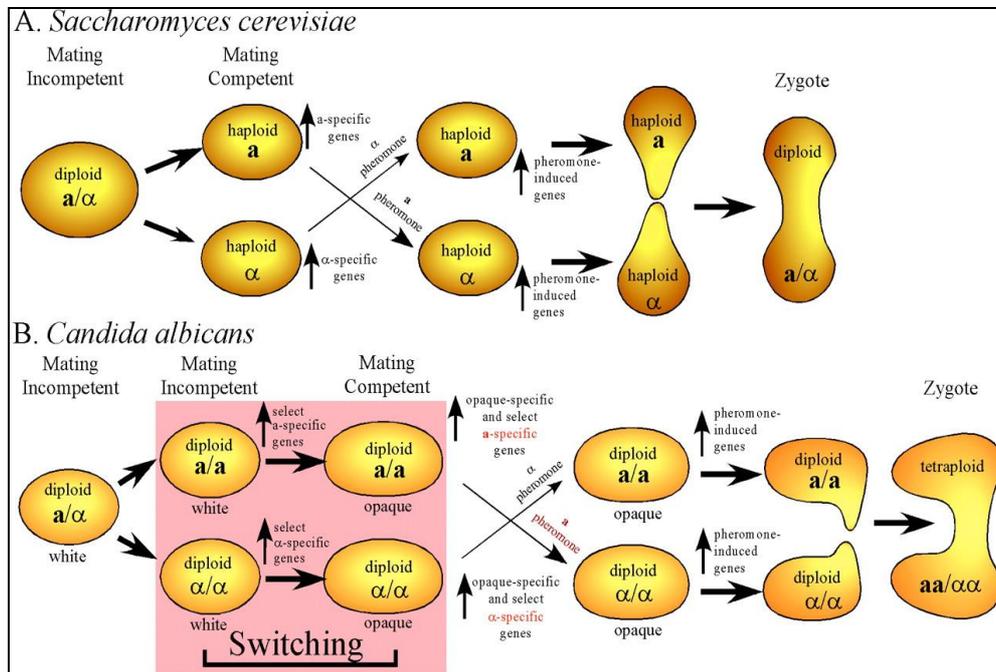
## Capacidad de conjugación

La existencia en *C. albicans* del locus *MTL* (mating type-like) se describió por Hull & Johnson (1999) y posteriormente en *C. tropicalis* por Porman et al (2011). El locus *MTL* controla el switching White-Opaque que solo se producirá en las células homocigotas. Así, de manera similar a lo que ocurre en *Sacharomyces cerevisiae*, las cepas homocigotas *MTL* a/a o bien *MTL* alfa/alfa pueden conjugarse, siempre que hayan evolucionado a células opacas (switching White-Opaque, Figura 2). Para que las células heterocigotas puedan conjugarse, deben convertirse en homocigotas en el locus *MTL*.

Desde el descubrimiento del switching White-Opaque en *C. albicans* (Slutsky et al, 1987), se admite que es un proceso que se produce de forma espontánea y a una frecuencia relativamente baja, que permite se mantengan de forma estable las dos fases, asegurando en una población determinada la presencia de células de la fase opuesta, que pueden adaptarse mejor a nuevos nichos durante una infección. El estudio de la expresión de genes implicados, mejorará el conocimiento y permitirá establecer pautas para el control de su expresión y actividad (Finkel & Mitchell, 2011).

La mayoría de los aislados clínicos de *C. albicans* y *C. tropicalis* son heterocigotas en el locus MTL a/alfa y contienen *MTLa* en un cromosoma y *MTL* alfa en el homólogo. (Magee & Magee, 2004).

En un trabajo reciente, Xie et al (2013) demuestran la existencia de switching White-Opaque en un tercio de las cepas de *C. albicans* heterocigotas de su estudio, aunque las células opaque de *MTLa/alfa* heterocigotas eran poco estables y mating-incompetentes.



**Figura 2.** Mating en *Saccharomyces cerevisiae* y switching y mating en *C. albicans* (Soll et al, 2003).

## Producción de enzimas

Las especies del género *Candida* pueden producir diferentes enzimas hidrolíticas, variando la actividad enzimática de unas a otras.

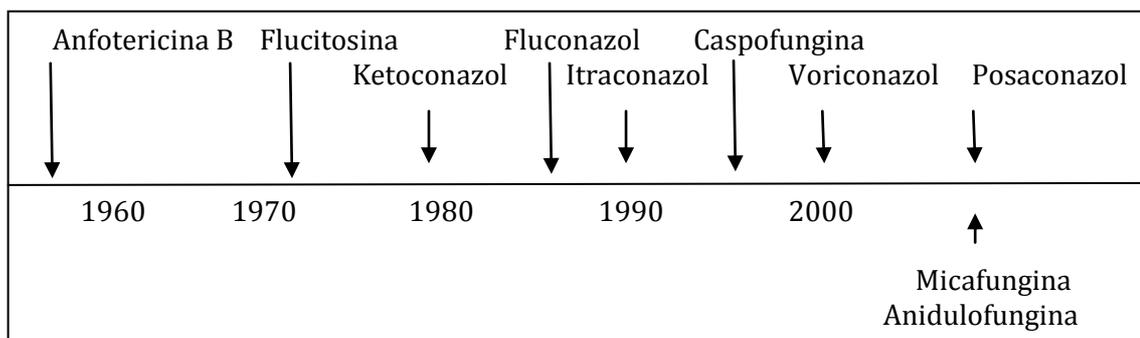
**Las enzimas aspartil proteasas secretadas (Saps)** constituyen una familia de hasta 11 miembros, dependiendo de la especie. Actúan como factores de virulencia facilitando la colonización e invasión debido fundamentalmente a su capacidad de dañar los tejidos y degradar material del hospedador, principalmente defensas inmunológicas y estructurales (Silva et al, 2011). *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son menos productoras de Saps, comparadas con *C. albicans* (Sacristán et al, 2011; Galán-Ladero et al, 2010; Asensio et al, 2005). Estas enzimas se agrupan en familias de genes/proteínas, y la expresión de las isoenzimas dependerá de la especie y de las condiciones ambientales. Su número es mayor en los genomas de los patógenos, principalmente en las especies más patógenas como *C. albicans* así como en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Butler et al, 2009).

**La actividad hemolítica** es también diferente según la especie (Luo et al, 2001). Se puede diferenciar una hemólisis tipo beta presente en *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* y *C. tropicalis* y en menor grado en *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*; hemólisis alfa en *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* y *C. utilis*, mientras que *C. parapsilosis* no produce ningún tipo de hemólisis. Luo et al (2001) indican que la actividad hemolítica debe ser estudiada por una posible utilidad diagnóstica.

#### 4- ANTIFÚNGICOS

Las infecciones por *Candida* spp. constituyen un importante problema principalmente en pacientes críticos y en inmunodeprimidos, utilizándose profilaxis con fluconazol para reducir el riesgo de infección fúngica (Brion et al, 2007) lo que ha originado la selección de cepas resistentes.

Hasta hace unos años la anfotericina B se consideraba tratamiento de elección de las infecciones fúngicas invasivas. La introducción inicialmente de los azoles, y con posterioridad las equinocandinas (Figura 3), y formulaciones lipídicas de la anfotericina B, han modificado la pauta de tratamiento de las candidemias.



**Figura 3.** Evolución histórica de los antifúngicos (Catalán & Montejo, 2006).

Los últimos datos epidemiológicos indican que la susceptibilidad de las distintas especies de *Candida* spp. a los antifúngicos es predecible (Eggiman et al, 2003; Pfaller et al, 2005; Pappas et al, 2009).

El tratamiento de las infecciones sistémicas en general requiere fármacos de amplio espectro y que provoquen el menor número de efectos secundarios al paciente, al ser enfermos generalmente en estado crítico o con graves inmunodeficiencias. Para el tratamiento de las micosis sistémicas se han descrito los siguientes fármacos que se engloban en tres familias, los polienos, cuyo principal representante es la anfotericina B, los azoles y el grupo más reciente, las equinocandinas.

## POLIENOS

**Anfotericina B.** Su mecanismo de acción se basa en la unión al ergosterol de las membranas plasmáticas, originando poros que aumentan la permeabilidad y producen la destrucción celular. Presenta un gran número de efectos secundarios.

El antagonismo con los azoles es frecuente si la administración del azol precede a la del polieno, pero no suele observarse si se administran al mismo tiempo o el tratamiento se inicia con el polieno y se sigue con el azol.

La resistencia a la **anfotericina B** de las diferentes especies de *Candida* es extraordinariamente rara (Eggiman et al, 2003).

*C. lusitaniae* y *C. guilliermondii* presentan la capacidad de desarrollar resistencia a anfotericina B (Mensa et al, 2013).

## ANTIFÚNGICOS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

**Flucitosina.** Es un derivado fluorado de citosina que actúa como un profármaco transformándose en el organismo en 5-fluorouracilo, inhibidor no competitivo de la enzima timidilato sintetasa, bloqueando la síntesis de DNA.

## AZOLES

Este grupo interfiere en la síntesis del ergosterol al inhibir el enzima C4- $\alpha$ -desmetilasa, encargada de transformar lanosterol en ergosterol. En este grupo se incluyen fluconazol, itraconazol y voriconazol, para tratamiento de micosis sistémicas. Su efecto es fungistático.

**Fluconazol.** Molécula pequeña con buena absorción. Al ser soluble en agua tiene mejor farmacocinética: Se une a proteínas plasmáticas, atraviesa barrera hematoencefálica, se elimina en orina. Fármaco principal en la profilaxis y tratamiento de las infecciones por hongos (pacientes VIH).

En nuestro entorno la presencia de cepas resistentes o sensible dosis-dependiente (SDD) es aún baja aunque un incremento de los niveles de sensibilidad a fluconazol comienza a detectarse. En 1999, en una serie de Pfaller et al., el 100% de las cepas de *C. albicans* eran sensibles a fluconazol. En 2007 Laverdiere et al., encuentran el 99% de las cepas sensibles, el 0,5% de cepas resistentes y el 0,5% sensible dosis-dependiente (SDD) mientras que Guinea et al. (2008) en el

Hospital Gregorio Marañón (Madrid) encuentran hasta un 4,59% de cepas de *Candida* (*C. albicans* y *C. glabrata*) resistentes a fluconazol.

**Itraconazol.** Triazol de buena absorción oral. Buena farmacocinética: se une a proteínas plasmáticas y afinidad 100 veces superior al CP-450 de las células fúngicas. Junto a fluconazol es fármaco de elección en tratamiento de las infecciones sistémicas por hongos: baja toxicidad y vía oral.

**Voriconazol.** Presenta un mayor espectro de acción dentro de los azoles.

La aparición de **resistencia a los azoles** puede ser debida a mutaciones, a una sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis del ergosterol o a la presencia de efectivas bombas de achique. En los últimos años se ha observado un claro aumento de la frecuencia de candidemias causadas por especies con sensibilidad disminuida a los azoles. A diferencia de lo que ocurre con las bacterias, el hecho de que la cepa de *Candida* proceda de un paciente ingresado en una unidad de cuidados intensivos no implica una mayor resistencia a los azoles sino que este hecho se asocia más a la especie de *Candida* causante de la candidemia:

*C. krusei* es intrínsecamente resistente a fluconazol (Pfaller et al, 2005).

*C. glabrata* muestra unas tasas de resistencia a los azoles superior al 10% en los aislados en hemocultivos (Pfaller et al, 2004)

## Introducción

Rustad et al (2002) han investigado una posible asociación entre la aparición de resistencia a los azoles y la configuración genética de *C. albicans*, desarrollando la hipótesis que las cepas *MTL*-homocigotas puedan ser intrínsecamente resistentes o bien ese carácter resistente radique en un gen ligado al *MTL* en el cromosoma 5 de *C. albicans*.

## EQUINOCANDINAS

Son antifúngicos que bloquean la síntesis de la pared del hongo. Son inhibidores de quitina sintetasa o beta-glucano sintetasa. Las equinocandinas, anidulofungina, caspofungina y micafungina, constituyen un nuevo grupo de antifúngicos con buena actividad fungicida y fungistática frente a la mayoría de especies de *Candida*, siendo muy utilizadas en candidiasis invasivas. (Pfaller et al, 2010). Su mecanismo de acción es muy específico, al actuar directamente sobre el 1,3- $\beta$ -D-glucano, componente de la pared de los hongos, provocando inestabilidad osmótica, e impidiendo de éste modo el crecimiento y la replicación celular.

**Caspofungina.** Es el primer representante de la familia de las equinocandinas. Tiene potente acción frente *C. albicans* y otras especies de *Candida*, incluidas *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* y *C. lusitaniae*, mientras que *C. parapsilosis*, *C. famata* y *C. guilliermondii* son menos sensibles (Mensa et al, 2013). Su eficacia ha sido comparada con la anfotericina B y la flucitosina.

## OTRAS TERAPIAS

La utilización de anticuerpos monoclonales recombinantes dirigidos frente a antígenos específicos es una línea de investigación abierta. El efungumab (Mycograb®) actúa uniéndose a la proteína HSP 90 con sinergia asociada a anfotericina B in vitro frente a un amplio espectro de especies de *Candida*. Recientemente se cuestiona la efectividad de esta molécula en asociación con la anfotericina B (Richie et al, 2012).

### **Elección de antifúngico en una candidemia**

En una candidemia el tratamiento de elección cuando aun no está identificada puede hacerse con una equinocandina.

Si la infección es leve, no existe neutropenia ni afección primaria o metastásica de un órgano y el paciente no ha recibido un azol durante el último mes, ni tiene antecedentes de colonización por *C. krusei* o *C. glabrata*, en lugar de la equinocandina el tratamiento puede iniciarse con fluconazol.

Una vez identificada la especie, si esta es sensible a fluconazol -*C. albicans*, *C. tropicalis* o *C. parapsisolis*- y la evolución es favorable el tratamiento con fluconazol puede continuarse.

La infección de *C. krusei* debe tratarse con una equinocandina, con voriconazol o con una forma lipídica de anfotericina B.

## Introducción

*C. lusitaniae* puede hacerse resistente a anfotericina B; es preferible tratar con una equinocandina o con fluconazol.

El 10-20% de las cepas de *C. glabrata* son resistentes a fluconazol o puede presentar resistencia durante el tratamiento.

Para el **estudio de sensibilidad** existen actualmente dos patrones diferentes, ambos basados en métodos de microdilución. Uno de ellos elaborado por el “*European Committee on Antibiotic Susceptibility testing*” (EUCAST) y el otro elaborado por el “*Clinical Laboratory Estándar Institute in the U.S.*”. (CLSI, former NCCLS).

Numerosos estudios han demostrado que ambos métodos son comparables (Tabla 1)

**Tabla 1.** Diferencias entre la metodología EUCAST y CLSI

<b>Recomendaciones</b>	<b>CLSI M27-A3</b>	<b>EUCAST EDef 7.2</b>
<i>Concentración de glucosa en RPMI 1640</i>	0.2%	2%
<i>Forma del pocillo de la placa de microtitulación</i>	Fondo redondo	Fondo plano
<i>Tamaño del inóculo</i>	0.5-2.5×10 <sup>3</sup>	0.5-2.5×10 <sup>3</sup>
<i>Tiempo de incubación</i>	48 h*	24 h
<i>Lectura</i>	Visual	Espectrofotométrica
<i>Anfotericina B</i>	Claro y disminución prominente	Menor concentración que inhibe al menos el 90%
<i>Azoles y equinocandinas</i>	Disminución prominente	Menor concentración que inhibe al menos el 90%

\*Excepto para las equinocandinas que se leen a las 24h

## Sensibilidad a antifúngicos y biocapas

**La resistencia de las biocapas** de *Candida* a los antifúngicos es un fenómeno multifactorial (Quindós et al, 2009). La diferente sensibilidad entre las levaduras planctónicas y las que crecen en biofilm, es debido no solo al difícil acceso de los antifúngicos, sino también a la coexistencia en el biofilm de diferentes grupos de población con menor susceptibilidad en base a su tasa de crecimiento etc. La composición de la matriz puede ser causa del distinto grado de penetración de los antifúngicos. Se ha comprobado que la difusión de la 5-fluorocitosina y fluconazol es más lenta en las biopelículas de *C. tropicalis* que en las de *C. albicans* (Douglas, 2002).

Según Park et al (2013) los biofilm originados a partir de células Opaque son mas permeables y por lo tanto más sensibles.

Entre los factores que intervienen hay diferentes mecanismos como:

- la barrera física formada por la matriz polimérica extracelular.
- la presencia de células persistentes, tolerantes ó durmientes, con menor actividad metabólica.
- los distintos fenotipos celulares dentro de la biopelícula.
- la sobreexpresión de diferentes genes asociados con los mecanismos moleculares de resistencia a los antifúngicos, por ejemplo genes que codifican bomba de expulsión (MDR1, CDR1 y CDR2) importante mecanismo de resistencia a los azoles (Ramage et al, 2001).
- un microambiente pluricelular poco propicio para la actividad de los antifúngicos.

## *Introducción*

Establecer el orden de frecuencia, determinar el perfil de resistencia y conocer los determinantes de patogenicidad de las diferentes especies de *Candida*, son parámetros de gran importancia para poder establecer un protocolo de tratamiento empírico, que así mismo valore el papel de las biocapas en la resistencia y en el mantenimiento de la infección. Un mejor conocimiento de la capacidad de virulencia de las distintas especies, facilitará el control de estos procesos infecciosos de alta morbi-mortalidad.

*Objetivos*

## **OBJETIVOS**

## *Objetivos*

Las levaduras del género *Candida* son comensales humanos muy ubicuas, pudiendo causar infección oportunista en diferentes localizaciones. La transición de comensal a patógeno no es atribuible solo a alteraciones del hospedador, sino también a la presencia de factores de virulencia, selectivamente expresados bajo condiciones predisponentes.

Las candidiasis invasoras y diseminadas por vía hematógena se han incrementado notablemente y constituyen procesos infecciosos graves principalmente en pacientes con factores de riesgo asociados.

Después de revisar el estado actual del tema y comprobar el interés del control y prevención de las infecciones fúngicas, y que con frecuencia se obtienen datos contradictorios en cuanto a factores de virulencia de las diferentes especies, nos planteamos la realización de este trabajo con el objetivo de estudiar las características epidemiológicas y microbiológicas de episodios de candidemia, en el Hospital Puerta del Mar de Cádiz, durante de dos años, valorando en las especies aisladas su sensibilidad a diferentes antifúngicos y la presencia de diferentes factores de virulencia.

El mejor conocimiento de los factores que contribuyen al establecimiento de una candidiasis, ayudará a prevenir el desarrollo de estas infecciones y facilitará el control de dicho proceso infeccioso.

## *Objetivos*

Este trabajo se ha diseñado con los siguientes objetivos:

I) Estudiar los aspectos epidemiológicos de las candidemias, en un periodo de dos años (2008-2009) en el Hospital Puerta del Mar (Cádiz), aplicando un protocolo que permita valorar los factores de riesgo predisponentes y la incidencia de las distintas especies de *Candida* spp.

II) Estudiar la sensibilidad a antifúngicos de las especies aisladas.

III) Valorar la presencia de factores de virulencia en las cepas aisladas:

Hidrofobicidad de la superficie celular (HSC)

Capacidad de adherencia a plástico

Formación de biocapa

Expresión de adhesinas Als-1

Actividad aspartil proteasa

IV) Analizar el locus *MTL* (MatingType Like) comprobando la naturaleza homocigota/heterocigota, en los aislados clínicos de especies con capacidad de conjugación como son *C. albicans* y *C. tropicalis*.

V) Relacionar los factores estudiados, mediante estudio estadístico.

## *Objetivos*

### **3- MATERIAL Y MÉTODOS**

## *Material y Métodos*

## **1. EQUIPOS Y APARATOS**

- Analizador ATB Plus (API System, BioMérieux SA, Marcy L'Étoile, Francia), para lectura de galerías de 32 pocillos para identificación de levaduras.
- Autoclave Autotester modelo 437G (Selecta, Madrid, España) para esterilización de material y medios de cultivo a 121° C y una atmósfera de presión durante veinte minutos.
- Balanzas analíticas de precisión mod. 1106 y mod. 2842 (Sartorius, Goettingen, Alemania) y Precisa modelo 600-C (Goettingen, Alemania).
- Cámara de fotografía CCD (Hitachi, Tokio, Japón).
- Centrífuga Centronic modelo S-577 (Selecta, Madrid, España) y Sorvall modelo TC6 (Dupont, Newtown, USA).
- Espectrofotómetro mod. Spectronic-20 (Bauch & Lomb, Nueva York, USA) y Helios ε (ThermoSpectronic, Rochester N.Y., USA).
- Estufa refrigerada Revco Scientific mod. RI-23-1060 (Ashville, USA).
- Estufa de 37°C, modelo G25-Incubator SOC (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA).
- Equipo Ribolyser (Hybaid Ltd, Teddington, Inglaterra).
- Incubador Memmert mod. 850 (Schwabach, Alemania).
- Incubador de CO<sub>2</sub> Revco Scientific mod. Ultima (Ashville, USA).

### *Material y Métodos*

- Lector multicanal de densidades ópticas Anthos 2020 (Anthos Labtec Instrument, Wals, Austria), acoplado a un software ADAP plus, diseñado para el manejo de datos con este dispositivo.
- Microscopio óptico mod. Reichter Diavar (Leica, Wetzlar, Alemania), suplementados con un ocular micrométrico Zeiss mod. CPI W 10X.
- Sonificador para suspensiones mod. Ultrasons P (Selecta, Madrid, España).
- Termociclador convencional PCR Sping (Hybond, Amersham, Inglaterra).

## **2. MEDIOS DE CULTIVO**

### **Medios habituales**

- Medio de Sabouraud agar glucosado al 4% (Merck, Darmstadt, Alemania).
- CHROMOagar Candida® (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia).
- Galerías de identificación ID 32C (API, BioMerieux).
- Medio de Sabouraud líquido (Panreac, Barcelona, España).
- Medio de Yeast Carbon Base (Difco, Detroit, Michigan, USA).
- Medio Yeast Nitrogen Base (Difco, Detroit, Michigan, USA).

### **Medios especiales**

#### **– Medio YCB-BSA**

Utilizado para la medida de la actividad aspartil proteasa en medio sólido. Fórmula para 100 mL:

- 1,17 g de medio de Yeast Carbon Base (Difco, Detroit, Michigan, USA).
- 0,01 g de extracto de levadura (Difco, Detroit, Michigan, USA).
- 0,2 g de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St Louise, USA).

Se preparó un concentrado con estos componentes en 10 mL de agua, se esterilizó por filtración usando filtros millipore de 0,45 µm de diámetro de poro y se le añadió a un matraz esterilizado en autoclave que contenía 90 mL de agua destilada y 1,5 g de agar bacteriológico (Panreac, Barcelona, España). Se repartió en placas petri de 90 mm a razón de 10 mL de medio por placa.

#### **- Medio Sabouraud-sangre**

Se utilizó para la medida de la actividad hemolítica en medio sólido. Fórmula para 100 mL:

- 6,5 g de medio de Sabouraud agar glucosado al 4% (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 7 mL de sangre de carnero desfibrinada (Biocult laboratorios, Madrid, España).
- 100 mL de agua destilada.

Se preparó en un matraz que se esterilizó en autoclave a 121<sup>o</sup> C durante 15 minutos y al que se añadió posteriormente, una vez enfriado, sangre de carnero en concentración final del 7%. Se repartió en placas petri de 90 mm a razón de 10 mL de medio por placa y se dejó solidificar.

– **Medio RPMI 1640**

Se utilizó para el estudio de la hidrofobicidad de la superficie celular, de la capacidad de adherencia y para la formación de biocapa. Fórmula para 100 mL:

- 1,04 g de RPMI-1640 Medium (Izasa, Barcelona, España).
- 2 g de D-Glucosa-monohidrato (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 3,45 g de Tampón MOPS (Sigma, St Louis, USA).

Se preparó un concentrado con estos componentes en 10 mL de agua, se esterilizó por filtración usando filtros millipore de 0,45 µm de diámetro de poro y se le añadió agua previamente esterilizada en cantidad suficiente para obtener un volumen final de 100 mL. Se repartió en matraces de 250 mL previamente esterilizados a razón de 25 mL por matraz.

**3. REACTIVOS Y OTROS COMPONENTES**

- Agar bacteriológico tipo europeo (Panreac, Barcelona, España).
- Albúmina sérica bovina (Sigma, Barcelona, España).
- Aux Médium (BioMerieux, Marcy L'Etoile, Francia).
- Breaking buffer: Triton-X 100 al 2%; SDS al 1%; NaCl 100 mM, Tris PH 8.0, 10 mM; EDTA 1 mM, agua esteril (c.s.p.).
- Cloruro cálcico 0,005 M (Codex, Farmitalia Carbo Erma, Milán, Italia).
- Cloruro sódico 1 M (Panreac, Barcelona, España).

- Cristal violeta (Panreac, Barcelona, España).
- D (+) -Glucosa-monohidrato (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Extracto de levadura (Difco, Detroit, Michigan, USA).
- Fenol-cloroformo (Sigma, St Louise, USA).
- Metanol (Panreac, Barcelona, España).
- Negro Amido 10B en solución para electroforesis (Merck).
- Placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) para el estudio de adherencia.
- Placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 6 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) para el estudio de ALS en biofilm.
- Placas de Petri de 90 mm para medios de cultivo.
- RPMI-1640 Medium (Sigma, Barcelona, España).
- Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic Systems Ltd, West Sussex, Inglaterra).
- Sangre de carnero desfibrinada (Biocult laboratorios, Madrid, España).
- Tampón fosfato PBS 0,15 M pH 7: 1,19 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,29 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,93 g NaCl; agua destilada 1L.
- Tampón MOPS (Sigma).
- Taq polimerasa (Biotools, Madrid, España).
- TE: Tris pH 8, 10 mM, EDTA 1 mM.
- Viales de criocongelación Protect (STC, Heywood lancs, Inglaterra).
- Xileno (Panreac, Barcelona, España).
- XTT (2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide; Sigma).

#### **4. ESTUDIO DE PACIENTES CON CANDIDEMIA**

Se estudiaron todos los episodios de candidemia de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz durante un periodo de dos años (Mayo 2007-Mayo 2009). Se define como candidemia el aislamiento de *Candida* spp. en uno o más hemocultivos. Los hemocultivos se procesaron por el sistema automático Versatrek (Trek Diagnóstico System Inc., Westlake, Ohio, suministrado en España por Izasa).

Se realizó a cada paciente una ficha epidemiológica - que se adjunta como Anexo al final de este apartado - donde se recogían datos personales (hoja 1), factores de riesgo (hoja 2), así como datos de las cepas, su sensibilidad a antifúngicos y la evolución (hoja 3). Se siguieron los principios de la Declaración de Helsinki y sus revisiones posteriores para estudios en humanos, el Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y de la Biomedicina, en la Declaración de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, la legislación para tal fin vigente en España y la Unión Europea y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica.

En todos los estudios se pidió el consentimiento informado del participante, y se guardó la adecuada confidencialidad de la información obtenida. El protocolo de recogida de datos fué archivado, y a cada participante se le asignó una clave de tal modo que no pueda relacionarse la muestra e información obtenida con la identidad del sujeto. Las muestras fueron anonimizadas, asegurando la imposibilidad de inferir su identidad, para su estudio y potencial análisis ulterior.

## **5. MICROORGANISMOS**

Este trabajo, que implica la utilización de agentes biológicos, se ajusta a lo establecido en la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de riesgos laborales, y en los Reales Decretos que la desarrollan, en cuanto a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.

### **5.1-Aislamiento e identificación**

Se estudiaron todas las candidas aisladas a partir de hemocultivos durante el periodo ya citado. Se incluyen en el estudio cepas control de las diferentes especies proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Valencia, España) (Tabla 2).

Los hemocultivos se mantenían en incubación un mínimo de 7 días, y finalizada la incubación se realizaron picaduras a ciegas en agar-sangre, agar chocolate y agar Sabouraud, así como un examen microscópico con tinción de Gram.

**Tabla 2.** Cepas de colección utilizadas.

<b>Especie</b>	<b>Identificación</b>
<i>Candida albicans</i>	CECT 1394 / ATCC 10231
<i>Candida albicans</i>	CECT 1676 / ATCC 36803
<i>Candida metapsilosis</i>	CECT 13010
<i>Candida orthopsilosis</i>	CECT 13011
<i>Candida parapsilosis</i>	CECT 1449 / ATCC 22019
<i>Candida tropicalis</i>	CECT 1440 / ATCC 4563
<i>Candida tropicalis</i>	CECT 1688 / ATCC 13803
<i>Candida glabrata</i>	CECT 1448 / ATCC 2001

En primer lugar, se aislaron las levaduras en medios convencionales como Sabouraud agar, para después realizar su identificación.

Las cepas ya identificadas se conservaban en viales de criotecas Microbanc (Prolab, Ontario, Canadá) a  $-80^{\circ}$  C. Las bolas congeladas se sembraron en medio sólido de Sabouraud y se incubaron a  $37^{\circ}$  C durante 24 h. Del crecimiento obtenido se inoculaba, con un asa de platino, en los distintos medios líquidos en los que se iba a trabajar y se incubaba a  $37^{\circ}$  C en agitación durante 48 h hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. A partir de este cultivo se obtuvieron los inóculos de trabajo para los distintos aspectos del estudio.

La **identificación de las levaduras** se llevó a cabo atendiendo a criterios morfológicos, métodos bioquímicos, y por técnicas de biología molecular:

#### **A) Criterios morfológicos**

Como medio cromogénico para la identificación de las distintas especies del género *Candida* se utilizó CHROMOagar **Candida**® (37 °C durante 48h), descrito por Odds y Bernaerts en 1994, que permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio (Figura 4). Como todos los medios colorimétricos, se basa en la detección de determinadas actividades enzimáticas por parte de las levaduras mediante la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico en presencia de un indicador de la enzima.

Una de las principales ventajas de estos medios es permitir diferenciar fácilmente los cultivos mixtos:

- Las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45 °C criterio que utilizaremos para diferenciarlas.
- *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea.
- *C. krusei* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco.
- *C. glabrata* manifiesta un color púrpura-rosa, en algunas ocasiones son colonias de color blanco y en este caso tendríamos que diferenciarlas de *Candida nivariensis* y *Candida bracariensis*.

### Material y Métodos

Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio.



**Figura 4.** Crecimiento en el medio CHROMOagar **Candida:**

*C. albicans* verde

*C. tropicalis* azul

*C. glabrata* violeta.

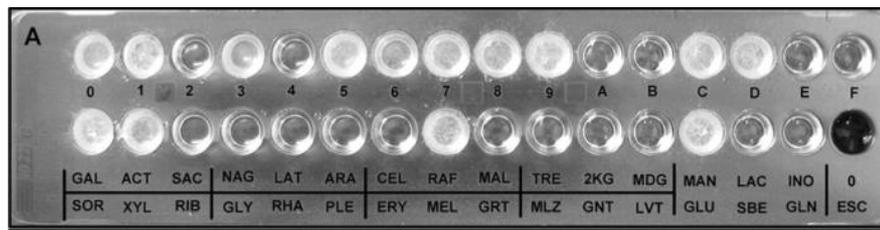
### B) Métodos bioquímicos

La galería ID 32 C (API, bioMérieux) está compuesta por diferentes pruebas de asimilación (Figura 5). Permite identificar el 93% de especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados (Freydiere et al, 2001).

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

La identificación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de colonias bien aisladas se prepara una suspensión en agua destilada a concentración definida (McFarland standard #2). Cinco gotas de esta suspensión se añaden a una ampolla de medio que

incluye el kit, y después de homogeneizarla se dispensa en los pocillos de la tira. Esta se incuba a 30° C durante 48h y se examina visualmente, marcando como positivos donde exista turbidez. Los resultados se transforman en un código numérico que permite su identificación utilizando ID 32C Analytical Profile Index.



**Figura 5.** Galería API 32C para identificación de levaduras

### **C) Técnicas de biología molecular para identificación de *Candida* grupo-*psilosis***

Para diferenciar las tres especies de *Candida* del grupo *-psilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. methapsilosis*) hemos utilizado técnicas moleculares, ya que los métodos convencionales no permiten su identificación. Como cepas control hemos utilizado

*C. orthopsilosis* CECT 13011

*C. parapsilosis* CECT 22019

*C. methapsilosis* CECT 13010.

Hemos elegido dos métodos para así confirmar resultados: secuenciación mediante iniciadores universales ITS-1/ITS-4 y digestión con enzima de restricción BanI. En estas técnicas moleculares recibimos el apoyo técnico y personal del Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia STAB-SAIUEx (financiado por UEX, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER y FSE).

Extracción del DNA de las levaduras

Para el aislamiento del DNA usamos el kit MasterPure Yeast Purification (Epicentre, Madison, WI; USA) y el siguiente protocolo:

1. Sedimentar las levaduras que crecen en 1,5 ml de cultivo durante 24 h en Sabouraud líquido, mediante microcentrifugación  $\geq 10.000$  rpm durante 2-5 minutos.
2. Eliminar todo el medio de cultivo.
3. Añadir **300  $\mu$ L de la solución de lisis** a cada tubo.
4. Tratar con RNasa añadiendo 1  $\mu$ L de la solución de 5  $\mu$ g/  $\mu$ L.
5. Suspender las células mediante vortex.
6. Incubar las células suspendidas a 65 °C durante 15 min.
7. Mantener las muestras en hielo 5 minutos.
8. Añadir **150  $\mu$ L de MPC Protein precipitation reagent** y vortex 10 segundos.
9. Sedimentar los restos celulares por microcentrifugación  $\geq 10.000$  rpm 10 minutos.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga y añadir **500  $\mu$ L de isopropanol** (no incluido en el kit). Mezclamos a fondo por inversión.
11. Sedimentar las células por centrifugación  $\geq 10.000$  rpm 10 minutos.
12. Eliminar el sobrenadante y desechar. Lavar el sedimento que contiene el DNA con **0,5 ml de etanol al 70 %**. Agitar, centrifugar y eliminar el sobrenadante de etanol.
13. Resuspender el DNA en 35  $\mu$ L de TE Tampón. Mantener el DNA a -20°C

### C.1- Análisis por amplificación y secuenciación de la región ITS-1/ITS-4

Se utilizaron los iniciadores universales específicos para la subunidad del DNAr D1-D2, para amplificación de la región ITS (internal transcribed spacer), ITS 1 e ITS 4, recogidos en la Tabla 3 de acuerdo con la técnica descrita por Gómez-López et al (2008).

La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones en 29 ciclos (Tavanti et al, 2005):

**1 ciclo:** Desnaturalización: 94°C, 2 minutos

**2 ciclo:** 25x :

Desnaturalización 94°C, 30 segundos

Hibridación 60°C, 90 segundos

Elongación 72°C, 75 segundos

**3 ciclo:** Extensión final 72°C 10 minutos

Mediante electroforesis se leyeron las secuencias obtenidas, comparándolas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las muestras se guardan en nevera a -4°C.

### C.2- Digestión con enzima de restricción BanI del fragmento SADH

Una enzima de restricción es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto (diana de restricción) o en un sitio no muy lejano a éste.

### Material y Métodos

Para la identificación de nuestras cepas se utilizó la enzima BshNI (BanI) ER 1001, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Amplificación del fragmento SADH por PCR con primers específicos según Tavanti et al, 2005 (Tabla 3).
2. Purificación del DNA obtenido mediante kit (Qiagen). Se comprobó por determinación espectrofotométrica a 260 nm la cantidad de ADN obtenida.
3. Digestión del producto de PCR con 0.4  $\mu$ L de enzima de restricción BanI:
  - i. Se añadió a cada tubo 4 uL del DNA a digerir + 16 uL de la mezcla preparada (Tabla 4).
  - ii. Se incubó en presencia de la enzima de restricción BanI durante 90 min a 37<sup>o</sup> C.
4. Se analizaron las secuencias obtenidas al correr en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0,05 mg/L).
5. Las bandas se observaron mediante UV transiluminación (Figura 6):
  - *C. parapsilosis*, tiene tres sitios de actuación del enzima de restricción por lo que veremos cuatro bandas (370 bp, 188 bp, 93 bp, 60 bp).
  - *C. orthopsilosis*, no tiene diana de restricción por lo que sólo veremos una banda (716 bp).
  - *C. metapsilosis*, se formarán dos bandas (521 bp, 196bp).

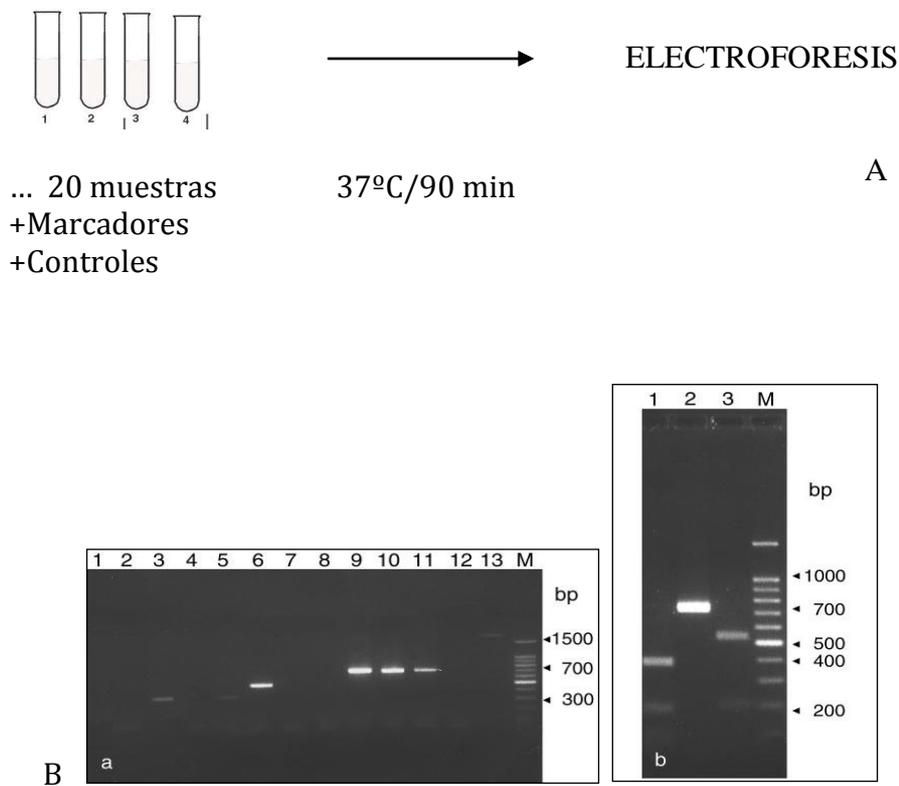
**Tabla 3.** Secuencia de los primer utilizados para identificación de las especies de *Candida* grupo-*psilosis*.

Método	Secuencia
<b>Amplificación región ITS</b>	ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
<b>Fragmento SADH</b>	Fwd 5' -GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' Rev, 5' -CAATGCCAAATCTCCCAA-3'

**Tabla 4.** Preparación de la muestra para digestión.

Reactivos	1 muestra	Mezcla 20 muestras (x 24)
DNA	(4 µL)	-
Tampón 5x	4 µL	96 µL
Enzima (Enz 10U/uL)	0.4 µL(1U)	2.4 µL
H <sub>2</sub> O	11.6 µL	46.4 µL
<b>Volumen final</b>	20 µL	384 µL (sin DNA g)

Material y Métodos



**Figura 6.** Esquema (A) y resultados de la electroforesis (B, tomado de Tavanti et al, 2005):

(a) amplificación del fragmento SADH (producto PCR-716 bp) en diferentes especies de *Candida*: 1, *C. albicans*; 2, *C. dubliniensis*; 3, *C. famata*; 4, *C. glabrata*; 5, *C. guilliermondii*; 6, *C. kefyr*; 7, *C. krusei*; 8, *C. lusitaniae*; 9, *C. metapsilosis*; 10, *C. orthopsilosis*; 11, *C. parapsilosis*; 12, *C. tropicalis*. 13, *S. cerevisiae*; M, 100-bp ladder.

(b) Digestion de SADH-PCR por la enzima de restricción *BanI*. Producto obtenido a partir de *C. metapsilosis* (1), *C. orthopsilosis* (2), y *C. parapsilosis* (3). M, 100-bp ladder.

## **6-SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS DE LAS ESPECIES AISLADAS**

Se estudia la actividad antifúngica de amfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungina y anidulofungina frente a todos los aislados clínicos. La sensibilidad a antifúngicos se estudiará mediante microdilución según la normativa de CLSI (M27-A.3), utilizando el sistema Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic Systems). Los inóculos se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las placas fueron incubadas 24-48h a 37° C.

La CMI vendrá definida para los azoles (fluconazol, itraconazol y voriconazol) como la menor concentración donde se produzca la inhibición de el 50% del crecimiento. La CMI de las equinocandinas (caspofungina y anidulofungina) se define como la menor concentración que produzca una importante disminución de la turbidez. Las diferentes concentraciones testadas se recogen en la Tabla 5.

Existen actualmente dos estándar para interpretación de los puntos de corte de CMI basados en métodos de microdilución, uno elaborado por el EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) y otro elaborado por CLSI (Clinical Laboratory Estándar Institute) en Estados Unidos (EUCAST 2008; M27 A-3, 2008).

*Material y Métodos*

Para fluconazol se admiten como puntos de corte por EUCAST:

Resistente, CMI >64 mg/L.

Sensible dosis-dependiente (SDD), CMI entre 16 y 32 mg/L.

Sensibles, las cepas con CMI ≤ 8mg/L.

Para voriconazol:

Resistente ≥4 mg/L; SDD 2 mg/L; Sensible ≤1 mg/L

**Tabla 5.** Concentraciones de los antifúngicos ensayados en Sensitrite YeastOne.

Antifúngico	Grupo	Rango de concentraciones
Anfotericina B	Polieno	0,008 - 16 mg/L
Fluconazol	Azoles	0,125 - 256 mg/L
Itraconazol		0,008 - 16 mg/L
Voriconazol		0,008 - 8 mg/L
Caspofungina	Equinocandinas	0,008 - 16 mg/L
Anidulofungina		0,008 - 16 mg/L

## **7-ESTUDIO DE FACTORES DE VIRULENCIA**

Se estudió en todas las cepas la presencia de factores de virulencia, como actividad enzimática, capacidad de adherencia, hidrofobicidad y formación de biofilm.

### **7.1-Medida de la actividad enzimática**

En este trabajo se valoró la actividad aspartil-proteasa y la actividad hemolisina, y se utilizaron los siguientes medios preparados en laboratorio para valoración de la actividad enzimática, YCB-BSA y Sabouraud sangre, respectivamente.

#### Estudio de la actividad aspartil proteasa en placa

Para la determinación de la actividad aspartil proteasa se utilizó como el medio de cultivo Yeast Carbon Base (Difco) con albúmina bovina (Sigma) (YCB-BSA) como única fuente de nitrógeno, usado por Cassone et al (1987) con el fin de estimular la producción de aspartil proteasas, necesarias para la utilización de la albúmina como fuente de nitrógeno.

Las placas con medio YCB-BSA, se inocularon con una gota de 10  $\mu$ L de una suspensión de levaduras de concentración estandarizada de  $10^6$  células/ml para cada cepa. Se deja secar la gota inoculada y se

### *Material y Métodos*

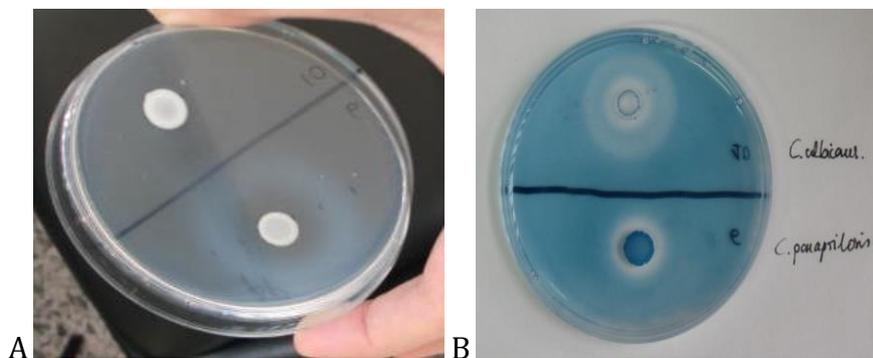
incubaban las placas a 37° C. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y en diferentes placas.

Se hizo un estudio previo incubando las placas en atmósfera normal y en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> durante 48 h, 72 h y 7 días, en estufas sin agitación. Se realizaron medidas del diámetro de la colonia y del diámetro del halo producido. A los 7 días se tiñeron las placas con 2 ml de negro amido al 1%, en una solución de metanol, acético y agua, en proporción 45:10:45, durante 24 h.

Se obtuvieron los mejores resultados después de 7 días de incubación y con tinción de negro amido al 1%, procesándose de este modo todas las cepas del estudio (Figura 7).

El cálculo de la actividad enzimática, mediante el Índice P<sub>z</sub>, se realizó basándonos en el método de Willianson et al (1986), descrito para evaluar la actividad fosfolipasa. Este método se basa en un cociente matemático entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de precipitación producido, clasificándose como de alta actividad si el cociente obtenido es menor de 0,40; actividad media si está entre 0,41 y 0,60 y baja actividad si se encuentra entre 0,61 y 0,99. Un índice P<sub>z</sub> de valor 1 nos indica que no se detecta actividad.

$$\text{Índice Pz} = \text{Diámetro de la colonia} / \text{Diámetro del halo de lisis}$$



**Figura 7.** Lectura de la actividad aspartil proteasa en el medio YCB-BSA, sin teñir (A) y teñido con negro amido al 1% (B). Estudio de una cepa de *C. albicans* y una cepa de *C. parapsilosis*, incubadas a 37° C con atmósfera enriquecida de CO<sub>2</sub>.

#### Estudio de la actividad hemolítica en placa

La medida de esta actividad enzimática se realizó basándonos en el método descrito por Manns et al (1994), ligeramente modificado por Luo et al (2001).

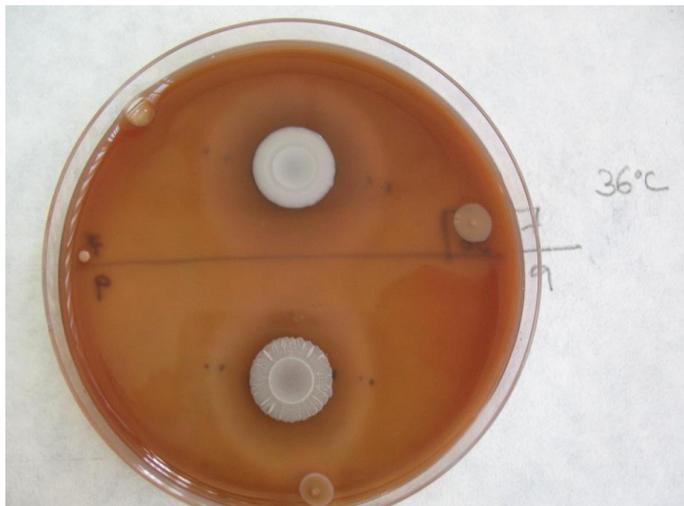
Se inocularon las placas del medio de cultivo específico, preparado con hematíes de carnero como diana de este enzima, depositando una gota de 10 µL de una suspensión de 10<sup>6</sup> células por ml de cada cepa y se incubaron a 37° C con/sin atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h, 72 h y 7 días (Figura 8).

### Material y Métodos

La producción de hemolisinas se evaluó calculando el índice de actividad enzimática (Índice Pz) con la fórmula de Williamson et al (1986), resultado de la división del diámetro de la colonia entre el diámetro del halo de lisis:

$$\text{Índice Pz} = \text{Diámetro de la colonia} / \text{Diámetro del halo de lisis}$$

Se establecieron los siguientes rangos de actividad: alta (Pz < 0.40); media (Pz 0.41-0.60), baja (Pz 0.61-0.99) y nula (Pz = 1).



**Figura 8.** Lectura de la actividad hemolisina en medio Agar-Sabouraud-Sangre de dos cepas de *C. parapsilosis* a 37°C

## **7.2- Hidrofobicidad de la superficie celular**

En este trabajo se utilizó RPMI 1640 para estudios de hidrofobicidad y adherencia así como para valorar la formación de biocapa

Los niveles de hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) se midieron por el test de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH), utilizándose la técnica modificada del método bifásico agua-hidrocarburo de Rosenberg et al (1980) descrita por Hazen et al (1986). Básicamente consiste en la determinación del reparto de los microorganismos entre la fase acuosa en que están suspendidos y una fase hidrocarbonada (p-xileno).

Las cepas fueron inoculadas en tubos en 5 ml de RPMI 1640, realizándose dos subcultivos. Se incubaron en agitación a 37° C. Después de 24 h de incubación, cuando están al comienzo de la fase estacionaria se centrifugan los cultivos durante 5 minutos a 3000 rpm y se realizan dos lavados con tampón fosfato frío 0,15M pH 7.4 (PBS). Se resuspendió el botón en PBS hasta una DO de 0,4 a 492 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Thermospectronic, Madrid, España) hasta obtener un volumen final de 4 mL. De esta suspensión de levaduras se reservó 1mL para hacer estudios de adherencia a plástico.

El valor de absorbancia obtenido frente a un blanco (PBS) era considerado como DO inicial ( $ABS_0$ ).

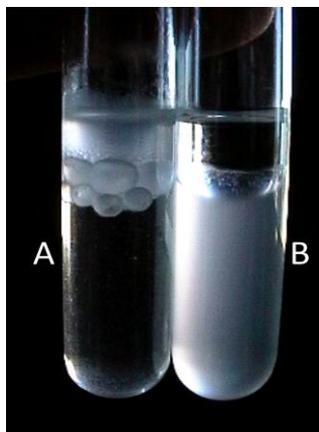
### *Material y Métodos*

A 3 mL de la suspensión, dispuestos en tubo de vidrio sin restos jabonosos, se añadió 1 ml de xileno (Panreac) y tras agitación intensa en vortex durante 1 minuto para conseguir la interposición de las dos fases, se dejó reposar durante 2-3 minutos, hasta la completa separación de ambas fases, la acuosa y la oleosa. Finalmente se midió la absorbancia (DO) de la fase acuosa ( $ABS_1$ ) (Figura 9).

La hidrofobicidad se expresa como el porcentaje de reducción de la densidad óptica  $ABS_1$  respecto a la DO inicial  $ABS_0$ .

Para calcular el valor de la hidrofobicidad de la superficie celular se utilizó la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de hidrofobicidad } \%HSC = [(ABS_0 - ABS_1) / ABS_0] \times 100$$



**Figura 9.** Método bifásico agua/hidrocarburo para valoración del porcentaje de hidrofobicidad de la superficie celular.

A: Levaduras resuspendidas en la fase de hidrocarburo (células hidrofóbicas)

B: Levaduras que permanecen en la fase acuosa (células hidrofílicas).

### **7.3- Capacidad de adherencia a plástico**

Se valoró la capacidad de adherencia a plástico de todas las cepas aisladas y de las cepas control.

Se siguió la técnica descrita por Christensen et al (1985). Un mL de la suspensión de levaduras, preparada como se describe en el apartado anterior, se repartió entre cuatro pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno (0,25 mL/pocillo). Las placas fueron incubadas a 37° C en atmósfera húmeda durante 24 horas.

Tras la incubación se aspiró cuidadosamente el contenido de los pocillos y posteriormente se realizaron tres lavados mediante la adición de 200 µL de PBS frío a cada pocillo, seguida de aspiración cuidadosa para eliminar las levaduras que no se encuentran adheridas. Se midió la densidad óptica en espectrofotómetro a 490 nm. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y en días diferentes (Figura 10).

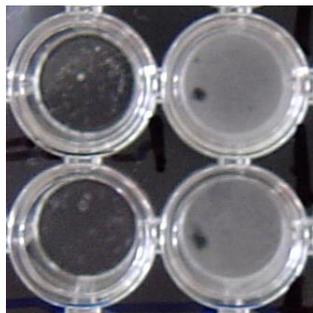
#### Estandarización de la técnica

Se realizaron los siguientes estudios previos para estandarización de la técnica:

- Se valoró la adherencia en varios tipos de placas de microtitulación de 96 pocillos incluyendo placas Greiner bio-one (Greiner, Frickenhausen, Alemania)
- Se buscó el tiempo de incubación adecuado para la adherencia, realizando incubaciones a distintos tiempos.
- Se estudió la densidad de la suspensión de levaduras en PBS, utilizada para valorar la adherencia.
- Se comprobó la linealidad de los resultados,

### *Material y Métodos*

relacionando turbidez con el color producido al añadir XTT (Sigma) con 0,01 M de menadiona, que cuantifica actividad mitocondrial, mediante una recta de regresión.



**Figura 10.** Valoración de la adherencia a plástico en una placa de microtitulación. Pocillos con levaduras adheridas (derecha) y sin adherir (izquierda).

### **7.4. Capacidad de formación de biocapa**

Se estudió la formación de la biocapa sobre placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Greiner), según el método descrito por Hawser et al (1994) con modificaciones (Blanco et al, 2006). Para ello se inoculan los pocillos con 250  $\mu$ l con un inóculo aproximado de  $5 \times 10^6$  levaduras/mL por cepa. Tras incubación durante 48 horas en agitación en atmósfera húmeda, se lavan los pocillos cuidadosamente con PBS frío, eliminando por aspiración del medio, las levaduras no adheridas. Se realizaron al menos tres lavados.

La medida de la biocapa formada se hizo por el procedimiento de de Ramage et al (2001) realizándose dos lecturas independientes:

#### Biocapa formada midiendo la densidad óptica

Se valoró la densidad de la biopelícula que ha quedado adherida al pocillo. Se midió directamente, en un lector de microplacas (Anthos 2020, Cultek, Madrid) a 492 nm, la DO de la biocapa formada, que indicaba la turbidez, directamente relacionada con la cantidad de biomasa de la biocapa de levaduras.

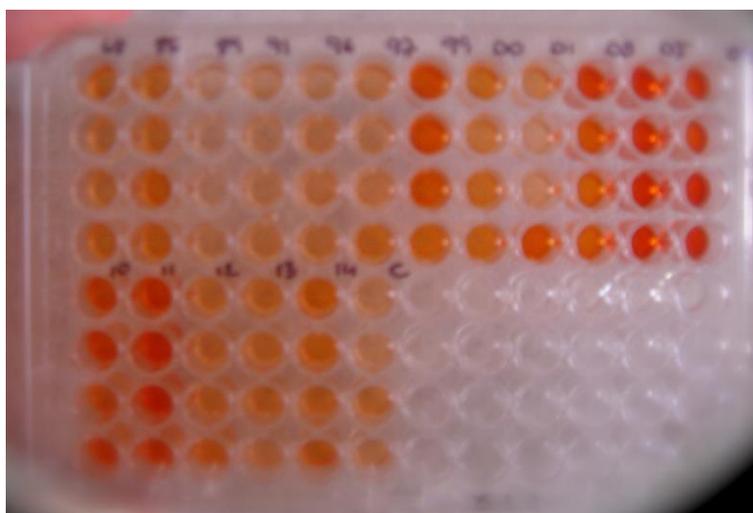
#### Actividad metabólica de las levaduras adheridas

La cantidad de levaduras viables en la biocapa formada se realizó valorando la actividad metabólica de las levaduras conenidas en la biocapa, cuantificando el color producido por la reducción del XTT (Sigma) con menadiona, según la técnica descrita por Ramage et al (2001) y Khun et al (2002). Esta técnica colorimétrica se basa en la producción de formazán a partir del XTT por las células viables.

Para ello se realizó una valoración de la actividad metabólica de las células adheridas utilizando el ensayo de reducción del XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H tetrazolium hydroxide; Sigma) según la técnica descrita por Ramage et al (2001). Se preparó una solución saturada de XTT a concentración de 0,5 g/L en Ringer lactato. Se esterilizó por filtración y se guardaron en alícuotas a  $-70^{\circ}$  C. Previamente al ensayo se añadió menadiona (Sigma) hasta una concentración de 1  $\mu$ M.

### *Material y Métodos*

Se añadieron 100  $\mu$ l de XTT con menadiona a los pocillos con la biocapa formada y a pocillos vacíos como control. Las placas se incubaron durante 1 h a 37<sup>o</sup> C y se cuantificó la reacción colorimétrica producida por la reducción enzimática del XTT con menadiona. El color se cuantificó en un lector de microplacas (Anthos 2020, Cultiwell) a 492 nm (Figura 11).



**Figura 11.** Medida de la biocapa por reducción del XTT

## 8. ESTUDIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se realizaron estudios de biología molecular complementarios para valorar la expresión de la adhesina ALS1 en células planctónicas y del biofilm así como para el estudio de la naturaleza del locus *MTL* en *C. albicans* y *C. tropicalis*.

### 8.1. Expresión del gen *ALS-1* en células de la biocapa en *C. tropicalis*.

Para cuantificar la distinta expresión de adhesinas ALS-1 en células formando biofilm y en células planctónicas de los 7 aislados de *C. tropicalis*, se hizo un estudio de Q-PCR.

Se sembraron las cepas en placas de Sabouraud (24 h, 37° C) y se prepararon células en biofilm y células planctónicas:

#### -Formación del biofilm para valoración de ALS-1

A partir de varias colonias aisladas se inoculó un tubo con 4 mL de RPMI 1640, pH 7.0 e incubamos 24 h a 37° C en agitación (130 rpm).

A partir de este cultivo se realizó una dilución 1/100 en un matraz hasta un volumen final de 25 mL en RPMI 1640, distribuyendo 4 mL a cada pocillo de una placa de 6 pocillos.

Se incubaron 24 h a 37° C y en agitación (130 rpm).

Se renovó el medio a las 24h y se incubó otras 24 h.

-Cultivo de células planctónicas para valoración de ALS-1

De la cepa incubada en RPMI 1640, se hizo una dilución 1/100 hasta un volumen final de 10 ml en RPMI 1640 pH 7.0 y se incubó 24 horas a 37° C y en agitación (130 rpm).

-Preparación de las muestras para realización de la PCR

Para obtener las células del biofilm, se eliminó el sobrenadante de la placa de 6 pocillos, lavando 3 veces con PBS frío para eliminar todas las células planctónicas. Sobre el biofilm que queda se añadió 1 mL de una solución de lisis (Sorbitol 1M, EDTA 100mM y 100 U de lyticase).

Para obtener las células planctónicas, a partir del cultivo de levaduras, centrifugamos a 5000g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1mL de la misma solución de lisis (Sorbitol 1M, EDTA 100mM y 100 U de lyticase).

Ambas muestras se incubaron a 30 °C durante 5 h en agitación (150 rpm aprox). Pasado ese tiempo de lisis, se levantó el biofilm con ayuda de un scraper y lo pasamos a un tubo de 15ml.

-Extracción de RNA

A continuación se procedió con las dos muestras de forma idéntica y simultánea:

Centrifugamos a 5000 g durante 10 min

Retiramos sobrenadante

Resuspendemos en 350 µL de buffer de lisis del Kit illustra RNAs isolation (GE Healthcare) y 3,5 µL mercaptoetanol

A continuación seguimos las indicaciones descritas en el manual de dicho kit. Una vez obtenido el RNA se determinará su concentración y pureza por nanodrop.

-Q-PCR One-step a partir del RNA de *C. tropicalis*

Se utilizó el kit iScript™ One-Step RT-PCR con SYBR Green (BioRad). Para cada muestra se añadieron las cantidades de tampón, enzima y cebadores recomendadas por el kit y 100 ng de RNA. Se valoró simultáneamente la actina y el fragmento 18 s, que fueron utilizados como housekeeping (Tabla 6).

La reacción siguió el siguiente protocolo:

Síntesis de cDNA 10 min a 50°C

Inactivación de transcriptasa reversa iScript 5 min a 95°C

Los ciclos de PCR (40 ciclos): 10 sec a 95°C

30 sec a 55°C

Al finalizar se programó la realización de una curva de melting

**Tabla 6.** Primers utilizados para ALS-1 y para los housekeeping.

<b>ALS-For:</b>	5'-AGG TGA TAC GTT CAC TTT GAT-3'
<b>ALS-Rev:</b>	5'-AGC TGC AGC AAA ATA GGC TTG-3'
<b>Actina-For:</b>	5'-CGC ACA CAC ACA CCT CCC GA-3'
<b>Actina-Rev:</b>	5'-GCG TCG TCA CCG GCA AAA CC-3'
<b>18s-For:</b>	5'-ATT TCT TTG GTG GCG GGA GC-3'
<b>18s-Rev:</b>	5'-GCA TTT CGC TGC GTT CTT CA-3'

## **8.2- Análisis de la configuración de los alelos de *MTL*a y *MTL*alfa en *C. tropicalis* y *C. albicans***

Recientemente se ha descrito la capacidad de conjugación a partir de células homocigotas (a/a o alfa/alfa) en el gen *MTL* (Mating Tipe Locus) tanto en *C. albicans* como en *C. tropicalis*. Por ello estudiamos las características del gen *MTL* en los aislados clínicos de *C. albicans* (16 aislados) y de *C. tropicalis* (6 aislados). Para este trabajo se contó con el Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia, (STAB) Servicio de Apoyo a la Investigación (SAIUEx) Universidad de Extremadura

### Aislamiento de RNA de *Candida*

- A partir del cultivo de levaduras planctónicas en Sabouraud líquido, se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos. Retirar sobrenadante.
- Se resuspendieron en 5 ml de una solución de lisis (Sorbitol 1M, EDTA 100mM y 100 U de lyticase). Las muestras se incubaron a 30 °C durante 5 h en agitación (150 rpm aprox).
- Las levaduras, recogidas en tubos de 15 ml, se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos. Retirar sobrenadante
- Resuspender en 350 µl de Buffer de lisis del Kit Illustra RNAs isolation (GE Healthcare) y 3,5 µl mercaptoetanol. Se siguieron las indicaciones descritas en el manual de dicho kit.
- Una vez obtenido el RNA se determinó su concentración y pureza por nanodrop.

- Síntesis de cDNA a partir de RNA de levaduras *Candida*

Para realizar la síntesis de cDNA a partir de RNA se utilizó el kit iScript cDNA Synthesis (BioRad).

Para cada muestra se añadieron las cantidades de tampón y enzima recomendadas por el kit para un volumen final de 20  $\mu$ l (4 $\mu$ l de buffer y 1 $\mu$ l de enzima) y 100 ng de RNA aproximadamente.

La reacción siguió el siguiente protocolo:

5 minutos a 25°C

30 minutos a 42°C

5 minutos a 85°C

Amplificación por PCR de los alelos de *MTL* (A2, alfa 2) en *C. tropicalis*

Para la reacción de PCR se utilizó el kit iTaq DNA Polymerase de BioRad (ref. 170-8870).

La mezcla de reacción estaba constituida por: iTaq buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP mix 0.2mM de cada uno, iTaq 1.25 U, primer F 200 nM, primer R 200nM y 1  $\mu$ l del cDNA sintetizado anteriormente.

Los cebadores usados se recogen en la Tabla 7

*Material y Métodos*

La reacción siguió el siguiente programa:

Deshibridación: 3 min at 95°C

35 ciclos de PCR:

30 sec at 95°C

30 sec at 55°C

45 sec at 72°C

Extension final: 10 min at 72°C

Finalmente los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%.

**Tabla 7.** Primers utilizados para alelos  $\alpha 2$  y  $\alpha 2$  del gen *MTL* de *C. tropicalis* tomados de Porman et al (2011).

**MTLa2-F** CTACTAATTTTGAAACCATTGGAGTCT

**MTLa2-R** GATTTGGTATGAAAAGAGGAACTCTAAC

**MTLalfa2-F** AACTTCAAATGCAAAATGTAAAACATAC

**MTLalfa2-R** TAAAACATTAAGCATAGAGGACAAAGAA

Amplificación por PCR de los alelos de *MTL* (A1, A2,  $\alpha$ 1) en *C. albicans*

Para la reacción de PCR utilizamos el kit iTaq DNA Polymerase de BioRad (ref. 170-8870).

La mezcla de reacción esta constituida por iTaq buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP mix 0.2mM de cada uno, iTaq 1.25 U, primer F 400 nM, primer R 400nM y 1  $\mu$ l del cDNA sintetizado anteriormente.

La reacción sigue el siguiente programa:

Deshibridacion: 3 min at 95°C

Los ciclos de PCR (35 ciclos): 30 sec at 95°C

30 sec at 55°C

45 sec at 72°C

Extension final: 10 min at 72°C

Finalmente los productos de la PCR se corren en un gel de agarosa al 1%.

Los cebadores usados son los que se recogen en la Tabla 8 ( Legrand M, et al, 2004).

**Tabla 8.** Primers utilizados para alelos a y alfa del gen *MTL* de *C. albicans*

MTLa2-F	CATGAATTCACATCTGGAGGCAC
MTLa2-R	ATAGCAAAGCAGCCAACTCAGGT
MTLalfa1-F	TTCGAGTACATTCTGGTCGCG
MTLalfa1-R	TGTAACATCCTCAATTGTACCCGA
MTLa1-F	TTGAAGCGTGAGAGGCAGGAG
MTLa1-R	GTTTGGGTTCCCTTCTTTCTCATTC

## **9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 12.0, utilizando distintos test en función de las características de las variables y de la normalidad de las muestras.

Las comparaciones entre variables cuantitativas, como es el caso de las comparaciones de hidrofobicidad de superficie celular en distintos medios, comparaciones entre adherencia a materiales plásticos a diferentes tiempos, se llevaron a cabo mediante el uso de correlaciones utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Las comparaciones entre variables cualitativas como es el caso del estudio del perfil enzimático y de los factores de riesgo se llevó a cabo utilizando tablas de contingencia.

La comparación entre variables mixtas cualitativas y cuantitativas, como es el caso de las comparaciones entre las distintas actividades enzimáticas y los factores de patogenicidad estudiados previamente, se realizó mediante el uso del test no paramétrico de Wilcoxon de rangos con suma para muestras apareadas, dadas las características de la muestra.

# ESTUDIO: CANDIDEMIAS

## HOJA-1 DATOS PERSONALES

<b>PACIENTE NÚMERO</b> .....		<b>CEPA NÚMERO</b> .....	
INICIALES apellidos nombre		Edad	Sexo
INGRESO: Fecha		Motivo	
Días de ingreso antes del episodio		Fecha del alta	
Procedencia del Enfermo			
<input type="checkbox"/> UCI	<input type="checkbox"/> Reanimación	<input type="checkbox"/> Otras UCI.....	
<input type="checkbox"/> Cirugía general	<input type="checkbox"/> Cardiovascular	<input type="checkbox"/> Otras.....	
<input type="checkbox"/> Oncología	<input type="checkbox"/> Traumatología		
<input type="checkbox"/> Urgencias-medicina interna			
<input type="checkbox"/> Otras procedencias .....			
<b>TIPO DE INFECCIÓN ACTUAL</b>			
<input type="checkbox"/> Abdomen.....	<input type="checkbox"/> Cardiovascular .....		
<input type="checkbox"/> Cutánea.....	<input type="checkbox"/> Digestiva .....		
<input type="checkbox"/> Genito-urinaria.....	<input type="checkbox"/> Herida quirúrgica .....		
<input type="checkbox"/> Infección catéter.....	<input type="checkbox"/> Infección prótesis .....		
<input type="checkbox"/> ORL.....	<input type="checkbox"/> Osteo-articular .....		
<input type="checkbox"/> Respiratoria	<input type="checkbox"/> SIDA .....		
<input type="checkbox"/> SNC.....	Otras		
<input type="checkbox"/> No se conoce			
<b>SÍNTOMAS:</b>			
Fiebre: <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> 37-38 °C	<input type="checkbox"/> 38-39 °C	<input type="checkbox"/> >39 °C
Otros.....			

## *Material y Métodos*

## HOJA 2- FACTORES DE RIESGO

### ENFERMEDADES SUBYACENTES

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> SIDA              | <input type="checkbox"/> Neoplasias               |
| <input type="checkbox"/> Quemaduras graves | <input type="checkbox"/> Neoplasias hematológicas |
| <input type="checkbox"/> Diabetes          | <input type="checkbox"/> Otras enfermedades       |

### FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS

- Trasplante de órgano sólido
- Cirugía .....
- Estancia anterior en UCI.....
- Neutropenia
- Otras hemopatías
- Nutrición parenteral

### BIODISPOSITIVOS○

- CATETER:     central venoso                       central arterial
- periférico venoso                       periférico arterial
- tunelizado
- Intubación .....                       Drenajes                       Válvulas V/A
- Sonda nasogástrica                       Sonda uretral
- Prótesis .....                       ○CAPDO○
- Otros.....

### TRATAMIENTO O PROFILAXIS PREVIAS

- Antibiótico .....
- Antifúngico.....
- Citostáticos .....
- Corticoterapia.....
- Radioterapia .....

### OTRAS CONSIDERACIONES

## *Material y Métodos*



## *Material y Métodos*

*Resultados*

## **RESULTADOS**

## *Resultados*

## **A- RESULTADOS ETIOEPIDEMIOLÓGICOS**

### **1. Pacientes con candidemia**

Se estudiaron las candidemias en un periodo de dos años (Mayo 2007-Mayo 2009) en el hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz, un hospital con 772 camas. Definimos un episodio de candidemia cuando se aísla *Candida* spp al menos en una de las tomas de hemocultivo. Cuando pasado más de dos semanas en uno de estos pacientes teníamos un nuevo aislamiento, se considera una nueva cepa, siguiendo el criterio expuesto por Das et al (2011).

Para la toma de muestra se extraen dos o tres hemocultivos por venopunciones diferentes, con un intervalo mínimo entre 15 minutos y una hora. El volumen de muestra varía en función del tipo de vial del hemocultivo empleado. Para neonatos se extrae de 0,5-1ml; en niños de 1 a 6 años, 1ml/año dividido en los dos frascos incubados en aerobiosis y anaerobiosis. En jóvenes 10 ml y en adultos un volumen de sangre de 20 ml que se reparte a partes iguales en aerobiosis y en anaerobiosis. El frasco aerobio se ventila y en el anaerobio se evita la entrada de aire. Los frascos se incuban lo antes posible en estufa a 35-37°C. Nunca se mantienen en nevera. Los hemocultivos se procesaron en el sistema Versatrek, con una incubación de 7 días, salvo en los casos que se sospecha bacteriemia por microorganismos de difícil crecimiento en los que se extendía la incubación hasta 4 semanas.

## *Resultados*

En los hemocultivos con signos de crecimiento se realiza una tinción de Gram de cuyos resultados se informa lo antes posible al médico responsable de la asistencia al paciente denominándole Informe Previo (IP). También se efectúan subcultivos en distintos medios sólidos (Agar Sangre, Agar chocolate y Agar Sabouraud) para obtener colonias aisladas y poder así realizar pruebas de identificación y sensibilidad.

Si existe crecimiento de levaduras, se siembran las colonias en CHROMOagar **Candida**® y además se realiza una identificación bioquímica con ID32C (BioMérieux). Las pruebas de sensibilidad a los distintos antifúngicos se hacen con el sistema Sensititre Yeast One (Y07).

Se aisló *Candida* spp. en los hemocultivos de 52 pacientes. En el primer año se aislaron candidas en hemocultivo a partir de 19 pacientes y en el segundo año aumentaron a 33 los pacientes con candidemia (36,5% y 63,5% respectivamente).

### **Pacientes con varios aislamientos de *Candida* spp.**

Existen pacientes con aislamientos de diferentes cepas. En dos pacientes se obtienen dos aislamientos consecutivos, después de dos semanas entre uno y otro aislamiento, considerándose cepas diferentes y en un pacientes se obtuvo cultivo mixto de tres especies. Se realizó este trabajo por lo tanto con un total de 56 cepas a partir de 52 pacientes.

Los pacientes con más de un aislamiento fueron:

- Paciente 16, con una cepa de *C. albicans* y después de 2 semanas se aísla de nuevo *C. albicans*
- Paciente 31, con *C. parapsilosis* y al cabo de 2 semanas se vuelve a aislar *C. parapsilosis*.
- Paciente 23 con dos cepas diferentes de *C. glabrata* y *C. lipolytica*. Las dos cepas de *C. glabrata* con diferentes características morfológicas y de sensibilidad, fueron enviadas al Instituto Carlos III y se confirmó su identificación.

Una vez aislada la levadura se recogía en fichas, incluidas en Material y Métodos, los siguientes datos:

- Datos epidemiológicos: edad, sexo, procedencia, tipo de infección, síntomas, etc
- Factores de riesgo: presencia o no de catéter en el momento del aislamiento, uso previo de antibióticos, uso de corticoides, cirugía previa, enfermedad de base, nacimiento prematuro etc.
- Características de las cepas aisladas, evolución microbiológica- erradicación, persistencia- y evolución clínica del paciente: curación, mejoría, fracaso.

### **Pacientes con candidemia y con aislamientos simultáneos de *Candida* spp.**

En 21 pacientes (40,4%) se aisló la misma levadura simultáneamente en **otras muestras clínicas**.

## Resultados

-En 3 pacientes existían aislamientos múltiples, aislándose en hemocultivo, catéter y orina: 2 pacientes con *C. albicans* y uno con *C. glabrata*.

-En 18 pacientes se encontró otro aislamiento con *Candida* spp además del hemocultivo (Tabla 9). El mayor número se correspondió con aislamiento simultáneo en catéter (n=8), seguido por aislamientos en muestra respiratoria (n=4) y en igual número (n=3) en orina y exudados.

### Pacientes con candidemia y con cultivo mixto bacteriano

Se obtuvieron 8 hemocultivos (15,4 %, 8/52) con crecimiento de *Candida* spp. y una bacteria (Tabla 10). Presentaron cultivo mixto con bacterias en el hemocultivo las siguientes especies de *Candida*:

- 4 *C. tropicalis* (4/6 pacientes; 66,7%), falleciendo 3 de ellos.
- 3 *C. parapsilosis* (3/13 pacientes; 23,1%), falleciendo 2 de ellos.
- 1 *C. glabrata* (1/7 pacientes; 14,3%), falleciendo dicho paciente.

Las bacterias aisladas en los cultivos con *Candida* spp. fueron:

- 4 *Staphylococcus* coagulasa negativa:
  - 2 *Staphylococcus epidermidis*.
  - 1 *Staphylococcus haemolyticus*.
  - 1 *Staphylococcus hominis-hominis*.
- 3 *Acinetobacter baumannii*.
- 1 *Enterococcus faecalis*.

**Tabla 9.** Especies con aislados simultáneos en hemocultivo y otra localización.

Especie	Catéter	Orina	Respiratorio	Exudados
<i>C. albicans</i>		3		2
<i>C. glabrata</i>	2		2	
<i>C. parapsilosis</i>	4			
<i>C. tropicalis</i>	1		1	1
<i>C. krusei</i>	portacath			
<i>Candida</i> sp.			1	
Global	8	3	4	3

**Tabla 10.** Pacientes con aislamiento en cultivo mixto de *Candida* spp y bacteria en el hemocultivo.

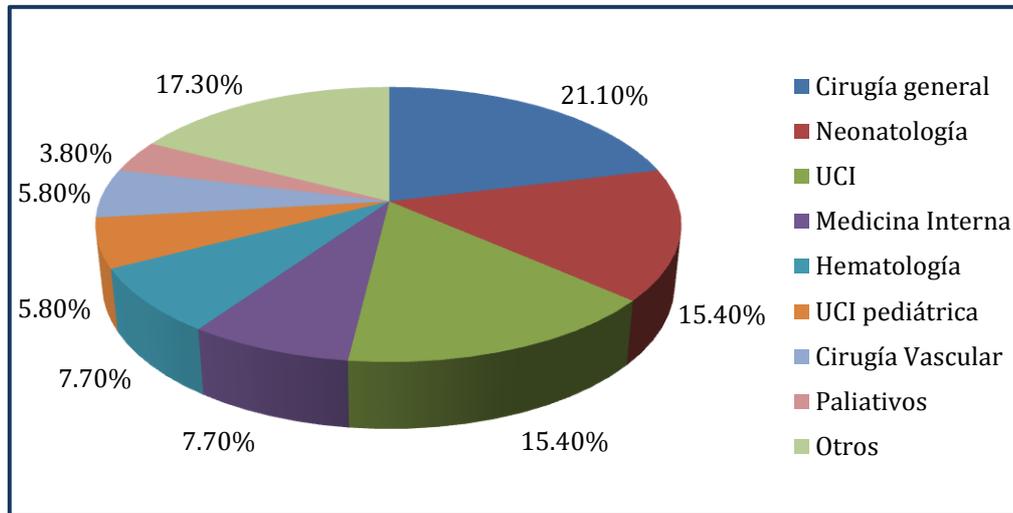
Paciente	Especie	Bacteria	Evolución
22	<i>C. tropicalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Exitus
39	<i>C. tropicalis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Exitus
25	<i>C. tropicalis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Exitus
27	<i>C. tropicalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mejoría
28	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Staphylococcus hominis-hominis</i>	Exitus
38	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Exitus
5	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Mejoría
43	<i>C. glabrata</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Exitus

## *Resultados*

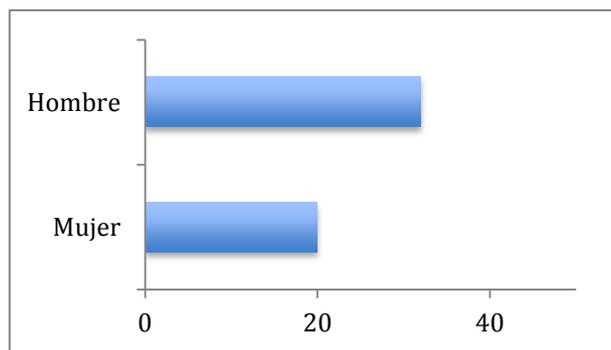
La distribución de las candidemias **según los servicios** se recoge en la Figura 12, siendo Cirugía, UCI y Neonatología los servicios con mayor número de aislamientos. En “otros”, con un 17,30% están los servicios de Pediatría, Ginecología, Nefrología, Digestivo, Cirugía Cardíaca, Neurocirugía, Neumología, Urología y Neurología, aislándose un caso en cada servicio.

De los 52 pacientes con candidemia, 19 eran mujeres y 33 eran hombres (Figura 13), no encontrándose diferencias significativas según sexo ( $P>0,05$ ).

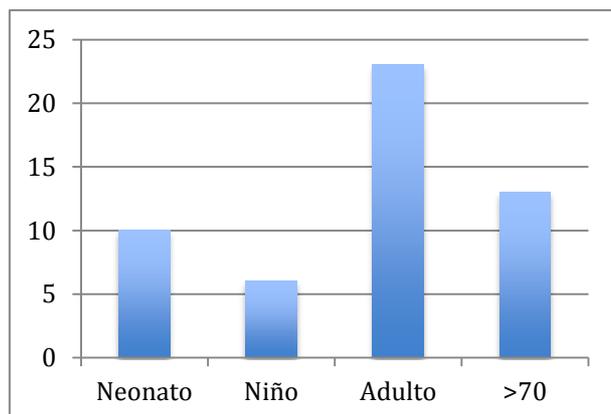
La mayoría de los pacientes eran adultos, con un alto porcentaje en mayores de 70 años. Al ser un hospital general con servicio de pediatría se aislaron 10 casos de candidemia en neonatos y 6 en niños (Figura 14).



**Figura 12.** Distribución de las candidemias por Servicios.



**Figura 13.**  
Distribución según sexo de los 52 pacientes con candidemia.

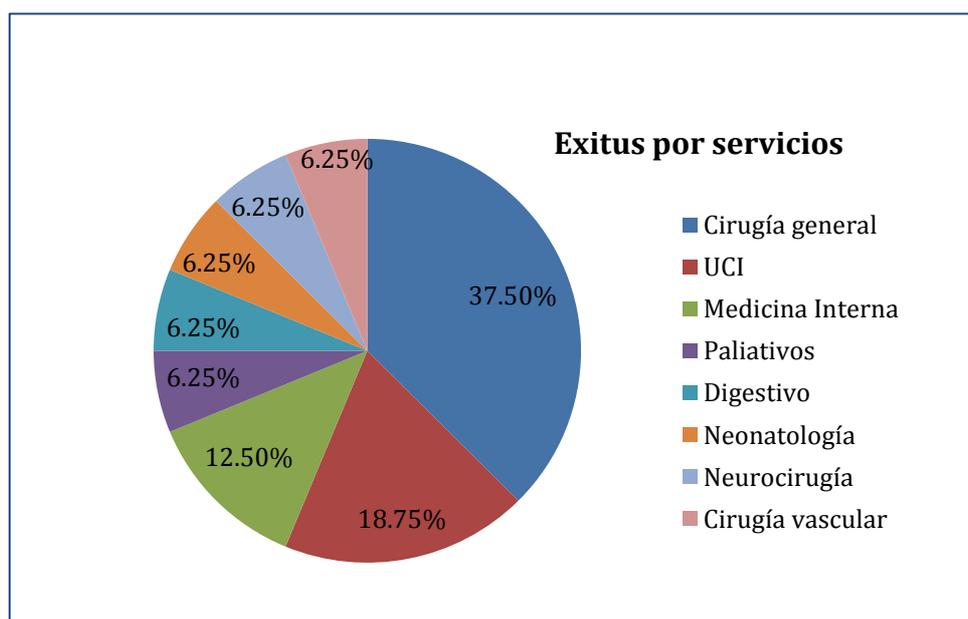


**Figura 14.**  
Candidemias por grupos de edad:  
Neonato: 0-4 semanas  
Niño: >4 semanas a ≤14 años  
Adulto: >14 a ≤69 años

### Pacientes con candidemia fallecidos

Durante el periodo de estudio **fallecieron** 16 de los 52 pacientes con candidemia (30,8%), 8 de ellos mujeres (42,1%; 8/19) y 8 varones (24,2%; 8/33).

En la Figura 15 se recoge el porcentaje de exitus en relación al servicio de procedencia de los aislados, encontrando la mayor prevalencia en Cirugía General, seguido por la UCI. Neonatología, aunque es uno de los Servicios con alta incidencia de candidemia, presenta un porcentaje de exitus reducido.



**Figura 15.** Porcentaje de exitus en relación al servicio de procedencia de las candidemias.

Teniendo en cuenta las **especies aisladas** en los pacientes que fallecen, calculamos el porcentaje respecto al total de fallecimientos de pacientes con candidemia (16), así como el porcentaje respecto al número de pacientes con aislamiento de esa especie (Tabla 11).

*C. albicans* es la especie donde se produce el mayor número de fallecimientos (43,7%), siendo la especie mas aislada. Analizando los resultados por especies, se observa que *C. tropicalis*, seguida por *C. albicans*, es la especie con mayor tasa de mortalidad respecto a su prevalencia. Los pacientes a los que se les aísla *C. tropicalis* fallecen el 66,6%, siendo el 25 % del total de exitus. Por el contrario, *C. parapsilosis* sensu stricto es la especie con menor mortalidad. Estos datos se reflejan en la Figura 16.

En la Tabla 12 se detalla la **patología de base** del paciente, especie aislada, servicio de procedencia del aislado, edad, sexo y tratamiento antifúngico recibido, si existe, en los pacientes que fallecieron. Respecto a la edad, uno prematuro, dos menores de 45 años y 13 > 45 años.

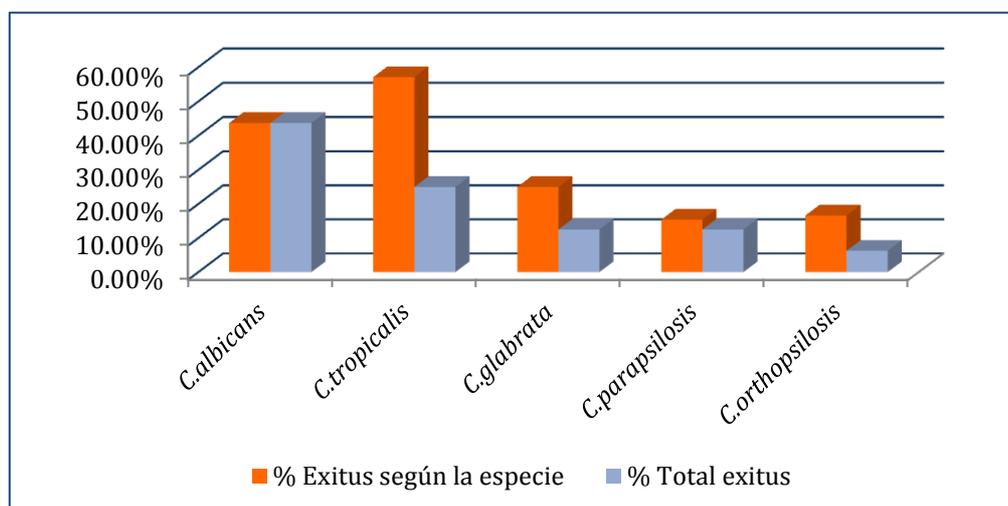
Todos habían recibido **tratamiento antifúngico**. En 3 casos se comprobó tras la identificación que no era el adecuado al administrar caspofungina en candidemia por *C. parapsilosis* y fluconazol en *C. glabrata*.

En la Tabla 13 se recogen las patologías y órganos afectados en los 52 pacientes. Los factores de riesgo valorados en el protocolo se incluyen en el estudio detallado de cada una de las especies aisladas.

Resultados

**Tabla 11.** Número de pacientes fallecidos en las distintas especies aisladas. Porcentaje en relación a las candidemias por esa especie (N) y al total de fallecimientos (T=16).

Candidemias (Nº pacientes, N)	Fallecimientos por especie <b>n</b>	Fallecimientos especie/ Aislamientos especie <b>n/N (%)</b>	Fallecimientos especie/ Total exitus candidemia <b>n/T (%)</b>
<i>C. albicans</i> (16)	7	7/16 (43,7%)	7/16 (43,7%)
<i>C. tropicalis</i> (6)	4	4/6 (66,6%)	4/16 (25%)
<i>C. glabrata</i> (7)	2	2/7 (28,57%)	2/16 (12,5%)
<i>C. parapsilosis</i> ss (13)	2	2/13 (15,38%)	2/16 (12,5%)
<i>C. orthopsilosis</i> (6)	1	1/6 (16.6%)	1/16 (6,25%)
TOTAL	16		



**Figura 16.** Porcentajes de pacientes que fallecen respecto a la prevalencia de la especie (■ fallecidos especie/aislados de esa especie) y porcentajes de pacientes que fallecen respecto al total de exitus (■ fallecidos especie/total de fallecidos).

**Tabla 12.** Pacientes fallecidos: Patología de base, servicio de procedencia, especie aislada, edad, sexo y tratamiento antifúngico recibido.

Paciente/Patología	Servicio	Especie	Edad	Sexo	Tratamiento <sup>a</sup>
8/Neoplasia Dolor no controlado	Paliativos	<i>C.albicans</i>	63a	Varón	FLC con IP <sup>b</sup>
11/Descompensación diabética. Hemicolecotomía	Cirugía General	<i>C.albicans</i>	44a	Varón	FLC con IP
13/Cáncer de Sigma. Peritonitis fecaloidea	Cirugía General	<i>C.albicans</i>	63a	Mujer	FLC antes de IP
34/Shock hemorrágico hemipericárdico	UCI	<i>C.albicans</i>	71a	Varón	CAS por IP
35/Hernia Umbilical, infección nosocomial	Cirugía General	<i>C.albicans</i>	80a	Mujer	FLC
37/ ELA, fallo respiratorio	M. Interna	<i>C.albicans</i>	62a	Varón	CAS antes de IP
41/Edema agudo de pulmón Fallo renal	UCI	<i>C.albicans</i>	77a	Mujer	VCR por IP
22/Prematuro (P) Bradicardia, Apnea	Neonatalog	<i>C.tropicalis</i>	P	Mujer	No-exitus
25/Leucemia Mieloide Aguda, Neumonía Inmunodeprimida	UCI	<i>C.tropicalis</i>	46a	Mujer	CAS
39/Aneurisma aorta abdominal	Cirugía vascular	<i>C.tropicalis</i>	72a	Varón	No-exitus
47/Adenocarcinoma vesical, cuadro infeccioso	Cuidados paliativos	<i>C.tropicalis</i>	56a	Mujer	No tto por no posible mejoría
36/Accid. cerebrovascular Craneotomía	Neuro cirugía	<i>C.glabrata</i>	80a	Mujer	CAS
43/Diarrea crónica, NP <sup>c</sup> domiciliaria, mugueta. Fiebre, trastornos metabólicos convulsiones generalizadas	Digestivo	<i>C.glabrata</i>	34a	Mujer	FLC (R intrínseca)
28/Fístula entérica, ileostomía	Cirugía general	<i>C.parapsil.</i>	63a	Varón	CAS por IP
31/Neoplasia Resección del colón	Cirugía general	<i>C.parapsil.</i>	60a	Varón	FLC→CAS→ ABD
38/Shock hemorrágico, Colestomía, peritonitis fecaloidea	Cirugía general	<i>C.orthopsil.</i>	62a	Varón	FLC por <i>Candida</i> en esputo

<sup>a</sup>ABD: anfotericina B; CAS: caspofungina; VCR: voriconazol; FLC: fluconazol.

<sup>b</sup>IP: informe previo cuando observamos levaduras en el gram;

<sup>c</sup>NP: Nutrición parenteral.

**Tabla 13. Patologías de los 52 pacientes con candidemia**

---

1.	Neonatología. Prematuro
2.	Neonatología. Prematuro. Bajo peso. Dificultad respiratoria
3.	Cirugía cardíaca (Endocarditis, operación)
4.	Neonatología. Prematuro. Bajo peso
5.	Meningitis bacteriana por <i>K. pneumoniae</i> (catéter IV Cándida)
6.	Operación: neosigma
7.	EPOC
8.	Neoplasia: mesotelioma
9.	Neonatología. Prematuro. CIR severo (crecimiento intrauterino retardado)
10.	Neurología. Previamente estancia en UCI por ACVC
11.	Digestivo (+ operación)
12.	<5. 2 años. Trombosis venosa intracraneal. UCI pediátrica
13.	Diverticulitis colónica perforada. Operación
14.	Hematológico. LMA
15.	Cesárea. Ginecología
16.	CA recto. Operación, resección
17.	<5. Prematuro. Bajo peso procedente de Ceuta
18.	<5. 3 meses. Hidronefrosis bilateral
19.	Shock séptico abdominal
20.	Hematológico. Hipotiroidismo congénito. LMA
21.	Adenoma intestino. Operación
22.	<5. Prematuro
23.	Fibrosis quística del páncreas
24.	<5. Prematuro
25.	LMA
26.	Deterioro cognitivo, demencia senil, Diabetes II
27.	Disnea con somnolencia
28.	Fístula entérica. Operación
29.	Artritis hombro derecho, origen post traumático
30.	<5. Prematuro
31.	Lesión estenosante, sospecha neoplasia. Cirugía
32.	<5. Prematuro
33.	Aneurisma aorta abdominal. Operación
34.	Shock hemorrágico hemopericardico. Operación
35.	Divertículo Zenker. Operación
36.	Hemorragia cerebral. Craneotomía
37.	Disnea + disfagia progresiva
38.	Aneurisma iliaco roto. Operación
39.	Aneurisma aorta abdominal. Operación
40.	Insuficiencia renal severa.
41.	Edema agudo de pulmón (pendiente de intervención para sustitución valvular)
42.	Herida catastrófica pierna derecha. Cirugía
43.	Digestivo. Diarrea crónica, malabsorción
44.	Hemorragia cerebral.
45.	<5. 2 años. Anemia aplásica
46.	Gastrectomía
47.	Cuidados paliativos. Adenocarcinoma vesical. Operada hace años
48.	Esternotomía. Operado anteriormente sustitución válvula aórtica
49.	Onfalocele. Cirugía pediátrica. Resección, anastomosis a nivel de yeyuno
50.	Retención orina. Colocación catéter suprapúbico
51.	<5. Prematuro
52.	Ca colon. Cirugía

---

## 2. Prevalencia y epidemiología de las especies aisladas

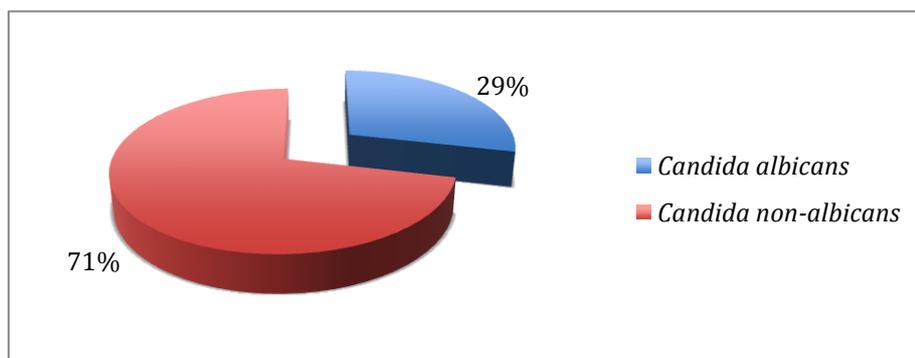
Todas las especies de *Candida* spp. se identificaron con medios cromogénicos (Chromagar) y métodos bioquímicos (galería ID 32 C de bioMérieux). En el caso de las tres especies de *Candida* grupo-*psilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. methapsilosis*) hemos utilizado técnicas moleculares ya que los métodos convencionales no son suficientes.

La especie más frecuentemente aislada en los hemocultivos fue *C. albicans* seguida por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. orthopsilosis*. Se aislaron durante el periodo de estudio 3 cepas de *C. krusei*, dos de ellas de pacientes hematológicos con leucemia mieloide aguda (LMA), un aislamiento único de *C. lusitaniae* y dos como *Candida* spp. En la Tabla 14 se recoge la frecuencia de las distintas especies aisladas y en la Figura 17 se representa la prevalencia de *C. albicans* y de las especies de *Candida* no-*albicans*.

**Tabla 14.** Especies aisladas durante el periodo del estudio

Especie	Total especie	Porcentaje
<i>C. albicans</i>	16	28,6
<i>C. parapsilosis</i>	14	25,0
<i>C. glabrata</i>	8	14,3
<i>C. tropicalis</i>	6	10,7
<i>C. orthopsilosis</i>	6	10,7
<i>C. krusei</i>	3	5,4
Otras	3	5,4
Total	56	100

## Resultados



**Figura 17.** Prevalencia de candidemias por *C. albicans* y *Candida non-albicans*

Se analizó la distribución de cada una de las especies por sexo (Tabla 15), encontrando que *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* y *C. krusei* se aislaron con mayor frecuencia en hombres y *C. glabrata* se aísla con mayor frecuencia en mujeres, aunque no se encuentra significación estadística ( $P > 0.1$ ).

En la Tabla 16 se distribuyen las cepas según los grupos de edad establecidos previamente, detectando que *C. albicans* se aísla fundamentalmente en adultos y *C. orthopsilosis* en neonatos y niños. Al valorar dentro de cada grupo de edad el porcentaje de las especies aisladas se confirmó la alta incidencia de *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* en neonatos. No hubo ninguna cepa de *C. glabrata* en neonatos mientras que *C. albicans* se encuentra en mayores de 70 años como primer aislamiento (Figura 18). En la Figura 19 se observa como la mayor incidencia de candidemias ocurre en adultos, y el 25% corresponde a mayores de 70 años.

**Tabla 15.** Distribución de las especies de *Candida* por sexo

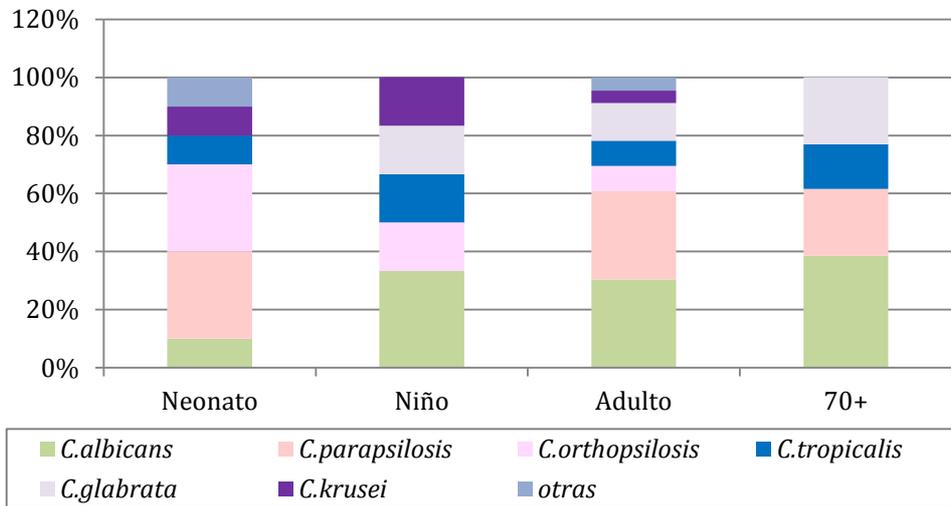
Especie aislada	Pacientes		Total pacientes
	femenino	masculino	
<i>C. albicans</i>	4 (17,7%)	11 (73,3%)	15
<i>C. parapsilosis</i>	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13
<i>C. glabrata</i>	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7
<i>C. tropicalis</i>	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6
<i>C. orthopsilosis</i>	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6
<i>C. krusei</i>	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3
Otras	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2
<b>Total pacientes</b>	<b>20 (38,5)</b>	<b>32 (61,5)</b>	<b>52</b>

**Tabla 16.** Especies aisladas según grupos de edad considerando neonatos de 0 a 4 semanas; niño de >4 semanas a ≤14 años; adulto >14 a ≤69 años.

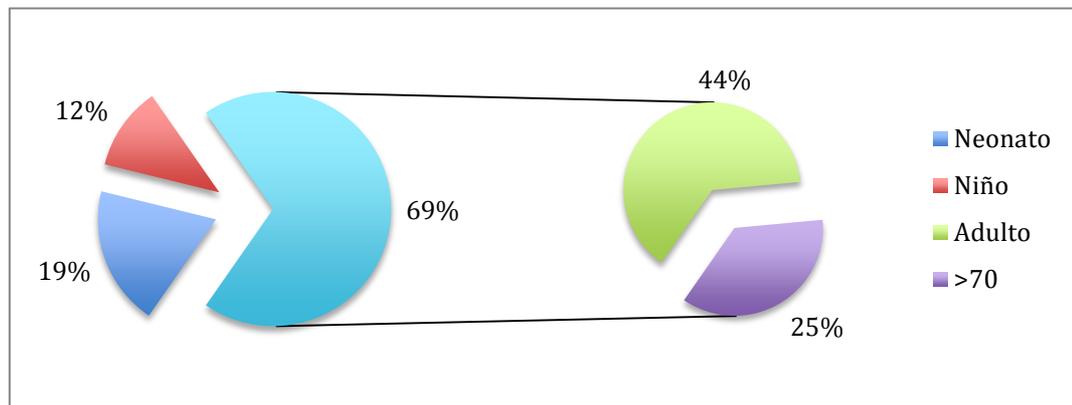
Grupos edad	Especies aisladas en los hemocultivos							Total
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>	Otras	
<b>Neonato</b> N	1	3	0	1	3	1	1	10
%	6,3%	23,1%	0%	16,7%	50,0%	33,3%	50,0%	19,2%
<b>Niño</b> N	2	0	1*	1	1	1	0	6
%	12,5%	,0%	16,7%	16,7%	16,7%	33,3%	,0%	11,5%
<b>Adulto</b> N	7	7	3	2	2	1	1	23
%	43,8%	53,8%	50,0%	33,3%	33,3%	33,3%	50,0%	44,2%
<b>70+</b> N	5	3	3	2	0	0	0	13
%	33,3%	23,1%	42,9%	33,3%	,0%	,0%	,0%	25,0%
<b>TOTAL</b> N	16	13	7	6	6	3	2	52
%	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

\*aislamiento mixto: 2 cepas de *C. glabrata* y 1 *Candida spp.*

Resultados



**Figura 18.** Prevalencia de las distintas especies de *Candida* por grupos de edad



**Figura 19.** Porcentaje de cada grupo de edad en el total de candidemias

## 2.1 Presencia de factores de riesgo según la especie aislada

A partir de la ficha realizada a los pacientes con candidemia se puede analizar la presencia de factores de riesgo posibles, respecto al desarrollo de una candidemia.

En la Tabla 17 se recogen los diferentes factores de riesgo como presencia de catéter, nutrición parenteral, tratamiento con corticoides, cirugía previa, tratamiento previo con antibióticos o nacimiento prematuro, que encontramos en los pacientes con candidemia en relación a la especie aislada. Analizando P-valor de los distintos factores de riesgo y las especies aisladas, la presencia de catéter es significativa ( $P=0,005$ ), mientras que con el resto de factores no se obtienen valores significativos: Edad ( $P=0,64$ ); Nutrición parenteral ( $P=0,23$ ); Corticoides ( $P=0,31$ ) y Cirugía previa ( $P=0,33$ ).

**Tabla 17.** Factores de riesgo en relación con la especie aislada, considerando los porcentajes dentro de cada especie. Tabla de contingencia.

Especie	Catéter N (%)	Nutrición parenteral N(%)	Corticoides N(%)	Cirugía N(%)	Antibiótico previo N(%)	Nacimiento prematuro N(%)
<i>C.albicans</i>	14(93,0)	5 (33,3)	3 (20,0)	7 (46,6)	15 (100)	1 (6,25)
<i>C.parapsilosis</i>	11(84,6)	6 (46,2)	2 (15,4)	7 (53,8)	13 (100)	3 (23,1)
<i>C.glabrata</i>	6 (85,7)	5 (71,4)	0	3 (42,8)	7 (100)	0
<i>C.tropicalis</i>	6 (100)	3 (50,0)	1(16,7)	1 (16,7)	6 (100)	1 (16,7)
<i>C.orthopsilosis</i>	6 (100)	6 (100)	1 (16,7)	4 (50,0)	6 (100)	3 (50,0)
<i>C.krusei</i>	1 (33,3)	1(33,3)	2 (66,6)	0	3 (100)	1 (33,3)
Otras	2 (100)	1(50,0)	0	0	2 (100)	1 (50,0)
<b>Total</b>	46(88,5)	28(53,8)	9 (17,3)	22(42,3)	52 (100)	10 (19,2)

### 3. Antifúngicos

Se estudió la sensibilidad a aquellos antifúngicos útiles para candidemia como son triazoles, fluconazol, anfotericina B y equinocandinas y se valoró la pauta terapéutica realizada.

#### 3.1 Sensibilidad a antifúngicos de las especies aisladas

Se valoró la sensibilidad a los antifúngicos de las 56 cepas aisladas, aplicando los puntos de corte propuestos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; Tabla 18) como del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI; Tabla 19). Los criterios son más exigentes en EUCAST que en CLSI. Así fluconazol se considera sensible a concentraciones  $<8$  mg/L con el criterio del CLSI, mientras que EUCAST considera sensibles a aquellas cepas que lo son a dosis  $<4$  mg/L.

Las cepas estudiadas son en su mayoría sensibles a los antifúngicos testados, aunque el número de aislados de algunas especies es bajo. En la Tabla 20 se recogen los resultados obtenidos indicando el intervalo de la CMI, la CMI 50 y la CMI 90.

- El 100% de los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis* fueron sensibles a los antifúngicos.
- *C. parapsilosis* tiene una cepa sensible-dosis dependiente a fluconazol según EUCAST (4 mg/L).
- Un alto porcentaje de las cepas de *C. glabrata* son resistentes a fluconazol, con una CMI 50 de 16 mg/L.
- *C. krusei*, intrínsecamente resistente a fluconazol, presentó valores altos de CMI en las lecturas realizadas a las 24h y 48h, siendo sensible al resto de antifúngicos testados.

**Tabla 18.** Puntos de corte según EUCAST, documento Edef 7.2.

EUCAST	Puntos de corte según especies (mg/L)									
	<i>C.albican</i>		<i>C.tropicali</i>		<i>C.parapsilosi</i>		<i>C.glabrat</i>		<i>C.krusei</i>	
Antifúngico	<i>s</i>		<i>s</i>		<i>s</i>		<i>a</i>		<i>i</i>	
	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
<b>Caspofungin a</b>	Nota*		Nota		-	-	Nota		Nota	
<b>Voriconazol</b>	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	IE**		IE	
<b>Fluconazol</b>	2	4	2	4	2	4	0.002	32	-	-
<b>Anfotericina B</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\*Nota: debido a la variación significativa inter-laboratorio, no se establecen puntos de corte

\*\*IE, evidencia insuficiente si la especie es sensible

**Tabla 19.** Puntos de corte de los antifúngicos según CLSI.

CLSI	Intervalos CMI (mg/L)		
	Sensible (S)	Sensible dosis dependiente (SDD)	Resistente (R)
<b>Caspofungina</b>			
<b>Micafungina</b>	≤2		>2 <sup>a</sup>
<b>Anidulofungina</b>			
<b>Voriconazol</b>	≤1	2	≥4
<b>Fluconazol<sup>b</sup></b>	≤8	16-32	≥64
<b>Anfotericina B<sup>c</sup></b>			

a: no sensible

b: *C. krusei* resistencia intrínseca; *C. glabrata* con CMI ≤32, puede utilizarse dosis mayor

c: No aprobada la interpretación de los datos.

Resultados

**Tabla 20.** Sensibilidad de las distintas especies aisladas a caspofungina, voriconazol, fluconazol, anfotericina B liposomal, valorada por Sensititre YeastOne (CMI en mg/L).

Especies	Antifúngico	CMI intervalo	CMI 50	CMI 90	% Sensibilidad
<i>C.parapsilosis</i> (n=14)	CAS	0,06-0,5	0,25	0,5	100%
	VOR	≤0,008-0,03	0,008	0,03	100%
	FLZ	0,125-4,00	1,00	2,00	92,85%*EUCAST 100% CLSI
	AMB	0,125-1	1,00	1,00	100%
<i>C.orthopsilosis</i> (n=6)	CAS	0,03-1,00	0,125	0,5	ND
	VOR	≤0,008-0,03	0,016	0,03	ND
	FLZ	0,5-2	0,5	1	ND
	AMB	0,03-1	0,25	0,5	ND
<i>C.albicans</i> (n=16)	CAS	≤0,008-0,125	0,032	0,125	100%
	VOR	≤0,008-0,06	≤0,008	0,03	100%
	FLZ	≤0,008-2,00	0,25	1,00	100%
	AMB	0,06-1,00	0,5	1,00	100%
<i>C.glabrata</i> (n=8)	CAS	0,06-0,5	0,06	0,25	
	VOR	0,008-2,00	0,25	1,00	ND
	FLZ	1,0-256,0	16	128,0	ND
	AMB	0,25-2,00	0,5	1,00	100%
<i>C.tropicalis</i> (n=6)	CAS	0,016-0,125	0,03	0,06	100%
	VOR	0,016-0,125	0,06	0,06	100%
	FLZ	0,5-2,00	0,5	2,00	100%
	AMB	0,5-2,0	1,00	1,00	100%
<i>C.krusei</i> (n=3)	CAS	0,25-1,00	0,125	0,5	
	VOR	≤0,008-0,06	0,03	0,06	ND
	FLZ	4-32	32	32	INEFEC
	AMB	0,125-1	1,00	1,00	100%
Otras (n=3)	CAS	0,032-0,5	0,25	0,5	
	VOR	<0,008-0,06	0,03	0,06	
	FLZ	<0,008-2,00	0,06	2,00	
	AMB	0,25-1,00	0,5	0,5	

\*Una cepa de *C. parapsilosis* es sensible-dosis dependiente a fluconazol

### 3.2. Pauta terapéutica antifúngica

La pauta terapéutica establecida en los 52 pacientes con candidemia fue diferente:

- 5 pacientes no recibieron tratamiento antifúngico al no valorarse el aislamiento de *Candida* en hemocultivo.
- 3 pacientes fallecieron previo al tratamiento.
- 13 pacientes murieron una vez empezado el tratamiento, a los pocos días.
- 28 pacientes tuvieron mejoría-curación.

En la Tabla 21 se recoge el número de pacientes tratados y el antifúngico seleccionado después del Informe Previo (IP) que se realizaba al observar levaduras en el hemocultivo. Los datos detallados del tratamiento instaurado, así como los cambios realizados en el mismo y la evolución de los 52 pacientes se recogen en la Tabla 22.

**Tabla 21.** Tratamiento instaurado por el Informe Previo (IP).

Número de Pacientes	Tratamiento instaurado
12	Fluconazol
12	Anfotericina B liposomal
10	Caspofungina
5	Voriconazol
2	Anfotericina B + Caspofungina
2	Anfotericina B + Fluconazol
1	Retiran nutrición parenteral
5	No consideran tratamiento
3	No tratamiento-Exitus

Resultados

**Tabla 22.** Tratamiento y evolución de los 52 pacientes con candidemia.

1	<i>C. lusitaniae</i>	IP: Anfotericina B liposomal	Mejoría
2	<i>C. orthopsilosis</i>	IP: Anfotericina B liposomal	Mejoría
3	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Fluconazol	Mejoría
4	<i>C. parapsilosis</i>	IP: sigue con Anfotericina B liposomal	Mejoría
5	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Fluconazol → Caspofungina	Mejoría
6	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Sigue con fluconazol	Mejoría
7	<i>C. parapsilosis</i>	IP: no lo valoran	No valoran
8	<i>C. albicans</i>	IP: Fluconazol	<b>EXITUS</b>
9	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Anfotericina B + fluconazol	Mejoría
10	<i>C. glabrata</i>	Previo voriconazol IP → Caspofungina	Mejoría
11	<i>C. albicans</i>	IP: Fluconazol	<b>EXITUS</b>
12	<i>C. tropicalis</i>	IP: Anfotericina B+ Caspofungina (persistencia)	Mejoría
13	<i>C. albicans</i>	IP: sigue fluconazol	<b>EXITUS</b>
14	<b>C. krusei</b>	Previo Anfotericina B, IP: añaden Caspofungina	Curación
15	<i>C. glabrata</i>	IP: Voriconazol	Curación
16	<i>C. albicans</i> *	IP: 1º fluconazol: persistencia → a Caspofungina	Erradicación
17	<i>C. albicans</i>	IP: Anfotericina B persistencia añaden Fluconazol	
18	<i>C. albicans</i>	IP: sigue con Fluconazol	Curación
19	<i>C. albicans</i>	IP: Voriconazol	Mejoría
20	<b>C. krusei</b>	IP: Anfotericina B liposomal	Mejoría
21	<i>C. orthopsilosis</i>	IP: Fluconazol	Mejoría
22	<i>C. tropicalis</i>	IP <b>tarde</b>	<b>EXITUS</b>
23	<i>C. glabrata</i> **	IP: sigue con Voriconazol	Mejoría
24	<i>C. orthopsilosis</i>	IP: sigue con Anfotericina B liposomal	Erradicación
25	<i>C. tropicalis</i>	IP: sigue Caspofungina	<b>EXITUS</b>
26	<i>C. glabrata</i>	Previo Fluconazol IP → Caspofungina	Mejoría
27	<i>C. tropicalis</i>	IP no valoran	Mejoría
28	<i>C. parapsilosis</i>	IP <b>tarde</b>	<b>EXITUS</b>
29	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Fluconazol	Erradicación
30	<i>C. orthopsilosis</i>	Profilaxis Fluconazol, IP → Anfotericina B liposomal	Curación
31	<i>C. parapsilosis</i>	Fluconazol IP → <b>Caspofungina</b> → Anfotericina B lipo	<b>EXITUS</b>
32	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Anfotericina B liposomal	Erradicación
33	<i>C. glabrata</i>	IP: Anfotericina B liposomal	Erradicación
34	<i>C. albicans</i>	IP: Caspofungina	<b>EXITUS</b>
35	<i>C. albicans</i>	IP: Fluconazol dolor fosa iliaca → Caspofungina	<b>EXITUS</b>
36	<i>C. glabrata</i>	IP: Caspofungina	No mejoría
37	<i>C. albicans</i>	IP: Caspofungina	<b>EXITUS</b>
38	<i>C. orthopsilosis</i>	Previo IP: Fluconazol. No cambio	<b>EXITUS</b>
39	<i>C. tropicalis</i>	IP: <b>ya había fallecido</b>	<b>EXITUS</b>
40	<i>C. albicans</i>	IP: Voriconazol	Erradicación
41	<i>C. albicans</i>	IP: Voriconazol	<b>EXITUS</b>
42	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Fluconazol	Curación
43	<i>C. glabrata</i>	IP: <b>Fluconazol</b>	<b>EXITUS</b>
44	<i>Candida spp.</i>	IP: Anfotericina B liposomal	Afebril
45	<i>C. albicans</i>	IP: Anfotericina B liposomal	Erradicación
46	<i>C. albicans</i>	Previo Fluconazol	Mejoría
47	<i>C. tropicalis</i>	IP: retirada Nutrición parenteral	<b>EXITUS</b>
48	<i>C. parapsilosis</i>	IP: Fluconazol	Curación
49	<i>C. orthopsilosis</i>	IP: sigue con Caspofungina	Curación
50	<i>C. albicans</i>	IP no modificó	No valoran
51	<b>C. krusei</b>	IP ya estaba de alta	No valoran
52	<i>C. parapsilosis</i>	IP no lo valoran	De alta

\*persistencia

\*\**C. glabrata* + *Candida spp.*

## **B. ESTUDIO DE FACTORES DE PATOGENICIDAD**

Existen pocos trabajos que estudien factores de patogenicidad en cepas de *Candida* aisladas de hemocultivos. Nosotros valoraremos la hidrofobicidad de la superficie celular, capacidad de adherencia a plástico, capacidad de formación de biofilm y actividad enzimática aspartil-proteasa.

### **1. Hidrofobicidad de la superficie celular**

Se valoró la hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) de todas las especies, incubadas a 37° C en medio RPMI 1640 durante 24 horas en agitación. Se utilizó el método de adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH), método bifásico agua-hidrocarburo, descrito por Hazen et al (1986). Este método valora la disminución de la absorbancia de la fase acuosa, después de agitar una suspensión de las levaduras en PBS con xileno (Figura 20).

Se establecieron los siguientes rangos de HSC:

Alta HSC	>50%
Media HSC	25-50%
Baja HSC	< 25%

## Resultados

Los resultados obtenidos muestran que la HSC está muy relacionada con la especie aislada, aunque dentro de cada especie encontramos algunas discrepancias (Tabla 23, Figura 21):

- *C. albicans* es la especie mas hidrofílica con un valor medio de 15% de HSC.
- *C. orthopsilosis* es también una especie hidrofílica aunque con un rango mas amplio (0-50%).
- *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. glabrata* y *C. krusei* son especies muy hidrofóbicas.
- *C. tropicalis* presenta hidrofobicidad media-alta variable entre las cepas.

### Excepciones encontradas en *C. albicans*:

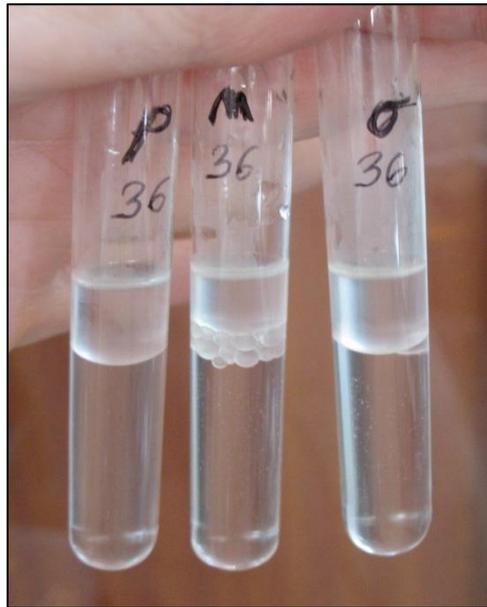
Paciente 35 (aislado 44) HSC= 25%; adherencia= 0,1; Biocapa ++

Paciente 40 (aislado 49) HSC= 26,5%; adherencia= 1,1; Biocapa +++

### Excepciones encontradas en *C. parapsilosis*:

Paciente 3 (aislado 4): HSC=0%; adherencia=0,06; Biocapa negativa.

Paciente 5 (aislado 7): HSC=15,0%; adherencia=0,04; Biocapa negativa.



**Figura 20.** HSC por el método MATH en especies de *Candida* grupo-*psilosis*:

Tubo p, *C. parapsilosis*

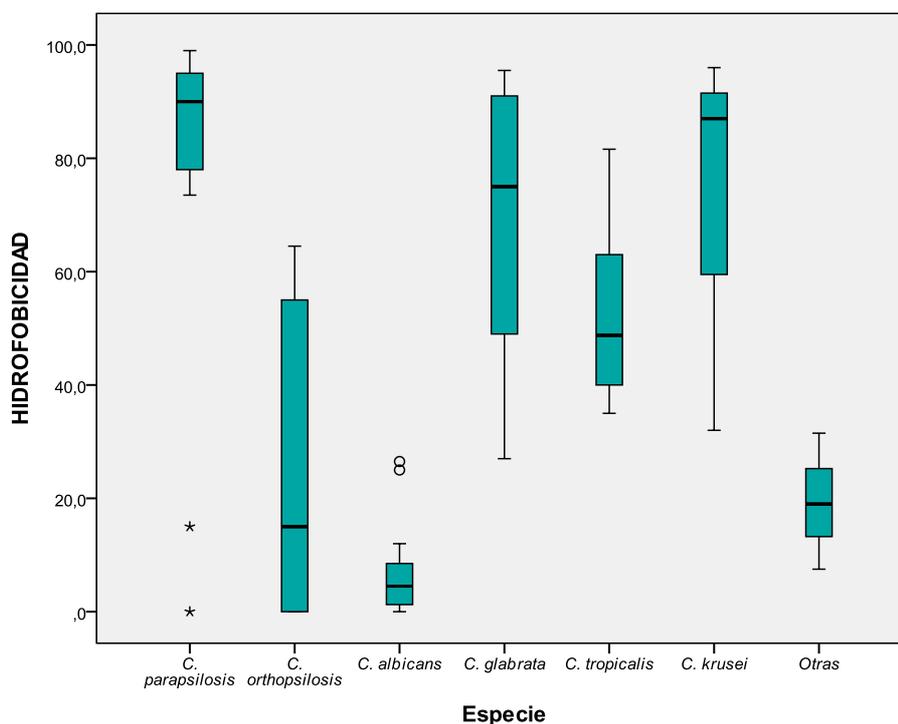
Tubo m, *C. metapsilosis*

Tubo o, *C. orthopsilosis*

Resultados

**Tabla 23.** Porcentaje de HSC de las especies aisladas, indicando el número de aislados (N), la media y el intervalo de confianza.

Especies	N	% HSC media	Intervalo de confianza para la media al 95%		Min	Max
<i>C.albicans</i>	16	6,8	2,45	11,17	0,0	26,5
<i>C.parapsilosis</i>	14	77,4	58,1	96,7	0,0	99,0
<i>C.glabrata</i>	8	69,1	47,24	90,87	27,0	95,5
<i>C.orthopsilosis</i>	6	29,9	-5,2	55,0	0,0	75,0
<i>C.tropicalis</i>	6	52,0	37,49	66,53	0,0	81,6
<i>C.krusei</i>	3	71,6	-14,39	157,73	32,0	96,0
Otras	3	28,3	-4,13	60,63	7,5	55,0



**Figura 21.** Valores de HSC (rango y media) de cada una de las especies.

## 2. Adherencia a poliestireno

Se estudia la adherencia a poliestireno en microplaca. Para la valoración de la adherencia a plástico utilizamos la técnica de Christensen et al (1985), realizando previamente la siguiente estandarización de la técnica para levaduras:

- Valoramos la adherencia en varios tipos de placas y se comprobó que las **placas Greiner** nos ofrecían resultados máximos y reproducibles. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, siendo los resultados superponibles ( $\pm 0,001$ ).
- Para seleccionar **el tiempo** de incubación óptimo, se realizaron incubaciones a distintos tiempos, encontrándose la máxima adherencia a las 2 h y se mantenía estable durante 24-48 h.
- Para seleccionar la **densidad** adecuada de la suspensión de levaduras en PBS, utilizamos diluciones de una cepa adherente y observamos que a partir de la dilución con densidad óptica inicial de 0,4 la adherencia alcanza el nivel máximo, a partir de la cual se mantiene con niveles constantes.
- La **lectura visual** diferencia claramente la presencia de levaduras adheridas, al apreciar la turbidez del pocillo.
- La **lectura de la turbidez (DO)** de las levaduras adheridas se realizó en un densitómetro (Microplate Reader, Anthos 2020). El rango de las densidades ópticas obtenidas con las distintas cepas fluctúa desde 0,02 hasta 0,20.
- Los resultados que visualmente habíamos considerado negativos presentaban una  $DO < 0,05$ . Haciendo un estudio estadístico de los resultados obtenidos, se confirma el **umbral de positividad** en  $DO_{492} > 0,05$ . Este dato se correspondía con la media de la

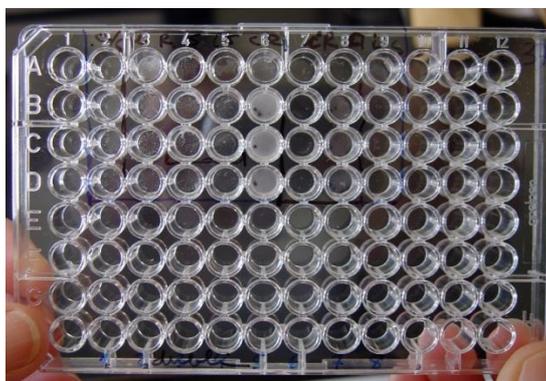
## Resultados

absorbancia de todos los resultados negativos (0,03) más tres veces la desviación típica (0,01), lo que nos permite asegurar con un 99% de confianza que las no adherentes tienen valores inferiores a ese umbral.

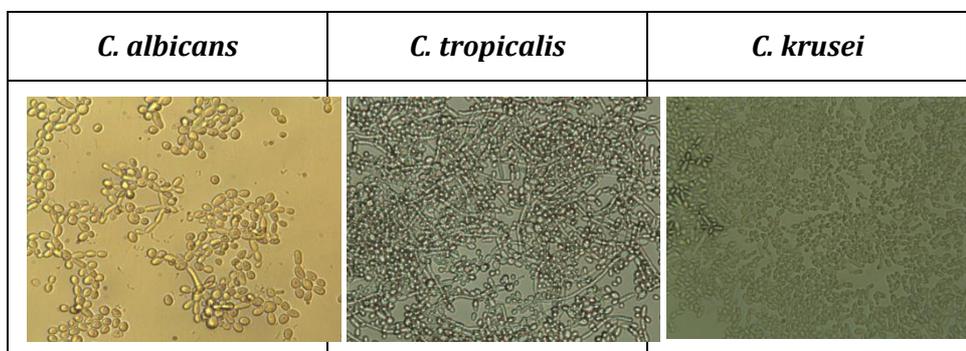
En la Figura 22 se observa la diferente adherencia a plástico de las distintas especies y en la Figura 23 se muestra a un aumento 40x al microscopio óptico las levaduras adheridas.

En la Tabla 24 se recogen los datos obtenidos según especie, con el rango y la media de los valores obtenidos con todas las cepas. La media global de todas las *Candida* aisladas en nuestro estudio es  $0,079 \pm 0,026$ , siendo *C. glabrata* la especie más adherente seguida por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. orthopsilosis* y *C. krusei* (Figura 24).

Se realizó un estudio comparativo entre capacidad adherencia y nivel de HSC de las 56 levaduras aisladas en el estudio, encontrando que existe significación estadística (sig 0,001),  $r = 0,42$ , aunque sólo el 17% ( $r^2 = 0,17$ ) de la adherencia queda explicada por la hidrofobicidad (Tabla 25).



**Figura 22.** Adherencia a poliestireno en microplacas Greiner.

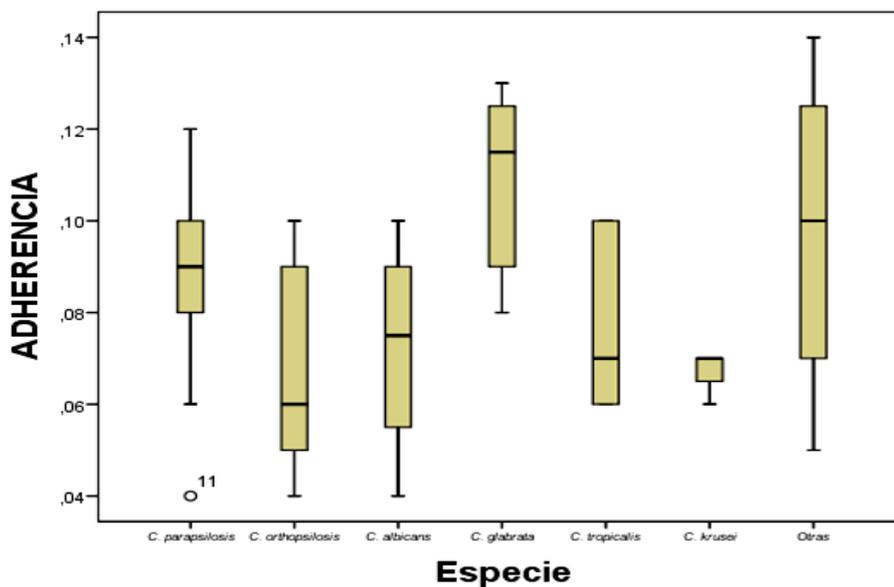


**Figura 23.** Capa adherente de diferentes levaduras al microscopio (40x).

**Tabla 24.** Capacidad de adherencia a poliestireno de las distintas especies aisladas, valorada en densidad óptica (DO).

<b>Especie (Número de cepas)</b>	<b>Adherencia (media DO)</b>	<b>Intervalo</b>
<i>C. albicans</i> (N=16)	0,072±0,02	0,04-0,10
<i>C. parapsilosis</i> (N=13)	0,086±0,02	0,04-0,12
<i>C. glabrata</i> (N=8)	0,11±0,02*	0,08-0,13
<i>C. tropicalis</i> (N=6)	0,076±0,02	0,03-0,10
<i>C. orthopsilosis</i> (N=6)	0,067±0,02	0,04-0,10
<i>C. krusei</i> (N=3)	0,06±0,005	0,06-0,07
Otras (N=4)	0,1±0,03	0,05-0,14
<b>TOTAL (N= 56)</b>	<b>0,079±0,026</b>	<b>0,03-0,14</b>

Resultados



**Figura 24.** Valores de adherencia (intervalo y media) de cada una de las especies.

**Tabla 25.** Correlación entre HSC y adherencia en las 56 cepas.

Correlaciones		HSC	ADH
HIDROFOBICIDAD (HSC)	Correlación de Pearson	1	,420**
	Significación (bilateral)		,001
	N	56	56
ADHERENCIA (ADH)	Correlación de Pearson	,420**	1
	Significación (bilateral)	,001	
	N	56	56

\*\*La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

### 3. Formación de biocapa

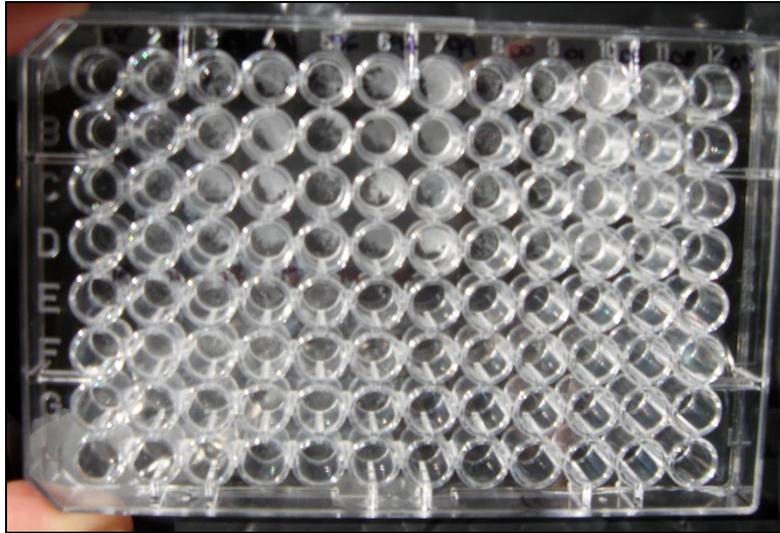
Se estudió la formación de la biocapa de las 56 cepas sobre placas de poliestireno, con pequeñas modificaciones de la técnica de Hawser et al (1998), descritas por Blanco et al (2006) incubando las levaduras en medio RPMI 1640 a 37°C y en agitación durante 48h. Como factor de corrección, a la medida de la densidad óptica de la biocapa formada, restamos el valor de la densidad óptica obtenida por la adherencia de la cepa.

Observamos en la Figura 25 la imagen de los pocillos de la microplaca con la biocapa adherida y en la Figura 26 la imagen de la biocapa de uno de los pocillos en microscopio óptico (40x).

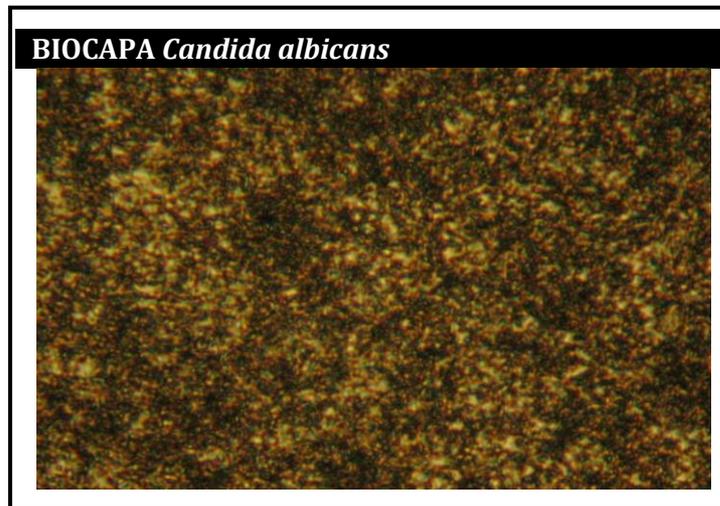
En la Tabla 26 y Figura 27 recogemos los datos obtenidos diferenciando las distintas especies, observando que *C. albicans* y *C. tropicalis* son los que presentan mayor formación de biofilm y también más variabilidad, seguido por *C. parapsilosis* mientras que *C. glabrata* y *C. krusei* no forman biofilm.

En el estudio comparativo realizado entre la capacidad de adherencia y formación de biocapa de las 56 levaduras aisladas en el estudio no se encontró significación estadística (P=0,429).

Resultados



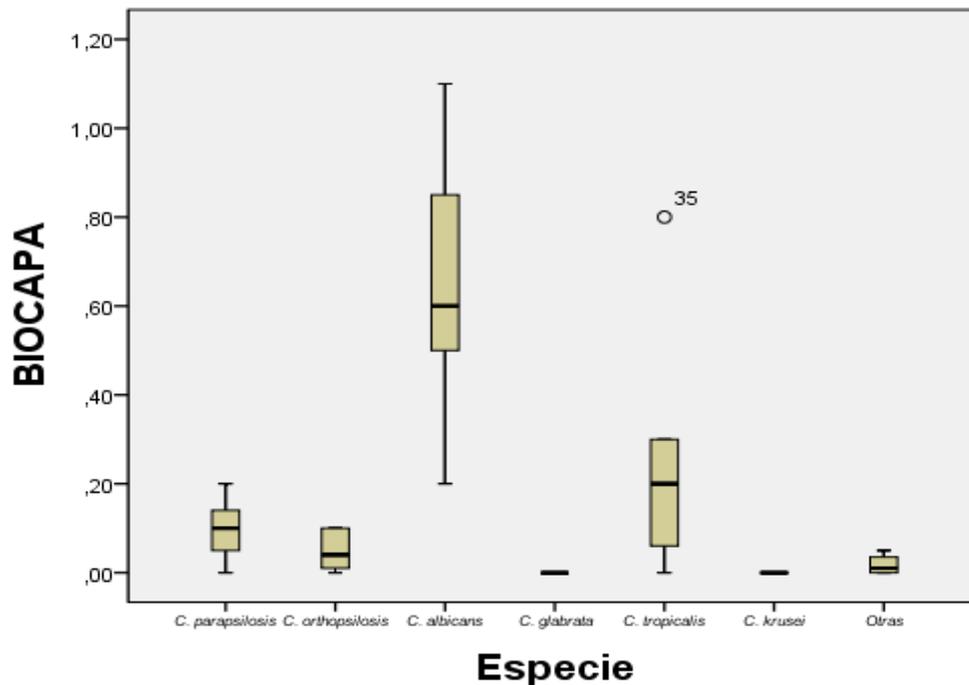
**Figura 25.** Formación de la biocapa en microplaca Greiner de 96 pocillos. Cada prueba por cuadruplicado.



**Figura 26.** Biocapa de *C. albicans* observada al microscopio óptico (40x) en el pocillo de la microplaca

**Tabla 26.** Capacidad de formación de biocapa de las distintas especies de *Candida* aisladas de hemocultivos.

Especie (Nº cepas)	Biocapa (D.O.)	Intervalo
<i>C.albicans</i> (N=16)	0,63±0,24	0,20-1,10
<i>C.parapsilosis</i> (N=14)	0,10±0,07	0,00-0,20
<i>C.orthopsilosis</i> (N=9)	0,05±0,04	0,00-0,10
<i>C.tropicalis</i> (N=6)	0,29±0,29	0,00-0,80
<i>C.glabrata</i> (N=8)	0,00±0,00	0,00-0,00
<i>C.krusei</i> (N=3)	0,00±0,00	0,00-0,00
Otras (N=5)	0,02±0,02	0,00-0,05
<b>TOTAL (N=56)</b>	<b>0,15±0,09</b>	<b>0,00-1,10</b>



**Figura 27.** Valores de la DO de la biocapa formada (intervalo y media) de cada una de las especies.

#### 4. Producción de aspartil proteasas

Se estudia la actividad proteolítica en las 56 cepas, valorando la actividad de las enzimas aspartil proteasas secretadas (Saps) sobre la albúmina del medio YCB-BSA. El estudio total se realizó después de 6 días de incubación y posterior tinción con negro amido al 1% (Figura 28) ya que según estudio previo fueron las condiciones óptimas para la valoración del halo producido. Se calculó el Índice Pz según la fórmula de Willianson et al (1986), considerando los siguientes niveles:

**Índice Pz= diámetro colonia/diámetro colonia + halo**

Alto: Pz  $\leq$ 0,5; Medio: Pz 0,51-0,74; Bajo: Pz  $\geq$ 0,74; Negativo Pz =1.



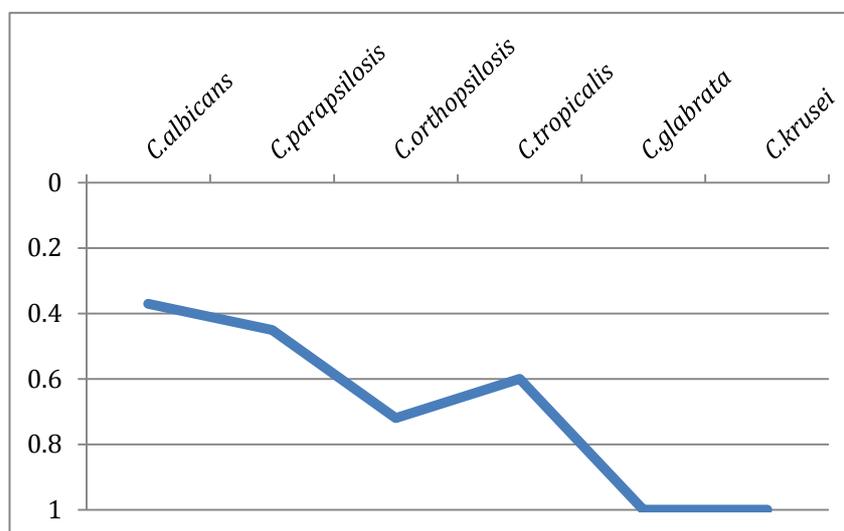
**Figura 28.** Valoración de la actividad aspartil-proteasa en medio YCB-BSA. Lectura de los halos con tinción negro amido (1%) a los 6 días de incubación en CO<sub>2</sub> en *C. albicans* (cepa 13) y *C. parapsilosis* (cepa 11).

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 27. Se observa la producción de un doble halo: Uno transparente que indica lisis total de la albúmina y a continuación uno opaco formado por restos precipitados. Son Saps + *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis* (Figura 29).

**Tabla 27.** Actividad aspartil proteasa: Distribución de las especies según nivel de actividad y valor medio del índice Pz obtenido a los 6 días de incubación, comparando los dos halos obtenidos.

	I Pz - Halo opaco				IPz - Halo transparente			
	Alto*	Medio	Bajo	Negativo	Alto	Medio	Bajo	Negativo
<i>C.albicans</i> (n)	2			13	14	1		
Media I Pz	<b>0,9± 0,23</b>				<b>0,37 ±0,09</b>			
<i>C.parapsilosis</i>	13				10	3		
Media I Pz	<b>0,22 ±0,02</b>				<b>0,45 ± 0,05</b>			
<i>C.orthopsilosis</i>	6				1	3	1	1
Media I Pz	<b>0,23 ±0,02</b>				<b>0,72± 0,2</b>			
<i>C.tropicalis</i>	6					6		
Media I Pz	<b>0,32± 0,04</b>				<b>0,6 ± 0,06</b>			
<i>C.glabrata</i>	3			5				8
Media I Pz	<b>0,72±0,38</b>				<b>1</b>			
<i>C.krusei</i>				3				3
Media I Pz	<b>1</b>				<b>1</b>			
Otras	3							3
Media I Pz	<b>0,33±0,05</b>				<b>1</b>			
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>			<b>21</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>15</b>
Media I Pz+SD	<b>0,54±0,34</b>				<b>0,65±0,26</b>			

\*Alto: Pz ≤0,5; Medio: Pz 0,51-0,74; Bajo: Pz ≥0,74; Negativo Pz =1.



**Figura 29.** Actividad enzimática de las distintas especies de *Candida* según el halo transparente (I Pz).

### 3. ESTUDIO COMPARATIVO POR ESPECIES

Se realizó en cada especie la valoración de sus datos epidemiológicos, el tratamiento antifúngico recibido, la presencia de factores de virulencia y su relación con la presencia de los mismos en *C. albicans*.

#### 1. *C. albicans*

*C. albicans* fue la especie predominante. Se aislaron 16 cepas a partir de los hemocultivos de 15 pacientes, ya que al paciente 46 se aísla *C. albicans* en un segundo hemocultivo, después de dos semanas del primer aislamiento, por lo que se considera nueva cepa.

Los **datos epidemiológicos** de los 15 pacientes con candidemia por *C. albicans* se recogen en la Tabla 28. La media de edad de los pacientes a los que le aislamos *C. albicans* es  $50,87 \pm 29,27$  (rango 0-81).

En cuanto al **tratamiento** recibido fué:

- Fluconazol, 5 pacientes (8, 11, 13, 18, 46)
- Voriconazol, 3 pacientes (19, 40, 41)
- Anfotericina B liposomal, 1 paciente (45)
- Anfotericina B liposomal + fluconazol, 1 paciente (17)
- Caspofungina, 2 pacientes (34, 37)
- Fluconazol con cambio a caspofungina por persistencia, 2 pacientes (16, 35)
- No recibe tratamiento 1 paciente (50)

**Tabla 28.** Datos epidemiológicos de los 15 pacientes con candidemia por *C. albicans*.

Paciente	Sexo, edad, servicio	Patología
8	Varón, 63 años, Paliativos	Neoplasia, mesotelioma
11	Varón, 44 años, Digestivo	Hemicolectomía
13	Mujer, 63 años, URP-Post quirúrgica	Diverticulitis colónica perforada
16	Varón, 62 años, Cirugía general	CA recto estadio T3, Resección rectosigmoide
17	Varón, Neonatología	Prematuridad
18	Varón, 3 meses, lactantes	Hidronefrosis bilateral
19	Varón, 36 años, UCI	Parapléjico, Shock séptico abdominal
34	Varón, 71 años, UCI	Shock hemorrágico
35	Mujer, 80 años, Cirugía general	Hernia Umbilical
37	Varón, 62 años, M. interna	ELA. <b>Éxito</b>
40	Varón, 44 años, Nefrología	Insuficiencia renal severa
41	Mujer, 77 años, UCI	Edema agudo de pulmón. <b>Éxito</b>
45	Varón, 2 años, Lactantes (Hematología)	Anemia aplásica
46	Varón, 78 años, Cirugía general	Gastrectomía
50	Varón, 81 años, Urología	Retención aguda de orina tras salida de catéter uretral

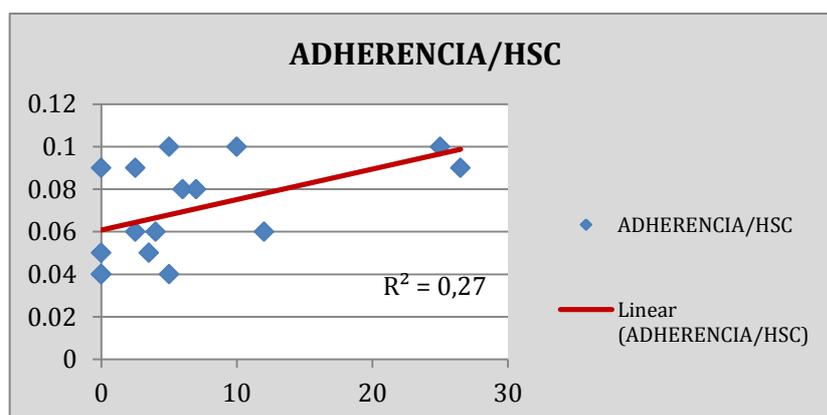
Factores de virulencia de las cepas de *C. albicans*

## Resultados

Las cepas de *C. albicans*, en las condiciones de nuestro estudio, incubación a 37°C en medio RPMI, presentaron las siguientes características:

Son muy poco **hidrofóbicas** (media de 6,8% de HSC), con diferencias significativas respecto al resto de las especies aisladas ( $p \leq 0,05$  respecto a todas las especies;  $p \leq 0,001$  con *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei*).

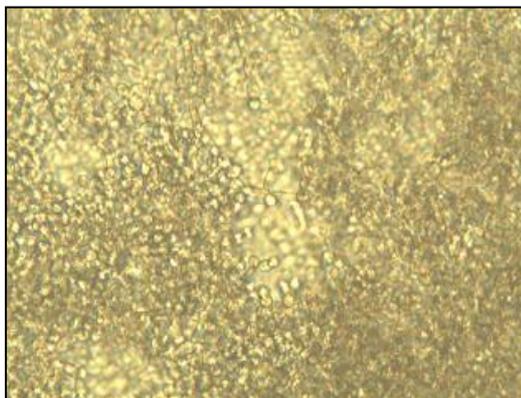
Presentan una **adherencia** de tipo medio, siendo más adherentes *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. Al estudiar como varía la adherencia en función de la hidrofobicidad encontramos que en *C. albicans* la significación estadística es  $P=0,037$ , existiendo una correlación lineal  $r=0,52$  (Correlación de Pearson), aunque sólo el 27% de la variabilidad de la adherencia queda explicada por la hidrofobicidad ( $r^2=0,27$ ) (Figura 30).



**Figura 30.** Correlación entre capacidad de adherencia e HSC en las cepas de *C. albicans*

*C. albicans* es la especie que presenta máxima producción de **biocapa** con 0,63 de DO de la biocapa frente a una media de 0,07

del resto de las especies. En la Figura 31 se observa la formación de una biocapa con presencia de levaduras y filamentos.



**Figura 31.** Biocapa de *C. albicans* ATCC 10231 en microplaca, al microscopio óptico 40x

Así mismo las cepas de *C. albicans* presentan buena actividad proteolítica aspartil proteasa Saps, siendo la especie que presenta mayor actividad. El 93,3% tiene un índice de actividad alto ( $Pz \leq 0,5$ ) con una media de índice  $Pz = 0,37 \pm 0,09$ . En la Figura 32 se puede apreciar el doble halo detectado.



**Figura 32.** Actividad Saps en dos cepas de *C. albicans* y *C. parapsilosis*, en medio YCB-BSA teñido con negro amido al 1%

## Resultados

Se estudió la composición del **locus MTL** a las 16 cepas de *C. albicans* aisladas de hemocultivos y a la cepa de colección *C. albicans* ATCC 10231.

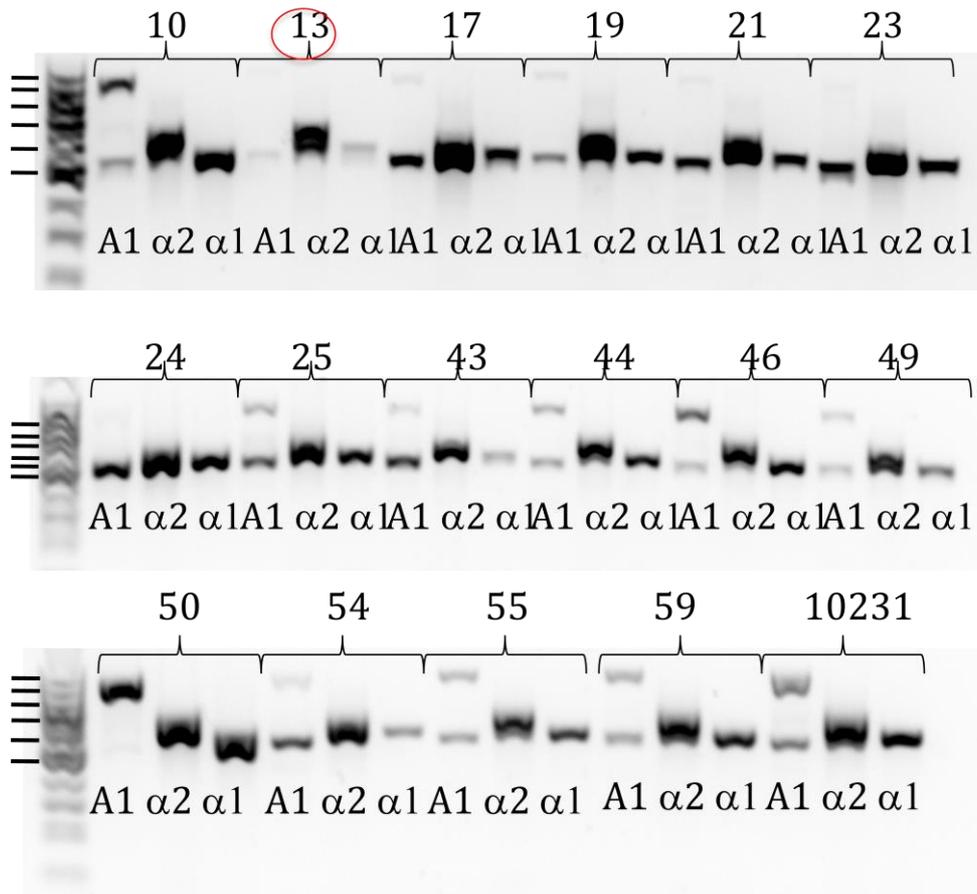
La cepa 13 fué la única cepa homocigota *MTL* alfa/alfa (Figura 33). Se estudiaron por PCR, utilizando los primers que se detallan en la Tabla 29 para A1, alfa1 y alfa2.

Se observa una doble banda en la fracción A1 (Figura 33), que al ser secuenciada, se identificaron ambas bandas como A1. Para mayor seguridad se repite la PCR utilizando otros primers (Tabla 30), repitiéndose el resultado obtenido (Figura 34). No se produce la doble banda antes observada. Se confirman los siguientes resultados:

- La mayoría de las cepas (15 de 16), incluida *C. albicans* ATCC 10231 son heterocigotas (*MTL* a/alfa).
- Ninguna es homocigota *MTL* a/a.
- Se encuentra una cepa de las 16 (6,25%) homocigota en el locus *MTL*, la cepa *C. albicans*-13, presentando *MTL* alfa/alfa.

La cepa homocigota reúne la siguientes características:

- sensible a los antifúngicos, con CMI a fluconazol de 2 mg/L
- es hidrofílica (0%) y poco adherente (DO adherida=0,05)
- no formadora de biocapa ni a las 24 h (DO biocapa= 0,06) ni a las 96 h de incubación (DO biocapa= 0,05).



**Figura 33.** Estudio del locus *MTL* en *C. albicans*, A1, alfa2 y alfa1. La cepa 13 es homocigota *MTL* alfa/alfa.



**Figura 34.** Repetición de la PCR con nuevos primers para confirmar la banda A1 del locus *MTL* en la cepa 13 de *C. albicans*.

Resultados

**Tabla 29.** Primers utilizados para el genotipado de *MTL* en *C. albicans*

<b>A1-F</b>	5'-TTGAAGCGTGAGAGGCAGGAG-3'
<b>A1-R</b>	5'-GATTAGGCTGTTTGTTCCTTCG-3'
<b>alfa 1-R</b>	TGTAAACATCCTCAATTGTACCCGA
<b>alfa 1-F</b>	TTGAAGCGTGAGAGGCAGGAG
<b>alpha2-F</b>	5'-CATGAATTCACATCTGGAGGCAC-3'
<b>alpha2-R</b>	5'-AAGCAGCCAACTCAGGTGAC-3'

**Tabla 30.** Primers utilizados en la la PCR para comprobación de A1-*MTL* genotipado

<b>A1-F</b>	5'- CATACCCAAACTCTTATTTGGG-3'
<b>A1-R</b>	5'-CACCTTCAACCTCCTCGTT TTTTCC-3'

## 2. *C. parapsilosis* complex

Se aislaron 19 cepas de *Candida* pertenecientes al grupo -*psilosis* a partir de los hemocultivos de 19 pacientes, siendo identificadas 13 cepas como *C. parapsilosis* sensu stricto y 6 cepas como *C. orthopsilosis*. En uno de los casos de fungemia por *C. orthopsilosis*, se obtuvo idéntico aislamiento al repetir el hemocultivo después de una semana de finalizar el tratamiento. No se encontró ningún aislado clínico de *C. methapsilosis*.

La suma de las candidemias por ambas especies superó al de pacientes con *C. albicans* que fueron 15 pacientes, siendo *C. parapsilosis* sensu stricto la segunda especie mas frecuente, responsable del 25% de las candidemias y *C. orthopsilosis* del 11,5% de las mismas.

Las 19 cepas habían sido previamente identificadas como *C. parapsilosis*, y se identificaron las nuevas especies por secuenciación mediante los iniciadores universales ITS-1/ITS-4, según la base de datos de secuencia genética (GenBank®, NIH genetic sequence database), colección que contiene las secuencias de DNA disponibles (Figura 35).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">gi 242253948 FM178400.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 242253946 FM178398.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 242253943 FM178395.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 242253942 FM178394.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 219963128 FJ515170.1</a>	Candida orthopsilosis strain SJ15 18S ribosomal RNA gene, partial s	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 190714328 FM172983.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 190714327 FM172982.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%
<a href="#">gi 190714326 FM172981.1</a>	Candida orthopsilosis 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gen	733	733	88%	0.0	99%

**Figura 35.** Fragmentos ITS identificativos de *C. orthopsilosis*.

## Resultados

Los datos epidemiológicos y de factores de riesgo de los pacientes con candidemia por *Candida* grupo *psilosis* respecto a *C. albicans* se recogen en la Tabla 31, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de ellos.

Se incluyeron en el estudio las cepas patrón *C parapsilosis* ss CECT 22019, *C. orthopsilosis* CECT 13011 y *C. metapsilosis* CECT 13010.

Los factores de riesgo estudiados comparativamente en los pacientes con candidemia con las nuevas especies *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. orthopsilosis*, se recogen en la Tabla 32.

Se encuentran diferencias significativas ( $p=0,02$ ) en la presencia de nutrición parenteral, utilizada en el 46,2% de los pacientes con *C. parapsilosis* sensu stricto, mientras que en *C. orthopsilosis* alcanzan al 100%. La incidencia fue superior en neonatos, en el porcentaje de aislamientos de *C. orthopsilosis*, aunque quizás debido al tamaño de la muestra no resultó significativo.

Los resultados de sensibilidad a antifúngicos muestran que, tanto *C. parapsilosis* sensu stricto como *C. orthopsilosis*, eran sensibles a anfotericina B, caspofungina, fluconazol y voriconazol, observándose un ligero desplazamiento de la CMI en *C. orthopsilosis* siendo más resistente a voriconazol y más sensible a caspofungina.

**Tabla 31.** Datos epidemiológicos de los pacientes con candidemia por *Candida* grupo -*psilosis* y candidemia por *C. albicans*.

<b>PACIENTES</b>	<b><i>C. - psilosis</i></b> N=19	<b><i>C. albicans</i></b> N=15	<b>P-valor</b>
<b>Sexo femenino</b>	6 (31,6%)	3 (20,0%)	0,44
<b>Catéter</b>	17 (89,5%)	15(100%)	0,19
<b>Nutrición parenteral</b>	12 (63,2%)	6 (40,0%)	0,18
<b>Corticoides</b>	3 (15,8%)	3 (20,0%)	0,75
<b>Cirugía</b>	10 (52,6%)	8 (53,3%)	0,96
<b>Uso previo de antibiótico</b>	19 (100 %)	15(100%)	
<b>Edad</b>			0,23
Neonato	6 (31,7%)	1 (6,7%)	
Niño	1 (5,3%)	2 (13,3%)	
Adulto	9 (47,4%)	7 (46,7%)	
70+	3 (15,8%)	5 (33,3%)	

**Tabla 32.** Factores de riesgo en los pacientes con candidemia por *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. orthopsilosis*.

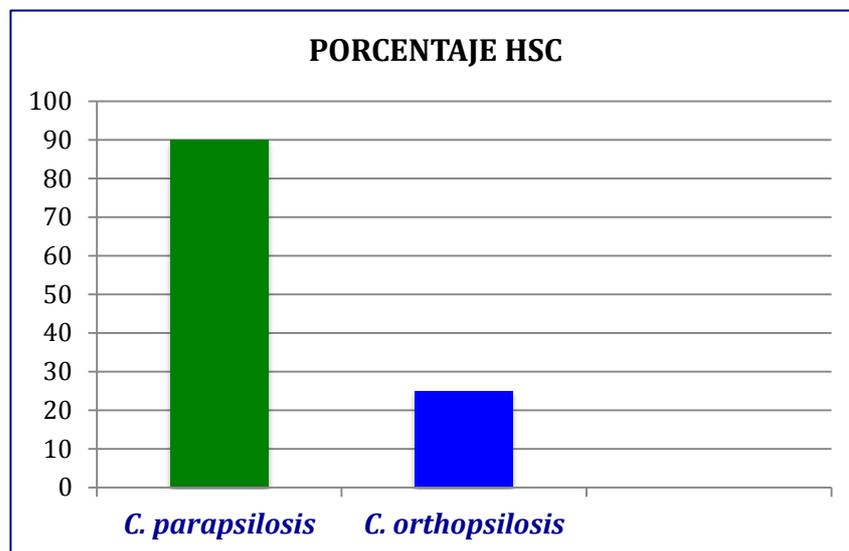
<b>PACIENTES</b>	<b><i>C.parapsilosis ss</i></b> N=13	<b><i>C.orthopsilosis</i></b> N=6	<b>P-valor</b>
<b>Catéter</b>	11 (84,6%)	6 (100%)	0,31
<b>Nutrición parenteral</b>	6 (46,2%)	6 (100%)	0,02*
<b>Corticoides</b>	2 (15,4%)	1 (16,7%)	0,94
<b>Cirugía</b>	7 (53,8%)	4 (50,0%)	0,87
<b>Antibiótico previo</b>	13 (100%)	6 (100%)	
<b>Prematuro</b>	3 (23,07%)	3 (50,0%)	0,18

\*Significativo

## Resultados

Al valorar la **hidrofobicidad de la superficie celular (HSC)** de *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. orthopsilosis* se observaron diferencias significativas ( $P=0,03$ ) en la HSC de ambas especies (Figura 36):

- Las 13 cepas de *C. parapsilosis* siempre presentaban altos porcentajes de HSC (mediana 90%)
- Las 6 cepas de *C. orthopsilosis* presentaban significativamente ( $P<0,005$ ) niveles bajos/medios de HSC (mediana 25%).
- Solo se valoró la cepa de colección de *C. metapsilosis* al no existir ningún aislado clínico, siendo un cepa muy hidrofóbica (85%).



**Figura 36.** Mediana del porcentaje de HSC de 13 cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto y 6 cepas de *C. orthopsilosis*.

En la **capacidad de adherencia**, no existen diferencias entre las especies de *Candida* del grupo *psilosis*, siendo todas adherentes, excepto la cepa de *C. parapsilosis* sensu stricto del paciente 5 y la cepa de *C. orthopsilosis* del paciente 30 que no son adherentes ( $DO < 0,05$ ), coincidiendo en ambas una HSC baja/nula.

La **formación de biocapa** presenta diferencias entre las especies:

- las cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto son en general formadoras de biocapa (11 cepas productoras de biofilm y dos no productoras)
- las cepas de *C. orthopsilosis* son en general nada o poco formadoras de biocapa, siendo solo una cepa muy productora.

En la Tabla 33 se recogen los resultados de HSC, adherencia y formación de biocapa de los aislados clínicos de *C. parapsilosis* sensu strictu y en la Tabla 34 los resultados de *C. orthopsilosis*. La cepa patrón de *C. metapsilosis* es muy adherente con una DO de 0,11.

Resultados

**Tabla 33.** Aislados clínicos de *C. parapsilosis* sensu strictu.

Valoración de la hidrofobicidad, adherencia y formación de biocapa.

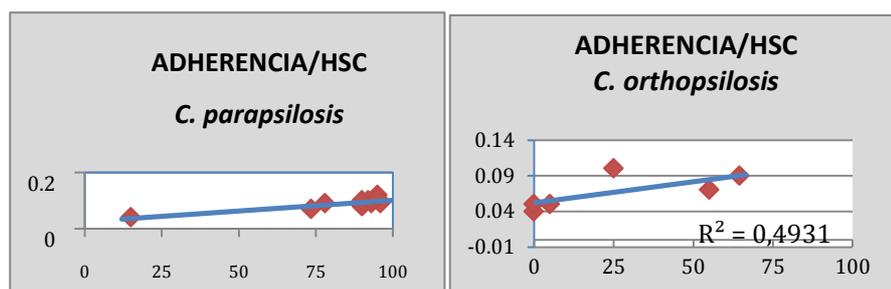
<i>Candida parapsilosis</i> sensu stricto			
Paciente	Hidrofobicidad	Adherencia	Biocapa
3	2,5	0,06	0,03
4	90	0,08	0,14
5	15	0,04	0,00
6	96	0,09	0,12
7	90	0,08	0,05
9	95	0,12	0,12
28	93	0,09	0,1
29	92	0,10	0,1
31	90	0,10	0,1
32	95	0,11	0,2
42	73,5	0,07	0
48	99	0,08	0,2
52	78	0,09	0,2
<b>GLOBAL</b>	<b>72,03+35,49</b>	<b>0,085+0,02</b>	<b>0,105+0,7</b>

**Tabla 34.** Aislados clínicos de *C. orthopsilosis*. Valoración de la hidrofobicidad, adherencia y formación de biocapa.

<i>Candida orthopsilosis</i>			
Paciente	Hidrofobicidad	Adherencia	Biocapa
2	5	0,05	0,01
21	55	0,07	0,03
24	25	0,10	0,10
30	0	0,04	0
38	0	0,05	0,05
49	64,5	0,09	0,1
<b>GLOBAL</b>	<b>31,056+31,33</b>	<b>0,07+0,02</b>	<b>0,048+0,04</b>

Se estudió la variación de la adherencia en función de la hidrofobicidad (Figura 37):

- En *C. parapsilosis* la significación estadística es 0,001; tiene una correlación de Pearson  $r=0,77$  y obtenemos que el 70% de la variabilidad de la adherencia queda explicada por la hidrofobicidad ( $r^2=0,7$ ).
- En *C. orthopsilosis* la significación estadística no es muy alta, es 0,12; tiene una correlación de Pearson  $r=0,70$ , y obtenemos que el 49% de la variabilidad de la adherencia queda explicada por la hidrofobicidad ( $r^2=0,49$ ).



**Figura 37.** Relación entre adherencia (DO, eje de las x) y porcentaje de HSC (eje de las y).

**La morfología** de las levaduras y las colonias en agar Sabouraud también presentan diferencias, aunque no de manera suficiente para ser utilizada en la diferenciación de especies:

*C. orthopsilosis* levaduras redondeadas, colonias cremosas

*C. metapsilosis* levaduras alargadas, colonias cremosas

*C. parapsilosis* ss levaduras alargadas, colonias rugosas, en flor

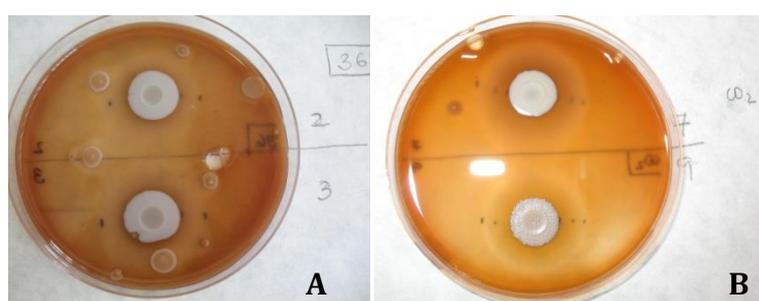
## Resultados

Valoramos la **actividad enzimática** de *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. orthopsilosis* tanto la actividad hemolítica como aspartilproteasa (Tabla 35), buscando detectar diferencias que permitieran su identificación.

La **actividad hemolítica**, en agar Sabouraud dextrosa con sangre de carnero al 7% se estudió en las cepas patrón y en los aislados clínicos (Figura 38). La lectura a los 6 días ofrece mejores resultados que a las 48 h.

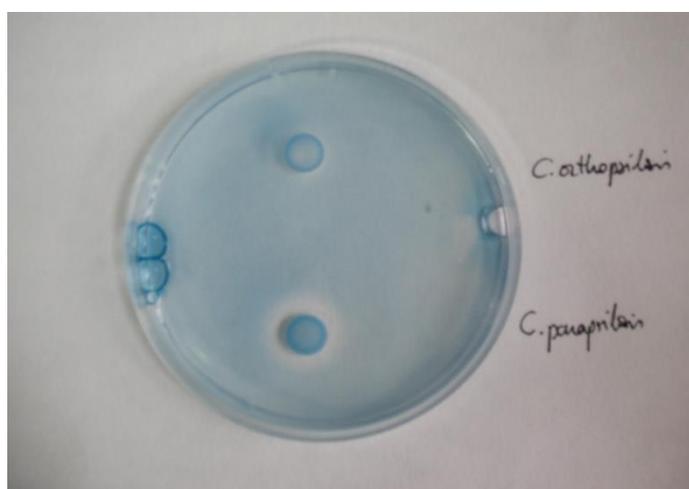
Existen diferencias a los 6 días de incubación, entre la actividad hemolítica de las dos especies pero no fueron significativas.

- El 75% de las cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto eran hemolíticas, presentando una morfología característica en flor y una hemólisis tipo alfa
- El 55,6% de las cepas de *C. orthopsilosis* presentaban hemólisis generalmente alfa aunque la cepa patrón daba hemólisis beta.



**Figura 38.** Actividad hemolítica de *C. orthopsilosis* (2) y *C. parapsilosis* sensu stricto (3) en incubación aeróbica (A) y en atmósfera de CO<sub>2</sub> (B).

La **actividad aspartil proteasa**, valorada en medio con albúmina como única fuente de carbono (Figura 39), ofreció los resultados que se recogen en la Tabla 35. Ambas especies poseen actividad aspartil proteasa, presentando mayor actividad *C. parapsilosis* sensu stricto, tanto a las 48 h de incubación como a los 6 días, aunque no de manera significativa. A los 6 días de incubación el halo transparente aparece en las 13 cepas de *C. parapsilosis* sensu stricto, 10 cepas con índice Pz alto y 3 con grado medio, mientras que en *C. orthopsilosis* solo una cepa es de nivel alto y 5 cepas producen actividad media.



**Figura 39.** Actividad aspartil proteasa de *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* sensu stricto en YCB-BSA, teñida con negro amido.

Resultados

**Tabla 35.** Actividad enzimática de *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* sensu stricto. Número de aislados distribuidos según Índice Pz a las 48 h y a los 6 días de incubación.

Hemolítica	Especie	Actividad enzimática según I Pz		
		Alta	Media	Baja/Nula
48 h	<i>C.orthopsilosis</i> (n=9)	0	3 (33,3%)	6 (66,7%)
	<i>C.parapsilosis</i> (n=16)	0	5 (31,25%)	11 (68,75)
6 días	<i>C.orthopsilosis</i> (n=9)	0	5 (55,6%)	4 (44,4%)
	<i>C.parapsilosis</i> (n=16)	0	12 (75%)	4 (25%)

\*Alto: Pz ≤0,5; Medio: Pz 0,51-0,6; Bajo: Pz ≥0,61; Negativo Pz=1

Saps	Especie	Actividad enzimática según I Pz		
		Alta	Media	Baja/Nula
48 h	<i>C.orthopsilosis</i> (n=7)			
	Halo opaco	-	3	4
	Halo transparente	-	-	7
	<i>C.parapsilosis</i> (n=13)			
	Halo opaco	1	9	2
	Halo transparente	-	2	10
6 días	<i>C.orthopsilosis</i> (n=7)			
	Halo opaco	7	-	-
	Halo transparente	1	5	1
	<i>C.parapsilosis</i> (n=13)			
	Halo opaco	13	-	-
	Halo transparente	10	3	-

### 3. *C. tropicalis*

Se aislaron 6 cepas de *C. tropicalis* a partir de los hemocultivos realizados. En la Tabla 36 se recogen los **datos epidemiológicos** de las cepas aisladas y en la Tabla 37 los **factores de riesgo** asociados comparativamente con *C. albicans*.

*C. tropicalis* es una especie emergente y existe poca información sobre sus determinantes de patogenicidad.

La mayoría de las cepas presentaban capacidad de filamentosación, en mayor o menor grado (Figura 40)

Las cepas de *C. tropicalis* presentan **HSC** media-alta. Al observar el crecimiento en RPMI 1640, se detecta un crecimiento por las paredes, característico de las cepas hidrofóbicas (Figura 41).

Todas las cepas eran **adherentes**, excepto la cepa patrón (Figura 42). Al estudiar como varía la adherencia en función de la hidrofobicidad no encontramos en *C. tropicalis* significación estadística ( $P= 0,5$ ).

Todas las cepas de *C. tropicalis* fueron **formadoras de biocapa**, siendo 3 cepas altamente productoras (cepas 34, 36 y 56) y 3 cepas (cepas 15, 29 y 48) y la cepa patrón CECT 1688 poco productoras.

Se valoró su actividad enzimática **aspartil-proteasa**, situándose como la tercera especie con actividad Saps ( $0,6\pm 0,06$ ), detrás de *C. parapsilosis* ( $0,45\pm 0,05$ ) y *C. albicans* ( $0,37\pm 0,09$ ), que fue la máxima productora.

**Tabla 36.** Datos epidemiológicos de los pacientes con candidemia por *C. tropicalis*.

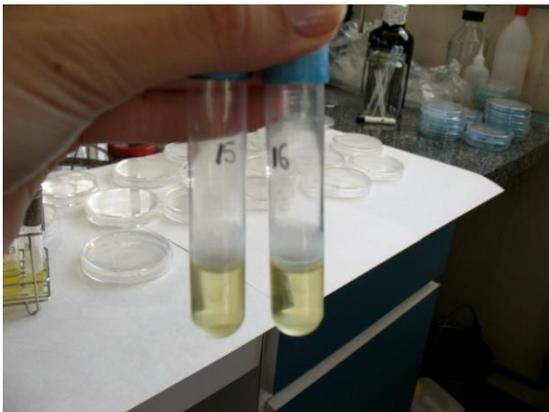
Paciente (Cepa)	Sexo, edad, Servicio	Patología	Evolución
12 (15)	Varón, 2 años, UCI pediátrica	Trombosis venosa intracraneal	
22 (29)	Prematura Neonatología	Bradicardia, Apnea, Mala perfusión	Exitus
25 (34)	Mujer, 46 años, Hematología	LMA, Neumonía en inmunodeprimida	Exitus
27 (36)	Varón, 87 años, Neumología	Fiebre y disnea con somnolencia	Mejoría
39 (48)	Varón, 72 años Cirugía vascular	Aneurisma aorto abdominal	Exitus
47 (56)	Mujer, 56 años, paliativos	Adenocarcinoma intestinal	Exitus

**Tabla 37.** Factores de riesgo en los pacientes con candidemia por *C. tropicalis*, comparativamente con *C. albicans*.

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	P valor
<b>Pacientes</b>	6	15	
<b>Sexo femenino</b>	3 (50%)	3 (20, 0%)	0,17
<b>Catéter</b>	6 (100%)	15(100%)	
<b>Nutrición parenteral</b>	3 (50%)	6 (40%)	0,67
<b>Corticoides</b>	1 (16, 7%)	3 (20%)	0,86
<b>Cirugía</b>	1(16, 7%)	8 (53, 3%)	0,12
<b>Uso previo de antibiótico</b>	6(100%)	15(100%)	
<b>Edad</b>			0,88
Neonato	1 (16, 7%)	1 (6, 7%)	
Niño	1(16, 7%)	2 (13, 3%)	
Adulto	2(33, 3%)	7 (46, 7%)	
70+	2(33, 3%)	5 (33, 3%)	



**Figura 40.**  
Capacidad de  
filamentación de *C.*  
*tropicalis*. Foto del  
borde de una colonia  
en YCB-BSA (40x)



**Figura 41.**  
Crecimiento característico  
de dos cepas hidrofóbicas  
de *C. tropicalis* en RPMI  
1640



**Figura 42.**  
*C. tropicalis* adherida  
a microplaca (40x)

## Resultados

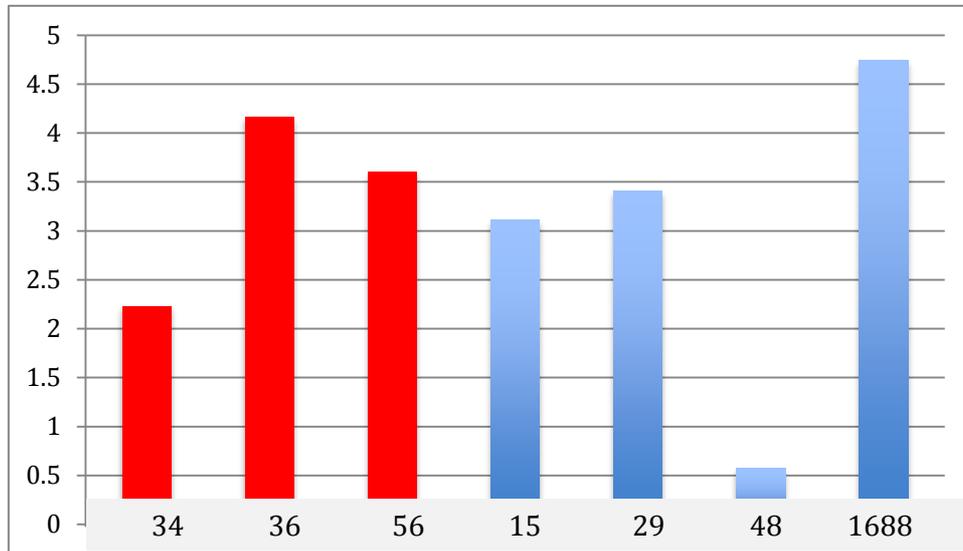
Se estudió la **expresión del gen ALS1** en células planctónicas y sesiles, dando lugar a la adhesina ALS1 (Agglutinin-like protein 1). Los resultados de la expresión del gen ALS1 los analizamos mediante cuantificación relativa de la adhesina ALS1, utilizando como housekeeping actina-1 y 18 s, obteniendo así la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión del gen ALS1 en biofilm respecto a su expresión en planctónicas según la fórmula:

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta Ct_{\text{biofilm}} - \Delta Ct_{\text{planctónicas}}]}$$

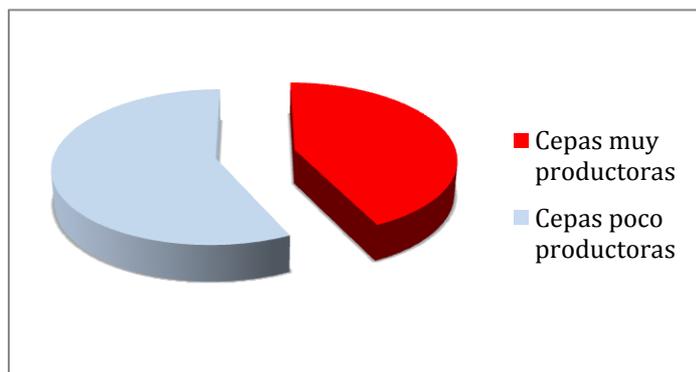
Encontramos que ALS1 se expresa 3,12 veces más en las células del biofilm que en células planctónicas (Tabla 38, Figura 43). No existe diferencias significativas entre la expresión del gen ALS1 y las cepas poco productoras o muy productoras de biofilm, representadas en diferente color en la Figura 44.

**Tabla 38.** Cuantificación relativa de la adhesina ALS1 en las cepas de *C.tropicalis* creciendo en biofilm respecto a las células planctónicas.

Cepa	ALS1	Biofilm (DO)
<i>C.tropicalis</i> 34	2,23	0,8
<i>C.tropicalis</i> 36	4,16	0,38
<i>C.tropicalis</i> 56	3,60	0,3
<i>C.tropicalis</i> 15	3,11	0,12
<i>C.tropicalis</i> 29	3,41	0,14
<i>C.tropicalis</i> 48	0,57	0,11
<i>C.tropicalis</i> CECT1688	4,74	0,07
<b>Media</b>	<b>3,12 ± 1,37</b>	



**Figura 43.** Expresión del gen *ALS1* en células del biofilm de *C. tropicalis* en relación a la expresión en planctónicas. Cepas 34, 36 y 56 son muy productoras de biofilm.



**Figura 44.** Proporción de cepas de *C. tropicalis* muy productoras (rojo) y poco productoras (azul) de biofilm.

## Resultados

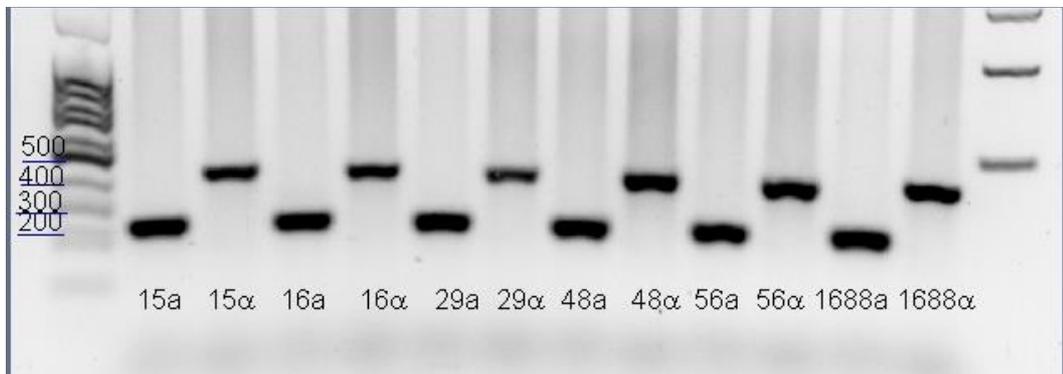
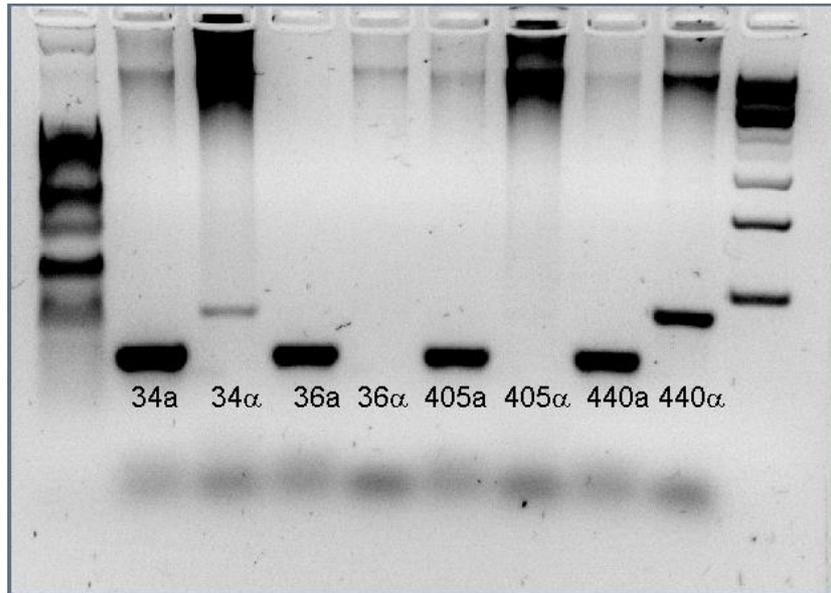
Se estudió en las cepas de *C. tropicalis* la **configuración del gen *MTL*** por PCR, utilizando los primers específicos que se describen en Material y Métodos *MTLa2* y *MTLalfa2*, descritos por Porman et al (2011).

- Se encontró 1 aislado (cepa 36) homocigota siendo *MTLa*.
- Ningún aislado homocigota para *MTLalfa*
- El resto de cepas eran heterocigotas, *MTLa/alfa*, incluidas las cepas patrón CECT 1688 y CECT 1440 y una cepa control 405, como podemos observar en la Figura 45.

En la Tabla 39 se recogen los datos obtenidos en factores de virulencia en relación con la composición del locus *MTL*. La cepa homocigota está en el rango inferior de HSC y con adherencia similar al resto de las cepas, aunque presentaba gran capacidad de filamentación y de formación de biocapa (Figura 46).

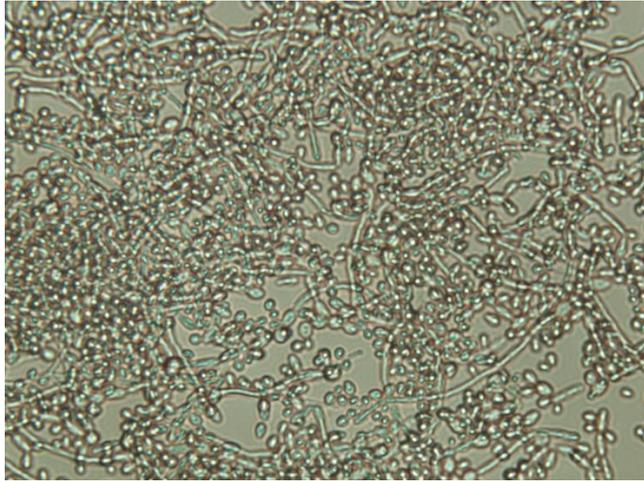
**Tabla 39.** HSC, adherencia, biocapa y actividad Saps de las cepas de *C. tropicalis* aisladas, en las cepas heterocigotas, homocigota y en los controles.

PACIENTE (CEPA)	<i>MTL</i>	HSC %	Adherencia DO	Biofilm DO	Saps IndicePz
12 (15-16)	a/alfa	50	0,06	0,12	Medio
22 (29)	a/alfa	40	0,06	0,14	Medio
25 (34)	a/alfa	63	0,06	0,8	Medio
39 (48)	a/alfa	47,5	0,10	0,11	Medio
47 (56)	a/alfa	82	0,10	0,3	Medio
TOTAL (5) Heterocigotas		56,5	0,076	0,29	
27 (36)	a	35	0,08	0,38	Medio
TOTAL AISLADOS		52±37,5	0,076±0,02	0,26±0,29	0,6 + 0,06
RANGO		35-82	0,06-0,10	0,11-0,8	
CECT 1440		0	0,03	0,06	
CECT 1688	a/alfa	13	0,04	0,07	

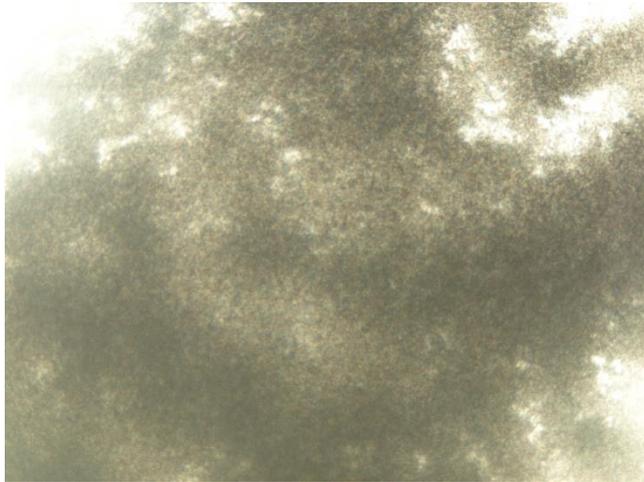


**Figura 45.** Resultados del estudio del locus *MTL* de las cepas de *C. tropicalis*. Todas las cepas eran heterocigotas con *MTL* a/alfa excepto la cepa 36 que es homocigota *MTL* a.

*Resultados*



Adherencia



Biocapa (40x)

**Figura 46.** *C. tropicalis* homocigota *MTLa* (cepa 36). Adherencia y formación de biocapa en pocillo de placa de poliestireno.

#### 4. *C. glabrata*

Se aislaron 8 cepas de *C. glabrata* en los hemocultivos, de siete pacientes diferentes, aislándose del paciente 23 en dos ocasiones *C. glabrata*, que se incluyó como nueva cepa al existir al menos una semana de diferencia entre ambos aislados.

En la Tabla 40 se describen las características de los pacientes y la patología asociada. La edad media de los pacientes con aislamiento de *C. glabrata* en nuestro estudio es de  $53,7 \pm 28,1$ , encontrándose significativamente con mayor frecuencia en mujeres (71,4% mujeres vs. 28,6% varones,  $P=0,02$ ).

En la tabla 41 se recogen los factores de riesgo comparativamente con *C. albicans*. Solo se encuentra diferencia significativa respecto al sexo femenino ( $P=0,02$ ), la existencia de catéter y el uso previo de antibióticos alcanza en ambos casos el 100% de los pacientes.

*C. glabrata* es la especie que presenta las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más altas frente a posaconazol (CMI<sub>50</sub>  $\geq 0,5$  mg/l y CMI<sub>90</sub>  $\geq 1$  mg/l) y un alto porcentaje de cepas con resistencia a fluconazol (CMI<sub>50</sub> de 16mg/L).

Recibieron tratamiento antifúngico con la siguiente pauta:

- 3 pacientes reciben caspofungina
- 2 pacientes, voriconazol
- Un paciente, anfotericina B liposomal
- Un paciente recibe fluconazol siendo resistente al mismo (paciente 43, con CMI 32 mg/L).

**Tabla 40.** Datos epidemiológicos de los pacientes con candidemia por *C. glabrata*.

Paciente (Cepa)	Sexo, edad, servicio	Patología
10(12)	Varón, 71 años Neurología	ACVC. Ingreso previo en UCI
15(20)	Mujer, 30 años Ginecología	Cesarea y pasan a estudio en hematología por hematoma en recto
23(30, 31)	Varón, 12 años UCI pediátrica	FQ páncreas, desnutrición severa, insuficiencia renal
26(35)	Mujer, 86 años Medicina interna	Neo vesical, deterioro estado general, demencia senil
33(42)	Mujer, 65 años Cirugía vascular	Aneurisma aorto-abdominal. Quirófano
36(45)	Mujer, 80 años UCI	ACVA. Craneotomía
43(52)	Mujer, 32 años Digestivo	Diarrea crónica, mala-absorción. Exitus

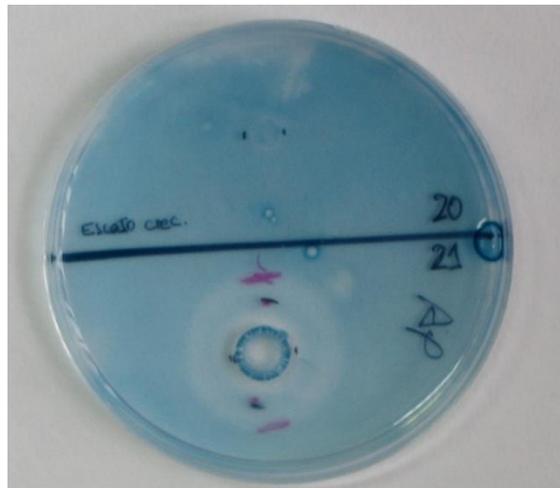
**Tabla 41.** Estudio comparativo de los factores de riesgo de *C. glabrata* con *C. albicans*.

Pacientes	<i>C. glabrata</i> N=7	<i>C. albicans</i> N=15	P valor
<b>Sexo femenino</b>	5 (71,4%)	3 (20,0%)	0,02
<b>Catéter</b>	7 (100,0%)	15(100%)	
<b>Nutrición parenteral</b>	5 (71,4%)	6 (40,0%)	0,17
<b>Corticoides</b>	0	3 (20,0%)	0,20
<b>Cirugía</b>	3(42,9%)	8 (53,3%)	0,64
<b>Uso previo de antibiótico</b>	7 (100%)	15(100%)	
<b>Edad</b>			0,89
Neonato	0	1 (6,7%)	
Niño	1(14,3%)	2 (13,3%)	
Adulto	3 (42,9%)	7 (46,7%)	
70+	3(42,9%)	5 (33,3%)	

La especie *C. glabrata* es muy **hidrofóbica** (27-95,5% HSC), siendo la especie que presenta mayor capacidad de **adherencia** (DO 0,08-0,13). Al estudiar como varía la adherencia en función de la hidrofobicidad no encontramos significación estadística ( $P=0,98$ ), no existe aleatoriedad en la variable.

El resto de factores de virulencia están ausentes en *C. glabrata*.

- No es formadora de **biocapa**, manteniendo una única monocapa adherida, al incubarse en RPMI para la formación del biofilm.
- Son muy poco **proteolíticas** (Figura 47). No producen halo transparente a los 6 días de incubación y solo en 3 cepas se detecta halo de precipitación.



**Figura 47.** Actividad Saps en *C. glabrata* (cepa 20) y *C. albicans* (cepa 21), en medio YCB-BSA teñido con negro amido al 1%.

### 5. *C. krusei*

Se aislaron 3 cepas de *C. krusei*, dos en pacientes hematológicos y una cepa en un neonato. En la Tabla 42 se recogen los datos epidemiológicos y factores de riesgo.

Las características de los pacientes con *C. krusei* fueron:

Neonato prematuro de 34 semanas al que no se trató

Niño (12 años) con hipotiroidismo congénito, leucemia aguda

Adulto (52 años) con leucemia aguda.

La sensibilidad a los antifúngicos de las cepas coincide con el patrón de resistencia de la especie, detectándose resistencia a fluconazol con CMI de 32 mg/L en las 3 cepas, una cepa con CMI de 0,5 mg/L a itraconazol, mientras que voriconazol y posaconazol presentan buena actividad (Tabla 43).

En cuanto a los factores de virulencia, las cepas cultivadas en RPMI 1640, presentaron altos niveles de HSC y eran adherentes a plástico, aunque en bajo grado; la formación de biocapa fue negativa al presentar una DO similar a la obtenida en la valoración de la adherencia (Tabla 43).

**Tabla 42.** Características y factores de riesgo de los pacientes con *C. krusei* aislada de hemocultivos.

Pacientes			Diagnóstico	Factores de riesgo	ANTIFUNGICOS*		Evolución
N (cepa)	Edad	Sexo			Profilaxis	Tratamiento	
14(18)	52	V	Leucemia aguda	Neutropenia Corticoides ATB-AE**	No	AMF-BL CASPO	Curación
26(26)	12	M	Leucemia aguda	Neutropenia Catéter ATB-AE	No	AMF-BL	Curación
51(60)	RN	V	Prematuro	Neutropenia Catéter ATB-AE	No	No	Curación

\*AMF-BL, anfotericina B liposomal; 5-FLC, 5-flucitosina; FCZ, fluconazol; VCZ, voriconazol; PCS, posaconazol; CASPO, caspofungina.

\*\*ATB-AE: antibiótico amplio espectro

**Tabla 43.** Sensibilidad a antifúngicos y determinantes de patogenicidad de las cepas de *C. krusei* aisladas.

SENSIBILIDAD A ANTIFÚNGICOS (CMI en mg/L).								
Cepa	AMF-BL*	5-FLC	FCZ	KTZ	ITCZ	VCZ	PCZ	CASPO
18	2	16	32	0,25	0,25	0,125	0,125	0,25
26	2	4	32	1	0,5	0,125	0,125	0,25
60	0,5	2	32	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25
DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD								
Cepa	Hidrofobicidad de Superficie Celular		Capacidad de adherencia a plástico			Formación de biocapa		
18	96%		0,06			0,06		
26	87%		0,07			0,07		
60	32%		0,07			0,05		

\*AMF-BL, anfotericina B liposomal; 5-FLC, 5-flucitosina; FCZ, fluconazol; KTZ, ketoconazol; ITCZ, itraconazol; VCZ, voriconazol; PCS, posaconazol; CASPO, caspofungina.

## 6. *C. lusitaniae*

Se aisló una cepa de *C. lusitaniae* (cepa 1) del hemocultivo de un prematuro de 32 semanas, con nutrición parenteral, cateterismo central y con tratamiento antibiótico previo (ampicilina y amikacina).

El paciente fue tratado con anfotericina B liposomal y evolucionó favorablemente. Los resultados obtenidos indican que era una cepa sensible:

Anfotericina B -CMI 0.25mg/l

Caspofungina-CMI 0.25mg/L

Itraconazol -CMI 0.125mg/L

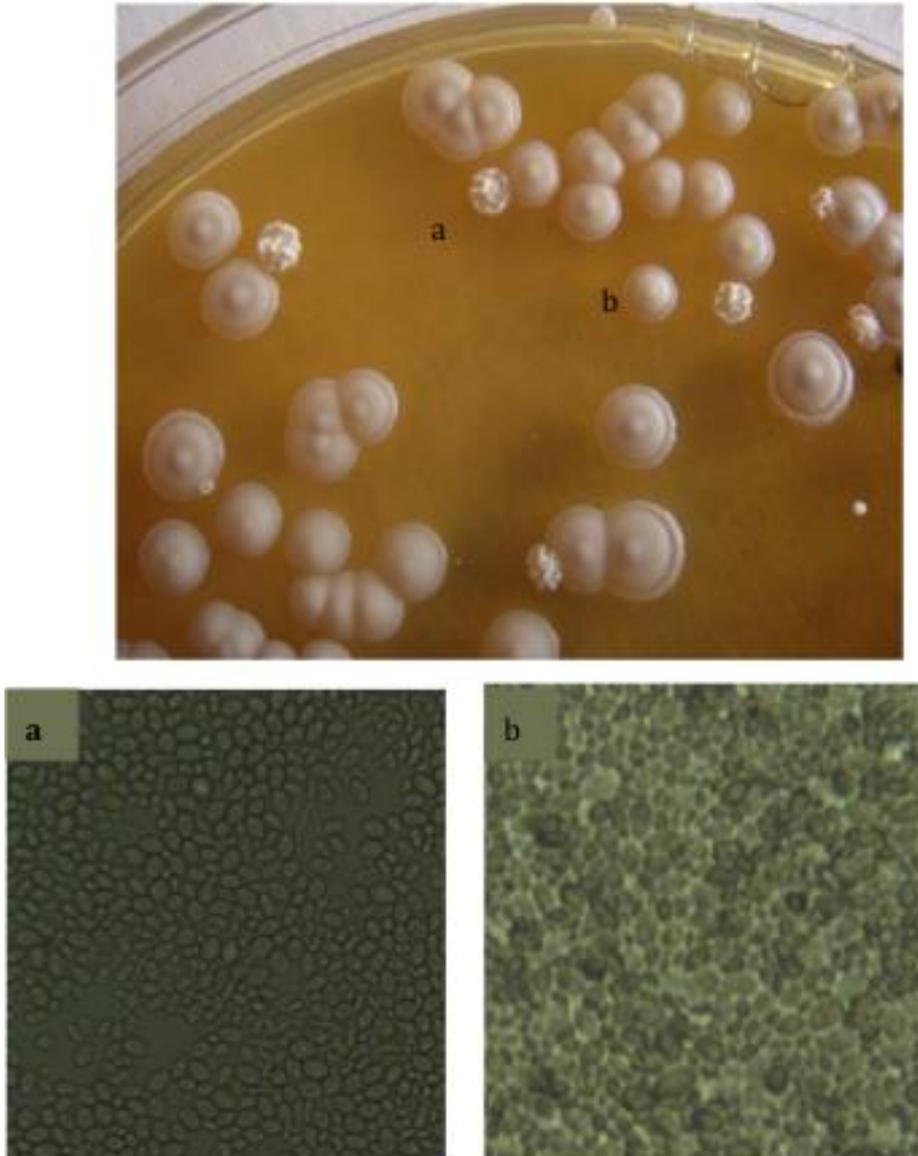
Voriconazol-CMI 0.03mg/L

Posaconazol-CMI 0.03mg/L

Fluconazol-CMI 2mg/L.

*C. lusitaniae* no presentó actividad enzimática hemolítica, ni aspartil-proteasa tanto en atmósfera normal como en atmósfera de CO<sub>2</sub>. A 37°C, presentó niveles medios-bajos de HSC (14,25+5%), poca adherencia a plástico (DO 0,06+0,02) y no era formadora de biocapa.

Por el contrario presentó una gran capacidad de **switching morfológico** (Figura 45), dando lugar a dos tipos de colonias en medio YPD, lisas y estrelladas, con una frecuencia aproximada de 1:10. Las colonias estaban constituidas por levaduras de distinta morfología, apareciendo formas filamentosas en las colonias estrelladas y formas levaduriformes en las lisas.



**Figura 45.** Switching de *C. lusitaniae* en medio YPD dando lugar a colonias estrelladas (a) y colonias lisas (b).

Presencia de filamentos en la colonia estrellada (a) y formas levaduriformes en la colonia lisa (B).

## *Resultados*

*Discusión*

## **DISCUSIÓN**

## *Discusión*

## IMPORTANCIA DE LAS CANDIDEMIAS

La vigilancia epidemiológica, constituye un instrumento de vital importancia para identificar, medir y analizar problemas de salud que afectan a la población con el objetivo de reducir la morbilidad que comporta y mejorar la salud (Pujol & Limón 2013).

El incremento de bacteriemias, presencia de bacterias viables en sangre detectada mediante hemocultivo, durante las dos últimas décadas, es un reflejo de la creciente gravedad de la población hospitalizada, así como de la mayor frecuencia, complejidad y agresividad de las maniobras diagnósticas y terapéuticas requeridas. (Candel, 2013). La candidemia es la enfermedad fúngica invasora más frecuente y constituye un amplio porcentaje respecto a las bacteriemias, caracterizándose por una alta morbilidad asociada (Pemán & Salavert, 2013). *Candida* spp. es actualmente el cuarto agente patógeno responsable de sepsis hospitalarias (Guery, 2009).

El aumento de las candidemias es debido a numerosos factores, como el uso de corticoides, de antibacterianos de amplio espectro que eliminan a las bacterias como competidores, favoreciendo la proliferación de levaduras y con ello el desarrollo de infecciones

### Discusión

fúngicas. La presencia de catéteres es utilizada como puerta de entrada de bacterias y levaduras que colonizan piel y mucosas. La existencia de enfermos inmunodeprimidos o con graves enfermedades subyacentes influye también en esa alta tasa de morbimortalidad.

La distribución de las especies causantes de candidemia presenta una gran variabilidad a nivel de países, de comunidades e incluso entre los distintos hospitales (Pemán & Salavert, 2013). En el estudio FUNGEMICA realizado en España en el 2009, las candidemias por *C. albicans* fluctuaban desde un 35% en Andalucía y Comunidad Valenciana hasta un 55% en Cataluña. Almirante et al (2011) encuentran un porcentaje en candidemia por *Candida* no-*albicans* del 54,6%. En nuestro trabajo, aunque *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada, el resto de especies de *Candida* no-*albicans* alcanzan el 71,4%.

En la candidemia, igual que en otras infecciones sistémicas, es esencial realizar un diagnóstico lo más certero y temprano posible que permita instaurar un tratamiento antifúngico precoz para limitar al máximo sus consecuencias (Pemán & Almirante, 2007). El hemocultivo sigue siendo la técnica recomendable para el diagnóstico a pesar de su escasa sensibilidad general, aproximadamente del 50%. En nuestro trabajo la resiembra realizada en Sabouraud ofreció mejores resultados en la recuperación de levaduras que el examen por tinción (datos no mostrados).

## FACTORES DE VIRULENCIA EN LEVADURAS RESPONSABLES DE CANDIDEMIAS

Las infecciones producidas por especies del género *Candida* varían dependiendo de la situación del individuo. Van desde procesos leves en personas inmunocompetentes a infecciones sistémicas con alta tasa de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Yang, 2003). Además de la situación del paciente, diversos determinantes de patogenicidad permite a éstos patógenos oportunistas, la colonización y posterior desarrollo del proceso infeccioso.

La emergencia de las candidemias en los hospitales, hace que cada vez sea más necesario conocer aquellos factores de patogenicidad que pueden estar presentes y en concreto la capacidad de formación de biocapa que ofrece a las células sesiles - incluidas en el biofilm - una mayor resistencia a antimicrobianos y protección frente a las defensas del huésped, para poder establecer estrategias de control.

Entre los **factores de virulencia**, la capacidad de formación de biocapa es considerada uno de los principales (Perumal et al, 2007), ya que capacita para dar lugar a infecciones asociadas a dispositivos médicos (catéteres, prótesis, marcapasos, sondas, etc.), responsables de complicaciones severas y de difícil erradicación al ofrecer una mayor

### *Discusión*

resistencia a antimicrobianos y permitir la persistencia de células viables dentro de la biocapa después del tratamiento.

Una **biocapa** es una comunidad compleja de microorganismos adheridos a una superficie biológica o inerte y rodeados por una matriz extracelular. Esta forma de vida se conoce desde hace tiempo, pero no ha sido hasta hace relativamente poco cuando se ha visto su gran impacto médico (Ramage et al, 2006), siendo especialmente estudiada en bacterias. La formación de biocapa conlleva una disminución de la sensibilidad, al proteger las levaduras incluidas en ella de la acción de antimicrobianos (Douglas, 2003) y el mantenimiento de células viables que actúan de reservorio de la infección.

La biocapa consiste en multicapas de células adheridas a células de la mucosa o a materiales inertes e incluidas en una matriz de material polimérico extracelular (Calderone & Gow, 2002). Dicha matriz se divide en dos capas fundamentales, una capa basal muy fina y otra constituida por hifas, filamentos y micelios mucho más gruesa y dispersa. Algunas levaduras de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm.

La arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de

nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio. La biocapa de las levaduras ha sido estudiada en menor grado que en las bacterias.

Las células sesiles que integran la biocapa poseen características diferentes de sus homólogas planctónicas (en suspensión) con una sobreexpresión de determinados genes (Deveau & Hogan, 2011). En *C. tropicalis*, especie muy formadora de biocapa, nuestros resultados confirman la sobreexpresión de las proteínas Als en la células en biocapa respecto a las células planctónicas.

La importancia actual de las candidiasis invasoras, asociadas la mayoría a la presencia de biocapas sobre dispositivos médicos, se refleja en un incremento de publicaciones al respecto (Quindós, 2002). Paralelamente al incremento de las micosis, se desarrollan investigaciones en relación con esa “forma de vida” de las poblaciones fúngicas (Uppuluri et al, 2007). La utilización de modelos *in Vitro*, bajo diferentes condiciones ambientales que reflejen adecuadamente el comportamiento de las células embebidas en la biocapa, permitirá evaluar la capacidad de formación de biocapa de *C. albicans* y de *Candida no-albicans*, así como el papel de las variaciones fenotípicas en su desarrollo.

La formación de biocapas sobre superficies mucosas así como sobre la superficie de implantes, prótesis y catéteres es un proceso que va a facilitar infecciones sistémicas, ya que los depósitos en la superficie

### Discusión

de catéteres venosos centrales, favorecen la rápida diseminación de la infección (Douglas, 2002).

La formación de biocapa en *Candida* spp (Henriques et al, 2006) es un mecanismo de patogenicidad complejo, y existe una gran variabilidad respecto a la especie. En este trabajo encontramos diferente capacidad de formar biocapa en relación a la especie aislada. *C. glabrata* y *C. krusei* no fueron formadoras de biocapa; *C. albicans* fue la especie más formadora, seguida por *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* sensu stricto.

En la capacidad de formación de biocapa pueden influir factores relacionados con las características hidrofóbicas de la superficie celular; la capacidad de adherencia a plástico; la capacidad de filamentación y de ahí el interés de su estudio para poder intervenir en su control.

**La capacidad de adherencia** es el primer paso para el establecimiento de una biocapa y **la hidrofobicidad de la superficie celular** (HSC) juega un papel crucial en la primera fase de la adherencia, existiendo una relación directa entre las características hidrofóbicas de la pared celular de las levaduras y su **capacidad de adherencia a plástico** (Blanco et al, 1997). La adhesión ocurre en varias fases, la primera, inespecífica, basada en fuerzas de atracción repulsión entre las que destaca la hidrofobicidad de las superficies (Jabra-Risk et al, 2001). A continuación se establecen interacciones

específicas entre las levaduras y los receptores de las células epiteliales (Vidotto et al, 2003). Una vez adheridos, muchos microorganismos son capaces de formar biocapa estableciendo un sistema de vida que les protege y favorece su supervivencia (Douglas, 2002).

Las condiciones en las que crece esta biocapa suelen ser diferentes a las ensayadas in Vitro. Algunos autores (Rosa et al, 2008) estudian el efecto de la anaerobiosis en los factores de virulencia. Las hifas son más hidrofóbicas que las levaduras, detectándose una alta composición en proteínas hidrofóbicas en la capa fibrilar externa de la pared celular de las hifas y una alta adherencia a plásticos (Tronchin et al, 2008).

La mayoría de las especies de *Candida* son hidrofóbicas y adherentes, estando ambos parámetros relacionados. *C. albicans* es la especie mas hidrofílica, con bajos niveles de adherencia, aunque al filamentar aumenta significativamente su hidrofobicidad.

La formación de biocapa es posterior a la adhesión del microorganismo, formándose una matriz de colonias del propio hongo. Las proteínas responsables de la adhesión celular, adhesinas, están localizadas en la superficie de la pared celular, y participan en cambios en la formación de colonias y en el desarrollo de biocapas entre otros procesos.

**Las adhesinas Als** constituyen una familia de proteínas de la pared celular, de las que se han descrito 8 miembros en *C. albicans*, 16 en *C. tropicalis* y 5 en *C. parapsilosis* (Butler et al, 2009). Se han asociado con la virulencia, estando principalmente relacionadas con la adhesión

### Discusión

a epitelio del hospedador, agregación y formación de biofilm (Dranginis et al, 2007). Se ha observado relación entre la expresión de adhesinas en las hifas y la formación de biocapa (Nobile et al, 2006). De las proteínas de superficie de la familia Als, están implicadas en la formación de las biocapas Als1 y Als3 (Nobile et al, 2008). Los genes *ALS* (agglutinin-like sequence) codifican dichas proteínas de la superficie celular, implicadas en los mecanismos de adhesión, pudiendo ser regulados por condiciones ambientales (Verstrepen & Fink, 2009).

Existen numerosos trabajos realizados con *C. albicans*, pero muy pocos en especies de *Candida* no-*albicans*. En este trabajo analizamos comparativamente en *C. tropicalis*, mediante una cuantificación relativa de la adhesina Als1, a las cepas cuando crecen en biofilm respecto a las células planctónicas, encontrando una sobreexpresión 3,12 veces mayor.

**Las enzimas aspartil proteasas secretadas (Sap)** constituyen una familia de hasta 11 miembros, dependiendo de la especie. Actúan como factores de virulencia facilitando la colonización e invasión debido fundamentalmente a su capacidad de dañar los tejidos y degradar material del huesped, principalmente defensas inmunológicas y estructurales (Silva et al, 2011). *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* son menos productoras de Saps, comparadas con *C. albicans*, como lo evidencian trabajos de nuestro grupo (Sacristán et al, 2011; Galán-Ladero et al, 2010; Asensio et al, 2005).

Las aspartil proteasas han sido estudiadas como posibles dianas terapéuticas. En trabajos anteriores (Blanco et al, 2003) se demostró que ritonavir y saquinavir inhiben la actividad Saps, disminuyendo la tasa de crecimiento de *C. albicans*.

Estas enzimas se agrupan en familias de genes/proteínas, y la expresión de las isoenzimas dependerá de la especie, y de las condiciones ambientales.

En *C. parapsilosis*, han sido identificados tres genes que codifican Saps y denominados *SAPP1-3*. Si bien el producto del gen *SAPP3* sigue siendo desconocido, las isoenzimas Sapp1p y Sapp2p han sido estudiadas; ambas enzimas tienen una amplia especificidad de sustrato, pero difieren en el patrón de expresión. Mientras que el gen *SAPP2* parece ser transcrito constitutivamente, la transcripción *SAPP1* es inducida por la presencia de una proteína exógena como única fuente de nitrógeno (Dostál et al, 2009).

En *C. tropicalis* se han descrito 4 genes (*SAPT1-4*). El número total de estas familias de genes está enriquecido en los genomas de los patógenos, principalmente entre las especies más patógenas como *C. albicans* que ha sido muy estudiada y en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* que han recibido menor atención (Butler et al, 2009).

En este trabajo se realizó un estudio semicuantitativo en placa, encontrando a *C. albicans* como la especie con mayor actividad proteásica, así como mayor actividad en *C. parapsilosis* sensu stricto

### Discusión

respecto a *C. orthopsilosis*. Se detecta actividad Saps aunque en menor grado en *C. tropicalis* y nula actividad en el resto de las cepas.

La **capacidad de conjugación** es un hecho recientemente descrito en *C. albicans* (Slutsky et al, 1987), y en *C. tropicalis* (Porman et al, 2011). Ambas poseen en el locus *MTL* (mating-type-like), distintos alelos *MTLa* o *MTLalfa*, existiendo cepas heterocigotas (a/alfa) y homocigotas (a o alfa) (Bennett, 2010). La conjugación solo es posible entre cepas homocigotas, que son a su vez capaces de originar células Opaque (Whiteway, 2009).

Las células Opaque, responsables del fenómeno de conjugación, difieren en su expresión génica ya que son homocigotas en el locus *MTL*, en su apariencia al microscopio al ser más elongadas, y en los tejidos del hospedador que invaden, al estar adaptadas a diferentes nichos (Ramírez-Zavala et al, 2008). Las células Opaque son más estables a 25° C, aunque en condiciones de anaerobiosis pueden estabilizarse a 37° C (Lohse & Johnson, 2009). El locus *MTL* juega un papel exclusivo en el proceso de conjugación, aceptándose que las células heterocigotas *MTL* a/alfa –mayoría en los aislados clínicos- son incapaces de conjugar mientras que las homocigotas, *MTLa* o *MTLalfa*, pueden evolucionar de levaduras normales (White) a células elongadas conjugativas (Opaque).

La mayoría de los aislados clínicos, hasta un 95% según la serie estudiada, tanto de *C. albicans* como de *C. tropicalis* son heterocigotas en el locus *MTL* (Magee & Magee, 2004; Lohse & Johnson, 2009). En

estudios previos de nuestro grupo (Sacristán et al, 2008) realizado en 16 aislados clínicos de *C. albicans*, dos cepas eran homocigotas (12,5%) y más resistentes que el resto.

En este trabajo encontramos una única cepa de los 16 aislados de *C. albicans* (6,25%) homocigota *MTL* alfa/alfa, con CMI al fluconazol de 2 mg/L, presentando el resto de las cepas una sensibilidad mayor (CMI<sub>90</sub>=1mg/L). Esta cepa no era formadora de biocapa.

En el estudio realizado en *C. tropicalis* se encontró una cepa homocigota (*MTL* a/a) de los 6 aislados clínicos (16,7%) que presentaba gran capacidad de filamentación y probablemente debido a ello, gran capacidad de formación de biocapa; era una cepa sensible a los anifúngicos testados, estando dentro de los niveles de la CMI<sub>50</sub>.

Los mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión de genes, son reversibles y responsables de cambios fenotípicos, influyendo en la patogenicidad al facilitar la adaptación a diferentes nichos ecológicos y afectando a la formación de la biocapa.

## ANÁLISIS DE LAS CANDIDEMIAS SEGÚN LA ESPECIE AISLADA

Aunque hay descritas más de cien especies distintas del género *Candida*, el 95-97% de las candidemias están causadas por cinco especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Pemán & Salavert, 2013). En este trabajo además de estas especies se aisló una cepa de *C. lusitaniae*

*C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada, siendo responsable del 29% de las candidemias estudiadas, aislándose fundamentalmente en adultos, y en un 73.3% en hombres. Aunque en general su frecuencia ha ido disminuyendo, en la mayoría de los trabajos existentes continua siendo la especie predominante (Almirante et al, 2011; Wisplinghoff et al, 2014).

Entre los factores de riesgo encontrados cabe destacar el tratamiento antibiótico previo en el 100% de los casos, la presencia de catéter en el 93.3%, estando en muchos casos relacionadas con cirugía digestiva, lo que avala el origen endógeno, fundamentalmente digestivo de los procesos infecciosos por *C. albicans*.

Todos los aislados eran sensibles a los antifúngicos testados, anfotericina B, fluconazol, voriconazol y caspofungina, de acuerdo a los puntos de corte del EUCAST

*C. albicans* es la especie que expresa en mayor grado factores de virulencia como actividad enzimática y formación de biofilm. Por el

contrario es una especie hidrofílica aunque al filamentar incrementa la hidrofobicidad de la superficie celular y su capacidad de adherencia. Así mismo las cepas más filamentadas son las más formadoras de biofilm.

Existen pocos los trabajos en los que se investigue la presencia de levaduras homocigotas en aislados clínicos, aunque se acepta la presencia de un 3-7% en *C. albicans*. Autores como Rustad et al (2002) encuentran 5 cepas *MTLa/a* y 6 cepas *MTLalfa/alfa* en 96 aislados clínicos; Lockart et al (2003) describe un 3 % de homocigotas en 220 aislados y Legrand et al (2004) encuentran 12 cepas homocigotas en 120 aislados.

El switching white-opaque había sido descrito por Soll en 1987, y se establece su papel en la conjugación unos 15 años después por Miller & Johnson (2002). Siguen existiendo actualmente numerosas incógnitas. Si la población natural es principalmente heterocigota ¿Cómo se mantiene un sistema tan complejo no utilizado por la mayoría? (Magge & Magee, 2004; Bennet & Jhonson, 2005).

En la actualidad parece ser que más que en la capacidad de recombinación, prácticamente nula en la naturaleza, se le da importancia al papel que podrían tener las células opaque en la patogénesis (Soll, 2014). Se admite que son diferentes antigénicamente, facilitando la evasión de la respuesta inmune, son menos susceptibles a la fagocitosis al no secretar quimioatrayente para leucocitos y además producen una feromona que induce a las células white a producir

### Discusión

biofilm, donde existiría una concentración mayor de células homocigotas que podrían conjugarse y les daría estabilidad, ya que a 37°C requieren atmósfera anaerobia.

Las especies de *Candida no-albicans* fueron responsables del 71% de los episodios de candidemia estudiados, tasa superior al 62.4% encontrado en España en las UCI pediátricas por Jordan et al (2014) y al 58% encontrado en Reino Unido por Das et al (2011).

*C. parapsilosis* y *C. orthopsilosis*, son especies emergentes y de las que existe poca información sobre sus determinantes de patogenicidad (Silva et al, 2011). La existencia de tres grupos genéticamente diferentes ya fue descrita por Lin et al (1995) al estudiar un posible brote de candidemia por *C. parapsilosis* que posteriormente serían clasificados como especies diferentes por Tavanti et al (2005), como *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*.

La incidencia de infecciones por *C. parapsilosis* complex varía ampliamente de unos estudios a otros, en base fundamentalmente al tipo de población estudiada. En hospitales infantiles alcanza hasta un 60% de las candidiasis aisladas (Durán et al, 2005; Rodríguez et al, 2006) mientras que en adultos los datos son inferiores encontrándose referencias que hablan de un 20-30% (Almirante et al, 2006; Pfaller et al, 2008). En nuestro trabajo hemos encontrado una incidencia de fungemia por *C. parapsilosis* complex del 36.5% que alcanza el 54.5% en neonatos, porcentaje que se distribuye entre las nuevas especies,

correspondiendo el 50% de los aislados en neonatos a *C. orthopsilosis* y el 23% a *C. parapsilosis* sensu stricto (Blanco-Blanco et al, 2013). No se ha identificado ninguna *C. metapsilosis* lo que coincide con lo descrito por otros autores al ser considerada una especie que no suele ser aislada a partir de muestras clínicas (Tavanti et al 2005).

*Candida* grupo-*psilosis* se encuentra en las manos del personal, considerándose fundamentalmente la colonización exógena. Los neonatos tienen alta permeabilidad de la piel, mucosas y sistema inmune inmaduro de ahí su alto aislamiento (van Asbeck et al, 2007).

*C. parapsilosis* sensu stricto fué la segunda especie más frecuentemente aislada, siendo formadora de biofilm y con actividad enzimática moderada aunque ambas características en menor grado que *C. albicans* (Blanco-Blanco y cols, 2013). La tasa de mortalidad fue la menor de todas las especies aisladas, lo que coincide con el estudio realizado por Jordan et al (2014), que la catalogan como la especie menos virulenta.

*C. orthopsilosis* se asoció en mayor grado con neonatos y con pacientes que recibían nutrición parenteral, características hasta ahora atribuidas a *C. parapsilosis*. Es también una especie capaz de producir biofilm (Lattif et al, 2010), aunque al ser una especie recientemente descrita existen muy pocos trabajos sobre sus factores de virulencia.

## Discusión

Ambas especies presentaron buena sensibilidad a los antifúngicos testados. Algunos autores (Borghi et al, 2011; Tavanti et al, 2007) encuentran en *C. orthopsilosis* mayor resistencia a voriconazol y mayor sensibilidad a las equinocandinas. Nuestras cepas fueron sensibles a ambos antifúngicos, y se observó un ligero desplazamiento en este sentido, aunque no fue significativo.

Es interesante diferenciar ambas especies, responsables de candidemias, para poder evaluar la epidemiología de las infecciones por *C. parapsilosis* sensu stricto y *C. orthopsilosis*. Los métodos moleculares, como la identificación de la secuencia de los segmentos ITS, son por ahora los únicos que permiten la identificación de las tres especies (Gómez-López et al, 2008). Aunque existen claras diferencias en las características de HSC, siendo *C. orthopsilosis* más hidrofílica que *C. parapsilosis* sensu stricto, y ser una técnica de realización muy sencilla, queremos ampliar el estudio con nuevas cepas para poder valorar su utilidad para la identificación.

***C. tropicalis*** es una especie responsable de infecciones urinarias en pacientes hospitalizados y de candidiasis invasiva en pacientes neutropénicos o con cáncer. En aislados clínicos de *C. tropicalis* se ha demostrado su capacidad de formación de biocapa.

Los 6 aislados de *C. tropicalis* obtenidos son muy productores de biofilm, en segundo lugar después de *C. albicans*. Se comprobó así mismo que las células en la biocapa expresaban 3 veces más el gen *ALS1* que las células pláncónicas, con el consiguiente incremento de la adhesina producida. Se evidenció la capacidad de filamentación de esta

especie, característica con importante repercusión en la formación del biofilm.

*C. tropicalis* es la especie que presenta mayor tasa de mortalidad relativa, falleciendo 4 de los 6 pacientes; 3 de ellos presentaban cultivo mixto con bacterias. La alta tasa de mortalidad en las infecciones por *C. tropicalis* ha sido descrita por Jordan et al (2014) en un trabajo sobre candidiasis invasiva en pediatría.

Uno de los 6 aislados de *C. tropicalis* presentaba de manera natural configuración homocigota *MTLa*, siendo el resto de las cepas heterocigotas *MTLa/alfa*. La cepa homocigota presentaba gran capacidad de filamentación y de formación de biocapa. Xie et al (2012), describen las formas filamentosas como la mejor fase inicial para la penetración celular, y proponen una posterior inhibición de la filamentación con un incremento de la expresión de genes que facilitarían la formación de células opaque, o células conjugativas.

**C. glabrata** es una especie con una incidencia muy variable dependiendo del país e incluso con gran variación entre hospitales. El porcentaje de aislamientos en este estudio (14,3%), detrás de *C. albicans* (28,6%) y *C. parapsilosis* (25%), coincide con los datos del estudio multicéntrico realizado en España por Puig-Asensio et al (2014), durante 2010 y 2011.

Se aísla con mayor frecuencia en personas mayores, y en muy pocos casos en jóvenes o niños. La media de edad de los pacientes con

### Discusión

aislamiento de *C. glabrata* en nuestro estudio es de  $53,7 \pm 28,1$ . En otros estudios hablan de una media de  $71,5 \pm 12,4$  años (Malani et al, 2011). En nuestro trabajo encontramos 6 aislamientos en adultos, 3 de ellos mayores de 70 años y una cepa aislada de un niño, que en un grupo reducido hace que se desplace la media. Nosotros obtenemos una mayor frecuencia en mujeres (71,4% mujeres vs. 28,6% varones), lo que coincide con un trabajo de Segireddy et al (2011) que encuentran 69,2% en mujeres vs. 30,8% en varones.

Algunos autores describen el origen de la infección nosocomial por *C. glabrata* principalmente en el uso de material contaminado, responsable de la colonización exógena, en mayor grado que la transmisión por las manos del personal sanitario, más frecuente en *C. parapsilosis* complex (Vazquez et al, 1998).

Es una especie con resistencia a fluconazol (EUCAST). Nuestras cepas tienen una CMI 50 de 16 mg/L y una CMI90 de 128 mg/L, por lo que es imprescindible buscar alternativas en el tratamiento.

*C. glabrata* se caracterizó por su gran capacidad de adherencia y por no ser formadora de biofilm. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Tournu & Van Dijck (2012) al estudiar el biofilm de diferentes especies de *Candida*, encontrando que *C. glabrata*, junto *C. krusei* son dos especies poco competentes en la formación de biofilm.

*C. krusei* es una especie responsables de candidemia fundamentalmente en pacientes hematológicos. En este trabajo *C. krusei* fue aislada en los hemocultivos de pacientes hematológicos, dos de ellos

con leucemia mieloide aguda (LMA). Esta característica se recoge en numerosos trabajos que sugieren la utilización de profilaxis con fluconazol, al ser intrínsecamente resistente al mismo, el motivo del predominio de esta especie en estos pacientes. Conen et al (2008) describen que 3 de los 4 casos con aislamiento de *C. krusei*, tenían como patología de base LMA e indican la buena respuesta al tratamiento con caspofungina.

Las cepas aisladas eran muy hidrofóbicas aunque poco adherentes y no eran formadoras de biofilm; no presentaban actividad enzimática extracelular. Los tres pacientes evolucionaron favorablemente del episodio de candidemia.

*C. lusitaniae* es una levadura que se aísla en raras ocasiones como agente etiológico de candidiasis (Miller y cols, 2006). Es responsable principalmente de casos de fungemia aunque también se ha aislado en otras localizaciones. *C. lusitaniae*, es una especie que de manera esporádica, puede ser responsable de candidemias en neonatos (Favela et al, 2003). Presenta buena sensibilidad a los antifúngicos y poca virulencia, aunque su importancia clínica radica en su capacidad para desarrollar resistencia durante el tratamiento (Miller et al, 2006).

Se confirma su capacidad de switching fenotípico, con una frecuencia aproximada de  $10^{-1}$ . Este mecanismo permite su adaptación a cambios ambientales a través de la expresión selectiva de genes. Esto

### *Discusión*

podría explicar, como en otras especies, su capacidad para desarrollar resistencia en el transcurso del tratamiento.

En general en este estudio se evidencia la importante repercusión de las candidemias, con una alta tasa de mortalidad, atribuible en muchas ocasiones a la enfermedad de base asociada, aunque también con una importante relación respecto a la especie aislada. Se obtiene una gran diferencia en cuanto a la presencia de factores de virulencia y sensibilidad a antifúngicos en relación con la especie aislada, presentando las especies con mayor tasa de mortalidad relativa, una mayor capacidad de formación de biofilm. Es por lo tanto de gran importancia la identificación de especie para un correcto tratamiento de la candidemia.

## **CONCLUSIONES**

## *Conclusiones*

El estudio etioepidemiológico de las candidemias y de factores de patogenicidad que puedan contribuir al establecimiento de una candidiasis, en las especies de *Candida* aisladas de hemocultivos, ha permitido elaborar las siguientes conclusiones:

1. Se diagnosticaron 52 pacientes con candidemia, falleciendo 16 de ellos. La mayoría de los fallecimientos se produjeron en candidemias por *C. albicans* y *C. tropicalis*, especie con mayor tasa de mortalidad relativa.
2. *C. albicans* es la especie más frecuentemente aislada, aunque las especies de *Candida* no-*albicans* presentaron globalmente una mayor incidencia.
3. Entre los factores de riesgo predisponentes destaca la presencia de catéter y el tratamiento antibiótico previo en el 100% de los casos.
4. Las especies aisladas poseen buena sensibilidad a antifúngicos, no encontrándose cepas resistentes, con excepción de *C. krusei*. El perfil de las candidemias por *C. krusei* eran pacientes hematológicos en los que se había utilizado fluconazol como profilaxis.
5. Existe una gran variabilidad, relacionada con la especie, respecto a la presencia de los factores de patogenicidad estudiados:
  - a. *C. albicans* es una especie poco hidrofóbica y poco adherente pero muy formadora de biofilm, siendo la especie con mayor actividad enzimática.
  - b. *C. tropicalis* es hidrofóbica y adherente, siendo con *C. albicans*, ambas con capacidad de filamentación, las especies más formadoras de

### Conclusiones

- biofilm. Su actividad enzimática es de nivel medio.
- c. *C. parapsilosis* sensu stricto es más hidrofóbica, adherente, formadora de biocapa y con mayor actividad enzimática que *C. orthopsilosis*.
  - d. *C. glabrata* y *C. krusei* son hidrofóbicas y adherentes pero no formadoras de biofilm, ni tienen actividad aspartil proteasa.
6. La diferenciación de las especies de *C. grupo-psilosis* es necesaria. Características epidemiológicas hasta ahora atribuidas a *C. parapsilosis* pueden ser desplazadas hacia *C. orthopsilosis*:
- a. Las candidemias por *C. orthopsilosis* provenían el 50 % de neonatos y el 100% recibían nutrición parenteral.
  - b. En *C. parapsilosis* sensu stricto el 23% eran neonatos y el 46.1% recibían nutrición parenteral.
7. La valoración de la HSC es un método simple, reproducible y con capacidad discriminatoria entre *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis*.
8. Se produce una sobreexpresión tres veces mayor del gen *ALS* (Agglutinin-Like Sequence) en células sesiles del biofilm que en las células planctónicas de *C. albicans* y de *C. tropicalis*.
9. El locus *MTL* (Mating-Type Locus) de los aislados clínicos de *C. albicans* y *C. tropicalis*, presenta, en la mayoría de las cepas, configuración heterocigota (a/alfa), existiendo también cepas homocigotas (a o alfa), aunque en baja proporción (6,25 y 16,7% respectivamente en cada especie).

*Bibliografía*

**BIBLIOGRAFÍA**

*Bibliografía*

- Aguado JM, Ruiz-Camps I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, Rovira M, Martín-Dávila P, Moreno A, Alvarez-Lerma F, León C, Madero L, Ruiz-Contreras J, Fortún J, Cuenca-Estrella M; Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. 2011; **29**: 345-61
- Al-Fattani y Douglas J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol 2006; **55**: 999-1008
- Almirante B, Cuenca-Estrella M. Candidemia: impacto de los estudios epidemiológicos en la terapéutica y en el pronóstico de una infección grave. Enfer Infecc Microbiol Clin 2011; **29**: 325-7
- Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela JL, Pahissa A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 2006; **44**: 1681-5
- Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 2005; **43**:1829-35
- Bariola JR, Saccente M. *Candida lusitanae* septic arthritis: case report and review of the literature. Diag Microbiol Infect Dis 2008; **61**: 61-3
- Bennet JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. N Engl J Med 2006; **355**: 1154-9
- Bennett RJ. Coming of Age-Sexual Reproduction in *Candida* Species. PLoS Pathogens 2010; **6**: e1001155
- Bishop JA, Chase N, Lee R, Kurtzman CP, Merz WG. Production of white colonies on CHROMagar Candida medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. J Clin Microbiol 2008; **46**: 3498-500
- Blanco MT, Blanco J, Sánchez-Benítez R, Pérez-Giraldo C, Morán FJ, Hurtado C, Gómez-García AC. Incubation temperatures affect

## Bibliografía

- adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity. *Microbios* 1997; **89**: 23-8
- Blanco MT, Cañadas J, García-Martos P, Marín P, García-Tapia A, Rodríguez J. Actividad in vitro de posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol frente a *Candida glabrata*. *Rev Esp Quimioter* 2009; **22**: 139-43
- Blanco MT, Morales JJ, Lucio L, Pérez-Giraldo C, Hurtado C, Gómez-García AC. Modification of adherence to plastic and to human buccal cells of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by a subinhibitory concentration of itraconazole. *Oral Microbiol Immunol* 2006; **21**: 69-72
- Blanco MT, Sacristán B, Beteta A, Fernández-Calderón MC, Hurtado C, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **60**: 129-31
- Blanco-Blanco MT, Gómez-García AC, Hurtado C, Galán-Ladero MA, Lozano MC, García-Tapias A, Blanco MT. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol* 2013; **13**: S1130-406
- Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 588-94
- Borghi E, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT, Morace G. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; **30**: 1437-41
- Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon JY; CandiRed Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* 2008; **34**: 292-9
- Bouza E, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32** Suppl 2: S87-91
- Brion LP, Uko SE, Goldman DL. Risk of resistance associated with fluconazole prophylaxis: systematic review. *J Infect* 2007; **54**: 521-9
- Canton E, Peman J, Gobernado M, Alvarez E, Baquero F, Cisterna R, Gil J, Martín-Mazuelos E, Rubio C, Sánchez-Sousa A, Serrano C. Sensititre YeastOne caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: correlation with results of NCCLS M27-A2 multicenter

- study. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1604–7
- Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinases secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 1987; **156**: 777-83
- Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinámica y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol* 2006; **23**: 39-49
- Chen YC, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; **68**: 284-92
- Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, Yu KW, Fan YH, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2005; **5**: 22
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; **22**: 996-1006
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-S3, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Informational supplement M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA
- Conen A, Weisser M, Jörg CO, Battegay M, Trampuz A, Frei R, Christen S, Heim D, Gratwohl A, Flückiger U. *Candida krusei*, a serious complication in patients with hematological malignancies: successful treatment with caspofungin. *Transpl Infect Dis* 2008; **10**: 66-70
- Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis* 2011; **15**: e759-63
- Davis SL, Vazquez JA, McKinnon PS. Epidemiology, risk factors, and outcomes of *Candida albicans* versus non-*albicans* candidemia in nonneutropenic patients. *Ann Pharmacother* 2007; **41**: 568–73
- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002; **19**:139-43

## Bibliografía

- Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003; **11**: 30-6
- Durán E, Ramírez de Ocariz I, Ventura P, Gil J, Rubio C. Candidemia: *Candida parapsilosis* en una unidad de neonatología. Rev Iberoam Micol 2005; **22**: 64
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis 2003; **3**: 685-702
- EUCAST-AFST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing). EUCAST definitive document EDef 7.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. 2012
- Favel A, Michel-Nguyen A, Peyron F, Martin C, Thomachot L, Detry A, Bouchara JP, Challier S, Noël T, Chastin C, Regli P. Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; **47**: 331-9
- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol 2011; **9**: 109-18
- Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol 2001; **39**: 9-33
- Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Hurtado C, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Gómez-García AC. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. Yeast 2013; **30**: 331-9
- García-Rodríguez J, Cantón E, Pemán J, Alvarez M, Ezpeleta G, Gómez-Nieto A, Iglesias I, Martín-Mazuelos E, Ramírez-de Ocariz I, Rezusta A, Royo-García G; Grupo de Estudio FUNGEMYCA. Incidencia etaria y geográfica y patrón de sensibilidad a los antifúngicos de las especies de *Candida* causantes de candidemia en la población pediátrica española. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013; **31**: 363-8
- Gómez J, García-Vázquez E, Espinosa C, Ruiz J, Canteras M, Hernández-Torres A, Baños V, Herrero JA, Valdés M. Nosocomial candidemia at a general hospital: prognostic factors and impact of early empiric treatment on outcome (2002-2005). Med Clin (Barc) 2010; **134**:17-9

- Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M; Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1506-9
- Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 1172-7
- Guinea J, Peláez T, Recio S, Torres-Narbona M, Bouza E. In vitro antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007 isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1396-400
- Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges SM, Johnson EM, Muller, Putensen EC, Rotstein C, Sganga G, Venditti M, Zaragoza-Crespo R, Kullberg B J. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med* 2009; **35**: 55-62
- Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. 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* 2004; **42**: 1519-27
- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 1994; **62**: 915-21
- Hazen KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and germ tube formation of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1988; **56**: 2521-5
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *Br J Biomed Sci* 2006; **63**: 5-11
- Horasan ES, Ersöz G, Göksu M, Otag F, Kurt AO, Karaçorlu S, Kaya A. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. *Mycopathologia* 2010; **170**: 263-8

## Bibliografía

- Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol* 2001; **18**: 17-22
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; **10**: 85-93
- Jordan I, Hernandez L, Balaguer M, López-Castilla JD, Casanueva L, Shuffelman C, García-Teresa MA, De Carlos JC, Anguita P, Aguilar L; ERICAP study group. *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* invasive infections in the PICU: clinical features, prognosis and mortality. *Rev Esp Quimioter* 2014; **27**: 56-62
- Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002; **50**: 243-60
- Laverdiere M, Labbé AC, Restieri C, Rotstein C, Heyland D, Madger S, Stewart T. Susceptibility patterns of *Candida* species recovered from Canadian intensive care units. *J Crit Care* 2007; **22**: 245-50
- Legrand M, Lephart P, Forche A, Mueller FM, Walsh T, Magee PT, Magee BB. Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Mol Microbiol* 2004; **52**: 1451-62
- Lin D, Wu LC, Rinaldi MG, Lehmann PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1815-21
- Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D, Soll DR. Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 49-61
- Lohse MB, Johnson AD. White-opaque switching in *Candida albicans*. *Current Opin Microbiol* 2009; **12**: 650-4
- Luo G, Lakshman P, Samaranyake LP, Joyce Y, Yau Y. *Candida* species exhibit differential in vitro haemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2971-4
- Magee PT, Magee BB. Through a glass opaquely: the biological significance of mating in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004; **7**: 661-5
- Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a haemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; **62**: 5154-6
- Mensa J, Gatell J, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E, Marco F.

- Guía de terapéutica antimicrobiana 2014. 24 ed. Ed Antares, Madrid, España
- Miller NS, Dick JD, Merz W. Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: association with amphotericin B resistance and filamentation. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1536-9
- Miller MG1, Johnson AD. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 2002; **110**: 293-302
- Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol* 2010; **59**: 414-20
- Moreira-Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber AZ, Moretti ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; **24**: 721-6
- Nailis H, Kucharíková S, Rídicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol* 2010; **10**:114. doi: 10.1186/1471-2180-10-114
- Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski T, Azeredo J, Oliveira R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathol* 2010; **169**: 175-82
- Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 2006; **5**: 1604-10
- Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, Mitchell AP. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* 2008; **18**: 1017-24
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, Filler SG, Fisher JF, Kulhberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503-35

## Bibliografía

- Park YN, Daniels KJ, Pujol C, Srikantha T, Soll DR. *Candida albicans* forms a specialized "sexual" as well as "pathogenic" biofilm. *Eukaryot Cell* 2013; **12**: 1120-31
- Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, Pérez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Roselló EM, Gómez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porrás A, Yagüe G; FUNGEMYCA Study Group. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1181-7
- Pemán J, Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; **31**: 328-41
- Pereira GH, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. *Med Mycol* 2010; **48**: 839-42
- Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 2007; **45**: 321-46
- Perumal P, Mekala S, Chaffin WL. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; **51**: 2454-63
- Pfaller MA, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **74**: 323-31
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Jones RN, Turnidge J, Diekema DJ. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the echinocandins and *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 52-6
- Pfaller MA, Diekema DJ; International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 11-23
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, Finkelievich J, Barnes R, Wadula J; Global Antifungal Surveillance Group. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the

- ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 842-9
- Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5848-59
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; **35**: 19-25
- Porman AM, Alby K, Hirakawa MP, Bennett RJ. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 21158-63
- Porman AM, Hirakawa MP, Jones SK, Wang N, Bennett RJ. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. *PLoS Genet.* 2013; 9 :e1003369. doi: 10.1371/ journal.pgen.1003369
- Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, Montejo M, Muñoz P, Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M, Almirante B; The CANDIPOP Project; GEIH-GEMICOMED (SEIMC); REIPI. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 0245-54
- Pujol M, Limón E. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; **31**: 108-13
- Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. Actividad de micafungina en biofilms de *Candida*. *Rev Iberoam Micol* 2009; **26**:49-55
- Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001; **18**: 163-170.
- Ramírez-Zavala B, Reuss O, Park YN, Ohlsen K, Morschhäuser J. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida*

## Bibliografía

- albicans*. PLoS Pathog 2008; **4**: e1000089. doi: 10.1371/journal.ppat.1000089
- Reissa E, Lasker BA, Iqbal NJ, James M, Arthington-Skaggs BA. Molecular epidemiology of *Candida parapsilosis* sepsis from outbreak investigations in neonatal intensive care units. Infect Genet Evol 2008; **8**: 103-9
- Richie DL, Ghannoum MA, Isham N, Thompson KV, Ryder NS. Nonspecific effect of Mycograb on amphotericin B MIC. Antimicrob Agents Chemother 2012; **56**: 3963-4
- Rodríguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F, Gene A, Xercavins M, Fontanals D, Rodríguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. Pediatr Infect Dis J 2006; **25**: 224-9
- Rodríguez-Tudela JL, Cuesta I, Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M. Técnicas moleculares en Micología. Enfer Infecc Microb Clin 2008a; 26 Suppl **13**: 47-53
- Rodríguez-Tudela JL, Donnelly JP, Arendrup MC, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning Fegeler D, Gaustad WP, Klimko N, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Schmalreck A, Stenderup J, Velegraki A, Verweij P. EUCAST technical note on fluconazole. Clin Microbiol Infect 2008b; **14**: 193-5
- Rosa EA, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, José da Silva W, Yau JY, Samaranayake LP. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. J Med Microbiol 2008; **57**:1277-81
- Rosenberg, M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 1980; **9**: 29-33
- Ruan SY, Chu CC, Hsueh PR. In vitro susceptibilities of invasive isolates of *Candida* species: rapid increase in rates of fluconazole susceptible-dose dependent *Candida glabrata* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2008; **52**: 2919-22
- Rueping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA. Invasive candidiasis and candidemia: from current opinions to future perspectives. Expert Opin Investig Drugs 2009; **18**: 735-48
- Rustad TR, Stevens DA, Pfaller MA, White TC. Homozygosity at the *Candida albicans* *MTL* locus associated with azole resistance. Microbiology 2002; **148**: 1061-72

- Sacristán B, Correa J, Galán MA, Blanco MT, Gómez-García AC. Sensibilidad a fluconazol de cepas de *Candida albicans* aisladas de broncoaspirados: Relación con la capacidad de switching, y con la configuración del locus MTL. XIII Congreso de la SEIMC. Madrid, 2008
- Salavert M, Jarque I, Pemán J. Aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clínico-terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; **24**: 36-45
- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 668-79
- Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2009; **47**:2392-7
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; **36**: 288-305
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 1987; **169**: 189-97
- Soll DR. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *J Oral Microbiol* 2014; **6**: 22993-  
doi: 10.3402/jom.v6.22993
- Soll DR, Lockhart SR, Zhao R. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 390-7
- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST - EUCAST). EUCAST technical note on voriconazole. *Clin Microbiol Infec* 2008; **14**: 985-7
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups I and III. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 284-92
- Tavanti A, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J Clin Microbiol*

*Bibliografía*

- 2007; **45**: 1455-62
- Tay ST, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 185-91
- Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 627-30
- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuck JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; **21**: 606-25
- Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, Bouchara JP. Adherence mechanism in human pathogenic fungi. *Med Mycol* 2008; **46**: 749-72
- van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia* 2007; **164**: 287-93
- Vazquez J, Dembry LM; Sanchez V, Vazquez MA, Sobel JD, Dmuchowski C, Zervos MJ. Nosocomial *Candida glabrata* colonization, *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 421-6
- Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Pontón J, Quindós G, Auki S, Ito-Kuwa S. Adherent of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to bucal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol* 2003; **20**: 52-4
- Whiteway M. Yeast Mating: Putting Some Fizz into Fungal Sex? *Current Biol* 2009; **19**: R258-60
- Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for byotyping *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1986; **24**: 415-7
- Wisplinghoff H, Ebberts J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: Species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **43**: 78-81
- Xie J, Du H, Guan G, Tong Y, Kourkoumpetis TK, Zhang L, Bai FY, Huang G. N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. *Eukaryotic cell* 2012; **11**: 773-82
- Yang Y-L. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; **36**: 223-8
- Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Lu KL, Srikantha T, Huang G, Garnaas AM, Soll DR. Alternative mating type configurations (a/α versus a/a or α/α)

*Bibliografia*

of *Candida albicans* result in alternative biofilms regulated by different pathways. PLoS Biol. 2011; 9:e1001117

## *Bibliografía*

## **PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL**

### **1. PUBLICACIONES**

Blanco M, Cañadas J, García-Martos P, Marín P, García-Tapia A, Rodríguez J. Actividad *in vitro* de posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol frente a *Candida glabrata*. Rev Esp Quimioter 2009; **22**: 139-43

Blanco MT, García-Martos P, García-Tapia A, Fernández C, Navarro J, Guerrero F. Fungemia por *Candida lipolytica*: a propósito de dos casos. Rev Iberoam Micol 2009; **26**: 211-2

Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Hurtado C, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Gomez-Garcia AC. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. Yeast 2013; **30**: 331-9

Blanco-Blanco MT, Gómez-García AC, Hurtado C, Galán-Ladero MA, Lozano MC, García-Tapia A, Blanco MT. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital. Rev Iberoam Micol 2013; **13**: S1130-1406 doi: 10.1016/j.riam.2013.04.001.

### **2. COMUNICACIONES A CONGRESOS**

#### **2.1. Congresos Nacionales**

Blanco Blanco MT, Lozano Domínguez MC, Marín Casanova P, Popa Popa I, García Tapia A. Fungemias por *Candida parapsilosis* en el Hospital Puerta del Mar de Cádiz en los últimos doce meses. Estudio comparativo con un periodo similar hace diez años. IX Congreso Nacional Micología. Córdoba, 17 al 19 de Septiembre 2008

García Tapia A, Blanco Blanco MT, Popa Popa I, Gil de Sola F, Marín Casanova P, García Martos P. Candidemias en los últimos 8 años en el Hospital Universitario Puerta del Mar: Incidencia, evolución y distribución de las especies. IX Congreso Nacional Micología. Córdoba, 17 al 19 de Septiembre 2008.

## Bibliografía

- Lozano Domínguez MC, Blanco Blanco MT, Martín Torrejón MI, Marín Casanova P, Fernández Gutierrez del Alamo C, García-Tapia A. Valor de la detección de anticuerpos frente el micelio de *Candida albicans* en el diagnóstico de candidiasis invasora. IX Congreso Nacional Micología. Córdoba, 17 al 19 de Septiembre 2008.
- Popa I, Blanco MT, García-Tapia A, Marín P, García-Martos P. Infección de LCR en pacientes con derivación: Características microbiológicas. IX Congreso Nacional Micología. Córdoba, 17 al 19 de Septiembre 2008.
- Blanco-Blanco MT, García-Tapia A, lozano Domínguez MC, Marín Casanova P, García-Martos P, Gómez-García AC. Estudio de resistencia y de factores de patogenicidad de *Candida krusei* aislada en hemocultivos de pacientes oncohematológicos. *Enf Inf Microbiol Clin* 2009; 27: 211.
- Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Negri M, Blanco J, Blanco MT, Oliveira R, Gómez-García AC. Formación de biocapa por cepas de *Candida tropicalis* responsables de candiduria en catéteres Foley incubadas con orina artificial. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Málaga, 1-4 de junio 2011.
- Blanco-Blanco MT, Galán-Ladero MA, Delgado M, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Expresión del gen ALS-1 por *Candida tropicalis* aisladas de hemocultivos, en células sesiles de la biocapa y en células planctónicas. XI Congreso de Micología. Cádiz 20-22 Septiembre 2012.
- Blanco-Blanco MT, Galán-Ladero MA, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Gómez-García AC. Hidrofobicidad de la superficie celular como prueba diferencial de *Candida parapsilosis* y *Candida orthopsilosis*. XI Congreso de Micología. Cádiz 20-22 Septiembre 2012.

## 2.2. Congresos Internacionales

- Blanco-Blanco MT, Fernández-Calderón MC, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Efecto de la clorhexidina y cloruro de benzalconio sobre la formación de biocapa en especies de *Cándida*. *Rev Esp Quimioter* 2007; 20:115. IX Congreso Nacional de la SEQ y I Congreso Internacional de la Sociedad Iberoamericana de Infectología (SIAI). Salamanca 2007.
- Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Delgado M, Pérez-Giraldo C, Blanco MT, Gómez-García AC. Farnesol effect on cell surface hydrophobicity, mycelium formation and biofilm development in *Candida albicans*. Congreso Internacional EUROBIOFILMS 2009. Roma, 2-5 Septiembre 2009.
- Blanco-Blanco MT, Hurtado C, Lucio L, Galán-Ladero MA, , Delgado M, Blanco J, Gómez-García AC. Effect of farnesol and voriconazole on *Candida albicans*

- biofilm formation. Biofilms in Nosocomial Fungal Infections. Congreso Internacional. París, France 31-1/02/2011
- Galán-Ladero MA, Beteta-López A, Blanco-Blanco MT, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Blanco MT. Biofilm-forming ability of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients with candiduria. Biofilms in nosocomial fungal infections. París, 31 Enero-1 Febrero 2011.
- Blanco-Blanco MT, Galán-Ladero MA, Blanco MT, Lucio L, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Biofilm production, adherence capacity, cellular surface hydrophobicity and secreted aspartyl-protease activity of different species of the genus *Candida* isolated from hemocultures. 24th European Congress of Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona 10-13 Mayo 2014.
- Blanco-Blanco MT, Galán MA, Fernández-Calderón MC, Delgado M, Blanco MT, Gómez-García AC. *Candida tropicalis* fungemia. Virulence factors and *MTL* configuration of the strains. 24th European Congress of Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona 10-13 Mayo 2014.
- Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Blanco MT, Beteta A, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. Relation between biofilm formation and *mtl* genes in *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. 24th European Congress of Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona 10-13 Mayo 2014.

*Bibliografía*